

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 915**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2008 PCT/US2008/009771**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2009 WO09023265**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 08827411 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2188311**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal 175 direccionado al receptor de EGF y derivados y usos del mismo**

30 Prioridad:

14.08.2007 US 964692 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOHNS, TERRANCE, GRANT;
SCOTT, ANDREW, MARK;
BURGESS, ANTONY, WILKS y
OLD, LLYOD, J.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 609 915 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

Anticuerpo monoclonal 175 direccionado al receptor de EGF y derivados y usos del mismo.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos, particularmente el anticuerpo 175, y fragmentos del mismo, que se fijan al receptor de EGF, particularmente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) amplificado o sobreexpresado y a la truncación EGFR de2-7 del EGFR. Estos anticuerpos son útiles en la diagnosis y el
10 tratamiento del cáncer. Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse también en terapia en combinación con agentes quimioterapéuticos o anti-cáncer y/o con otros anticuerpos o fragmentos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El tratamiento de una enfermedad proliferativa, particularmente cáncer, por medios quimioterapéuticos está basado a menudo en el aprovechamiento de las diferencias en células proliferantes diana y otras células normales en el cuerpo humano o animal. Por ejemplo, muchos agentes químicos están diseñados para ser absorbidos por replicación rápida del DNA a fin de que el proceso de replicación del DNA y la división celular se interrumpa. Otro enfoque consiste en identificar antígenos en la superficie de células tumorales u otras células anormales que no se
20 expresan normalmente en el tejido humano desarrollado, tales como antígenos tumorales o antígenos embrionarios. Dichos antígenos pueden estar direccionados con proteínas de fijación tales como anticuerpos que pueden bloquear o neutralizar el antígeno. Adicionalmente, las proteínas de fijación, que incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, pueden suministrar un agente tóxico u otra sustancia que es capaz de activar directa o indirectamente un agente tóxico en el sitio de un tumor.

25 El EGFR es una diana atractiva para terapia con anticuerpos direccionados a tumores, debido a que se sobreexpresa en muchos tipos de tumores epiteliales (Voldborg, B. R., et al. (1997) Ann Oncol 8:1197-206; den Eynde, B. y Scott, A. M. (1998) Tumor Antigens. En: P. J. Delves y I. M. Roitt (eds.), Encyclopedia of Immunology, Segunda Edición, pp. 2424-31. Londres: Academic Press). Además, la expresión del EGFR está asociada con una mala prognosis en numerosos tipos de tumor que incluyen estómago, colon, vejiga urinaria, mama, próstata, endometrio, riñón y cerebro (v.g., glioma). Como consecuencia, se han publicado en la bibliografía numerosos anticuerpos de EGFR, estando sometidos varios de ellos a evaluación clínica (Baselga, J., et al. (2000) J Clin Oncol. 18: 904; Faillot, T., et al. (1996) Neurosurgery 39: 478-83; Seymour, L. (1999) Cancer Treat Rev 25: 301-12). Los resultados de estudios de utilización de mAbs de EGFR en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, cáncer de
30 pulmón de células escamosas, gliomas cerebrales y astrocitomas malignos han sido alentadores. La actividad anti-tumor de la mayoría de los anticuerpos EGFR se mejora por su capacidad para bloquear la fijación de ligandos (Sturgis, E. M., et al. (1994) Otolaryngol Head Neck Surg 111: 633-43; Goldstein, N. I., et al. (1995) Clin Cancer Res 1: 1311-8). Tales anticuerpos pueden mediar su eficacia por modulación de la proliferación celular y las funciones inmunes dependientes de anticuerpos (v.g. activación del complemento). El uso de estos anticuerpos, sin embargo,
40 puede estar limitado por la absorción en órganos que tienen niveles endógenos altos de EGFR tales como el hígado y la piel (Baselga, J., et al. (2000) J Clin Oncol. 18: 904; Faillot, T., et al. (1996) Neurosurgery 39: 478-83).

Una proporción significativa de tumores que contienen amplificaciones del gen EGFR (es decir, copias múltiples del gen EGFR) co-expresan también una versión truncada del receptor (Wikstrand, C. J., et al. (1998) *J Neurovirol* 4: 148-58) conocida como EGFR de2-7, ΔEGFR, o Δ2-7 (términos utilizados intercambiamente en esta memoria) (Olapade-Olaopa, E. O., et al. (2000) *Br J Cancer* 82: 186-94). La transposición observada en el EGFR de2-7 da como resultado un mRNA maduro en entramado que carece de 801 nucleótidos que abarcan los exones 2-7 (Wong, A. J., et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2965-9; Yamazaki, H., et al. (1990) *Jpn J Cancer Res* 81: 773-9; Yamazaki, H., et al. (1998) *Mol Cell Biol* 8: 1816-20; Sugawa, N., et al. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8602-6). La proteína EGFR correspondiente tiene una delección de 267 aminoácidos que comprenden los residuos 6-273 del dominio extracelular y un nuevo residuo glicina en la juntura de fusión (Sugawa, N., et al. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8602-6). Esta delección, junto con la inserción de un residuo glicina, produce un péptido juntural singular en la interfaz de la delección. El EGFR de2-7 ha sido consignado en cierto número de tipos de tumor que incluyen glioma, mama, pulmón, ovario y próstata (Wikstrand, C. J., et al. (1997) *Cancer Res* 57: 4130-40; Olapade-Olaopa, E. O., et al. (2000) *Br J Cancer* 82: 186-94; Wikstrand, C. J., et al. (1995) *Cancer Res* 55: 3140-8; Garcia de Palazzo, I. E., et al. (1993) *Cancer Res* 53: 3217-20). Si bien este receptor truncado no fija ligando alguno, posee actividad constitutiva baja e imparte una ventaja de crecimiento significativa a las células de glioma que crecen como xenoinjertos tumorales en los ratones lampiños (Nishikawa, R., et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7727-31, 1994.) y es capaz de transformar las células NIH3T3 y las células MCF-7 (Batra, S. K., et al. (1995) *Cell Growth Differ* 6: 1251-9). Los mecanismos celulares utilizados por el EGFR de2-7 en las células de glioma no están totalmente definidos, pero se ha informado que incluyen una disminución en la apoptosis y un pequeño aumento de proliferación (Nagane, M., et al. (1996) *Cancer Res* 56: 5079-86).

Dado que la expresión de este receptor truncado está restringida a las células tumorales, la misma representa una diana muy específica para la terapia de anticuerpos. De acuerdo con ello, varios laboratorios han comunicado la generación de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales específicos para el péptido singular del EGFR de2-7 (Wikstrand, C. J., et al (1998) *J Neurovirol* 4: 148-58; Humfrey, P. A., et al (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4207-11; Okamoto, S., et al (1996) *Br J Cancer* 73: 1366-72; Hills, D., et al (1995) *Int J Cancer* 63: 537-43). Una serie de mAbs de ratón, aislados después de inmunización con el péptido singular de2-7, exhibían todos ellos selectividad y especificidad para el receptor truncado y estaban direccionados a xenoinjertos EGFR de2-7 positivos desarrollados en ratones lampiños (Wikstrand, C. J., et al (1995) *Cancer Res* 55: 3140-8; Reist, C. J., et al (1997) *Cancer Res* 57: 1510-5; Reist, C. J., et al (1995) *Cancer Res* 55: 4375-82)..

Sin embargo, un posible inconveniente de los anticuerpos EGFR de2-7 es que sólo una proporción de tumores que exhiben amplificación del gen EGFR expresa también el EGFR de2-7. Por tanto, sería de esperar que los anticuerpos específicos EGFR de2-7 fuesen útiles sólo en cierto porcentaje de tumores EGFR-positivos. Así, si bien la evidencia existente de actividad de los anticuerpos EGFR es alentadora, persisten las limitaciones observadas en cuanto a la gama de aplicabilidad y eficacia arriba reflejadas. De acuerdo con ello, sería deseable disponer de anticuerpos y agentes análogos que demuestren eficacia con una amplia gama de tumores, y es hacia la consecución de dicho objetivo a lo que está dirigida la presente invención. Además, anticuerpos que no estén direccionados a los tejidos normales y al EGFR en ausencia de amplificación, sobreexpresión, o mutación, serían particularmente útiles. Un anticuerpo de este tipo, el anticuerpo monoclonal mAb806, ha sido descrito previamente en WO02092771 y WO05081854. Tales anticuerpos adicionales son necesarios y serían deseables.

La citación de referencias en esta memoria no debe interpretarse como admisión de que ello constituya técnica anterior a la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 Los anticuerpos de la presente invención, anticuerpo 175 y fragmentos del mismo o anticuerpos monómeros, recombinantes, o híbridos derivados de los mismos, reconocen un epítipo de EGFR que se encuentra en células tumorígenas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable en células normales o tipo salvaje. Los anticuerpos de la presente invención se ilustran adicionalmente por el anticuerpo mAb175 descrito en esta memoria.

10 Esta invención describe un anticuerpo direccionado al mismo epítipo del receptor de EGF que el anticuerpo monoclonal (mAb) 806 descrito previamente (descrito en WO02092771 y WO05081854). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), los aminoácidos más importantes para fijación de antígeno, de mAb175 son altamente homólogas al anticuerpo 806, con sólo un pequeño número de diferencias de aminoácidos.

15 La fijación de un anticuerpo a su antígeno diana está mediada por las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de sus cadenas pesada y ligera, existiendo tres regiones CDR, a saber CDR1, CDR2, y CDR3. De acuerdo con ello, los anticuerpos basados en las regiones CDR de mAb175 serán anticuerpos útiles para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, con inclusión de la terapia *in vivo*. Los anticuerpos que están basados en
20 las CDRs del anticuerpo mAb175 identificado serán útiles para direccionamiento de tumores con EGFR amplificado con indiferencia de su estatus de EGFR de2-7. Dado que mAb175 no se fija significativamente al receptor normal tipo salvaje, no existiría una absorción significativa en el tejido normal, una limitación de los anticuerpos EGFR que están siendo desarrollados actualmente.

25 Las secuencias del anticuerpo monoclonal 175, direccionadas al receptor de EGF, han sido determinadas y las regiones CDR del anticuerpo tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la Figura 1. Las CDRs para cada una de la cadena ligera y la cadena pesada se proporcionan en esta memoria. Las CDRs de la cadena ligera de Ab175 corresponden a CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) y CDR3 (SEQ ID NO: 3). Las CDRs de la cadena pesada de Ab175 corresponden a CDR1 (SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 5) y CDR3 (SEQ ID NO: 6).

30 Análogamente al anticuerpo 806, los anticuerpos 175 de la invención reconocen también EGFR amplificado tipo salvaje y el EGFR de2-7, pero se fijan a un epítipo distinto del péptido juntural singular de la mutación EGFR de2-7 (péptido juntural LEEKKGNVVTDH (SEQ ID NO:13). MAb175 se fija a la superficie de las células A431, que tienen una amplificación del gen EGFR pero no expresan el EGFR de2-7. Es importante que mAb175, al igual que
35 mAb806, no se fija significativamente a tejidos normales tales como hígado y piel, que expresan niveles de EGFR endógeno tipo salvaje (wt), pero en los cuales EGFR no está expresado o amplificado de modo aberrante.

Si bien tiene características muy similares a mAb806 en lo que respecta a la fijación de epítipo, tinción inmunohistoquímica etc., mAb175 exhibe de hecho una potencia mayor que mAb806 en el tratamiento de los
40 xenoinjertos de glioma humano que expresan el receptor de EGF de2-7. La presente invención y realizaciones de la misma se expresan en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo como se define en la reivindicación 1.

En una realización preferida, los dominios de fijación están transportados por un entramado de anticuerpo humano.

5 En aspectos adicionales, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo como se ha definido arriba, y métodos de preparación de anticuerpos de la invención que comprenden expresar dichos ácidos nucleicos en condiciones que llevan a cabo la expresión de dicho miembro de fijación y recuperar el miembro de fijación.

10 Otro aspecto adicional de la invención son composiciones de tales anticuerpos con anticuerpos adicionales, tales como anticuerpos que se fijan a EGFR, inhibiendo preferiblemente la fijación de ligandos al mismo. Tales composiciones pueden ser cócteles, kits o análogos "one pot", formulados preferiblemente para facilidad de administración.

15 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la invención pueden estar destinados a uso en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento de un tumor en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención.

La presente invención se refiere también a una molécula o gen clonado de DNA recombinante, o una variante degenerada del mismo, que codifica un anticuerpo de la presente invención; preferiblemente una molécula de ácido nucleico en particular una molécula o gen clonado de DNA recombinante que codifica los dominios CDR 1, 2, y 3 VH del anticuerpo representados en la Figura 1 (SEQ ID NOS: 4-6). En otra realización, la presente invención se refiere también a una molécula o gen clonado de DNA recombinante, o una variante degenerada del mismo, preferiblemente una molécula de ácido nucleico, en particular una molécula de DNA recombinante de o gen clonado, que codifica los dominios CDR 1, 2, y 3 VL del anticuerpo representados en la Figura 1 (SEQ ID NOS: 1-3).

20
25

En una realización adicional de la invención, la secuencia completa de DNA de la molécula o gen clonado de DNA recombinante que codifica las secuencias proporcionadas en esta memoria puede estar enlazada operativamente a una secuencia de control de la expresión que puede estar introducida en un hospedador apropiado. La invención se extiende de acuerdo con ello a hospedadores unicelulares transformados con el gen clonado o la molécula de DNA recombinante que comprende una secuencia de DNA que codifica las CDRs VH y/o VL presentes, o porciones de las mismas, del anticuerpo, y más particularmente, una secuencia de DNA que codifica las CDRs VH y/o VL indicadas anteriormente y en la Figura 1 y en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

30

35 La presente invención contempla naturalmente varios medios para preparación de los anticuerpos y fragmentos activos de los mismos, que incluyen, como se ilustra en esta memoria, técnicas recombinantes conocidas, y la invención se propone, de acuerdo con ello, abarcar tales preparaciones de anticuerpos sintéticas o químicas dentro de su alcance. El aislamiento de las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos descritas en esta memoria facilita la reproducción del anticuerpo de la presente invención por tales técnicas recombinantes, y de acuerdo con ello, la invención se extiende a vectores de expresión preparados para expresión en sistemas hospedadores por técnicas de DNA recombinante, y a los hospedadores transformados resultantes.

40

La utilidad diagnóstica de la presente invención se extiende al uso de los anticuerpos de la presente invención en ensayos para caracterizar tumores o muestras celulares o para investigar tumores o cáncer, con inclusión de ensayos diagnósticos *in vitro*. En un inmunoensayo, una cantidad de control de los anticuerpos, o análogos puede prepararse y marcarse con una enzima, una pareja de fijación específica y/o un elemento radiactivo, y puede introducirse luego en una muestra de células. Después que el material marcado o su o sus parejas de fijación han tenido una oportunidad de reaccionar con sitios existentes en la muestra, la masa resultante puede examinarse por técnicas conocidas, que pueden variar con la naturaleza de la marca fijada.

Los anticuerpos de la invención pueden llevar un marcador detectable o funcional. Los miembros de fijación específica pueden llevar un marcador radiactivo, tal como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc y ^{186}Re . Cuando se utilizan marcadores radiactivos, pueden emplearse procedimientos de conteo conocidos disponibles actualmente para identificar y cuantificar los anticuerpos. En el caso de que el marcador sea una enzima, la detección puede realizarse por cualquiera de los métodos colorimétricos, espectrofotométricos, amperométricos o gasométricos conocidos en la técnica utilizados actualmente.

Los anticuerpos radiomarcados y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas diagnósticas *in vitro* y en técnicas de obtención de radioimágenes *in vivo*. Los anticuerpos radiomarcados y fragmentos de los mismos, en particular radioinmunoconjugados, son útiles en radioimmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para terapia del cáncer. Los anticuerpos radiomarcados y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de cirugía radioinmuno-guiadas, en las cuales aquéllos pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células de cáncer, células precancerosas, células tumorales, y células hiperproliferativas, antes de, durante o después de la cirugía para eliminar tales células.

Los inmunoconjugados o proteínas de fusión de anticuerpos de la presente invención, en los cuales los anticuerpos y fragmentos de los mismos, de la presente invención están conjugados o fijados a otras moléculas o agentes incluyen además, pero sin carácter limitante, miembros de fijación conjugados a un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citocina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o fármaco.

La descripción incluye un sistema de ensayo que puede prepararse en la forma de un kit de test para el análisis cuantitativo de la extensión de la presencia de, por ejemplo, EGFR amplificado o EGFR de2-7. El sistema o kit de test puede comprender un componente marcado preparado por una de las técnicas radiactivas y/o enzimáticas expuestas en esta memoria, acoplado un marcador al anticuerpo, y uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales, al menos uno de los cuales es un componente libre o inmovilizado a determinar o su(s) pareja(s) de fijación.

En una realización adicional, la descripción se refiere a ciertos métodos terapéuticos que podrían estar basados en la actividad del anticuerpo, o fragmentos activos del mismo, o en agentes u otros fármacos determinados que posean la misma actividad. Un primer método terapéutico está asociado con la prevención o tratamiento del cáncer, incluyendo pero sin carácter limitante cáncer de cabeza y cuello, mama, próstata y glioma.

En particular, los anticuerpos de la presente invención, y en una realización particular el anticuerpo 175 cuyas

secuencias de regiones de dominio CDR se presentan en la Figura 1 y en las SEQ ID NOs 1-6 de esta memoria, o fragmentos activos de las mismas, y anticuerpos quiméricos (biespecíficos) o sintéticos derivados de ellas pueden prepararse en composiciones farmacéuticas, que incluyen un vehículo, portador o diluyente adecuado, para administración en casos en que la terapia sea apropiada, tales como para tratar un cáncer. Tales composiciones farmacéuticas pueden incluir también métodos de modulación de la semi-vida de los anticuerpos o fragmentos por métodos conocidos en la práctica, tales como pegilación. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender además anticuerpos o agentes terapéuticos adicionales.

Así pues, una composición de la presente invención puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, terapias o agentes, simultánea o sucesivamente dependiendo de la condición a tratar. Adicionalmente, la presente invención contempla e incluye composiciones que comprenden el anticuerpo o fragmento del mismo, descrito en esta memoria, y otros agentes o terapéuticos tales como agentes o terapéuticos anti-cáncer, agentes o anticuerpos anti-EGFR, o inmunomoduladores. Más generalmente, estos agentes anti-cáncer pueden ser inhibidores de tirosina-quinasa o inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores posteriores a la traducción, inhibidores del crecimiento o división celular (v.g. anti-mitóticos), inhibidores de PDGFR o inhibidores de transducción de señales. Otros tratamientos o terapéuticos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos de alivio del dolor tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (v.g. aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o antieméticos. Así, estos agentes pueden ser agentes específicos anti-EGFR, tales como AG1478, o pueden ser agentes anti-cáncer y anti-neoplásicos más generales, incluyendo ejemplos no limitantes doxorubicina, carboplatino y cisplatino. Adicionalmente, la composición puede administrarse con inmunomoduladores, tales como interleucinas, factor de necrosis de tumores (TNF) u otros factores de crecimiento, citocinas u hormonas tales como dexametasona que estimulan la respuesta inmune y la reducción o eliminación de células de cáncer o tumores. La composición puede administrarse también con, o puede incluir combinaciones junto con otros anticuerpos anti-EGFR, que incluyen pero sin carácter limitante los anticuerpos anti-EGFR mAb806; anticuerpo 528; 225; SC-03; 108 (ATCC HB9764) Patente U.S. No. 6,217,866; 14E1 (Patente U.S. No. 5,942,602); DH8.3; L8A4; Y10; HuMAX- EGFR (Genmab/Medarex); ICR62; y ABX-EGF (Abgenix).

La presente invención incluye también anticuerpos y fragmentos de los mismos, que están unidos covalentemente a o asociados de otro modo con otras moléculas o agentes. Estas otras moléculas o agentes incluyen, pero sin carácter limitante, moléculas (con inclusión de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo) con características de reconocimiento, toxinas, ligandos, y agentes quimioterapéuticos distintos.

Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la descripción detallada que sigue, que prosigue con referencia a los dibujos ilustrativos siguientes, y las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Alineación de las secuencias de aminoácidos para CDR's de mAb806 y mAb175. Las diferencias de secuencia entre los dos anticuerpos están marcadas en negrita.

Figura 2: Tinción inmunohistoquímica de linajes de células e hígado humano normal con mAb175. **A:** Se utilizó mAb175 biotinilado para teñir secciones preparadas a partir de bloques que contenían células A431 (que sobreexpresan el EGFR tipo salvaje), células U87MG.Δ 2-7 (que expresan el EGFR Δ2-7) y células U87MG (que expresan el EGFR tipo salvaje a niveles moderados). **B:** Tinción de hígado humano normal (400x) con mAb175 (panel izquierdo), control isotipo (panel central) y control de anticuerpo secundario (panel derecho). No se observó tinción sinusoidal o de los hepatocitos específica.

Figura 3: Reactividad de mAb806 y mAb175 con fragmentos del EGFR presentados en levadura. **A:** Histogramas de citometría de flujo representativos que muestran la señal de fluorescencia media de la marcación con mAb175 y mAb806 de fragmentos EGFR presentados en levadura. Con la presentación en levadura cierto porcentaje de células no expresan proteína en su superficie, dando como resultado 2 picos de histograma. Se utiliza el anticuerpo 9E10 como control positivo, dado que todos los fragmentos contienen una etiqueta c-myc lineal en el terminal C. **B:** Sumario de la fijación de anticuerpos a diversos fragmentos EGFR. **C:** Los fragmentos EGFR se desnaturalizaron por calentamiento de pelets de levadura a 80 °C durante 30 min. La etiqueta c-myc era reconocida todavía por el anticuerpo 9E10 anti-myc en todos los casos, demostrando que el tratamiento térmico no pone en compromiso la proteína presentada en la superficie de la levadura. El anticuerpo EGFR mAb 225 sensible a la conformación se utilizó para confirmar la desnaturalización.

Figura 4: Efectos antitumorales de mAb175 sobre xenoinjertos de cáncer de cerebro y próstata. **A:** Ratones (n = 5) que llevaban xenoinjertos U87MG.Δ2-7 se inyectaron por vía intraperitoneal con PBS, 1 mg de mAb175 o mAb806 (control positivo), 3 veces por semana durante 2 semanas los días 6, 8, 10, 13, 15 y 17 cuando el volumen inicial del tumor era 100 mm³. Los datos se expresan como volumen medio del tumor ± SE. **B:** Las células se tiñeron con dos anticuerpos irrelevantes (*azul, macizo y verde, hueco*), mAb 528 para EGFR total (*rosado, macizo*), mAb806 (*azul claro, hueco*) y mAb175 (*anaranjado, hueco*) y se analizaron luego por FACS. **C:** Células DU145 se lisaron, se sometieron a IP con mAb 528, mAb806, mAb175 o dos anticuerpos irrelevantes independientes y se sometieron luego a inmunotransferencia para EGFR. **D:** Ratones (n = 5) portadores de xenoinjertos DU145 se inyectaron por vía intraperitoneal con PBS, 1 mg de mAb175 o mAb806, diariamente los días 18-22, 25-29 y 39-43 cuando el volumen inicial del tumor era 85 mm³. Los datos se expresan como volumen medio del tumor ± SE.

Figura 5: Estructuras cristalinas del péptido EGFR 287-302 fijado a los fragmentos Fab. (A) Dibujo de Fab 806, con cadena ligera, rojo; cadena pesada, azul; péptido fijado, amarillo; y el EGFR₂₈₇₋₃₀₂ de EGFR superpuesto, púrpura. (B) Dibujo de Fab175 con la cadena ligera, amarillo; cadena pesada, verde; péptido fijado, lila; y EGFR₂₈₇₋₃₀₂ de EGFR(D1-3), púrpura. (C) Detalle de (B) que muestra la semejanza de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en el receptor al péptido fijado a Fab 175. Las cadenas principales de los péptidos se muestran como trazas C α , y las cadenas laterales interaccionantes como palillos. Los átomos O están coloreados en rojo; N, azul; S, anaranjado y C, como para la cadena principal. (D) Superposición de EGFR con el complejo Fab175: péptido que muestra solapamiento espacial. Coloración como en (C) con la superficie de EGFR187-286 coloreada en turquesa. (E) Vista ortogonal a (D) con EGFR 187-286 representado en azul opaco y la superficie de las cadenas ligera (anaranjada) y pesada (verde) transparentes. (F) Vista estereoscópica detallada del complejo 175 Fab mirando hacia el sitio de fijación de antígeno. Coloración

como en (C) y con los enlaces de hidrógeno de la cadena lateral moteados en negro. Las moléculas de agua ocultas como resultado de la formación del complejo se muestran como esferas rojas.

Figura 6: Influencia del enlace cistina 271-283 sobre la fijación de mAb806 al EGFR. **A:** Células transfectadas con EGFR tipo salvaje, EGFR-C271A, EGFR-C283A o el mutante C271A/C283A se tiñeron con mAb 528 (histograma rosado macizo), mAb806 (línea azul) o sólo el anticuerpo secundario (púrpura) y se analizaron luego por FACS. La ganancia se estableció utilizando un anticuerpo irrelevante de la misma clase.

B: Células BaF3 que expresaban el EGFR-C 271A o EGFR C 271/283A se examinaron en cuanto a su respuesta a EGF en un ensayo MTT como se describe en Métodos. Los valores CE_{50} se obtuvieron utilizando el ajuste de Boltzman de los puntos de datos. Los datos representan la media y la desviación estándar de medidas triplicadas. **C:** Células BaF3 que expresaban el tipo salvaje o el EGFR-C271A/C283A se dejaron sin alimento de IL-3 y suero, exponiéndose después a EGF o control de vehículo. Los lisados de células enteras se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti-fosfotirosina (panel superior) o anticuerpo anti-EGFR (panel inferior). **D:** Células BaF3 que expresaban el EGFR tipo salvaje (*panel izquierdo*) o el C271A/C283A (*panel derecho*) se estimularon con concentraciones crecientes de EGF en ausencia de anticuerpo (símbolos vacíos), o en presencia de mAb 528 (círculos grises) o mAb806 (triángulos negros), ambos a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los datos se expresan como el valor medio y la desviación estándar de medidas triplicadas.

Figura 7: A) Imagen de cámara gamma de cuerpo entero de la biodistribución de ^{111}In ch806 en un paciente con carcinoma metastásico de células escamosas de las cuerdas vocales, mostrando absorción cuantitativa alta en el tumor en el lado derecho del cuello (flecha). Se observa también la actividad del conjunto de la sangre, y catabolismo menor de ^{111}In libre en el hígado. B) Imagen por Tomografía Computarizada de Fotones Simples (SPECT) del cuello de este paciente, mostrando la absorción de ^{111}In -ch806 en el tumor viable (flecha), indicando la absorción central reducida necrosis. C) Escaneo CT correspondiente del cuello que demuestra una gran masa tumoral en el lado derecho del cuello (flecha) con necrosis central.

Figura 8: Modelo estereoscópico de la estructura del EGFR 1-621 no restringido. La cadena principal del receptor está trazada en azul y el ligando TGF- α en rojo. El epítipo mAb806/175 está representado en turquesa, y los enlaces disulfuro en amarillo. Los átomos del enlace disulfuro que une el epítipo al receptor se muestran en formato de llenado espacial. El modelo se construyó por acoplamiento del dominio CR2 de EGFR-ECD de la conformación restringida (13) a la estructura de un monómero EGFR no restringido en presencia de su ligando (14).

Figura 9: Reactividad de mAb806 con fragmentos del EGFR. Lisados de células 293T transfectadas con vectores que expresaban el fragmento soluble 1-501 de EGFR o proteínas de fusión del fragmento GH/EGFR (GH-274-501, GH-282-501, GH-290-501 and GH-298-501) se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron a membrana y se sometieron a inmunotransferencia con mAb806 (panel izquierdo) o el anticuerpo anti-myc 9B11 (panel derecho).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse métodos de biología molecular convencional, microbiología, y DNA recombinante dentro de la experiencia en la técnica. Tales métodos se expresan detalladamente en la bibliografía. Véanse, v.g., Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Por consiguiente, si aparecen en esta memoria, los términos siguientes tendrán las definiciones expuestas a continuación.

15
A. TERMINOLOGÍA

El término "expresión aberrante" en sus diversas formas gramaticales puede significar e incluir cualquier expresión o sobreexpresión aumentada o alterada de una proteína en un tejido, v.g. un aumento en la cantidad de una proteína, causado por cualquier medio que incluya expresión o traducción intensificada, modulación del promotor o un regulador de la proteína, amplificación de un gen para una proteína, o semi-vida o estabilidad incrementadas, de tal modo que existe o puede detectarse en un momento dado mayor cantidad de la proteína, en contraste con un estado no sobreexpresado. Expresión aberrante incluye y contempla cualquier escenario o alteración en la que la expresión o la maquinaria de modificación posterior a la traducción de la proteína en una célula está gravida o alterada de otro modo debido a expresión intensificada o niveles o cantidades incrementados de una proteína, con inclusión de aquellos casos en los que se expresa una proteína alterada como en proteína o variante mutada debido a alteración, deleción o inserción de secuencia, o plegamiento alterado.

Es importante apreciar que el término "expresión aberrante" se ha seleccionado específicamente en esta memoria para abarcar el estado en que están presentes cantidades/niveles anormales (usualmente aumentados) de la proteína, con indiferencia de la causa eficiente de dicha cantidad o nivel anormal. Así, cantidades anormales de proteínas pueden ser resultado de sobreexpresión de la proteína en ausencia de amplificación de gen, que es el caso v.g. en muchas muestras celulares/tisulares tomadas de la cabeza y el cuello de individuos con cáncer, en tanto que otras muestras exhiben niveles de proteína anormales atribuibles a amplificación génica.

35
A este respecto, parte del trabajo de los inventores que se presenta en esta memoria para ilustrar la invención incluye el análisis de muestras, algunas de las cuales exhiben niveles anormales de proteína resultantes de la amplificación de EGFR. Esto da cuenta por tanto de la presentación en esta memoria de hallazgos experimentales en los que se hace referencia a amplificación y del uso de los términos "amplificación/amplificado" y análogos en la descripción de libras anormales de EGFR. Sin embargo, es la observación de las cantidades o niveles anormales de la proteína lo que define el entorno o circunstancia en que se contempla la intervención clínica como por recurso a

los miembros de fijación de la invención, y por esta razón, la presente memoria descriptiva considera que el término “expresión aberrante” capta de un modo más general el entorno causal que produce la anormalidad correspondiente en los niveles de EGFR.

5 Conforme a ello, si bien se entiende que los términos “sobrexpresión” y “amplificación” en sus diversas formas gramaticales tienen significados técnicos distintos, los mismos deben considerarse equivalentes uno a otro, en la medida en que los mismos representan el estado en que están presentes niveles anormales de proteína EGFR en el contexto de la presente invención. Por consiguiente, se ha elegido el término “expresión aberrante” dado que se cree que subsume los términos “sobrexpresión” y “amplificación” dentro de su alcance para los propósitos de esta
 10 memoria, por lo que todos los términos pueden considerarse equivalentes unos a otros cuando se utilizan en esta memoria.

El término “anticuerpo” describe una inmunoglobulina, tanto si se produce naturalmente o por síntesis parcialmente o en su totalidad. El término abarca también cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de fijación que es,
 15 o es homólogo a, un dominio de fijación de anticuerpo. Por este término se contemplan también anticuerpos injertados en CDR.

Dado que los anticuerpos pueden modificarse de diversas maneras, debe interpretarse que el término “anticuerpo” abarca cualquier miembro o sustancia de fijación específica que tenga un dominio de fijación con la especificidad
 20 requerida. Así, este término abarca fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, con inclusión de cualquier polipéptido que comprenda un dominio de fijación de inmunoglobulina, sea natural o sintético total o parcialmente. Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de fijación de inmunoglobulina, o equivalente, fusionadas a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en las Patentes U.S. NOs. 4,816,397 y 4,816,567.

25 Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo entero pueden realizar la función de antígenos de fijación. Ejemplos de fragmentos de fijación son (i) el fragmento Fab constituido por dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd constituido por los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv constituido por los dominios VL y VH de un anticuerpo simple; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio
 30 VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las cuales un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de fijación de antígeno (Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) fragmentos de anticuerpo multivalentes (dímeros, trímeros y/o tetrámeros scFv (Power and Hudson, J Immunol. Methods 242: 193-
 35 204 9 (2000)); (ix) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (PCT/US92/09965) y (x) “diacuerpos”, fragmentos multivalentes o multi-específicos construidos por fusión de genes (WO94/13804; P. Holliger et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993)).

Un “sitio de combinación de anticuerpos” es una porción estructural de una molécula de anticuerpo que comprende
 40 regiones variables e hipervariables de cadena ligera o de cadenas pesada y ligera que fija específicamente un antígeno.

La expresión "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales como se utilizan en esta memoria contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

5 Moléculas de anticuerpo ilustrativas son moléculas intactas de inmunoglobulina, moléculas sustancialmente intactas de inmunoglobulina y aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratopo, con inclusión de aquellas porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ and F(v), porciones que se prefieren para uso en los métodos terapéuticos descritos en esta memoria.

10 Los anticuerpos pueden ser también biespecíficos, en los cuales un dominio de fijación del anticuerpo es un miembro de fijación específica de la invención, y el otro dominio de fijación tiene una especificidad diferente, v.g. para reclutar una función efectora o análoga. Anticuerpos biespecíficos de la presente invención incluyen aquéllos en los cuales un dominio de fijación del anticuerpo es un miembro de fijación específica de la presente invención, con inclusión de un fragmento del mismo, y el otro dominio de fijación es un anticuerpo distinto o fragmento del mismo, que incluye el de un anticuerpo anti-EGFR distinto, por ejemplo el anticuerpo 528 (Patente U.S. No. 4,943,533), el anticuerpo quimérico y humanizado 225 (patente U.S. No. 4,943,533 y WO/9640210), un anticuerpo anti-de2-7 tal como DH8.3 (Hills, D. et al (1995) Int. J. Cancer 63(4):537-543), el anticuerpo L8A4 y Y10 (Reist, CJ et al (1995) Cancer Res. 55(19):4375-4382; Foulon CF et al. (2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460), ICR62 (Modjtahedi H et al (1993) Cell Biofys. Jan-Jun;22(1-3):129-46; Modjtahedi et al (2002) P.A.A.C.R. 55(14):3140-3148, o el anticuerpo de Wikstrand et al (Wikstrand C. et al (1995) Cancer Res. 55(14):3140-3148). El otro dominio de fijación puede ser un anticuerpo que reconoce o está direccionado a un tipo de célula particular, como en un anticuerpo específico de células neurales o gliales. En los anticuerpos biespecíficos de la presente invención, uno de los dominios de fijación del anticuerpo de la invención puede estar combinado con otros dominios de fijación o moléculas que reconocen receptores celulares particulares y/o modulan las células de una manera particular, como por ejemplo un inmunomodulador (v.g., interleucina(s)), un modulador del crecimiento o citocina (v.g. factor de necrosis de tumores (TNF), y particularmente, la modalidad biespecífica de TNF demostrada en U.S.S.N. 60/355.838 presentado el 13 de febrero de 2002) o una toxina (v.g., ricina) o un agente o factor anti-mitótico o apoptótico.

30 Porciones Fab y F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo pueden prepararse por la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, sobre moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas por métodos bien conocidos. Véase, por ejemplo la patente U.S. No. 4.342.566 otorgada a Theofilopolous et al. Porciones Fab' de moléculas de anticuerpo son también bien conocidas y se producen a partir de porciones F(ab')₂ seguido por reducción de los enlaces disulfuro que unen las dos porciones de cadena pesada como en el caso de mercaptoetanol, y seguido por alquilación del mercaptano de la proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida. En esta memoria se prefiere un anticuerpo que contiene moléculas de anticuerpo intactas.

40 La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene una sola especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal exhibe por tanto típicamente una afinidad de fijación única para cualquier antígeno con el cual inmunorreaccione el mismo. Un anticuerpo monoclonal puede contener también una molécula de anticuerpo que tenga una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente; v.g., un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

El término “dominio de fijación de antígeno” describe la parte de un anticuerpo que comprende el área que se fija específicamente a y es complementaria de parte o la totalidad de un antígeno. En el caso de un antígeno grande, un anticuerpo puede fijarse solo a una parte del antígeno únicamente, parte que se conoce como un epítipo. Un dominio de fijación de antígeno puede estar proporcionado por uno o más dominios variables de anticuerpo.

5 Preferiblemente, un dominio de fijación de antígeno comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada del anticuerpo (VH).

“Modificación post-traducciona” puede abarcar una cualquiera de o combinación de modificaciones, con inclusión de modificación covalente, que sufre una proteína después de su traducción completa y después de ser liberada del ribosoma o en el polipéptido naciente simultáneamente a la traducción. Modificación post-traducciona incluye, pero sin carácter limitante, fosforilación, miristilación, ubiquitinación, glicosilación, fijación de coenzima, metilación y acetilación. La modificación post-traducciona puede modular o influenciar la actividad de una proteína, su destino intracelular o extracelular, su estabilidad o semi-vida, y/o su reconocimiento por ligandos, receptores u otras proteínas. La modificación post-traducciona puede ocurrir en orgánulos de la célula, en el núcleo o citoplasma o extracelularmente.

El término “específico” puede utilizarse para hacer referencia a la situación en la que un miembro de un par de fijación específica no exhibirá fijación significativa alguna a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de fijación específica(s). El término es aplicable también donde v.g. un dominio de fijación de antígeno es específico para un epítipo particular que es llevado por varios antígenos, en cuyo caso el miembro de fijación específica que lleva el dominio de fijación de antígeno será capaz de fijarse a los diversos antígenos que llevan el epítipo.

El término “comprender” se utiliza generalmente en el sentido de inclusión, es decir que permite la presencia de una o más características o componentes.

El término “constituido esencialmente por” se refiere a un producto, particularmente una secuencia peptídica, de un número definido de residuos que no está unido covalentemente a un producto mayor. En el caso del péptido de la invención al que se hace referencia anteriormente, los expertos en la técnica apreciarán que pueden contemplarse sin embargo modificaciones menores en el terminal N-o C-del péptido, tales como la modificación química del terminal para añadir un grupo protector o análogo, v.g. la amidación del terminal C.

El término “aislado” se refiere al estado en el cual se encontrarán los anticuerpos de la invención, o el ácido nucleico que codifica tales anticuerpos o CDRs del mismo, de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos y el ácido nucleico estarán exentos o sustancialmente exentos de material con el cual están asociados naturalmente, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los cuales se encuentran aquéllos en su entorno natural, o el entorno en el cual se preparan los mismos (v.g. cultivo de células) cuando tal preparación se practica por tecnología de DNA recombinante *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos y el ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y estar aislados todavía para propósitos prácticos -por ejemplo los miembros estarán mezclados normalmente con gelatina u otros portadores si se utilizan para recubrir placas de microtitulación para uso en inmunoensayos, o estarán mezclados con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilizan en diagnóstico o terapia. Los anticuerpos pueden estar glicosilados, sea naturalmente o por sistemas de células eucariotas heterólogas, o pueden no estar glicosilados (por ejemplo si se producen por expresión en una célula procarionota).

Asimismo, como se utilizan en esta memoria, los términos “glicosilación” y “glicosilado” incluyen y abarcan la modificación post-traducciona l de proteínas, denominadas glicoproteínas, por adición de oligosacáridos. Los oligosacáridos se añaden en los sitios de glicosilación en las glicoproteínas, incluyendo particularmente oligosacáridos enlazados a N y oligosacáridos enlazados a O. Los oligosacáridos enlazados a N se añaden a un residuo Asn, particularmente donde el residuo Asn se encuentra en la secuencia N-X-S/T, donde X no puede ser Pro o Asp, y son los más comunes encontrados en las glicoproteínas. En la biosíntesis de glicoproteínas enlazadas a N un oligosacárido de tipo rico en manosa (constituido generalmente por dolicol, N-acetilglucosamina, manosa, y glucosa) se forma primeramente en el retículo endoplásmico (ER). Las glicoproteínas de tipo rico en manosa son transportadas luego desde el ER al Golgi, donde tiene lugar el procesamiento y la modificación posteriores de los oligosacáridos. Los oligosacáridos enlazados a O se añaden al grupo hidroxilo de residuos Ser o Thr. En los oligosacáridos enlazados a O, la N-acetilglucosamina es transferida primeramente al residuo Ser o Thr por la N-acetil-glucosaminiltransferasa en el ER. La proteína se desplaza luego al Golgi donde tienen lugar la modificación y alargamiento de cadena posteriores. Modificaciones enlazadas a O pueden ocurrir con la simple adición del monosacárido OGlcNAc sólo en aquellos sitios Ser o Thr que pueden también, en condiciones diferentes, sufrir fosforilación en lugar de glicosilación.

Como se utiliza en esta memoria, “pg” significa picogramo, “ng” significa nanogramo, “ug” o “µg” significa microgramo, “mg” significa miligramo, “ul” o “µl” significa microlitro, “ml” significa mililitro, y “l” significa litro.

Los términos “anticuerpo 175”, “175 anticuerpo”, “mAb175”, y cualesquiera variantes no citadas específicamente, pueden utilizarse de modo intercambiable de esta memoria, y como se utiliza a lo largo de la presente solicitud y las reivindicaciones se extienden a aquellas proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, y 6 y el perfil de actividades indicado en esta memoria y en las reivindicaciones.

Los residuos de aminoácidos descritos en esta memoria están preferiblemente en la forma isómera “L”. Sin embargo, pueden sustituirse residuos en la forma isómera “D” en lugar de cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que la propiedad funcional deseada de fijación de inmunoglobulina sea retenida por el polipéptido. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el término amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el término carboxi de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura estándar de los polipéptidos, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), las abreviaturas para los residuos de aminoácido se muestran en la Tabla de Correspondencia siguiente:

TABLA DE CORRESPONDENCIA		
SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1-Letra	3-Letras	
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Fe	Fenilalanina
M	Met	Metionina

ES 2 609 915 T3

TABLA DE CORRESPONDENCIA		
SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1-Letra	3-Letras	
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valine
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
C	Cys	Cisteína

5 Debe indicarse que todas las secuencias de residuos de aminoácido se representan en esta memoria por fórmulas cuya orientación izquierda y derecha se encuentra en la dirección convencional del término amino al término carboxi. Adicionalmente, debe indicarse que un guión al comienzo o al final de una secuencia de residuo de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido. La Tabla anterior se presenta para correlacionar las notaciones de tres letras y una sola letra que pueden aparecer alternativamente en esta memoria.

10 Un “replicón” es cualquier elemento genético (v.g., plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de DNA *in vivo*; es decir capaz de replicación bajo su propio control.

Un “vector” es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al cual puede estar unido otro segmento de DNA para llevar a cabo la replicación del segmento unido.

15 Una “molécula de DNA” se refiere a la forma polímera de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina, o

5 citosina) en su forma monocatenaria, o una hélice bicatenaria. Este término se refiere únicamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no limita la misma a forma terciaria particular alguna. Así, este término incluye DNA bicatenario encontrado, *inter alia*, en moléculas de DNA lineales (v.g., fragmentos de restricción), virus, plásmidos, y cromosomas. En la discusión de la estructura de moléculas de DNA bicatenarias particulares, las

10 Un "origen de replicación" se refiere a aquellas secuencias de DNA que participan en la síntesis del DNA.

Una "secuencia codificante" de DNA es una secuencia de DNA bicatenario que se transcribe y traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de comienzo en el término 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el término 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero sin carácter limitante,

15 secuencias procariotas, cDNA de mRNA eucariota, secuencias de DNA genómico de DNA eucariota (v.g. de mamífero), e incluso secuencias de DNA sintético. Una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción estará localizada usualmente en posición 3' respecto a la secuencia codificante.

20 Las secuencias de control de la transcripción y la traducción son secuencias reguladoras de DNA, tales como promotores, intensificadores, señales de poliadenilación, terminadores, y análogas, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula hospedadora.

Una "secuencia promotora" es una reacción reguladora de DNA capaz de fijar RNA-polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). Para los propósitos de definición de

25 la presente invención, la secuencia promotora está unida en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del ruido de fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (definido convenientemente por mapeado con nucleasa S1), así como dominios de fijación de proteínas (secuencias de consenso) responsables de la fijación de

30 RNA-polimerasa. Los promotores eucariotas contendrán con frecuencia, pero no siempre, secuencias "TATA" y secuencias "CAT". Los promotores procariotas contienen secuencias Shine-Dalgarno además de las secuencias de consenso -10 y -35.

Una "secuencia de control de la expresión" es una secuencia de DNA que controla y regula la transcripción y

35 traducción de otra secuencia de DNA. Una secuencia codificante se encuentra "bajo el control" de secuencias controladoras de la transcripción y la traducción en una célula cuando la RNA-polimerasa transcribe la secuencia codificante en mRNA, que se traduce luego en la proteína codificada por la secuencia codificante.

Una "secuencia señal" puede incluirse antes de la secuencia codificante. Esta secuencia codifica un péptido señal,

40 N-terminal al polipéptido, que se comunica con la célula hospedadora para dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido en el medio, y este péptido señal es cortado por la célula hospedadora antes que la proteína abandone la célula. Las secuencias señal pueden encontrarse asociadas con una diversidad de proteínas nativas a

procariotas y eucariotas.

El término “oligonucleótido”, como se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la sonda se define como una molécula que comprende dos o más ribonucleótidos, preferiblemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependen de la función y el uso últimos del oligonucleótido. El término “cebador”, como se utiliza en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido, tanto si existe naturalmente como si se encuentra en un material digerido de restricción purificado o producido por síntesis, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se pone en condiciones en las cuales se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador, que es complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una DNA-polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser monocatenario o bicatenario y tiene que ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, que incluyen temperatura, fuente del cebador y uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico contiene típicamente 15-25 nucleótidos o más, aunque puede contener menos nucleótidos. Los cebadores se seleccionan de modo que sean “sustancialmente” complementarios a diferentes cadenas de una secuencia de DNA diana particular. Esto significa que los cebadores tienen que ser suficientemente complementarios para hibridarse con sus cadenas respectivas. Por tanto, la secuencia del cebador no precisa reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede estar unido al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementario a la cadena. Alternativamente, bases no complementarias o secuencias más largas pueden estar intercaladas en el cebador, con tal que la secuencia cebadora tenga complementariedad suficiente con la secuencia de la cadena para hibridarse con ella y formar de este modo el molde para la síntesis del producto de extensión.

Como se utiliza en esta memoria, los términos “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta el DNA bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

Una célula ha sido “transformada” por DNA exógeno o heterólogo cuando dicho DNA se ha introducido en el interior de la célula. El DNA transformante puede estar integrado (enlazado covalentemente) o no en el DNA cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariotas, levaduras, y células de mamífero por ejemplo, el DNA transformante puede mantenerse en un elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada establemente es una en la cual el DNA transformante se ha integrado en un cromosoma de tal modo que el mismo es heredado por las células hijas por replicación cromosómica.

Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer linajes o clones de células que comprenden una población de células hijas que contienen el DNA transformante. Un “clon” es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro común por mitosis. Un “linaje de células” es un clon de una célula primaria que es capaz de crecer establemente *in vitro* durante muchas generaciones.

Dos secuencias de DNA son “sustancialmente homólogas” cuando al menos aproximadamente 75 % (con preferencia al menos aproximadamente 80 %, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 90 ó 95 %) de

los nucleótidos coinciden a lo largo de la longitud definida de las secuencias de DNA. Secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse por comparación de las secuencias utilizando software estándar disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, en condiciones severas como se definen para dicho sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia en la técnica. Véase, v.g., Maniatis et al., *supra*; DNA Cloning, Vols. I y II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

Debe apreciarse que están también dentro del alcance de la presente invención secuencias de DNA codificantes de anticuerpos de la invención, que codifican v.g. un anticuerpo que tiene un dominio de región variable que tiene o comprende la misma secuencia de aminoácidos que SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

Es bien conocido en la técnica que los codones siguientes pueden utilizarse intercambiabilmente para codificar cada aminoácido específico:

15	Fenilalanina (Phe o F)	UUU o UUC
	Leucina (Leu o L)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG
	Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
20	Metionina (Met o M)	AUG
	Valina (Val o V)	GUU o GUC of GUA o GUG
25	Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU o AGC
	Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
	Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
30	Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
	Tirosina (Tyr o Y)	UAU o UAC
35	Histidina (His o H)	CAU o CAC
	Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
	Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
40	Lisina (Lys o K)	AAA o AAG

ES 2 609 915 T3

	Ácido aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
	Ácido glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
5	Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC
	Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
	Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
10	Triptófano (Trp o W)	UGG
	Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (opal)

15 Debe entenderse que los codones arriba especificados son para secuencias de RNA. Los codones correspondientes para DNA tienen una T en sustitución de U.

Pueden realizarse mutaciones en las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de anticuerpo expuestos en esta memoria de tal modo que un codón particular es cambiado por un codón que codifica un aminoácido diferente. Una mutación de este tipo se hace generalmente realizando los mínimos cambios de nucleótido posibles. Una mutación de sustitución de esta clase puede hacerse para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a una agrupación de aminoácidos que tienen un tamaño o característica particular por un aminoácido perteneciente a otra agrupación) o de una manera conservadora (es decir cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a una agrupación de aminoácidos que tienen un tamaño o característica particular por un aminoácido perteneciente a la misma agrupación). Un cambio conservador de este tipo conduce generalmente a menos cambio en la estructura y función de la proteína resultante. Un cambio no conservador es más probable que altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. Debe considerarse que la presente invención incluye secuencias que contienen cambios conservadores que no alteran significativamente la actividad o características de fijación de la proteína resultante.

Lo que sigue es un ejemplo de diversas agrupaciones de aminoácidos:

Aminoácidos con grupos R no polares

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

Aminoácidos con grupos R polares no cargados

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

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

ES 2 609 915 T3

Ácido aspártico, Ácido glutámico

Aminoácidos básicos (cargados positivamente a pH 6,0)

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

Otra agrupación puede estar constituida por aquellos aminoácidos que tienen grupos fenilo: Fenilalanina, Triptófano, Tirosina.

10 Otra agrupación puede ser según el peso molecular (es decir, el tamaño de los grupos R):

	Glicina	75
	Alanina	89
15	Serina	105
	Prolina	115
20	Valina	117
	Treonina	119
	Cisteína	121
25	Leucina	131
	Isoleucina	131
30	Asparagina	132
	Ácido aspártico	133
	Glutamina	146
35	Lisina	146
	Ácido glutámico	147
40	Metionina	149
	Histidina (a pH 6,0)	155

ES 2 609 915 T3

	Fenilalanina	165
	Arginina	174
5	Tirosina	181
	Triptófano	204

Sustituciones particularmente preferidas son:

- 10
- Lys en lugar de Arg y viceversa de tal modo que puede mantenerse una carga positiva;
 -
 - Glu en lugar de Asp y viceversa de tal modo que puede mantenerse una carga negativa;
 -
- 15
- Ser en lugar de Thr de tal modo que puede mantenerse un -OH libre; y
 -
 - Gln en lugar de Asn de tal modo que puede mantenerse un -NH₂ libre.
 -
- 20
- Pueden introducirse también sustituciones de aminoácidos para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, puede introducirse un Cys en un sitio potencial para puentes disulfuro con otro Cys. Puede introducirse un His como un sitio particularmente "catalítico" (a saber, His puede actuar como ácido o base y es el aminoácido más común en catálisis bioquímica). Puede introducirse Pro debido a su estructura particularmente plana, que induce vueltas β en la estructura de la proteína.
- 25
- Dos secuencias de aminoácido son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente 70 % de los residuos de aminoácido (con preferencia al menos aproximadamente 80 %, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 90 ó 95 %) son idénticos, o representan sustituciones conservadoras.
- 30
- Una región "heteróloga" del constructo de DNA es un segmento identificable de DNA dentro de una molécula de DNA mayor que no se encuentra en asociación con la molécula mayor en la naturaleza. Así, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen estará flanqueado usualmente por DNA que no flanquea el DNA genómico del mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es un constructo en el que la secuencia codificante propiamente dicha no se encuentra en la naturaleza (v.g., un
- 35
- cDNA en el que la secuencia genómica codificante contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes que el gen nativo). Las variaciones alélicas o eventos de mutación existentes naturalmente no dan lugar a una región heteróloga de DNA como se define en esta memoria.
- 40
- La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o adversa similar, tal como perturbación gástrica, mareo y análogas, cuando se administran a un humano.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza en esta memoria para significar una cantidad suficiente para prevenir, y preferiblemente reducir al menos aproximadamente 30 %, con preferencia al menos 50 %, con más preferencia al menos 70 %, con mayor preferencia al menos 80 %, y preferiblemente al menos 90%, un cambio clínicamente significativo en el crecimiento o progresión o actividad mitótica de una masa celular diana, grupo de 5 células de cáncer o tumor, u otra particularidad de patología. Por ejemplo, puede reducirse el grado de activación de EGFR o la actividad o cantidad o número de células EGFR-positivas, particularmente de células reactivas o positivas para el anticuerpo o miembro de fijación.

Una secuencia de DNA está "enlazada operativamente" a una secuencia de control de la expresión cuando la 10 secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y traducción de dicha secuencia de DNA. La expresión "enlazada operativamente" incluye el hecho de tener una señal de inicio apropiada (v.g., ATG) delante de la secuencia de DNA a expresar y mantener el entramado de lectura correcto que permite la expresión de la secuencia de DNA bajo el control de la secuencia de control de la expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia de DNA. Si un gen que se desea insertar en una molécula de DNA recombinante no 15 contiene una señal de inicio apropiada, dicha señal de inicio puede insertarse delante del gen.

La expresión "condiciones estándar de hibridación" se refiere a condiciones de sal y temperatura sustancialmente equivalentes a 5 x SSC y 65 °C tanto para hibridación como para lavado. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que dichas "condiciones estándar de hibridación" dependen de condiciones particulares que incluyen la 20 concentración de sodio y magnesio en el tampón, la longitud y concentración de la secuencia de nucleótidos, el porcentaje de desapareamiento, el porcentaje de formamida, y análogos. También es importante en la determinación de las "condiciones estándar de hibridación" si las dos secuencias que se hibridan son RNA-RNA, DNA-DNA o RNA-DNA. Tales condiciones estándar de hibridación son determinadas fácilmente por un experto en la técnica según fórmulas bien conocidas, en las cuales la hibridación tiene lugar típicamente 10-20 °C por debajo de la T_m predicha o 25 determinada con lavados de mayor severidad, en caso deseado.

B. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona un nuevo anticuerpo 175 o fragmento del mismo, con inclusión de fragmentos 30 inmunógenos, que reconoce un epítipo de EGFR, particularmente el péptido EGFR (₂₈₇CGADSYEMEEDGVRKC₃₀₂(SEQ ID NO: 14)), que se presenta en células tumorígenas, hiperproliferativas o anormales en las cuales el epítipo está aumentado, se revela, es evidente y no es detectable en células normales o tipo salvaje. En una realización particular pero no limitante, el anticuerpo reconoce un epítipo de EGFR que está intensificado o es evidente después de modificación simple de carbohidratos o glicosilación temprana y está 35 reducido o no es evidente en presencia de modificación o glicosilación de carbohidratos complejos. El anticuerpo o fragmento del mismo no se fija o reconoce las células normales o tipo salvaje que contienen epítipo de EGFR normal o tipo salvaje en ausencia de sobreexpresión, amplificación, o un evento tumorígeno.

En un aspecto particular de la invención y como se ha expuesto anteriormente, los presentes inventores han 40 descubierto el nuevo anticuerpo monoclonal 175, que reconoce específicamente EGFR amplificado tipo salvaje y el EGFR de2-7, pero se fija a un epítipo distinto del péptido juntural singular de la mutación de EGFR de2-7. Adicionalmente, si bien mAb175 no reconoce el EGFR normal tipo salvaje expresado en la superficie celular de las

células de glioma, se fija de hecho al dominio extracelular del EGFR inmovilizado en la superficie de placas ELISA, indicando un epítipo de conformación con un aspecto polipeptídico. Es importante que mAb175 no se fijaba significativamente a tejidos normales tales como el hígado, que expresan niveles de EGFR endógeno tipo salvaje que son mayores que en la mayoría de los tejidos normales restantes, pero en los cuales EGFR no está
5 sobreexpresado o aumentado. Así, mAb175 demuestra especificidad nueva y útil, reconociendo EGFR de2-7 y EGFR amplificado, en tanto que no reconoce EGFR normal tipo salvaje o el péptido juntural singular que es característico de EGFR 2-7. El anticuerpo 175 de la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de los dominios CDR VH y VL representadas en la Figura 1 y en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

10 Usos Diagnósticos y Terapéuticos

La especificidad singular de los anticuerpos 175 o fragmentos de los mismos, de la presente invención, proporciona usos diagnósticos y terapéuticos para identificar, caracterizar, direccionar y tratar, reducir o eliminar numerosos tipos de células tumorígenas y tipos de tumor, por ejemplo tumores de cabeza y cuello,
15 mama, pulmón, vejiga o próstata y glioma, sin los problemas asociados con la absorción de tejido normal que pueden encontrarse con anticuerpos EGFR conocidos previamente. Así, células que sobreexpresan EGFR (v.g. por amplificación o expresión de un EGFR mutante o variante), particularmente aquéllas que demuestran modificación aberrante post-traducciona pueden reconocerse, aislarse, caracterizarse, direccionarse y tratarse o eliminarse utilizando el o los anticuerpos 175 o fragmentos de los mismos de la presente invención.

Los anticuerpos de la presente invención pueden clasificar así específicamente la naturaleza de tumores o células tumorígenas de EGFR, por tinción o reconocimiento de otro modo de dichos tumores o células en los que está presente sobreexpresión de EGFR, particularmente amplificación y/o mutación de EGFR, particularmente EGFR de2-7. Adicionalmente, los anticuerpos 175 de la presente invención demuestran
25 actividad anti-tumor significativa *in vivo* contra tumores que contienen EGFR amplificado y contra xenoinjertos EGFR de2-7 positivos. En un ejemplo adicional de la descripción, se proporciona un método de tratamiento de un tumor, una condición cancerosa, una condición pre-cancerosa, y cualquier condición relacionada con o resultante de crecimiento hiperproliferativo de células que comprende la administración de un anticuerpo 175 de la invención.

Los anticuerpos de la presente invención están diseñados para ser utilizados en métodos de diagnóstico y tratamiento de tumores en individuos humanos o animales, particularmente tumores epiteliales. Estos tumores pueden ser tumores sólidos primarios o secundarios de cualquier tipo con inclusión, pero sin carácter limitante, de tumores de glioma, mama, pulmón, próstata, cabeza o cuello.

35 Generación de anticuerpos

La metodología general para producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas es bien conocida. Pueden crearse también linajes de células inmortales productoras de anticuerpos por técnicas distintas de la
40 fusión, tales como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o transfección con virus Epstein-Barr. Véase, v.g., M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980); véanse también las Patentes U.S. NOs.

4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; 4,493,890. Paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra EGFR pueden clasificarse respecto a diversas propiedades; a saber isotipo, epítipo, afinidad, etc. De particular interés son los anticuerpos monoclonales que mimetizan la actividad de EGFR o sus subunidades. Tales anticuerpos monoclonales pueden identificarse fácilmente en ensayos de actividad de miembros de fijación específica. Anticuerpos de afinidad alta son útiles también cuando es posible la purificación por inmutofinidad de miembros de fijación específica nativos o recombinantes. Un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de la presente invención puede producirse por iniciación de un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo con la especificidad de antígeno apropiada. El cultivo se mantiene en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para que el hibridoma secrete las moléculas de anticuerpo en el medio. El medio que contiene el anticuerpo se recoge luego. Las moléculas de anticuerpo pueden aislarse después adicionalmente por técnicas bien conocidas.

Métodos para producción de anticuerpos anti-EGFR monoclonales son también bien conocidos en la técnica. Véase Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953 (1983). Típicamente, se utiliza el EGFR o un péptido análogo, sea sólo o conjugado a un portador inmunógeno, como el inmunógeno en el procedimiento descrito anteriormente para producción de anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los hibridomas se seleccionan respecto a la capacidad para producir un anticuerpo que inmunorreaccione con el EGFR presente en células tumorígenas, anormales o hiperproliferativas. Otros anticuerpos anti-EGFR incluyen, pero sin carácter limitante, el anticuerpo HuMAX-EGFR de Genmab/Medarex, el anticuerpo 108 (ATCC HB9764) y la Patente U.S. No. 6,217,866, y el anticuerpo 14E1 de Schering AG (Patente U.S. No. 5,942,602).

Anticuerpos Quiméricos, Biespecíficos y Fragmentos Recombinantes

En general, las regiones CDR, que comprenden secuencias de aminoácidos expuestas como las regiones CDR de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 estarán transportadas en una estructura que permite la fijación de las regiones CDR a un antígeno de tumor.

La estructura para el transporte de las CDRs de la invención será generalmente la de una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o porción sustancial de la misma en la cual las regiones CDR están localizadas en posiciones correspondientes a la región CDR de dominios variables de anticuerpo VH y VL existentes naturalmente, codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y localizaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat, E. A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª edición, US Department of Health and Human Services, 1987, y actualizaciones del mismo, disponibles ahora en Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu>).

Las secuencias de aminoácidos expuestas como SEQ ID NO: 4, 5 y 6 son transportadas como las CDR 1, 2 y 3 en un dominio variable de cadena pesada humana o una porción sustancial del mismo, y las secuencias de aminoácidos expuestas como SEQ ID NOs: 1, 2 y 3 son transportadas como las CDRs 1-3 respectivamente en un dominio variable de cadena ligera humana o una porción sustancial del mismo.

Los dominios variables pueden derivarse de cualquier dominio variable humano de línea germinal o reordenado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en secuencias de consenso de dominios

variables humanos conocidos. Las secuencias derivadas de CDR de la invención, como se definen en el párrafo anterior, pueden introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de regiones CDR, utilizando tecnología de DNA recombinante. Por ejemplo, Marks et al (Bio/Technology, 1992,10:779-783) describen métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpo en los cuales se utilizan
5 cebadores de consenso dirigidos o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable en conjunción con cebadores de consenso para la tercera región de entramado de genes VH humanos a fin de proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una o más CDR. Marks et al describen adicionalmente de qué modo puede combinarse este repertorio con una CDR de un anticuerpo particular. Utilizando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR de la presente invención pueden desordenarse con repertorios de
10 dominios VH o VL que carecen de una o más CDR, y los dominios VH y VL completos desordenados combinarse con un dominio VL o VH cognado para proporcionar anticuerpos de la invención. El repertorio puede presentarse luego en un sistema hospedador adecuado tal como el sistema de presentación de fago de WO 92/01047 de tal modo que pueden seleccionarse miembros de fijación específica adecuados. Un repertorio puede estar constituido por cualquier número desde 10^4 miembros individuales en adelante, por ejemplo de 10^6
15 a 10^8 ó 10^{10} miembros. Técnicas de desordenamiento o combinatorias análogas han sido descritas también por Stemmer (Nature, 1994,370:389-391), que describe la técnica en relación con un gen de β -lactamasa pero observa que el método puede utilizarse para la generación de anticuerpos.

Una alternativa adicional consiste en generar nuevas regiones VH o VL que llevan las secuencias derivadas de
20 CDR de la invención utilizando mutagénesis aleatoria de, por ejemplo, ácido nucleico codificante de las CDRs de VH o VL de mAb175 para generar mutaciones dentro del o de los dominios. Dicha técnica ha sido descrita por Gram et al (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580), que utilizaron PCR propensa a error. Otro método que puede utilizarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes VH o VL. Tales técnicas han sido descritas por Barbas et al, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) y por Schier et al (1996, J. Mol. Biol. 263:551-
25 567). Todos los métodos arriba descritos se conocen como tales en la técnica y no forman parte en sí mismos de la presente invención. Las personas expertas serán capaces de utilizar dichos métodos para proporcionar miembros de fijación específica de la invención utilizando metodología rutinaria en la técnica.

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR.
30 Residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquéllos que no están asociados normalmente con regiones de dominio variable existentes naturalmente. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos de la presente invención producidos por técnicas de DNA recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N-o C-terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otros pasos de manipulación. Otros pasos de manipulación incluyen la introducción de
35 enlazadores para unir dominios variables de la invención a secuencias de proteína adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas como se expone con mayor detalle más adelante.

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o
40 partes de las mismas. Por ejemplo, anticuerpos basados en SEQ ID NOs: 1-3 pueden unirse en su extremo C-terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpos que incluyen cadenas C κ o C λ humanas. Análogamente, anticuerpos basados en SEQ ID NOs: 4-6 pueden unirse en su extremo C-terminal a la

totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, v.g. IgG, IgA, IgE, IgD e IgM y cualquiera de las subclases isotipo, particularmente IgG1, IgG2b, e IgG4.

5 La aplicación de ingeniería molecular para convertir mAbs murinos en mAbs quiméricos (región V de ratón, región C humana) y reactivos humanizados en los que sólo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del mAb son de origen murino ha sido crítica para el éxito clínico de la terapia con mAb. Los mAbs construidos por ingeniería genética tienen inmunogenicidad acusadamente reducida o ausente, semivida en suero aumentada, y la porción humana Fc del mAb aumenta el potencial para reclutar los efectores inmunes del complemento y células citotóxicas. Investigaciones en la biodistribución, farmacocinética y cualquier inducción de una respuesta inmune a mAbs administrados clínicamente requiere el desarrollo de análisis para discriminar entre las proteínas farmacéuticas y endógenas.

15 Los anticuerpos, o cualesquiera fragmentos de los mismos, pueden conjugarse o fusionarse también recombinantemente a cualquier toxina celular, bacteriana o de otro tipo, v.g. exotoxina de pseudomonas, ricina, o toxina de la difteria. La parte de la toxina utilizada puede ser la toxina entera, o cualquier dominio particular de la toxina. Tales moléculas anticuerpo-toxina han sido utilizadas con éxito para direccionamiento y terapia de diferentes clases de cánceres, véase v.g. Pastan, Biochim Biophys Acta. 1997 Oct 24; 1333(2):C1-6; Kreitman et al., N Engl J Med. 2001 Jul 26;345(4):241-7; Schnell et al., Leukemia. 2000 Jan; 14(1):129-35; Ghetie et al., Mol Biotechnol. 2001 Jul; 18(3):251-68.

20 Pueden formarse multímeros bi- y tri-específicos por asociación de diferentes moléculas scFv, y han sido diseñados como reactivos de reticulación para reclutamiento de células T en tumores (inmunoterapia), redireccionamiento viral (terapia génica) y como reactivos de aglutinación de los glóbulos rojos de la sangre (inmunodiagnósticos), véase v.g. Todorovska et al., J Immunol Methods. 2001 Feb 1; 248(1-2):47-66; Tomlinson et al., Methods Enzymol. 2000; 326:461-79; McCall et al., J Immunol. 2001 May 15; 166(10):6112-7. Pueden prepararse anticuerpos totalmente humanos por inmunización de ratones transgénicos que llevan porciones grandes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas humanas. Estos ratones, ejemplos de los cuales son el Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) (Patentes U.S. NOs. 6,075,181 y 6,150,584), el HuMAb-Mouse™ (Medarex, Inc./GenFarm) (Patentes U.S. 5545806 y 5569825), el TransChromo Mouse™ (Kirin) y el KM Mouse™ (Medarex/Kirin), son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos pueden prepararse luego por, v.g. la técnica estándar del hibridoma o por presentación de fago. Estos anticuerpos contendrán entonces únicamente secuencias de aminoácidos totalmente humanas. Anticuerpos plenamente humanos pueden generarse también utilizando presentación de fago de bibliotecas humanas. La presentación de fago puede realizarse utilizando métodos bien conocidos por el profesional experto, como en Hoogenboom et al y Marks et al (Hoogenboom HR y Winter G. (1992) J Mol Biol. 227(2):381-8; Marks JD et al (1991) J Mol Biol. 222(3):581-97; y también en las Patentes U.S. 5885793 y 5969108).

Anticuerpos terapéuticos y usos

40 Las propiedades *in vivo*, particularmente con relación a la ratio tumor: sangre y la tasa de aclaramiento, de los anticuerpos de la invención serán al menos comparables a mAb175. Después de la administración a un individuo humano o animal, dicho miembro de fijación específica exhibirá una ratio pico de tumor a sangre >1:1. Preferiblemente, a dicha ratio el miembro de fijación específica tendrá también una ratio de tumor a órgano mayor

que 1:1, preferiblemente mayor que 2:1, más preferiblemente mayor que 5:1. Preferentemente, a dicha ratio el miembro de fijación específica tendrá también una ratio de órgano a sangre < 1:1 en órganos alejados del sitio del tumor. Estas ratios excluyen los órganos de catabolismo y secreción del miembro de fijación específica administrado.

- 5
- Los anticuerpos de la invención pueden marcarse con un marcador detectable o funcional. Marcadores detectables incluyen, pero sin carácter limitante, radiomarcadores tales como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc y ^{186}Re , que pueden unirse a los anticuerpos de la invención utilizando química convencional conocida en la técnica de la formación de imágenes de anticuerpos.
- 10 Los marcadores incluyen también marcadores fluorescentes y marcadores utilizados convencionalmente en la técnica para imágenes MRI-CT. Los mismos incluyen también marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante. Los marcadores incluyen además restos químicos tales como biotina que pueden detectarse por fijación a un resto detectable cognado específico, v.g. avidina marcada. Los marcadores funcionales incluyen sustancias que están diseñadas para direccionarse al sitio de un tumor para causar la destrucción del tejido tumoral.
- 15 Tales marcadores funcionales incluyen fármacos citotóxicos tales como 5-fluorouracilo o ricina, y enzimas tales como carboxipeptidasa o nitrorreductasa bacterianas, que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio de un tumor.

- Los anticuerpos 175 y/o sus subunidades pueden poseer ciertas aplicaciones de diagnóstico y pueden utilizarse por ejemplo para el propósito de detectar y/o medir condiciones tales como cáncer, lesiones pre-cancerosas, condiciones relacionadas con o resultantes del crecimiento celular hiperproliferativo, o análogas. Los anticuerpos 175 radiomarcados y sus fragmentos, son útiles en técnicas diagnósticas *in vitro* y en técnicas de obtención de radioimágenes *in vivo* así como en radioinmunoterapia. En el caso de la obtención de imágenes *in vivo*, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse a un agente de obtención de imágenes en lugar de uno o
- 20 más radioisótopos, incluyendo pero sin carácter limitante un agente intensificador de imágenes de resonancia magnética, en donde por ejemplo una molécula de anticuerpo está cargada con un gran número de iones paramagnéticos por medio de grupos quelantes. Ejemplos de grupos quelantes incluyen EDTA, porfirinas, poliaminas, éteres corona y polioximas. Ejemplos de iones paramagnéticos incluyen gadolinio, hierro, manganeso, renio, europio, lantano, holmio y ferbio. Los anticuerpos 175 radiomarcados y sus fragmentos, particularmente
- 25 radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para terapia del cáncer.

- Los anticuerpos 175 radiomarcados y sus fragmentos, son útiles en técnicas de cirugía radioinmuno-guiadas, en donde aquéllos pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células de cáncer, células pre-cancerosas, células tumorales, y células hiperproliferativas, antes de, durante o después de cirugía para eliminar
- 35 tales células. Los inmunoconjugados o proteínas de fusión de anticuerpos de la presente invención, en donde los anticuerpos 175 y sus fragmentos de la presente invención están conjugados o unidos a otras moléculas o agentes incluyen adicionalmente, pero sin limitación, anticuerpos 175 conjugados a un agente químico de ablación, toxina, inmunomodulador, citocina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o fármaco.

- 40 La radioinmunoterapia (RAIT) ha entrado en la clínica y demostrado eficacia utilizando diversos inmunoconjugados de anticuerpos. El anticuerpo del antígeno anti-carcinoembrionario (anti-CEA) humanizado marcado con ^{131}I , hMN-

14, ha sido evaluado en el cáncer colorrectal (Behr TM et al (2002) Cancer 94(4Suppl): 1373-81) y el mismo anticuerpo con marcador ⁹⁰Y ha sido valorado en el carcinoma medular de tiroides (Stein R et al (2002) Cancer 94(1):51-61). La radioinmunoterapia utilizando anticuerpos monoclonales ha sido evaluada y comunicada para el linfoma no-Hodgkin's y el cáncer de páncreas (Goldenberg DM (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39(1-2):195-201; Gold DV et al (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39 (1-2) 147-54). Métodos de radioinmunoterapia con anticuerpos particulares se describen también en las Patentes U.S. 6,306,393 y 6,331,175. La cirugía radioinmunoguiada (RIGS) ha entrado también en la clínica y demostrado eficacia y utilidad, incluyendo la utilización de anticuerpos anti-CEA y anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumores (Kim JC et al (2002) Int J Cancer 97(4):542-7; Schneebaum S et al (2001) World J Surg 25(12):1495-8; Avital S et al (2000) Cancer 89(8):1692-8; McIntosh DG et al (1997) Cancer Biother Radiofarm 12 (4):287-94).

Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse a un paciente que precise tratamiento por cualquier ruta adecuada, usualmente por inyección en el torrente sanguíneo o CSF, o directamente en el sitio del tumor. La dosis precisa dependerá de varios factores, que incluyen si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y la localización del tumor, la naturaleza precisa del anticuerpo (si es un anticuerpo entero, fragmento, diacuerpo, etc.), y la naturaleza del marcador detectable o funcional unido al anticuerpo. En el caso de un anticuerpo utilizado para terapia, una dosis simple máxima adecuada es aproximadamente 45 mCi/m², hasta un máximo de aproximadamente 250 mCi/m². La dosificación preferible está comprendida en el intervalo de 15 a 40 mCi, con un intervalo de dosis preferido adicional de 20 a 30 mCi, ó 10 a 30 mCi. Dicha terapia puede requerir reemplazo de médula ósea o de células madre. Una dosis de anticuerpos típica para obtención de imágenes de tumor o tratamiento de un tumor estará comprendida en el intervalo de 0,5 a 40 miligramos, preferiblemente de 1 a 4 mg de anticuerpo en la forma F(ab')₂. Los anticuerpos desnudos se administran preferiblemente en dosis de 20 a 1000 mg de proteína por dosis, o 20 a 500 mg de proteína por dosis, o 20 a 100 mg de proteína por dosis. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para muchachos y niños de corta edad, y ajustarse también para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, 2 veces por semana, semanal o mensualmente, a discreción del médico. Estas formulaciones pueden incluir una segunda proteína de fijación, tal como las proteínas de fijación de EGFR descritas anteriormente. En una forma especialmente preferida, esta segunda proteína de fijación es un anticuerpo monoclonal tal como 528 ó 225, considerados más adelante.

30 *Composiciones Farmacéuticas y Terapéuticas*

Los anticuerpos de la presente invención se administrarán usualmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de fijación específica. Así, las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para uso según la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, portador, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral, o por inyección, v.g. intravenosa.

40 Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden presentarse en forma de tableta, cápsula, polvo o líquido. Una tableta puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones

farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

5 Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de aflicción, el ingrediente activo se encontrará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está exenta de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Quienes poseen experiencia relevante en la técnica están perfectamente capacitados para preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactada. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones,
10 antioxidantes y/u otros aditivos, en caso requerido.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, terapéuticas o agentes, sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la condición a tratar. Adicionalmente, la presente invención contempla e incluye composiciones que comprenden el miembro de fijación, particularmente anticuerpo o fragmento
15 del mismo, descrito en esta memoria y otros agentes o terapéuticas tales como agentes o terapéuticas anti-cáncer, hormonas, agentes o anticuerpos anti-EGFR, o inmunomoduladores. Más generalmente, estos agentes anti-cáncer pueden ser inhibidores de tirosina-quinasa o inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores posteriores a la traducción, inhibidores del crecimiento o la división celular (v.g. anti-mitóticos), o inhibidores de transducción de señales. Otros tratamientos o terapéuticas pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos de
20 alivio del dolor tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (v.g. aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o anti-eméticos. La composición puede administrarse en combinación (sea secuencialmente (es decir antes o después) o simultáneamente) con inhibidores de tirosina-quinasa (que incluyen, pero sin carácter limitante, AG1478 y ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), doxorubicina, temozolomide, cisplatino, carboplatino, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxiaurea, 5-fluoruracilo, citosina-arabinósido,
25 ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina, lomustina, y/u otros agentes quimioterapéuticos. Así, estos agentes pueden ser agentes anti-EGFR específicos, o inhibidores de tirosina-quinasa tales como AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, o SU-6668 o puede ser agentes anti-cáncer y anti-neoplásicos más generales tales como doxorubicina, cisplatino, temozolomida, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxiaurea, 5-fluoruracilo, citosina-arabinósido, ciclofosfamida, epipodofilotoxin, carmustina, o lomustina. Adicionalmente, la composición puede administrarse con
30 hormonas tales como dexametasona, inmunomoduladores, tales como interleucinas, factor de necrosis de tumores (TNF) u otros factores de crecimiento o citocinas que estimulan la respuesta inmune y la reducción o eliminación de células de cáncer o tumores. Un inmunomodulador tal como TNF puede combinarse junto con un miembro de la invención en forma de un anticuerpo biespecífico que reconoce el epítipo EGFR 806 fijándose también a los receptores de TNF. La composición puede administrarse también con, o puede incluir combinaciones junto con otros
35 anticuerpos anti-EGFR, incluyendo, pero sin carácter limitante, los anticuerpos anti-EGFR 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62 y ABX-EGF.

Con anterioridad, el uso de agentes tales como doxorubicina y cisplatino en asociación con anticuerpos anti-EGFR ha producido actividad anti-tumor mejorada (Fan *et al*, 1993; Baselga *et al*, 1993). La combinación de doxorubicina
40 y mAb 528 daba como resultado la erradicación total de xenoinjertos establecidos de A431, mientras que el tratamiento con cualquiera de los agentes solo causaba únicamente inhibición temporal del crecimiento *in vivo* (Baselga *et al*, 1993). Análogamente, la combinación de cisplatino y cualquiera de mAb 528 ó 225 conducía

también a la erradicación de xenoinjertos A431 bien establecidos, lo que no se observaba cuando se utilizó tratamiento con cualquiera de los agentes (Fan *et al*, 1993).

Radioterapia Convencional

5 Adicionalmente, la presente invención contempla e incluye composiciones terapéuticas para uso del anticuerpo en combinación con radioterapia convencional. Se ha indicado que el tratamiento con anticuerpos direccionados a los receptores de EGF puede mejorar los efectos de la radioterapia convencional (Milas *et al.*, Clin Cancer Res.2000 Feb: 6(2):701 8, Huang *et al.*, Clin Cancer Res. 2000 Jun: 6(6):2166 74).

10 Se contemplan combinaciones del anticuerpo 175 o fragmento del mismo y terapéuticas anti-cáncer, demostrando particularmente las terapéuticas anti-EGFR, con inclusión de otros anticuerpos anti-EGFR, terapia eficaz, y particularmente sinergia, contra tumores xenoinjertados. La combinación de AG1478 y mAb175 es una combinación ilustrativa de este tipo. AG1478 (4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina) es un inhibidor potente y selectivo de la
15 quinasa del receptor de EGF y se describe particularmente en la Patente de los Estados Unidos No. 5,457,105 (véase también, Liu, W. *et al* (1999) J. Cell Sci. 112:2409; Eguchi, S. *et al* (1998) J. Biol. Chem. 273:8890; Levitsky, A. y Gazit, A. (1995) Science 267:1782). Se prevé y se contempla la sinergia terapéutica del anticuerpo 175 con otros anticuerpos anti-EGFR, particularmente con el anticuerpo anti-EGFR 528.

20 La presente invención contempla además composiciones terapéuticas útiles en la práctica de los métodos terapéuticos de esta invención. Una composición terapéutica objeto incluye, en mezcla, un excipiente farmacéuticamente aceptable (portador) y uno o más anticuerpos 175 o fragmento del mismo, como se describe en esta memoria como ingrediente activo. En una realización preferida, la composición comprende un antígeno capaz de modular la fijación específica del presente miembro de fijación/anticuerpo con una célula diana.

25 La preparación de composiciones terapéuticas que contienen polipéptidos, análogos o fragmentos activos como ingredientes activos es bien conocida en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, sea como soluciones líquidas o suspensiones. Sin embargo, pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en un líquido antes de la inyección. La preparación puede emulsionarse
30 también. El ingrediente terapéutico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o análogos y combinaciones de los mismos. Adicionalmente, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias adyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH que mejoran la eficacia del ingrediente activo. Un polipéptido, análogo o
35 fragmento activo puede formularse en la composición terapéutica como formas salinas neutralizadas farmacéuticamente aceptables. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la molécula de polipéptido o anticuerpo) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y análogos. Sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres pueden derivarse
40 también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etil-amino-etanol, histidina, procaína, y análogas.

Las composiciones terapéuticas que contienen polipéptido, análogo, o fragmento activo se administran convencionalmente por vía intravenosa, tal como por inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. El término “dosis unitaria” cuando se utiliza con referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para humanos, concediendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, portador, o vehículo.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar depende del individuo a tratar, la capacidad del sistema inmunitario del individuo para utilizar el ingrediente activo, y el grado de capacidad de fijación de EGFR deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para administración dependen del criterio del especialista y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, dosis adecuadas pueden comprender desde aproximadamente 0,1 a 20, con preferencia aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10, y más preferiblemente 1 a varios miligramos de ingrediente activo por kilogramo de peso corporal del individuo al día, y dependen de la ruta de administración. Los regímenes adecuados para administración inicial y dosis de refuerzo son también variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida por dosis repetidas a intervalos de una o más horas por inyección u otra administración subsiguiente. Alternativamente, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones de 10 nanomolar a 10 micromolar en la sangre.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden encontrarse en forma de tableta, cápsula, polvo, o líquido. Una tableta puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Para inyección intravenosa o inyección en el sitio de aflicción, el ingrediente activo se encontrará en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está exenta de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Quienes poseen una experiencia relevante en la técnica están perfectamente capacitados para preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactada. En caso requerido, pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Ensayos de diagnóstico

La presente invención se refiere también a una diversidad de aplicaciones diagnósticas, que incluyen métodos para detectar la presencia de estímulos tales como EGFR expresado de modo aberrante, por referencia a su capacidad para ser reconocido por el presente anticuerpo 175. Aplicaciones diagnósticas del o los anticuerpos de la presente invención incluyen aplicaciones *in vitro* bien conocidas y estándar para el profesional experto, y basadas en la presente descripción. Ensayos diagnósticos y kits para evaluación *in vitro* y evaluación del estatus de EGFR, particularmente con respecto a la expresión aberrante de EGFR, pueden utilizarse para diagnosticar, evaluar y monitorizar muestras de pacientes que incluyen aquéllos que padecen o se sospecha que padecen cáncer, una condición pre-cancerosa, una condición relacionada con crecimiento celular hiperproliferativo, o de una muestra de tumor. La valoración y evaluación del estatus EGFR es útil también en la determinación de la idoneidad de un

paciente para una prueba clínica de un fármaco o para la administración de un agente quimioterapéutico o miembro de fijación específica particular, particularmente un anticuerpo de la presente invención, con inclusión de combinaciones del mismo, frente a un agente o anticuerpo diferente. Este tipo de monitorización y evaluación diagnóstica se encuentra ya en práctica utilizando anticuerpos contra la proteína HER2 en el cáncer de mama (Test de Hercep, Dako Corporation), donde el ensayo se utiliza también para evaluar pacientes para terapia de anticuerpos utilizando Herceptina. Las aplicaciones *in vivo* incluyen la obtención de imágenes de tumores o evaluación del estatus de cáncer de individuos, con inclusión de la obtención de radioimágenes.

Como se ha sugerido anteriormente, el método diagnóstico de la descripción comprende examinar una muestra de células o medio mediante un ensayo que incluye una cantidad eficaz de un antagonista para un EGFR/proteína, tal como un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente mAb175 como se proporciona en esta memoria. Adicionalmente, es preferible que las moléculas de anticuerpo anti-EGFR utilizadas en esta memoria se encuentren en la forma de porciones Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) o moléculas de anticuerpo enteras. Como se ha expuesto previamente, pacientes capaces que pueden beneficiarse de este método incluyen aquéllos que padecen cáncer, una lesión pre-cancerosa, una infección viral, patologías que implican o son resultado de crecimiento celular hiperproliferativo u otro trastorno patológico análogo.

La presencia de EGFR en las células puede averiguarse por los procedimientos inmunológicos usuales *in vitro* o *in vivo* aplicables a tales determinaciones. Se conocen varios procedimientos útiles. Los procedimientos y su aplicación son todos ellos familiares para los expertos en la técnica, y según ello pueden utilizarse dentro del alcance de la presente descripción. En tales procedimientos, el EGFR forma complejos con uno o más anticuerpos o parejas de fijación y un miembro del complejo se marca con un marcador detectable. El hecho de que se ha formado un complejo y, en caso deseado, la cantidad del mismo, puede determinarse por métodos conocidos aplicables a la detección de marcadores. Los marcadores empleados más habitualmente para estos estudios son elementos radiactivos, enzimas, productos químicos que emiten fluorescencia cuando se exponen a luz ultravioleta, y otros. Se conocen varios materiales fluorescentes que pueden utilizarse como marcadores. Éstos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Rojo Texas, azul AMCA y Amarillo Lucifer. El anticuerpo EGFR o EGFR 175 puede marcarse también con un elemento radiactivo o con una enzima. El marcador radiactivo puede detectarse por cualquiera de los procedimientos de conteo disponibles actualmente. El isótopo preferido puede seleccionarse de ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ²¹¹At, ¹⁹⁸Au, ⁶⁷Cu, ²²⁵Ac, ²¹³Bi, ⁹⁹Tc y ¹⁸⁶Re. Son también útiles marcadores enzimáticos, que pueden detectarse por cualquiera de los métodos colorimétricos, espectrofotométricos, fluoroespectrofotométricos, amperométricos o gasométricos utilizados actualmente. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada por reacción con moléculas formadoras de puentes tales como carbodiimidas, diisocianatos, aldehído glutárico y análogos. Muchas enzimas que pueden utilizarse en estos procedimientos se conocen y pueden ser utilizadas. Las preferidas son peroxidasa, β-glucuronidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galactosidasa, ureasa, glucosa-oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Se hace referencia a las Patentes U.S. NOs. 3,654,090; 3,850,752; y 4,016,043 a modo de ejemplo para su descripción de materiales y métodos de marcación alternativos.

En un ejemplo adicional, pueden prepararse kits de test comerciales adecuados para uso por un médico especialista a fin de determinar la presencia o ausencia de expresión aberrante de EGFR, con inclusión, pero sin carácter limitante, de EGFR amplificado y/o una mutación de EGFR, en células diana sospechosas. De acuerdo con las

técnicas de ensayo expuestas anteriormente, una clase de tales kits contendrá al menos el EGFR marcado o su pareja de fijación, por ejemplo un anticuerpo específico para el mismo (anticuerpo 175), e instrucciones, por supuesto, dependiendo del método seleccionado, v.g., "competitivo", "sándwich", "DASP" y análogos. Los kits pueden contener también reactivos periféricos tales como tampones, estabilizadores, etc.

5

Conforme a lo anterior, puede prepararse un kit de test para la demostración de la presencia o capacidad de células para expresión aberrante o formas aberrantes de EGFR, que comprende:

- 10 (a) una cantidad predeterminada de al menos un componente reactivo marcado inmunoquímicamente obtenido por la fijación directa o indirecta del anticuerpo 175 o una pareja de fijación específica del mismo, a un marcador detectable;
- (b) otros reactivos; y
- 15 (c) instrucciones para uso de dicho kit.

Conforme a lo anterior, puede prepararse un sistema de ensayo para selección de fármacos potenciales eficaces para modular la actividad del EGFR, o la expresión aberrante de EGFR, y/o la actividad o fijación del anticuerpo (particularmente anticuerpo 175). El receptor o el anticuerpo puede introducirse en un sistema de test, y el fármaco prospectivo puede introducirse también en el cultivo de células resultante, examinándose después de ello el cultivo a fin de observar cualesquiera cambios en la actividad de fase S de las células, debida a a la adición del fármaco prospectivo solo, o debida al efecto de las cantidades añadidas del o los agentes conocidos.

25 Ácidos Nucleicos

La presente invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo 175 de la presente invención. El ácido nucleico incluye DNA y RNA. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención como se ha definido arriba.

30

La presente invención proporciona también constructos en la forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como se ha indicado arriba. La presente invención proporciona también una célula hospedadora recombinante que comprende uno o más constructos como se ha indicado arriba. Un ácido nucleico que codifica cualquier anticuerpo 175 como se proporciona forma en sí mismo un aspecto de la presente invención, como lo hace un método de producción del anticuerpo, método que comprende expresión del ácido nucleico codificante para ello. La expresión puede lograrse convenientemente por cultivo en condiciones apropiadas de células hospedadoras recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, puede aislarse y/o purificarse un miembro de fijación específica utilizando cualquier técnica adecuada, y utilizarse después según sea apropiado.

35

Los anticuerpos y moléculas y vectores de ácido nucleico codificante de acuerdo con la presente invención pueden proporcionarse aislados y/o purificados, v.g. a partir de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u

40

homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, exentos o sustancialmente exentos de ácido nucleico o genes de origen distinto que la secuencia codificante de un polipéptido con la función requerida. El ácido nucleico según la presente invención puede comprender DNA o RNA y puede ser total o parcialmente sintético. Sistemas para clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células hospedadoras diferentes son bien conocidos.

5 Células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas de baculovirus. Linajes de células de mamífero disponibles en la técnica para expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un hospedador bacteriano común preferido es *E.coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas tales como *E.coli* está bien establecida en la técnica. Para revisión, véase por ejemplo Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo está disponible también para los expertos en la técnica como opción para la producción de un miembro de fijación específica, véase por ejemplo para revisiones recientes, Raff, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560. Pueden seleccionarse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, con inclusión de secuencias promotoras, secuencias terminadoras, 15 secuencias de poliadenilación, secuencias intensificadoras, genes marcadores y otras secuencias en caso apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, v.g. de fago, o fagémido, en caso apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de DNA en 20 células y expresión génica, así como análisis de proteínas, se describen en detalle en *Short Protocols in Molecular Biology*, 2ª edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Así, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula hospedadora que contiene ácido nucleico codificante de un anticuerpo como se describe en esta memoria. Otro aspecto adicional proporciona un método que 25 comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula hospedadora. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. La introducción puede seguirse causando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, v.g. por cultivo de células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen. En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (v.g. cromosoma) de la célula hospedadora. La integración puede promoverse por inclusión de secuencias que promueven recombinación con el genoma, según técnicas estándar. La presente 30 invención proporciona también un método que comprende utilizar un constructo como se ha indicado arriba en un sistema de expresión a fin de expresar un anticuerpo o polipéptido como se ha indicado arriba.

Como se ha expuesto anteriormente, la presente invención se refiere también a una molécula o gen clonado de DNA recombinante, o una variante degenerada del mismo, que codifica un anticuerpo 175 o un fragmento del mismo, que 35 posee una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, y 6; preferiblemente una molécula de ácido nucleico. Como es bien conocido en la técnica, las secuencias de DNA pueden expresarse enlazando operativamente las mismas a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando dicho vector de expresión para transformar un hospedador unicelular apropiado.

40 En la selección de una secuencia de control de la expresión, se considerarán normalmente una diversidad de factores. Éstos incluyen, por ejemplo, la concentración relativa del sistema, su controlabilidad, y su compatibilidad con la secuencia de DNA o gen particular a expresar, particularmente en lo que respecta a estructuras potenciales

secundarias. Los hospedadores unicelulares adecuados se seleccionarán considerando, v.g., su compatibilidad con el vector seleccionado, sus características de secreción, su capacidad para plegar correctamente las proteínas, y sus requerimientos de fermentación, así como la toxicidad para el hospedador del producto codificado por las secuencias de DNA a expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión. Considerando estos y otros factores, una persona experta en la técnica podrá construir una diversidad de combinaciones vector/secuencia de control de la expresión/hospedador que expresarán las secuencias de DNA de esta invención en fermentación o en cultivo animal en gran escala.

Análogos, tales como fragmentos, puede producirse, por ejemplo, por digestión con pepsina de uno o más péptidos o material de anticuerpos. Otros análogos, tales como muteínas, pueden producirse por mutagénesis orientada estándar de secuencias codificantes de miembros de fijación específica. Los análogos que exhiben actividad afín al anticuerpo 175 tales como moléculas pequeñas, tanto si funcionan como promotores o como inhibidores, pueden identificarse por ensayos *in vivo* y/o *in vitro* conocidos. Una secuencia de DNA que codifica un anticuerpo 175 puede prepararse por síntesis en vez de clonarse. La secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados por métodos estándar y ensamblados en una secuencia codificante completa. Véase, v.g., Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair et al., Science, 223:1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259:6311 (1984). Las secuencias de DNA sintético permiten la construcción cómoda de genes que expresarán análogos de miembros de fijación específica o "muteínas". Alternativamente, pueden producirse muteínas codificantes de DNA por mutagénesis orientada de genes de miembros de fijación específica nativos o cDNAs, y pueden producirse directamente muteínas utilizando síntesis convencional de polipéptidos. Un método general para incorporación específica del sitio de aminoácidos no naturales en proteínas se describe en Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, Science, 244:182-188 (abril 1989). Este método puede utilizarse para crear análogos con aminoácidos no naturales.

La invención puede comprenderse mejor haciendo referencia a los Ejemplos no limitantes siguientes, que se proporcionan como ilustrativos de la invención. Los ejemplos que siguen se presentan a fin de ilustrar más detalladamente las realizaciones preferidas de la invención y no deberían interpretarse en modo alguno, sin embargo,

como limitantes de alcance general de la invención.

EJEMPLO 1

SUMARIO

El EGFR existe en dos conformeros bien definidos – restringido y no restringido. El conformero restringido, que se ha observado únicamente en formas del receptor exentas de ligando (y parcialmente ligadas), puede ser inducido por un ligando para formar el conformero no restringido, espalda con espalda. mAb806 reconoce un epítipo en algunas formas truncadas, sobreexpresadas o activadas del EGFR en la superficie celular, pero no reconoce el EGFR en las células normales no estimuladas. Otro anticuerpo afín, mAb175, reconoce también este epítipo inusual. Los presentes inventores han determinado las estructuras 3D del epítipo del péptido EGFR₂₈₇₋₃₀₂ unido a Fabs de los anticuerpos mAb806 y mAb175. En presencia del anticuerpo, el epítipo del péptido adopta una

conformación muy similar a la encontrada en ambas formas del receptor. Sin embargo, la fijación de los anticuerpos mAb806 o mAb175 a la estructura de EGFR tipo salvaje estaría prohibida por conflictos estéricos importantes del Fab con el dominio CR1 en ambas conformaciones restringida y no restringida. El examen de la conformación 3D del dominio CR1 sugería que la rotura de un enlace disulfuro inmediatamente delante del epítipo debería permitir que el dominio CR1 se abriera lo suficiente para permitir la fijación de cualquiera de los anticuerpos. El mutante cistina EGFR_{C271A/C283A} no sólo se fija a mAb806 y mAb175, sino que la estequiometría es 1:1 (es decir equivalente a mAb 528 que reconoce el dominio de fijación de ligando de EGFR L2). Mientras que mAb806 falla en cuanto a la inhibición del crecimiento *in vitro* de células que expresan EGFR tipo salvaje, mAb806 inhibe completamente, expresando la estimulación asociada al ligando de las células BaF/3 EGFR_{C271A/C283A}. Los resultados obtenidos por los presentes inventores indican que los mecanismos de fijación de los anticuerpos mAb806 y mAb175 requieren una forma del EGFR en la que el epítipo está expuesto preferentemente durante la activación del receptor o por truncación o sobreexpresión. Como secuencia, y en contraste con otros anticuerpos de EGFR, mAb806 se localiza preferentemente en el tumor en los pacientes de cáncer que sobreexpresan el EGFR. El mecanismo de acción sugiere nuevos métodos para la generación de anticuerpos para detección de tumores y para la mejora de la ratio anticuerpo/inhibidor de la destrucción de las células de cáncer con formas sobreexpresadas, truncadas o activadas de receptores en la familia EGFR.

SIGNIFICACIÓN

El EGFR está involucrado en la estimulación del crecimiento de muchos tumores humanos. Aunque se han utilizado inhibidores y antagonistas como agentes terapéuticos, el éxito se ha visto limitado, en parte por interferir con el EGFR en los tejidos normales y en parte por la acción temporal limitada de algunos de los agentes; es decir Abs que tienen acción más duradera. Los anticuerpos mAb806 y mAb175 reconocer una conformación inusual del receptor, que existe a menudo en las células tumorales, pero no en las células normales. El sitio de fijación tridimensional de estos anticuerpos en el EGFR identifica la conformación inusual, lo que explica su especificidad tumoral. Estos anticuerpos actúan sinérgicamente con otros agentes anti-EGFR para inducir una destrucción profunda del tumor en los ratones. Los resultados iniciales en pacientes de cáncer utilizando formas radiomarcadas de los anticuerpos confirman la selectividad para el tumor.

INTRODUCCIÓN

La comprensión de la activación del EGFR por su familia de ligandos ha sido retardada, pero estudios genéticos elegantes (1-3), biofísicos (4-8) y más recientemente cristalográficos (9-17) han revelado muchos de la serie compleja de cambios de conformación y eventos de agregación requeridos para activar el dominio tirosina-quinasa intracelular del EGFR (18). Entre estas complejidades es evidente que, en solución, el dominio extracelular de EGFR adopta al menos dos conformaciones fundamentales: una conformación restringida inactiva y un dímero activo no restringido o extendido, unido a ligando "espalda con espalda". El EGFR fue el primer receptor de factor de crecimiento que se asoció al cáncer (19; 20). El EGFR es activado por ligandos autocrinos (19; 21; 22) y, en una elevada proporción de gliomas avanzados, el dominio extracelular del receptor de EGFR está truncado (23; 24) y como consecuencia activado. A menudo, se requiere la activación del EGFR para el mantenimiento del estado maligno. Inversamente, excepto para un pequeño número de células en los folículos capilares y la glándula de Brunner, en organismos adultos el EGFR se expresa a niveles bajos y es inactivo durante la vida adulta.

Se han desarrollado dos clases principales de agentes para direccionamiento al EGFR: inhibidores de tirosina-quinasa (TKI's) y anticuerpos monoclonales (mAb's). Los TKI's tales como gefitinib (ZD1839) y erlotinib (OSI-774) se fijan competitivamente a la bolsa de ATP de EGFR para inhibir su activación. En contraste, los anticuerpos contra EGFR, tales como cetuximab (C 225) y panitumumab (ABX-EGFR) inhiben competitivamente la fijación de ligando y previenen con ello la activación del receptor. Ambas clases de inhibidores y anticuerpos exhiben actividad antitumoral importante en una gama de modelos de xenoinjerto de ratón dependientes de EGFR (25-29), habiendo sido aprobadas ambas en cánceres seleccionados que incluyen NSCL, pancreático, de cabeza y cuello, y de colon (30-32). Si bien las tasas de respuesta a estas terapéuticas de EGFR son modestas, se espera que la identificación con éxito de subconjuntos de pacientes que respondan análogamente al bloqueo de EGFR será capaz de mejorar los resultados para los pacientes. En el glioma, por ejemplo, la respuesta a Tarceva parece restringida en gran parte a un subconjunto de pacientes que son positivos dobles para EGFR Δ 2-7 (designado también EGFRvIII), la truncación extracelular del EGFR expresada comúnmente en el glioma, y PTEN (33). Si bien estas terapéuticas son prometedoras, su uso está restringido por toxicidades limitantes de la dosis, tales como erupción en la piel, que es resultado de una absorción importante de estos agentes en la piel normal donde la expresión de EGFR es notable.

Muchos gliomas sobreexpresan EGFR (23;24), debido predominantemente a la amplificación del gen EGFR. La amplificación del gen EGFR en el glioma está asociada también con un evento de mutación que conduce a la escisión de los exones 2-7 (34) y la expresión subsiguiente de una forma truncada EGFR Δ 2-7 parcialmente activada del EGFR (35;36), arriba mencionada. El EGFR Δ 2-7 contiene un péptido de fusión único el término N, resultante del empalme de los exones 1 y 8 y la inserción de una única glicina. Varios anticuerpos monoclonales dirigidos a este péptido juntural han sido descritos (34) y representan por tanto terapéuticas potenciales específicas para el EGFR Δ 2-7. Los presentes inventores generaron un panel de anticuerpos específicos EGFR Δ 2-7 utilizando células NR6 (como variante de 3T3 desprovista de miembro endógeno de la familia EGFR) que sobreexpresan este EGFR truncado. Si bien exhiben una fijación fuerte al EGFR Δ 2-7, algunos de estos anticuerpos se fijan también a EGFR tipo salvaje cuando está sobreexpresado, pero no cuando el mismo se expresa a niveles fisiológicos. El mejor descrito de estos anticuerpos, mAb806 (35; 37; 38), parece no fijarse a células que expresen menos de 1×10^5 EGFR en su superficie, pero sólo donde niveles de expresión mayores conducen a una población diferenciada de EGFR reactivo con mAb806 (5-10 % de la población total del receptor) (35, 37,38).

Estudios subsiguientes de mapeado de epítomos han demostrado que mAb806 se fija a un bucle cisteína corto entre los aminoácidos 287-302 en el dominio extracelular que está expuesto sólo transitoriamente cuando el EGFR cambia desde la conformación restringida a la extendida (23,28). Así, la reactividad de mAb 826 se encuentra sólo en células con condiciones favorables para la anulación de la restricción del receptor, tales como la presencia de mutaciones (v.g., EGFR Δ 2-7), sobreexpresión o activación del receptor. En el caso de sobreexpresión de EGFR, parece existir una anulación incrementada de la restricción como resultado tanto de activación de EGFR independiente de ligando como de cambios en la glicosilación (39). Estas condiciones son comunes en las células tumorales, pero son raras en los tejidos normales, permitiendo por ello que mAb806 se dirija preferentemente a las células tumorales en comparación con los tejidos normales, tales como el hígado. De hecho, los resultados de la prueba clínica de Fase I completada recientemente por los autores de la presente invención con una versión quimérica de mAb806 demuestran que el epítomo direccionado por este anticuerpo no se expresa en tejido normal, pero es accesible en una gama de tumores EGFR-positivos (28; 40). En los xenoinjertos, mAb806 tiene una actividad anti-tumor fuerte contra las células del glioma U87MG que expresan el EGFR Δ 2-7, así como una gama de

otros modelos que sobreexpresan el EGFR tipo salvaje en ausencia de esta mutación (28; 40). Adicionalmente, mAb806 exhibe actividad sinérgica anti-tumor en modelos animales cuando se utiliza en combinación con otras terapéuticas de EGFR, con inclusión de inhibidores de EGFR-quinasa (27) y anticuerpos (41), con epítomos no afines.

5

La secuencia de aminoácidos de EGFR entre los residuos cisteína 287 y 302 es suficiente para la fijación de mAb806. Sin embargo, mientras que la truncación encontrada en el EGFR Δ 2-7 expone claramente este bucle de cisteína para la fijación por mAb806, el mecanismo de fijación de mAb806-EGFR tipo salvaje ha sido resuelto sólo parcialmente. La estructura cristalina del EGFR se ha resuelto tanto para el dominio extracelular de longitud total como para el fragmento EGFR-ECD₁₋₅₀₁ unido al ligando. El análisis de estas estructuras demuestra que mAb806 no podría fijarse al EGFR restringido como se observa en la estructura ECD de longitud total (13) o al dímero no restringido, unido al ligando espalda con espalda observado con los constructos EGFR-ECD₁₋₅₀₁ (14) o EGFR-ECD₁₋₆₂₁ (42). Por esta razón, los autores de la presente invención han propuesto que mAb806 se fija a una forma parcialmente no restringida del EGFR tipo salvaje que existe entre los estados inactivo y activo. La incapacidad de mAb806 para fijarse al EGFR ligado no restringido se confirmó ulteriormente por preincubación de EGFR tipo salvaje que expresaba células BaF/3 con EGF en condiciones que prevenían la internalización del receptor. En estas condiciones, un porcentaje mayoritario del EGFR debería formar dímeros ligados espalda con espalda, previniendo así la fijación de mAb806; observación que se confirmó claramente (43). Sin embargo, el efecto del ligando sobre la fijación de mAb806 en estado estacionario, tal como podría ocurrir en células con un bucle autocrino fuerte EGFR/ligando, se desconoce. Es interesante que, mientras que la fijación de mAb806 al EGFR tipo salvaje de la superficie celular es dependiente de la conformación del receptor, en el sentido inmunológico, el epítomo no es conformacional, dado que mAb806 es una sonda excelente para EGFR en transferencias Western, es decir, es capaz de reconocer el receptor desnaturalizado. Evidentemente, la accesibilidad al epítomo tal como se determina por la conformación de EGFR, es el factor más crítico en lo que respecta a la fijación de mAb806, no la conformación del epítomo propiamente dicho. MAb806 se fija también a EGFR inmovilizado en plástico y chips de resonancia de plasmones de superficie (37).

10
15
20
25

En este informe, se describe, también la actividad biológica, especificidad y epítomo de otros anticuerpos, generados de igual manera que mAb806. A fin de comprender la especificidad singular de estos anticuerpos, se determinaron las estructuras 3D para el epítomo del péptido mAb806 (EGFR₂₈₇₋₃₀₂) unido al fragmento Fab de mAb806 y mAb175 y los fragmentos Fab libres. La orientación de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en el receptor y la conformación de este péptido unido al anticuerpo confirmaron que mAb806 tiene que unirse a una forma específica del EGFR y que esta forma tiene que plegarse de un modo diferente al EGFR tipo salvaje observado en la conformación restringida o extendida. Utilizando mutaciones puntuales, los autores de la invención han examinado la influencia de un bucle cisteína adyacente (aminoácidos 271-283) en la estructura de EGFR, y la reactividad mAb806/175 en este bucle parece restringir severamente la fijación de estos anticuerpos. Se expone la eficacia de mAb806 y 175 contra xenoinjertos DU145, un linaje de células de próstata que posee un bucle de estimulación autocrina TGF- α /EGFR fuerte, y la fijación de mAb806 radiomarcado a un paciente de cáncer de cabeza y cuello tratado en un escenario de Fase I (44).

30
35
40

RESULTADOS**Especificidad de mAb175**

5 Estudios de fijación preliminares sugerían que mAb175 exhibía especificidad similar para EGFR que mAb806. En las regiones CDR de mAb806 (IgG2b) y mAb175 (IgG1), las secuencias de aminoácidos son prácticamente idénticas, con sólo un aminoácido de diferencia en cada una (Figura 1). Todas estas diferencias preservan la carga y el tamaño de las cadenas laterales. Claramente, estos anticuerpos se han generado de modo independiente.

10 Se condujeron una serie de experimentos de inmunohistoquímica para analizar la especificidad de fijación de mAb175. mAb175 tiñe secciones de xenoinjertos A431 que sobreexpresan el EGFR (Figura 2A) y secciones de xenoinjertos de glioma U87MG.Δ2-7 que expresan el EGFR Δ2-7 (Figura 2A). En contraste, mAb175 no tiñe las secciones de xenoinjertos U87MG. El linaje de células U87MG expresa sólo niveles modestos del EGFR tipo salvaje (Figura 2A) y carece de bucle autocrino de EGFR detectable. Y lo que es más importante, mAb175 no se fija a secciones de hígado humano normal (Figura 2B). Así, mAb175 parece demostrar la misma especificidad que mAb806; es decir, detecta EGFR humano sobreexpresado y truncado, pero no el EGFR tipo salvaje expresado a niveles modestos.

Identificación del epítipo de mAb175

20 Dado que mAb175 se fija también al EGFRΔ2-7, en el cual están deletados los aminoácidos 6-273, y EGFR₁₋₅₀₁, el epítipo de mAb175 tiene que estar contenido dentro de los residuos 274-501. Durante la determinación del epítipo de mAb806, se expresaron una serie de fragmentos EGFR marcados con c-myc fusionados al término carboxi de GH humano, todos los cuales terminaban en el aminoácido 501 (45; 46). El mAb175 reaccionaba también con ambos fragmentos de EGFR 274-501 y 282-501 en transferencias Western, pero no detectaba fragmentos que comenzaran en el aminoácido 290 ó 298 (Figura Suplementaria 9). La presencia de todas las proteínas de fusión GH-EGFR se confirmó utilizando el anticuerpo c-myc, 9E10 (Figura Suplementaria 9). Por tanto, un determinante crítico del epítipo Pde mAb175 está localizado cerca del aminoácido 290. Por último, un fragmento 274-501 de EGFR con el epítipo de mAb806 deletado (EGFR Δ 287-302) era también negativo para fijación de mAb175 (Figura 9), lo que sugería que esta región determinaba análogamente la mayor parte de la fijación de mAb175.

Se utilizó un segundo método para caracterizar adicionalmente el epítipo de mAb175. Fragmentos que abarcaban dominios extracelulares del EGFR se expresaron en la superficie de levadura y se testaron respecto a fijación de mAb175 por inmunofluorescencia indirecta utilizando citometría de flujo. El mAb175 reconocía el fragmento de levadura 273-621, que corresponde al dominio extracelular del EGFR Δ2-7, pero no a los fragmentos 1-176, 1-294, 294-543 ó 475-621 (Figures 3A y 3B). Así, al menos parte del epítipo mAb175 tiene que estar contenido dentro de la región entre los aminoácidos 274-294, coincidiendo con los datos de inmunotransferencia de los autores de la invención utilizando fragmentos de EGFR. Dado que mAb175 se fija al fragmento desnaturalizado del 273-621 (Figura 3C), el epítipo tiene que ser de naturaleza lineal (Figura Suplementaria 9). Está claro que mAb806 y mAb175 reconocen una región y conformación similares del EGFR.

Utilizando resonancia de plasmones de superficie (BIAcore) se investigó la fijación de mAb175 al péptido EGFR

(²⁸⁷CGADSYEMEEDGVRKC₃₀₂(SEQ ID NO: 14)).El EGFR₂₈₇₋₃₀₂ se inmovilizó en la superficie del biosensor utilizando químicas de acoplamiento de amina, intercambio tiol-disulfuro o Pms-Ser. El último método inmoviliza el péptido exclusivamente por la cisteína N-terminal (47). mAb175 se unía al EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en todas las orientaciones (Tabla 1). La afinidad de mAb175 para EGFR₂₈₇₋₃₀₂ variaba desde 35 nM para acoplamiento Pms-serina a 154 nM para acoplamiento de amina. En todos los casos, la afinidad de fijación de mAb175 para EGFR₂₈₇₋₃₀₂ era menor que la obtenida para mAb806 (Tabla 1). Se determinó también la afinidad de mAb175 para dos fragmentos extracelulares diferentes del EGFR. mAb175 se fijaba al fragmento 1-501 con una afinidad similar a la obtenida utilizando el péptido (16 nM frente a 35 nM) (Tabla 1). Como era de esperar, la afinidad de mAb175 contra el dominio extracelular de longitud total 1-621, que puede formar la conformación restringida, era mucho menor (188 nM). Aunque mAb806 y mAb175 tienen afinidades similares para EGFR₂₈₇₋₃₀₂, mAb175 parece presentar una afinidad mayor para el dominio extracelular del EGFR (Tabla 1). Claramente, el epítipo de mAb175 está contenido dentro del EGFR₂₈₇₋₃₀₂ y, como mAb806, la afinidad de fijación al dominio extracelular del EGFR es dependiente de la conformación.

Tabla 1: Determinación BIAcore de afinidades de los anticuerpos para la fijación de mAb806 y mAb175 a los epítipos de EGFR

Fragmento de EGFR	K _D para mAb175 (nM)	K _D para mAb806 (nM)
287-302 (acoplamiento Pms-Ser)	35	16
287-302 (acoplamiento de Tiol)	143	84
287-302 (acoplamiento de amina)	154	85
1-501 (no puede formar restricción)	16	34
1-621 (puede formar restricción)	188	389

El panel de mutantes del fragmento 273-621 de EGFR, expresado en la superficie de levadura (45; 46), se utilizó para caracterizar la estructura fina del epítipo mAb175. mAb175 y mAb806 exhibían un patrón prácticamente idéntico de reactividad con los mutantes (Tabla 2). La rotura del enlace disulfuro 287-302 tenía sólo un efecto moderado sobre la reactividad del epítipo, dado que el anticuerpo se fijaba a todos los mutantes en C287 y a algunos pero no todos los mutantes en C302 (Tabla 2). Aminoácidos críticos para la fijación de mAb175 incluyen E293, G298, V299, R300 y C302 (Tabla 2). mAb175 parecía moderadamente más sensible a las mutaciones V299 y D297, pero mAb806 exhibía también fijación reducida a algunas mutaciones en estos sitios (Tabla 2). Una vez más, el epítipo mAb175 parece ser esencialmente igual que el epítipo reconocido por mAb806.

Tabla 2: Presentación de las mutaciones del epítipo 287-302 de EGFR en levadura y registros de fijación para mAb806 y mAb175

Mutante de EGFR	Fijación de mAb806	Fijación de mAb175
C287A	+	+
C287G	+	+

ES 2 609 915 T3

Mutante de EGFR	Fijación de mAb806	Fijación de mAb175
C287R	+	+
C287S	+	+
C287W	+	+
C287Y	+	+
G288A	++	++
A289K	++	++
D290A	++	++
S291A	++	++
Y292A	++	++
E293A	+	+
E293D	+	+
E293G	+	+
E293K	-	-
M294A	++	++
E295A	++	++
E296A	++	++
D297A	++	+ en contacto
D297Y	+	+
G298A	+	+
G298D	-	-
G298S	-	-
V299A	++	+ en contacto
V299D	-	-
V299K	++	+ en contacto
R300A	++	++
R300C	+	+
R300P	-	-
K301A	++	++
K301E	+	+
C302A	-	-

Mutante de EGFR	Fijación de mAb806	Fijación de mAb175
C302F	+	+
C302G	-	-
C302R	+	+
C302S	-	-
C302Y	+	+

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

Se examinó la actividad anti-tumor *in vivo* de mAb806 y mAb175 contra xenoinjertos de glioma U87MG. Δ 2-7. Se dejó que los xenoinjertos se establecieran durante 6 días antes del comienzo de la terapia de anticuerpos (3 veces por semana durante 2 semanas los días indicados). En este momento, el volumen medio del tumor era 100 mm³ (Figura 4A). El tratamiento con mAb175 dio como resultado una reducción en la tasa de crecimiento global del tumor comparado con el tratamiento con vehículo o mAb806 y era muy significativo el día 19 después de la inoculación ($P < 0,0001$ frente al control y $P < 0,002$ frente a ma 806), cuando el grupo de control se sacrificó por razones éticas. El volumen medio del tumor en este momento era 1530, 300 y 100 mm³ para los grupos de tratamiento con vehículo, mAb806 y mAb175, respectivamente (Figura 4A), confirmando que mAb175 presenta actividad anti-tumor contra los xenoinjertos que expresan el EGFR Δ 2-7.

Aun cuando las células U87MG expresan aproximadamente 1×10^5 EGFR por célula, mAb806 no es capaz de reconocer EGFR alguno de la superficie y, lo que no es sorprendente, no inhibe el crecimiento *in vivo* de U87MG. Adicionalmente, éstas células no co-expresan ligando alguno de EGFR. Se ensayó si el epítipo de EGFR se expone transitoriamente y es por tanto susceptible de ser reconocido por mAb806 y mAb175 en células que contienen un bucle autocrino de EGFR. El linaje de células de próstata DU145 expresa el EGFR tipo salvaje a niveles similares al observado en las células U87MG, pero, al contrario que las células U87MG, las células DU145 contienen una amplificación del gen TGF- α y exhiben por tanto un bucle autocrino EGFR/TGF- α . Tanto mAb175 como 806 se fijan a las células DU145 como se determinó por análisis FACS (Figura 4B) y ambos son capaces de inmunoprecipitar una pequeña proporción del EGFR extraído de estas células (Figura 4C). Ambas técnicas demostraban mayor fijación de mAb175; sin embargo, cuando se comparaba con mAb 528, que se fija al dominio L2, mAb175 y mAb806 se fijan sólo a un subconjunto de EGFR en la superficie de estas células (Figura 4B y 4C). Se hicieron observaciones similares con un segundo linaje de células de próstata (LnCap); (datos no presentados) y un linaje de colon (LIM1215) los dos cuales contienen también bucles autocrinos de EGFR (22;48). Claramente, mAb806 y mAb175 pueden reconocer sólo una pequeña proporción del EGFR en las células en presencia de un bucle de estimulación autocrino.

Dado que mAb175 y mAb806 se fijan más eficazmente al EGFR expresado en células DU145 que en células U87MG, se realizó un estudio para analizar la actividad anti-tumor de estos anticuerpos en xenoinjertos DU145 desarrollados en ratones lampiños. Se dejó que los xenoinjertos se establecieran durante 18 días antes del comienzo de la terapia (3 veces por semana durante 3 semanas los días indicados). En este momento, el volumen medio del tumor era 90 mm³ (Figura 4D). Tanto mAb175 como mAb806 inhibían el crecimiento de los xenoinjertos

DU145. El grupo de control se sacrificó el día 67 y tenía un volumen medio de tumor de 1145 mm³ comparado con 605 y 815 mm³ para los grupos mAb806 y mAb175 respectivamente ($p < 0,007$ and 0,02 respectivamente) (Figura 4D).

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

Con objeto de comprender los detalles moleculares del modo en que mAb806 y mAb175 podrían reconocer EGFR en algunas, pero no todas las conformaciones, se determinaron las estructuras cristalinas de fragmentos Fab para ambos anticuerpos en complejos con el epítipo de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ oxidado (a resolución 2,0 y 1,59 Å respectivamente, Figuras 5A y 5B) y solos (a resolución 2,3 Å y 2,8 Å, respectivamente). En ambos casos, las estructuras Fab libre y complejada eran esencialmente iguales y las conformaciones del péptido y los bucles CDR de los anticuerpos eran bien definidas (Figura 5). El epítipo adopta una estructura de cinta β , con un borde de la cinta apuntando hacia el Fab y V299 oculto en el centro del sitio de fijación de antígeno (Figura 5C-E). Ambos extremos del epítipo están expuestos a disolvente, lo que es consistente con el hecho de que estos anticuerpos fijan polipéptidos mucho más largos.

De los 20 residuos de anticuerpo en contacto con el epítipo, existen solamente dos sustituciones entre mAb806 y mAb175 (Figura 1). Los residuos de contacto de mAb175 son: S30, S31, N32, Y49, H50, Y91, F94, W96 en la cadena ligera, y D32, Y33, A34, Y51, S53, Y54, S55, N57, R59, A99, G100, R101 en la cadena pesada; los residuos de contacto de mAb806 son los mismos, con diferencias de secuencia para la cadena ligera, N30 y la cadena pesada, F33. EGFR₂₈₇₋₃₀₂ se fija al Fab por contactos estrechos entre los residuos peptídicos 293-302, teniendo lugar la mayor parte de los contactos entre los residuos 297 y 302. Los únicos enlaces de hidrógeno entre los átomos de la cadena principal de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ y el Fab corresponden a los residuos 300 y 302 (Figura 5F). El reconocimiento de la secuencia del epítipo ocurre a través de enlaces de hidrógeno de la cadena lateral con los residuos E293 (a H50 y R101 del Fab), D297 (a Y51 y N57), R300 (a D32) y K301 (por moléculas de agua a Y51 y W96). Contactos hidrófobos tienen lugar en G298, V299 and C302.

La conformación de la cadena principal del epítipo entre 293 y 302 era esencialmente idéntica en los cristales de Fab806 y Fab175 (desviación rms = 0,4 Å, para los átomos C α en estos residuos). Aunque constreñido por el enlace disulfuro, el término N del péptido (287-292) no está en contacto significativo con ninguna estructura de anticuerpo, y las conformaciones en esta región difieren. No obstante, este segmento en el complejo Fab806 aparece bastante desordenado. Y lo que es más interesante, la conformación del péptido EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en contacto con los anticuerpos está relacionada muy estrechamente con la conformación de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ observada en la cadena principal de las estructuras de EGFR restringida o no restringida (Li et al., 2005; Garrett et al., 2002). Para EGFR₂₈₇₋₃₀₂ del complejo Fab175, las desviaciones rms en las posiciones C α son 0,66 y 0,75 Å, respectivamente (Figura 5).

Para tener una idea más clara en cuanto al reconocimiento de EGFR por mAb806 y mAb175, se estudió la conformación del péptido EGFR₂₈₇₋₃₀₂ oxidado marcado con ¹⁵N por espectroscopía NMR en solución, libre y en presencia de 806 Fab (véanse los Datos Suplementarios para detalles). Para el péptido libre, se asignaron resonancias y se compararon con las correspondientes a un serpiente caprichoso. Esencialmente, el péptido libre adoptaba una estructura de serpiente caprichoso, no la cinta beta como se observaba en el EGFR nativo (14). Por

adición del Fab, se observaban cambios de resonancia. Sin embargo, debido a la débil señal procedente del ensanchamiento importante de las líneas después de adición del Fab y la cristalización con éxito de los complejos, la estructura en solución del complejo Fab806-epítipo no se continuó. Sin embargo, evidentemente, cuando el péptido se fija al fragmento Fab de mAb806 (o mAb175) parece ser que el Fab selecciona o induce la conformación del péptido que coincide con dicho péptido en el receptor nativo.

¿Por qué reconocen mAb806 y mAb175 solamente *algunas* conformaciones de EGFR? Se acopló el fragmento Fab de mAb175 a un dominio extracelular de EGFR (monómeros restringidos y no restringidos) por superposición de EGFR₂₈₇₋₃₀₂. Para un fragmento como Δ2-7 no había conflictos estéricos importantes con el receptor. En la forma no restringida había sustancialmente más área superficial accesible del Fab oculta (920 Å² comparada con 550 Å² en la forma restringida). Por tanto, este antígeno puede establecer contactos adicionales con regiones del anticuerpo distintas de CDR, como se indica por los mutantes de expresión de levadura (45). Inversamente, acoplando el ectodominio de EGFR entero al Fab, se produce un solapamiento espacial sustancial con la parte del dominio CR1 que precede al epítipo (residuos 187-286) y que pasa por el centro del Fab (Figura 5D, E). Por tanto, dado que el dominio CR1 tiene esencialmente la misma estructura en las conformaciones restringida o no restringida, mAb806 o mAb175 serán incapaces de fijarse a cualquier forma de EGFR. Claramente, tiene que existir una diferencia entre la orientación del epítipo con respecto al dominio CR1 en cualquiera de las conformaciones conocidas del EGFR tipo salvaje y la orientación que permite la fijación del epítipo. La inspección del dominio CR1 indicaba que el enlace disulfuro (271-283) que precede a EGFR₂₈₇₋₃₀₂ constriñe el polipéptido que bloquea el acceso al epítipo; sería de esperar que la rotura de este disulfuro, aun cuando no está involucrada en la fijación directa a los anticuerpos, permitiera el despliegue parcial del dominio CR1 de tal modo que mAb175 o mAb806 pudieran lograr acceso al epítipo.

La rotura del enlace disulfuro de EGFR 271-283 aumenta la fijación de mAb806

Los enlaces disulfuro de las proteínas proporcionan rigidez estructural incrementada, pero en algunos receptores de la superficie celular, particularmente los de citocinas y factores de crecimiento, la rotura transitoria de enlaces disulfuro y el intercambio de disulfuro pueden controlar la función del receptor (49). Dado que éste era un mecanismo por el cual mAb806 y mAb175 podrían lograr acceso a su sitio de fijación, se intentó aumentar la accesibilidad del epítipo por mutación de uno cualquiera o ambos residuos cisteína en las posiciones 271 y 283 a residuos alanina (C271A/C283A). Los vectores capaces de expresar EGFR C271A-, C283A-o C271A/C283A-de longitud total se transfectaron en el linaje de células Ba/F3 dependientes de IL-3. Se seleccionaron clones Ba/F3 estables que expresaban el EGFR C271A y C271A/C283A mutante a niveles equivalentes al EGFR tipo salvaje (Figura 6A). No se observaron células Ba/F3 que expresaran niveles altos de EGFR C283A mutante. Como se ha descrito anteriormente, el EGFR tipo salvaje reacciona débilmente con mAb806; sin embargo, los receptores mutantes reaccionaban con igual fuerza con mAb528, mAb806 y el anticuerpo anti-FLAG, lo que sugería que el receptor se expresa en la superficie de la célula, está plegado correctamente y que el epítipo para mAb806 es completamente accesible en tales casos. Para confirmar que mAb806 reconoce el mutante C271A/C283A más eficientemente que el EGFR tipo salvaje, se determinó la ratio de mAb806 que se fijaba a la fijación de mAb528. Dado que tanto el EGFR tipo salvaje como C271A/C283A estaban marcados en el terminal N con FLAG, se determinó también la ratio de fijación de mAb806 y mAb528 al anticuerpo M2. Como se indicado anteriormente, mAb806 reconocía sólo una pequeña proporción del EGFR tipo salvaje total expresado en la superficie de las

células Ba/F3 (la ratio de fijación mAb806/528 es 0,08) (Tabla 3). En contraste, MAb806 reconocía virtualmente la totalidad del EGFR mutante C271A/C283A expresado en la superficie celular (una ratio de fijación mAb806/528 de 1,01) (Figura 6A y Tabla 3).

5 **Tabla 3:** Reactividad de mAb806 reactivity con células que expresan el EGFR tipo salvaje o EGFR C271A/C283A

Linaje de células	Ratios de fijación de anticuerpo		
	mAb 528/M2	mAb806/M2	mAb806/mAb 528
EGFR-FLAG tipo salvaje	1,37	0,11	0,08
EGFR tipo salvaje	-	-	0,07
C271/283A*	1,08 ± 0,10	1,09 ± 0,38	1,01 ± 0,13
*Media de 4 clones independientes			

La mutación de las dos cisteínas no ponía en compromiso la fijación de EGF o la función del receptor. Las células BaF3 que expresan el EGFR 271A/C283A mutante proliferan en presencia de EGF (Figura 6B). Se ha observado reproduciblemente un desplazamiento a la izquierda en la curva dosis-respuesta para EGF en células que expresan las mutaciones C271A/C283, lo que sugiere mayor afinidad para el ligando, o un potencial de señalización intensificado para el receptor mutante. El análisis por transferencia western confirmó que el mutante C271A/C283A se expresa a niveles similares al EGFR tipo salvaje y está fosforilado en la tirosina en respuesta a la estimulación de EGFR (Figura 6C). Consistentemente con estudios previos en otros linajes de células, mAb806 no tiene efecto alguno sobre la proliferación inducida *in vitro* por EGF proliferation de células Ba/F3 que expresan el EGFR tipo salvaje, mientras que el mAb 528 bloqueante del ligando inhibe por completo la proliferación inducida por EGF de estas células (Figura 6D, *panel izquierdo*). En contraste, mAb806 eliminaba totalmente por ablación la proliferación inducida por EGFR en células BaF3 que expresaban el mutante C271/283A (Figura 6D, *panel derecho*). Cuando se rompe el bucle de cisteínas 271-283, no sólo mAb806 se fija más eficazmente, sino que una vez fijado, mAb806 previene la proliferación inducida del ligando.

20

Estudio de Imagen en Fase I en el Cáncer de Cabeza y Cuello

Ocho pacientes [1 mujer y 3 varones; edad media de 61 años (intervalo 44-75)] completaron esta prueba en fase 1 como se indica (44). Todos los pacientes satisfacían los criterios de inclusión y, excepto para el paciente 8 (que padecía un tumor primario cerebral), todos ellos padecían enfermedad metastásica al comienzo del estudio. En todos los pacientes se observaba la absorción del anticuerpo por el tumor, y ¹¹¹In-ch806, la versión chimerizada de mAb806, demostraba una absorción rápida y de alto nivel en el tumor (Figura 7). El aclaramiento de ¹¹¹In-ch806 de los órganos normales (hígado, pulmones, riñón y bazo) no exhibía diferencia alguna entre los niveles de dosis (44). En particular, el aclaramiento del hígado no exhibía diferencia alguna entre los niveles de dosis, lo que indicaba la ausencia de compartimiento de antígeno saturable en el hígado para ch806. La absorción total en el hígado era un máximo de 14,45 ± 2,43 %ID inmediatamente después de la infusión, y descendía a 8,45 ± 1,63 %ID a las 72 horas, y 3,18 ± 0,87 %ID una semana después de la infusión. Esto está en contraste acusado con la absorción de anticuerpos para EGFR tipo salvaje (v.g. 225), que se ha demostrado alcanza más de 30 %ID en el hígado (para una dosis de 40 mg) durante más de 3 días después de la infusión (50).

30

La absorción pico medida del tumor de ^{111}In -ch806 ocurría 5-7 días después de la infusión. El cálculo de la absorción cuantitativa del tumor en los pacientes 1 y 3 no pudo realizarse exactamente debido a la proximidad de la lesión diana al conjunto de sangre cardiaco y el movimiento del paciente. La absorción pico de ch806 en el tumor oscilaba desde 5,21 a $13,73 \times 10^{-3}$ %ID/g de tejido tumoral. El cálculo de la concentración real de ch806 en el tumor indicaba valores pico de (media \pm SD) $0,85 \pm 0$ $\mu\text{g/g}$ (5 mg/m^2), $0,92 \pm 0$ $\mu\text{g/gm}$ (10mg/m^2), $3,80 \pm 1,10\mu\text{g/gm}$ (20mg/m^2), y $7,05 \pm 1,40\mu\text{g/gm}$ (40mg/m^2).

DISCUSIÓN

10 Cuando los niveles de actividad del EGFR o el erbB2 afín se perturban, anticuerpos tales como cetuximab y herceptina, que están direccionados a miembros de la familia EGFR, son opciones importantes para tratamiento del cáncer. La determinación de los sitios de fijación para estos anticuerpos, las estructuras 3D tanto de los receptores diana como más recientemente, los complejos anticuerpo: receptor, ha mejorado nuestra comprensión del modo en que estos anticuerpos interfieren con la activación del receptor. Estos estudios han sugerido también que el
15 direccionamiento de otros epítomos en esta familia de receptores puede producir nuevas oportunidades para la utilización de combinaciones de anticuerpos a fin de mejorar el tratamiento del cáncer.

Lamentablemente, todos los anticuerpos terapéuticos anti-EGFR disponibles actualmente reconocen el EGFR tipo salvaje, que se expresa prácticamente en todos los tejidos normales. El EGFR expresado en los tejidos normales no
20 sólo representa un gran sumidero para los anticuerpos, sino que los mismos son probablemente críticos en la toxicidad limitante de la dosis (tal como erupción en la piel) observada y hacen imposible el uso de conjugados anticuerpo/citotóxico. A pesar de estos problemas, debe indicarse que la mayoría de los tejidos normales parecen carecer de EGFR activado, por lo que la neutralización de los anticuerpos anti-EGFR parece no tener un efecto acusado sobre la señalización homeostática vital. En contraste, muchos tumores contienen EGFR activado, sea por
25 mecanismos autocrino/paracrino, truncación, mutación, amplificación génica y/o sobreexpresión. Es importante que el EGFR activado parece contribuir a la tumorigenicidad por intensificación del movimiento celular, proliferación, invasión, angiogénesis y supervivencia de las células tumorales. Por consiguiente, la administración de anticuerpos anti-EGFR o inhibidores de la EGFR-quinasa puede disminuir el crecimiento y la supervivencia de las células del tumor. Los anticuerpos dirigidos al péptido juntural único en el EGFR Δ 2-7 tienen el potencial de direccionarse a
30 varios tumores (51) sin las dificultades asociadas con la absorción de tejido normal. En el glioma, la expresión del EGFR Δ 2-7 va acompañada por sobreexpresión del EGFR tipo salvaje que no sería inhibido por otros anticuerpos EGFR Δ 2-7, pero debería ser inhibido por mAb806 o mAb175.

Previamente, los autores de la invención han descrito un anticuerpo, mAb806, que fue generado contra células que
35 expresan EGFR Δ 2-7. mAb806 no sólo se fija a este receptor truncado, sino que se fija también a EGFR tipo salvaje sobreexpresado. MAb806 reconoce un epítomo contenido dentro de un bucle cisteína (aminoácidos 287-302) que es accesible en el EGFR Δ 2-7, pero no en el EGFR tipo salvaje cuando se expresa a niveles bajos a moderados en las células y en ausencia de ligandos. Análogamente, el dominio extracelular de longitud total purificado de EGFR (EGFR $_{1-621}$). Se encontró que el epítomo para este anticuerpo está próximo a la región bisagra del dominio
40 extracelular de EGFR que sufre cambio de conformación durante la formación del estado activo. Adicionalmente, el epítomo no sólo está oculto en la conformación inactiva, sino que parece también estar inaccesible en el dímero de EGFR no restringido unido a ligando espalda con espalda. Las interesantes propiedades de mAb806 incitaron a los

autores de la invención a reanalizar otros hibridomas que expresen los anticuerpos monoclonales aislados de la fusión inicial (38). En selecciones preliminares, uno de éstos, mAb175, parecía tener propiedades de fijación de EGFR similares a mAb806. Las secuencias de aminoácidos dentro de sus bucles CDR son notablemente similares (90 % de identidad de secuencia), y estas diferencias preservan el tamaño y la carga de la cadena lateral relevante.

5 Al igual que mAb806, el mAb175 tiñe las células tumorales que sobreexpresan el EGFR o que expresan el EGFR Δ 2-7, pero no las células con niveles moderados del EGFR tipo salvaje, v.g. el hígado humano. Un mapeado de epítomos detallado demostró que mAb175 no sólo se fija al mismo bucle de cisteína que mAb806, sino que tiene también un perfil de fijación cuasi-idéntico a una serie de mutantes que contienen mutaciones puntuales en este bucle. Además, ninguno de los anticuerpos requería que el enlace disulfuro del epítomo estuviera intacto para la
10 fijación.

Tanto mAb806 como mAb175 poseen actividad antitumoral contra xenoinjertos de glioma humano que expresan el EGFR Δ 2-7, y ambos inducen un retardo significativo en el crecimiento del tumor, aunque mAb175 parecía ligeramente más potente en este modelo. Es interesante que mAb806 y mAb175 se fijan al EGFR expresado en las
15 células de próstata DU 145, un linaje de células que expresa niveles modestos de EGFR pero secreta una cantidad significativa de TGF- α (52) de manera autocrina. Como el caso de los linajes de células que sobreexpresan el EGFR, ambos anticuerpos fijan solamente una pequeña proporción del EGFR de la superficie en las células DU145. Sin embargo, los dos anticuerpos inhiben el crecimiento de los xenoinjertos de DU145 en ratones lampiños. Así, parece que la presencia de ligando en condiciones fisiológicas aumenta la disponibilidad de la forma de transición
20 del EGFR reconocida por estos anticuerpos y que el direccionamiento de esta forma es suficiente para regular en sentido decreciente el crecimiento celular impulsado por EGFR.

Esta clase de anticuerpos anti-EGFR puede muy bien tener una acción antitumoral aún mayor que la considerada inicialmente. Además, la actividad sinérgica de mAb806, cuando se utiliza en combinación con otras terapéuticas de
25 EGFR (41), sugiere un papel terapéutico inmediato para los anticuerpos de esta clase. mAb806 se fija también a las células tumorales que contienen mutaciones asociadas con el cáncer que activan la quinasa de EGFR. mAb806 y mAb175 se fijan selectivamente a células que tienen un EGFR activado y pueden ser reactivos útiles para identificación y/o monitorización de pacientes que respondan verosímilmente a las terapéuticas de EGFR aprobadas actualmente.

30 Los estudios estructurales realizados por los autores de la invención con el epítipo de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ indican que tanto mAb806 como mAb175 reconocían el mismo motivo estructural 3D. Los residuos peptídicos en contacto con mAb806 y mAb175 exhibían estructuras casi idénticas en ambos casos, lo que sugería que ésta es la conformación de estos aminoácidos, encontrados en EGFR Δ 2-7, el antígeno generador. De hecho, la cadena peptídica principal
35 de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ observada en las estructuras anticuerpo/péptido coincide estrechamente con la existente en las dos conformaciones conocidas de la estructura de EGFR. Sin embargo, la orientación del epítipo en estas estructuras impediría el acceso del anticuerpo a los aminoácidos relevantes: esto es consistente con la observación experimental de que el anticuerpo 806 no se fija a EGFR tipo salvaje. La inspección detallada de la estructura de EGFR generaba otra posibilidad interesante. El epítipo de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ cuelga de un segundo bucle unido por
40 disulfuro (aminoácidos 271-283) y la rotura de este enlace disulfuro debería permitir el acceso al bucle de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ sin cambiar la conformación de la cadena principal del epítipo (véase la Figura 8). Los resultados obtenidos por los autores de la invención con el mutante de EGFR C 271A/C 283A indican que el dominio CR1 debe abrirse para

permitir que mAb806 y 175 se fijen estequiométricamente al receptor mutante. Este receptor mutante puede adoptar todavía una conformación nativa dado que es plenamente sensible a la estimulación de EGF pero, al contrario que el EGFR tipo salvaje, es totalmente inhibido por mAb806.

5 En la superficie de las células que sobreexpresan el EGFR tipo salvaje, existe claramente una sub-población de receptores en los cuales el epítipo de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ está accesible para la fijación de mAb806 o mAb175. Si bien el acceso ocurre muy fácilmente durante la activación del receptor, no está claro todavía si esta sub-población de receptores son aquéllos que se encuentran en transición de conformación a la forma no restringida, los que se hallan en transición de la forma no restringida al estado ligado activado, o si existe una oxidación incompleta en un subconjunto del EGFR en el cual el enlace disulfuro entre 271 y 283 se ha deteriorado (reducido). Si existe de hecho
10 una forma reducida de EGFR en la superficie de las células del cáncer, los datos de los inventores demuestran claramente que la misma es probablemente activa y capaz de iniciar la señalización celular. La capacidad de mAb806 para inhibir el crecimiento de xenoinjertos que sobreexpresan el EGFR tipo salvaje, a pesar de fijarse solamente a una pequeña sub-población de receptores y de no inhibir la señalización aguas abajo del EGFR, sigue siendo un enigma. Por esta razón, el concepto de que mAb806 se fija a un sub-conjunto único de EGFR que tiene propiedades de señalización inusuales ha sido siempre atractivo, debido especialmente a su extraordinaria sinergia con otras terapéuticas de EGFR. Si existe en la superficie celular de las células de cáncer, un EGFR reducido en el disulfuro 271-283 podría representar esta forma singular del EGFR. Finalmente, debería recordarse que, si bien la delección en el EGFR Δ 2-7 es muy grande, la misma termina en el aminoácido 273. El EGFR Δ 2-7 carece de este
20 enlace disulfuro y se sabe que tiene propiedades de señalización diferentes del EGFR tipo salvaje. Por otra parte, la activación de las mutaciones de quinasa, los bucles autocrinos y la infra-glicosilación del EGFR aumentan también la reactividad de mAb806 por aumentar la activación del receptor, presumiblemente sin necesidad de romper el disulfuro 271-283. Estas observaciones respaldan el concepto de que el dominio CR1 puede plegarse para permitir el acceso a EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en algún punto durante la activación de EGFR, pero está protegido contra el plegamiento en los estados restringido y fijado a ligando. Los inventores están realizando actualmente estudios continuados para determinar si el EGFR reconocido por mAb806 contiene un enlace disulfuro 271-283 reducido.

El análisis de los resultados de nuestra prueba en Fase I de 806 quimérico (ch806) confirmó que el epítipo direccionado por mAb806 es específico de tumor. El análisis cuantitativo de la biodistribución demuestra claramente
30 la absorción rápida y específica de ch806 en el tumor. Estos datos son consistentes con el direccionamiento cuantitativo máximo de anticuerpos a antígenos expresados en células de cáncer y notablemente superior a los valores de los anticuerpos de EGFR tipo salvaje para dosis equivalentes (44; 50). La absorción de ch806 en todos los tejidos normales (con inclusión del hígado) era baja, lo que indicaba la ausencia de pruebas de la fijación a EGFR tipo salvaje en el tejido normal, y en el hígado presentaba sólo actividad en la agrupación de sangre y un catabolismo poco importante de ¹¹¹In-quelato libre. Esto se diferencia claramente de los anticuerpos que direccionan EGFR tipo salvaje (v.g. 225; cetuximab), que se ha demostrado tienen una absorción muy alta (20-30 %ID) en hígado retenida durante más de 72 horas después de la infusión, a pesar de administrarse grandes dosis de proteína (hasta 300 mg) (50). Adicionalmente, los anticuerpos para EGFR tipo salvaje requieren grandes dosis de carga para saturar el tejido normal antes que sea evidente la absorción en el tumor (50), y tienen también una
40 toxicidad limitante de la dosis de fijación del anticuerpo a EGFR tipo salvaje en la piel y el intestino (53). Estos resultados indican que mAb806 no se direcciona al tejido normal en los humanos, y el análisis cuantitativo de la biodistribución confirma la especificidad tumoral del epítipo de EGFR direccionado por mAb806 *in vivo*.

El direccionamiento del epítipo de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ con anticuerpos derivados de mAb806 o mAb175 es una vía de ataque del EGFR activado en las células de cáncer con absorción mínima en tejido normal. La activación del receptor puede ser resultado de muchos de los mecanismos asociados con el cáncer. Asimismo, y lo que posiblemente es más importante, estos anticuerpos pueden utilizarse para direccionar citotóxicos, nano-partículas terapéuticas, siRNA y radioisótopos directamente al sitio de tumor. Por último, estos estudios confirman que mAb806 y mAb175 son herramientas valiosas para ayudar al mapeado de aquellos eventos asociados con la activación de EGFR en la superficie celular.

En la comprensión, a nivel molecular, del modo en que un anticuerpo puede reconocer formas aberrantes y activadas de un receptor de factores de crecimiento pero no el receptor tipo salvaje inactivo, este trabajo puede utilizarse para generar anticuerpos para otras dianas para terapéuticas del cáncer, por ejemplo otros miembros de la familia EGFR. Un método podría utilizar el mutante de disulfuro EGFR-C 227A/C 283A que se fija estequiométricamente a los anticuerpos mAb806 y mAb175. Si las perturbaciones de conformación observadas para EGFR ocurren también cuando erbB2, erbB3 o erbB4 se sobreexpresan o activan continuamente, entonces los mutantes de disulfuro homólogos de estos receptores pueden actuar como inmunógenos para la creación de otros anticuerpos de direccionamiento a miembros de la familia EGFR con selectividad para tumores. Adicionalmente, cuando las células tumorales sobreexpresan otros receptores, particularmente aquéllos con dominios ricos en disulfuro tales como Trk, una proporción de estos receptores puede plegarse parcialmente de modo erróneo debido a la infra-glicosilación o romper transitoriamente los enlaces disulfuro. Es imaginable que un mutante disulfuro o receptores truncados podrían utilizarse análogamente como inmunógenos para generar potencialmente anticuerpos que reconozcan otros receptores expresados de modo aberrante.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

25 Linajes de Células

El linaje de células U87MG.Δ2-7(54) transfectadas con EGFR Δ2-7 y el linaje A431 (2) han sido descritos anteriormente. El linaje de células de próstata independientes de hormonas DU145(55) se obtuvo de la ATCC (atcc.org). Véanse los Datos Suplementarios para condiciones de crecimiento de los linaje de células.

30

Anticuerpos, Fabs y péptidos

mAb806 y mAb175 se produjeron y purificaron en la Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne). Para preparación y caracterización de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y epítipos peptídicos, véanse los Datos Suplementarios.

35

Mapeado de mAb175 utilizando fragmentos de EGFR expresados en células de mamífero y levadura

El mapeado se realizó como se describe en los Datos Suplementarios.

40

Resonancia de plasmones de superficie (BIAcore)

Se utilizó para todos los experimentos un BIAcore 3000. Los péptidos que contenían el epítipo putativo de mAb806 se inmovilizaron en un chip sensor CM5 utilizando acoplamiento con amina, tiol o Pms a un caudal de 5 µl/min(47).

- 5 Los mAb806 y mAb175 se sometieron a pasos sobre la superficie del sensor a un caudal de 5µl/min a 25°C. Las superficies se re-generaron entre las operaciones por inyección de HCl 10 mM a un caudal de 10µl/min.

Inmunoprecipitación y transferencia Western

- 10 Las células se lisaron con tampón de lisis (1% Triton X-100, HEPES 30 mM, NaCl 150 mM, fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo 500 mM, aprotinina 150 nM, inhibidor de proteasa E-64 1 mM, EDTA 0,5 mM, y leupeptina 1 mM, pH 7,4) durante 20 min, se clarificaron por centrifugación a 14,000 x g durante 30 min, se inmunoprecipitaron con los anticuerpos relevantes a una concentración final de 5 µg/ml durante 60 min y se capturaron mediante perlas de Sepharose-A durante una noche. Las muestras se eluyeron luego con Tampón de
- 15 Muestra 2X NuPAGE SDS (Invitrogen), se resolvieron en geles NuPAGE (de 3-8% o 4-12%), se sometieron a electrotransferencia a membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) y se sondaron luego con los anticuerpos relevantes antes de detección por radiografía de quimioluminiscencia.

Inmunohistoquímica

- 20 Se tiñeron secciones congeladas con 5 µg/mL de mAb175 o control isotipo irrelevante durante 60 min a la temperatura ambiente. El anticuerpo fijado se detectó utilizando el sistema de detección HRP Dako Envision+ según las instrucciones del fabricante. Las secciones se lavaron finalmente con agua, se sometieron a contratinción con hematoxilina y se montaron.

25

Modelos de Xenoinjerto

- Células U87MG.Δ2-7 (3×10^6) el 100 µL de PBS se inocularon subcutáneamente en ambos flancos de ratones lampiños hembra Balb/c de 4 a 6 semanas de edad (Animal Research Centre, Perth, Australia). Todos los estudios
- 30 se realizaron utilizando modelos de tumor establecidos como se ha indicado anteriormente (41). El tratamiento comenzó una vez que los tumores habían alcanzado el volumen medio indicado en la leyenda de la Figura apropiada. El volumen de tumor en mm^3 se determinó utilizando la fórmula $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$, donde longitud era el eje más largo y anchura era la medida perpendicular. Los datos se expresan como volumen medio de tumor \pm SE para cada grupo de tratamiento. Todos los datos se analizaron respecto a significación por el test de Student de
- 35 un solo lado donde $p < 0,05$ se consideraba estadísticamente significativo. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Animal Ethics Committee del hospital de Austin.

Generación y caracterización de linajes de células estables que expresan constructos mutantes de EGFR

- 40 Se generaron mutaciones del EGFR (tipo salvaje) utilizando un kit de mutagénesis orientada (Stratagene, La Jolla, CA). La plantilla para cada mutagénesis era el cDNA de EGFR humano (número de acceso x00588)(2). Se realizó una secuenciación de nucleótidos automática de cada constructo para confirmar la integridad de las mutaciones de

EGFR. Se transfectaron EGFR tipo salvaje y mutante (C 173A/C 281A) en células BaF/3 por electroporación. Detalles adicionales acerca de la caracterización de los linajes de células se presentan en los Datos Suplementarios.

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

Los procedimientos cristalográficos para preparación y análisis de Fab 806, Fab 175 y los complejos individuales Fab-péptido y detalles acerca de los estudios NMR del péptido del epítipo 806 marcado con ¹⁵N en solución se describen en los datos suplementarios. Las estructuras se determinaron por reemplazamiento molecular y el refinamiento convergió con R=0,225/R libre=0,289 para Fab806 y R=0,226/R libre=0,279 para Fab806: péptido; R=0,210/R libre=0,05 para Fab806 y R=0,203/R libre=0,257 para Fab806: péptido.

Biodistribución del Tumor chAb806 en los Pacientes

15 Para demostrar la especificidad tumoral de mAb806 *in vivo*, se preparó por ingeniería genética una versión quimérica (ch806) y se produjo en condiciones de cGMP (56). Se condujo una primera prueba en hombres de Fase I para evaluar la seguridad, biodistribución y respuesta inmune de ch806 en pacientes con tumores 806 positivos, y los resultados de seguridad, biodistribución y farmacocinética han sido consignados previamente (44). Para definir la especificidad de ch806 en tumor comparado con tejido normal (a saber, hígado) en los pacientes, se realizó la absorción cuantitativa de ch806 en tumor e hígado por cálculo del % de dosis inyectada (ID) de ¹¹¹In-ch806 a partir de las imágenes en cámara gamma de cuerpo total obtenidas a lo largo de una semana después de la inyección de 5-7mCi (200-280 MBq) de ¹¹¹In-ch806. Los cálculos de dosimetría en hígado y tumor se realizaron basándose en regiones de interés en el conjunto de datos de imagen de infusión de ¹¹¹In-ch806 en cada paciente individual, corregidos por ruido de fondo y atenuación, que permitían el cálculo de la actividad acumulada. El cálculo de la dosimetría se realizó para deducir la concentración de ¹¹¹In-ch806 en tumor e hígado durante un periodo de una semana después de la inyección.

REFERENCIAS

30 1. Holbro, T. and Hynes, N. E. (2004) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:195-217., 195-217.

2. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and. (1984) *Nature.* 309, 418-425.

35 3. Yen, L., Benlimame, N., Nie, Z. R., Xiao, D., Wang, T., Al Moustafa, A. E., Esumi, H., Milanini, J., Hynes, N. E., Pages, G., and Alaoui-Jamali, M. A. (2002) *Mol. Biol. Cell.* 13, 4029-4044.

4. Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 30392-30399.

40 5. Gadella, T. W. J. and Jovin, T. M. (1995) *Journal of Cell Biology* 129, 1543-1558.

6. Schlessinger, J. (2002) *Cell* 110, 669-672.
7. Yarden, Y. and Schlessinger, J. (1987) *Biochemistry*. 26, 1443-1451.
- 5 8. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127-137.
9. Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M., and Leahy, D. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15024-15029.
- 10 10. Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., and Yokoyama, S. (2003) *Mol. Cell.* 12, 541-552.
11. Cho, H. S. and Leahy, D. J. (2002) *Science* 297, 1330-1333.
- 15 12. Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003) *Nature* 421, 756-760.
13. Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) *Mol Cell* 11, 507-517.
- 20 14. Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2002) *Cell* 110, 763-773.
- 25 15. Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003) *Mol Cell* 11, 495-505.
16. Jorissen, R. N., Walker, F. W., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., and Burgess, A. W. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284, 31-53. 2003.
- 30 17. Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C. (2002) *J Biol. Chem.* 277, 46265-46272.
18. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J. (2006) *Cell.* 125, 1137-1149.
- 35 19. de Larco, J. E. and Todaro, G. J. (1978) *J Cell Physiol* 94, 335-342.
20. Todaro, G. J., Delarco, J. E., and Cohen, S. (1976) *Nature* 264, 26-31.
- 40 21. de Larco, J. E., Reynolds, R., Carlberg, K., Engle, C., and Todaro, G. J. (1980) *J Biol. Chem.* 255, 3685-3690.
22. Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1992) *Mol Biol. Cell* 3, 1235-1243.

23. Ekstrand, A. J., James, C. D., Cavenee, W. K., Seliger, B., Pettersson, R. F., and Collins, V. P. (1991) *Cancer Res.* 51, 2164-2172.
- 5 24. Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4207-4211.
25. Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Pirak, M. E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1605-1611.
- 10 26. Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3778-3781.
- 15 27. Johns, T. G., Luwor, R. B., Murone, C., Walker, F., Weinstock, J., Vitali, A. A., Perera, R. M., Jungbluth, A. A., Stockert, E., Old, L. J., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15871-15876.
28. Luwor, R. B., Johns, T. G., Murone, C., Huang, H. J., Cavenee, W. K., Ritter, G., Old, L. J., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2001) *Cancer Res.* 61, 5355-5361.
- 20 29. Perera, R. M., Narita, Y., Furnari, F. B., Gan, H. K., Murone, C., Ahlqvist, M., Luwor, R. B., Burgess, A. W., Stockert, E., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Cavenee, W. K., Scott, A. M., and Johns, T. G. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11, 6390-6399.
- 25 30. Arteaga, C. L. and Baselga, J. (2004) *Cancer Cell.* 5, 525-531.
31. Baselga, J. (2006) *Science.* 312, 1175-1178.
32. Bernier, J. (2006) *Expert. Rev Anticancer Ther.* 6, 1539-1552.
- 30 33. Mellingerhoff, I. K., Cloughesy, T. F., and Mischel, P. S. (2007) *Clin. Cancer Res.* 13, 378-381.
34. Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4207-4211.
- 35 35. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7727-7731.
- 40 36. Sok, J. C., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. L., Freilino, M. L., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B., and Grandis, J. R. (2006) *Clin Cancer Res.* 12, 5064-5073.

37. Johns, T. G., Stockert, E., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Huang, H. J., Cavenee, W. K., Smyth, F. E., Hall, C. M., Watson, N., Nice, E. C., Gullick, W. J., Old, L. J., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2002) *Int J Cancer*. 98, 398-408.
- 5 38. Jungbluth, A. A., Stockert, E., Huang, H. J., Collins, V. P., Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns, T. J., Scott, A. M., Gullick, W. J., Ritter, G., Cohen, L., Scanlan, M. J., Cavenee, W. K., and Old, L. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 639-644.
39. Johns, T. G., Mellman, I., Cartwright, G. A., Ritter, G., Old, L. J., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2005) *FASEB J.* 19, 780-782.
- 10 40. Johns, T. G., Perera, R. M., Vernes, S. C., Vitali, A. A., Cao, D. X., Cavenee, W. K., Scott, A. M., and Furnari, F. B. (2007) *Clin Cancer Res.* 13, 1911-1925.
41. Perera, R. M., Narita, Y., Furnari, F. B., Gan, H. K., Murone, C., Ahlkvist, M., Luwor, R. B., Burgess, A. W., Stockert, E., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Cavenee, W. K., Scott, A. M., and Johns, T. G. (2005) *Clin Cancer Res.* 11,6390-6399.
- 15 42. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) *Cell* 110, 775-787.
- 20 43. Walker, F., Orchard, S. G., Jorissen, R. N., Hall, N. E., Zhang, H. H., Hoyne, P. A., Adams, T. E., Johns, T. G., Ward, C., Garrett, T. P., Zhu, H. J., Nerrie, M., Scott, A. M., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2004) *J Biol Chem.* 279, 22387-22398.
- 25 44. Scott, A. M., Lee, F. T., Tebbutt, N., Herbertson, R., Gill, S. S., Liu, Z., Skrinos, E., Murone, C., Saunderson, T. H., Chappell, B., Papenfuss, A. T., Poon, A. M., Hopkins, W., Smyth, F. E., MacGregor, D., Cher, L. M., Jungbluth, A. A., Brechbiel, M. W., Murphy, R., Burgess, A. W., Hoffman, E. W., Johns, T. G., and Old, L. J. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 4071-4076.
- 30 45. Chao, G., Cochran, J. R., and Wittrup, K. D. (2004) *Mol Biol.* 342, 539-550.
46. Johns, T. G., Adams, T. E., Cochran, J. R., Hall, N. E., Hoyne, P. A., Olsen, M. J., Kim, Y. S., Rothacker, J., Nice, E. C., Walker, F., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Ward, C. W., Burgess, A. W., Wittrup, K. D., and Scott, A. M. (2004) *J Biol Chem.* 279, 30375-30384.
- 35 47. Wade, J. D., Hojo, K., Kawasaki, K., Johns, T. G., Catimel, B., Rothacker, J., and Nice, E. C. (2006) *Anal Biochem.* 348, 315-317.
48. Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1991) *Mol Cell Biol.* 11, 4005-4014.
49. Hogg, P. J. (2003) *Trends in biochemical sciences* 28, 210-214.

50. Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., and. (1991) J Natl Cancer Inst. 83, 97-104.

5 51. Sampson, J. H., Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 7503-7508.

52. MacDonald, A., Chisholm, G. D., and Habib, F. K. (1990) Br. J Cancer. 62, 579-584.

10 -53. Baselga, J. and Arteaga, C. L. (2005) J Clin Oncol. 23,2445-2459.

54. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K. (1997) J Biol Chem. 272, 2927-2935.

15 55. Mickey, D. D., Stone, K. R., Wunderli, H., Mickey, G. H., Vollmer, R. T., and Paulson, D. F. (1977) Cancer Res. 37, 4049-4058.

20 56. Panousis, C., Rayzman, V. M., Johns, T. G., Renner, C., Liu, Z., Cartwright, G., Lee, F. T., Wang, D., Gan, H., Cao, D., Kypridis, A., Smyth, F. E., Brechbiel, M. W., Burgess, A. W., Old, L. J., and Scott, A. M. (2005) Br. J Cancer. 92, 1069-1077.

EJEMPLO 2

DATOS SUPLEMENTARIOS

25

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Linajes de células

30 Todos los linajes de células se mantuvieron en DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) que contenía 10% FCS (CSL, Melbourne), glutamina 2 mM (Sigma Chemical Co, St. Louis), y penicilina/estreptomina (Life Technologies, Grand Island). Adicionalmente, el linaje de células U87MG.Δ2-7 se mantuvo en 400mg/ml de geneticina (Life Technologies, Inc, Grand Island). Los linajes de células BaF/3(1) y BaF/3 que expresaban receptores diferentes de EGF (2) se mantuvieron rutinariamente en RPMI 1640 (GIBCO BRL) suplementado con 10% de suero de ternero fetal (GIBCO BRL) y 10% de medio WEHI-3B acondicionado (3) como fuente de IL-3. Todos los linajes de células se dejaron crecer a 37°C en una atmósfera de aire /CO₂ (95%-5%).

35

Anticuerpos y péptidos

40 Generación de anticuerpos. El linaje de fibroblastos murinos NR6_{ΔEGFR} se utilizó como inmunógeno. Se generaron hibridomas de ratón por inmunización de ratones BALB/c cinco veces subcutáneamente a intervalos de 2 a 3 semanas con 5x10⁵ -2x10⁶ células en adyuvante. Se utilizó adyuvante de Freund completo para la primera

inyección. Después de ello, se utilizó adyuvante de Freund incompleto (Difco). Se fusionaron células de bazo de ratones inmunizados con el linaje de células de mieloma de ratón SP2/0. Los sobrenadantes de los clones nuevamente generados se clasificaron en ensayos de hemadsorción para reactividad con los linajes de células NR6, NR6_{wEGFR}, y NR6_{ΔEGFR}, y se analizaron luego por ensayos de hemadsorción con linajes de células de glioblastoma humano U87MG, U87MG_{wEGFR}, y U87MG_{ΔEGFR}.

Los mAb's intactos (50 mg) se digirieron en PBS con papaína activada durante 2-3 h a 37°C a una ratio de 1:20 y la papaína se desactivó con yodoacetamida. El material digerido se pasó luego por una columna de Proteína-A Sepharose (Amersham) en tampón de fosfato de sodio 20mM de pH 8,0, purificándose ulteriormente el flujo directo por intercambio de catión utilizando una columna Mono-S (Amersham). La proteína se concentró luego utilizando un concentrador centrífugo MWCO 10,000 (Millipore). Para los complejos Fab-péptido se añadió directamente un exceso molar de péptido liofilizado al Fab y se incubó durante 2 horas a 4°C antes de realizar las pruebas de cristalización.

15 **Mapeado de mAb175 utilizando fragmentos de EGFR expresados en células de mamífero**

El día anterior a la transfección con estos fragmentos, se sembraron fibroblastos de riñón embrionario 293 T humanos a 8×10^5 por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos que contenían 2 mL de medio. Las células se transfectaron con 3-4 μg de DNA plasmídico complejado con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. 24 a 48 horas después de la transfección, los cultivos de células se aspiraron y las monocapas de células se lisaron en 250 μL de tampón de lisis (1% Triton X-100, 10% glicerol, NaCl 150 mM, HEPES 50 mM de pH 7,4, EGTA 1 mM y mezcla de Inhibidor de Proteasas Completo (Roche). Se mezclaron partes alícuotas del lisado de células (10-15 μl) con tampón de muestra de SDS que contenía 1,5% de β -mercaptoetanol, desnaturizado por calentamiento durante 5 min a 100°C y tratado por electroforesis en geles de poliacrilamida Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen). Las muestras se pasaron luego por electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa que se lavaron en tampón TBST (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, NaCl 100mM y 0,1% de Tween-20) y se bloquearon en TBST que contenía 2,5 % de leche desnatada durante 30 min a la temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante una noche a 4°C con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mAb175 en tampón de bloqueo. Membranas paralelas se sondaron durante una noche con mAb 9B11 (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) para detectar el epítipo c-myc. Las membranas se lavaron en TBST, y se incubaron en tampón de bloqueo que contenía IgG anti-ratón de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Biorad) a una dilución de 1:5000 durante 2 horas a la temperatura ambiente. Las transferencias se lavaron luego en TBST, y se revelaron utilizando film de autorradiografía después de incubación con Sustrato Quimioluminiscente Western Pico (Pierce, Rockford, Illinois).

35

Mapeado de mAb175 utilizando fragmentos de EGFR expresados en células de mamífero y levadura

Una serie de fragmentos de ectodominio de EGFR solapantes marcados con c-myc, que comenzaban en los residuos 274, 282, 290 y 298 y que terminaban todos ellos en el aminoácido 501 y fusionados a hormona del crecimiento se han descrito anteriormente (6).

40

La expresión de las proteínas de EGFR en la superficie de células de levadura se realizó como se ha descrito arriba

(7). Resumidamente, colonias transformadas se dejaron crecer a 30 °C en medio mínimo que contenía base nitrogenada de levadura, hidrolizado de caseína, dextrosa, y tampón de fosfato de pH 7,4, en una plataforma de sacudidas durante aproximadamente un día hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 5-6. Las células de levadura se indujeron luego respecto a presentación de proteínas por transferencia a medio mínimo que contenía galactosa, y se incubaron con sacudidas a 30 °C durante 24 horas. Los cultivos se guardaron luego a 4 °C hasta su análisis. Se obtuvo fluido de ascitis bruto que contenía el anticuerpo monoclonal c-myc 9E10 de Covance (Richmond, CA). Se lavaron 1 x 10⁶ células de levadura con tampón FACS enfriado en hielo (PBS que contenía 1 mg/mL de BSA) y se incubaron con ascitis anti-c-myc (dilución 1:50), o anticuerpo monoclonal EGFR humano (10 µg/mL) en un volumen final de 50 µL, durante una hora a 4° C. Las células se lavaron luego con tampón FACS enfriado en hielo y se incubaron con IgG anti-ratón marcado con ficoeritrina (dilución 1:25), en un volumen final de 50 µL durante 1 hora a 4° C, protegido de la luz. Después de lavado de las células de levadura con tampón FACS enfriado en hielo, se obtuvieron los datos de fluorescencia con un citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman-Coulter), y se analizaron con software de citometría WinMDI (J. Trotter, Scripps University). Para determinación de los epítomos lineales frente a los conformacionales, las células de levadura se calentaron a 80°C durante 30 min, y se enfriaron luego en hielo 20 min antes de la marcación con anticuerpos. La serie de mutantes de EGFR enumerados en la Tabla 2 se han descrito anteriormente (8).

Generación y caracterización de linajes de células estables que expresan constructos mutantes de EGFR

Generación de linajes de células que expresan mutantes de EGFR

Se obtuvieron linajes de células estables que expresaban el EGFR mutante por selección en medio que contenía neomicina. Después de la selección final, se aisló mRNA de cada linaje de células, se sometió a transcripción inversa y la secuencia de EGFR se amplificó por PCR. Todas las mutaciones en el EGFR expresado se confirmaron por secuenciación de los productos PCR. El nivel de expresión de EGFR se determinó por análisis FACS en un instrumento FACStar ((Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ) utilizando el anticuerpo anti-EGFR mAb528(9;10) a 10 µg/ml en PBS, 5% FCS, EDTA 5 mM seguido por Ig anti-ratón marcado con Alexa 488 (dilución final 1:400). La fluorescencia de fondo se determinó por incubación de las células con un anticuerpo primario irrelevante de la misma clase. Todas las células se sometieron rutinariamente a pasos en RPMI, 10% FCS, 10 % de medio WEHI3B acondicionado y 1,5 mg/ml de G418.

Activación dependiente de EGF del EGFR mutante

Células que expresaban el EGFR tipo salvaje o C271A/C283A-EGFR se lavaron y se incubaron durante 3 horas en medio sin suero o IL-3. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en el medio que contenía EGF (100 ng/ml) o un volumen equivalente de PBS. Las células se cosecharon al cabo de 15min, se redujeron a un sedimento y se lisaron directamente en tampón de muestra SDS/PAGE que contenía β-mercaptoetanol. Las muestras se separaron en geles NuPAGE de gradiente 4-12%, se transfirieron a membrana Immobilon de PVDF y se sondaron con anti-fosfotirosina (4G10, Upstate Biotechnologies) o anticuerpos anti-EGFR (mAb806, producido en el LICR). Las bandas reactivas se detectaron utilizando quimioluminiscencia.

Efecto del EGF y los anticuerpos sobre la proliferación celular

Células que crecían en fase logarítmica se cosecharon y se lavaron 2 veces con PBS para separar la IL-3 residual. Las células se resuspendieron en RPMI 1640 más 10% de FCS y se sembraron en placas de 96 pocillos a 10^5 células/pocillo con portador sólo o con concentraciones crecientes de EGF. En caso apropiado, se añadió también a los cultivos una concentración fija de mAb528 o mAb806 (2 µg/pocillo). La proliferación se determinó utilizando el ensayo MTT (11).

Reactividad con Anticuerpos específicos de Conformación

Las células se recogieron por centrifugación y se tiñeron con los anticuerpos de control o de test (todos ellos a 10 µg/ml en tampón FACS durante 40 min en hielo, lavados en tampón FACS) seguido por Ig anti-ratón marcada con Alexa 488 (dilución final 1:400, 20 min en hielo). Las células se lavaron con tampón FACS enfriado en hielo, se recogieron por centrifugación, y se analizaron en un canal FACScan; el canal de fluorescencia pico y la fluorescencia media se determinaron para cada muestra utilizando la herramienta estadística en CellQuest (Becton and Dickinson). La fluorescencia de fondo (control negativo) se dedujo de todas las medidas. Los valores de fluorescencia media se seleccionaron como los más representativos de la forma del pico y la intensidad de fluorescencia y se utilizaron para deducir la ratio de fijación de mAb806 a mAb 528.

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

Los cristales de Fab 806 nativo se dejaron crecer por difusión de vapor en gota colgante utilizando 10mg/ml de Fab y un depósito que contenía tampón de acetato de sodio 0,1 M de pH 4,6, 6-8% PEG6000 y 15-20% de isopropanol. Para la recogida de los datos, los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora que contenía tampón 0,1 M de acetato de sodio de pH 4,6, 10% PEG6000, 15-20% de isopropanol y 10% de glicerol. Los cristales se montaron luego en un bucle de nailon y se sometieron directamente a congelación súbita en nitrógeno líquido.

Los cristales del complejo 806 Fab-péptido se dejaron crecer por difusión de vapor en gota colgante utilizando 10 mg/mL de complejo Fab-péptido y un depósito que contenía acetato de amonio 0,2 M y 16-18 % de monometiléter de PEG 5000, mejorando luego la calidad de los cristales por técnicas de siembra. Para la recogida de los datos, los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora constituida por un depósito suplementado con 25 % de glicerol. Los cristales se montaron luego en un bucle de nailon y se sometieron directamente a congelación súbita en nitrógeno líquido.

Los cristales del complejo 175 Fab-péptido se dejaron crecer inicialmente por difusión interfacial libre utilizando un sistema de cristalización Topaz (Fluidigm, San Francisco). Los microcristales se dejaron crecer por difusión de vapor en gota colgante utilizando 7mg/ml de Fab con condiciones similares de tampón Bis-tris propano 0,1M, acetato de amonio 0,2M y 18% de PEG 10.000. Los microcristales se mejoraron luego por siembra en bandas en formiato de sodio 0,15M y 15 % de PEG 1500 para producir cristales en forma de pequeñas placas. Para la recogida de los datos los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora constituida por un depósito suplementado con 25 % de glicerol. Los cristales se montaron luego en un bucle de nailon y se sometieron directamente a congelación súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción en los cristales complejo 806 Fab y 175 Fab se recogieron en la propia empresa utilizando un detector R-AXIS IV en un generador Rigaku micromax-007 provisto de óptica AXCO, después de lo cual se procesaron estos datos utilizando CrystalClear. Los datos del complejo 806-péptido se recogieron en un detector ADSC quantum315 CCD en la línea de luz X29, Brookhaven National Laboratory, procesándose estos datos con HKL2000(12) (las estadísticas de recogida de los datos se muestran en Tabla 1). El Fab 806 nativo se resolvió por reemplazamiento molecular utilizando el programa MOLREP(13) con empleo de las coordenadas de la estructura 2E8. El refinamiento de la estructura se realizó en REFMAC5(14) y el modelo de construcción en Coot (15). Las estructuras de ambos péptidos 806 y Fab 175 Fab se resolvieron por reemplazamiento molecular utilizando el programa MOLREP con empleo de las coordenadas de la estructura de 806 Fab, refinamiento y reconstrucción que se realizaron de nuevo en REFMAC5, y COOT y O. La validación de las estructuras finales se realizó con PROCHECK(16) y WHATCHECK(17).

Estudios NMR

Para los estudios NMR, se produjo recombinantemente un péptido marcado con ^{15}N como una fusión con el dominio SH2 de SHP2 utilizando el método descrito previamente por Fairlie et al. (18), excepto que los *E.coli* se dejaron crecer en medio mínimo de Neidhart suplementado con $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (19). El péptido se escindió de la pareja de fusión utilizando CNBr, se purificó por HPLC en fase inversa y se confirmó su identidad por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación del terminal N. El residuo metionina dentro de la secuencia de fijación del anticuerpo 806 se mutó a leucina para hacer posible la escisión de la pareja de fusión, pero no dentro del péptido propiamente dicho.

Las muestras utilizadas para los estudios NMR se prepararon en solución acuosa que contenía 5 % de $^2\text{H}_2\text{O}$, NaCl 70 mM y NaPO_4 50 mM a pH 6,8. Todos los espectros se adquirieron a 298K en un espectrómetro Bruker Avance500 utilizando una criosonda. Las asignaciones secuenciales del péptido en ausencia de m806Fab se establecieron utilizando TOCSY 2D estándar y NOESY así como espectros TOCSY y NOESY ^{15}N -editados. La interacción entre el péptido and fAb806 se examinó por monitorización de los espectros ^{15}N HSQC del péptido en ausencia y presencia de fAb806. La perturbación espectral de los espectros ^{15}N HSQC del péptido en presencia de fAb806 indica claramente que el péptido era capaz de fijarse al fAb806 en presencia de condiciones en solución. Sin embargo, la conformación detallada del péptido en la forma de complejo no se determinó.

Tabla Suplementaria 1. Recogida de Datos y Estadísticas de Refino

Recogida de datos

35

	806(nativo)	806(péptido)	175(nativo)	175(péptido)
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2
Dimensiones de la celda (Å)				
<i>a</i>	140,37	35,92	36,37	83,17
<i>b</i>	74,62	83,16	94,80	69,26

ES 2 609 915 T3

	806(nativo)	806(péptido)	175(nativo)	175(péptido)
<i>c</i>	83,87	72,21 $\beta=92,43$	108,90	71,47
Fuente	la propia empresa	BNL X29	la propia empresa	la propia empresa
Longitud de onda (Å)	1,542	1,1	1,542	1,542
Intervalo de resolución (Å)	29,7-2,2	50-2,0	50-2,8	14,18-1,59
	(2,27-2,20)	(2,07-2,0)	(2,87-2,80)	(1,65-1,59)
<i>R</i> _{fusión} (%)	6,4 (26,7)	6,6 (28,2)		8,6 (30,0)
<i>I</i> / σ	12,2 (3,2)	22 (3,15)		10,2 (2,2)
Completitud (%)	98,3 (91,3)	96,6 (79,2)	98,4 (90,5)	78,8 (11,8)
				98,1 a 1,89 Å
Reflexiones totales	156497	98374		205401
Reflexiones singulares	44905	27692	9171	43879

Los números entre paréntesis corresponden a la envuelta de resolución máxima.

Refino

5

Intervalo de resolución (Å)	20-2,3	72,17-2,00	50-2,6	14,18-1,6
Reflexiones	37397	26284	9171	41611
<i>R</i> _{críst}	0,225	0,226	0,210	0,203
<i>R</i> _{libre}	0,289	0,279	0,305	0,257
Átomos de proteína	6580	3294	3276	3390
Átomos de disolvente	208	199	46	247
Longitud de enlace r.m.s.d (Å)	0,022	0,007	0,015	0,014
Ángulo de enlace r.m.s.d (°)	1,70	1,12	1,77	1,48
Factor B medio (Å ²)	40,3	33,6	37,5	20,7
Factores B anisótropos totales (Å ²)				
B11	-1,52	2,42	0,20	1,13
B22	2,22	-0,26	-1,022	-0,38
B33	-0,70	-2,11	1,03	-0,74

Referencias

1. Palacios, R., Henson, G., Steinmetz, M., and McKearn, J. P. (1984) *Nature*. 309, 126-131.
- 5 2. Walker, F., Orchard, S. G., Jorissen, R. N., Hall, N. E., Zhang, H. H., Hoyne, P. A., Adams, T. E., Johns, T. G., Ward, C., Garrett, T. P., Zhu, H. J., Nerrie, M., Scott, A. M., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2004) *J Biol Chem*. 279, 22387-22398.
- 10 3. Ymer, S., Tucker, W. Q., Sanderson, C. J., Hapel, A. J., Campbell, H. D., and Young, I. G. (1985) *Nature*. 317, 255-258.
- 15 4. Panousis, C., Rayzman, V. M., Johns, T. G., Renner, C., Liu, Z., Cartwright, G., Lee, F. T., Wang, D., Gan, H., Cao, D., Kypridis, A., Smyth, F. E., Brechbiel, M. W., Burgess, A. W., Old, L. J., and Scott, A. M. (2005) *Br. J Cancer*. 92, 1069-1077.
5. Johns, T. G., Adams, T. E., Cochran, J. R., Hall, N. E., Hoyne, P. A., Olsen, M. J., Kim, Y. S., Rothacker, J., Nice, E. C., Walker, F., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Ward, C. W., Burgess, A. W., Wittrup, K. D., and Scott, A. M. (2004) *J Biol Chem*. 279, 30375-30384.
- 20 6. Johns, T. G., Adams, T. E., Cochran, J. R., Hall, N. E., Hoyne, P. A., Olsen, M. J., Kim, Y. S., Rothacker, J., Nice, E. C., Walker, F., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Ward, C. W., Burgess, A. W., Wittrup, K. D., and Scott, A. M. (2004) *J Biol Chem*. 279, 30375-30384.
- 25 7. Johns, T. G., Adams, T. E., Cochran, J. R., Hall, N. E., Hoyne, P. A., Olsen, M. J., Kim, Y. S., Rothacker, J., Nice, E. C., Walker, F., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Ward, C. W., Burgess, A. W., Wittrup, K. D., and Scott, A. M. (2004) *J Biol Chem*. 279, 30375-30384.
- 30 8. Johns, T. G., Adams, T. E., Cochran, J. R., Hall, N. E., Hoyne, P. A., Olsen, M. J., Kim, Y. S., Rothacker, J., Nice, E. C., Walker, F., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Ward, C. W., Burgess, A. W., Wittrup, K. D., and Scott, A. M. (2004) *J Biol Chem*. 279, 30375-30384.
9. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. (1984) *Cancer Res*. 44, 1002-1007.
- 35 10. Gill, G. N., Kawamoto, T., Cochet, C., Le, A., Sato, J. D., Masui, H., McLeod, C., and Mendelsohn, J. (1984) *J Biol Chem*. 259, 7755-7760.
11. van de Loosdrecht, A. A., Beelen, R. H., Ossenkoppele, G. J., Broekhoven, M. G., and Langenhuijsen, M. M. (1994) *J Immunol Methods*. 174, 311-320.
- 40 12. Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) *processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode* Academic Press (New York).

13. Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Cryst* 30, 1022-1025.
14. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta crystallographica* 53, 240-255.
- 5 15. Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) *Acta crystallographica* 60, 2126-2132.
16. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Cryst* 26, 283-291.
17. Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) *Nature* 381, 272.
- 10 18. Fairlie, W. D., Ubaldi, A. D., De Souza, D. P., Hemmings, G. J., Nicola, N. A., and Baca, M. (2002) *Protein expression and purification* 26, 171-178.
19. Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974) *Journal of bacteriology* 119, 736-747.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de fijación de antígeno que se fija a EGFR, en donde dicho anticuerpo o fragmento no reconoce el péptido juntural LEEKKGNWTDH (SEQ ID NO: 13), teniendo dicho anticuerpo o fragmento (i) secuencias CDR 1, 2 y 3 de región variable de cadena pesada que comprenden SDYAWN (SEQ ID NO:4), YISYSANTRYNPSLKS (SEQ ID NO: 5) y ATAGRGFPY (SEQ ID NO: 6) respectivamente; y (ii) secuencias CDR 1, 2 y 3 de región variable de cadena ligera que comprenden HSSQDISSNIG (SEQ ID NO: 1), YHGNTLED (SEQ ID NO: 2), y VQYGQFPWT (SEQ ID NO:3) respectivamente.
2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 que reconoce el epítipo del péptido de los aminoácidos de EGFR₂₈₇CGADSYEMEEDGVRKC₃₀₂ (SEQ ID NO: 14).
3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo o fragmento es totalmente humano, humanizado o quimérico.
4. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dichas CDRs son transportadas por un entramado de anticuerpo humano.
5. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o fragmento comprende una región constante de IgG1 humana.
6. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o fragmento comprende una región constante kappa humana.
7. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo o fragmento se encuentra en forma de un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, scFv, diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo.
8. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que lleva un marcador detectable o funcional.
9. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación 8, en el que dicho marcador se selecciona del grupo constituido por un fármaco unido covalentemente y un radiomarcador.
10. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho anticuerpo o fragmento está pegilado.
11. Un inmunoconjugado o proteína de fusión de anticuerpo que comprende el anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 conjugado a un agente seleccionado de un agente de ablación química como una toxina, un inmunomodulador, una citocina, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un fármaco.

12. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el anticuerpo o fragmento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
13. Un método de preparación del anticuerpo o fragmento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende expresar el ácido nucleico de la reivindicación 12 en condiciones que llevan a cabo la expresión de dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.
14. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o el inmunoconjugado o proteína de fusión de anticuerpos de la reivindicación 11, para uso en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal.
15. El anticuerpo o fragmento como se define en, una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o el inmunoconjugado o la proteína de fusión de anticuerpos de la reivindicación 11, para uso en el tratamiento de un tumor en un paciente humano.
16. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y opcionalmente un vehículo, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
17. Un kit, que comprende una forma de dosificación farmacéutica de la composición farmacéutica de la reivindicación 16, y una forma de dosificación farmacéutica separada que comprende un agente anti-cáncer adicional seleccionado del grupo constituido por agentes quimioterapéuticos, anticuerpos anti-EGFR, agentes radioinmunoterapéuticos y combinaciones de los mismos.
18. El kit de la reivindicación 17, en el cual dichos inhibidores de tirosina-quinasa se seleccionan del grupo constituido por AG 1478, ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668, y sus combinaciones.
19. Un hospedador unicelular transformado con una molécula de DNA recombinante que comprende una secuencia de DNA o variante degenerada de la misma, que codifica el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
20. El hospedador unicelular transformado de la reivindicación 19, en el cual el hospedador unicelular se selecciona del grupo constituido por *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, levaduras, y células CHO, YB/20, NSO, SP2/0, RI.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSCI, BSC40, y BMT10, células de planta, células de insecto, y células humanas en cultivo de tejido.
21. Uso del anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición farmacéutica de la reivindicación 16 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer en un mamífero.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, para uso en el tratamiento de cánceres residentes en el cerebro que producen EGFR expresado de modo aberrante.

23. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 22, en la cual dichos cánceres residentes en el cerebro se seleccionan de glioblastomas, meduloblastomas, meningiomas, astrocitomas neoplásticos y malformaciones arteriovenosas neoplásticas.
- 5 24. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 22, en la cual dicha composición farmacéutica debe administrarse sistémicamente.
25. El uso según la reivindicación 21, en el cual dicho cáncer está localizado en o adyacente al cerebro.
- 10 26. Uso del anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de tumores neurales en un mamífero.
27. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21, 25 ó 26, en el cual el anticuerpo o fragmento está radiomarcado y se utiliza en radioinmunoterapia.
- 15 28. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21, 25 ó 26, en el cual se administra primeramente la composición de la reivindicación 16, administrándose después de ello una composición que comprende un agente quimioterapéutico.

20

FIGURA 1

Cadena Ligera
 CDR1-806 ²³HSSQDINSNIG
 CDR1-175 ²³HSSQDISSNIG
 CDR2-806 ⁴⁹YHGTNLDD
 CDR2-175 ⁴⁹YHGTNLED
 CDR3-806 ⁸⁹VQYAQFPWT
 CDR3-175 ⁸⁹VQYGQFPWT

Cadena Pesada
 CDR1-806 ³¹SDFAWN
 CDR1-175 ³¹SDYAWN
 CDR2-806 ⁵¹YISYGNTRYNPSLKS
 CDR2-175 ⁵¹YISYANTRYNPSLKS
 CDR3-806 ⁹⁷VTAGRGPY
 CDR3-175 ⁹⁷ATAGRGPY

Se da el número del primer residuo.

El subrayado indica los residuos que están en contacto con EGFR287-302

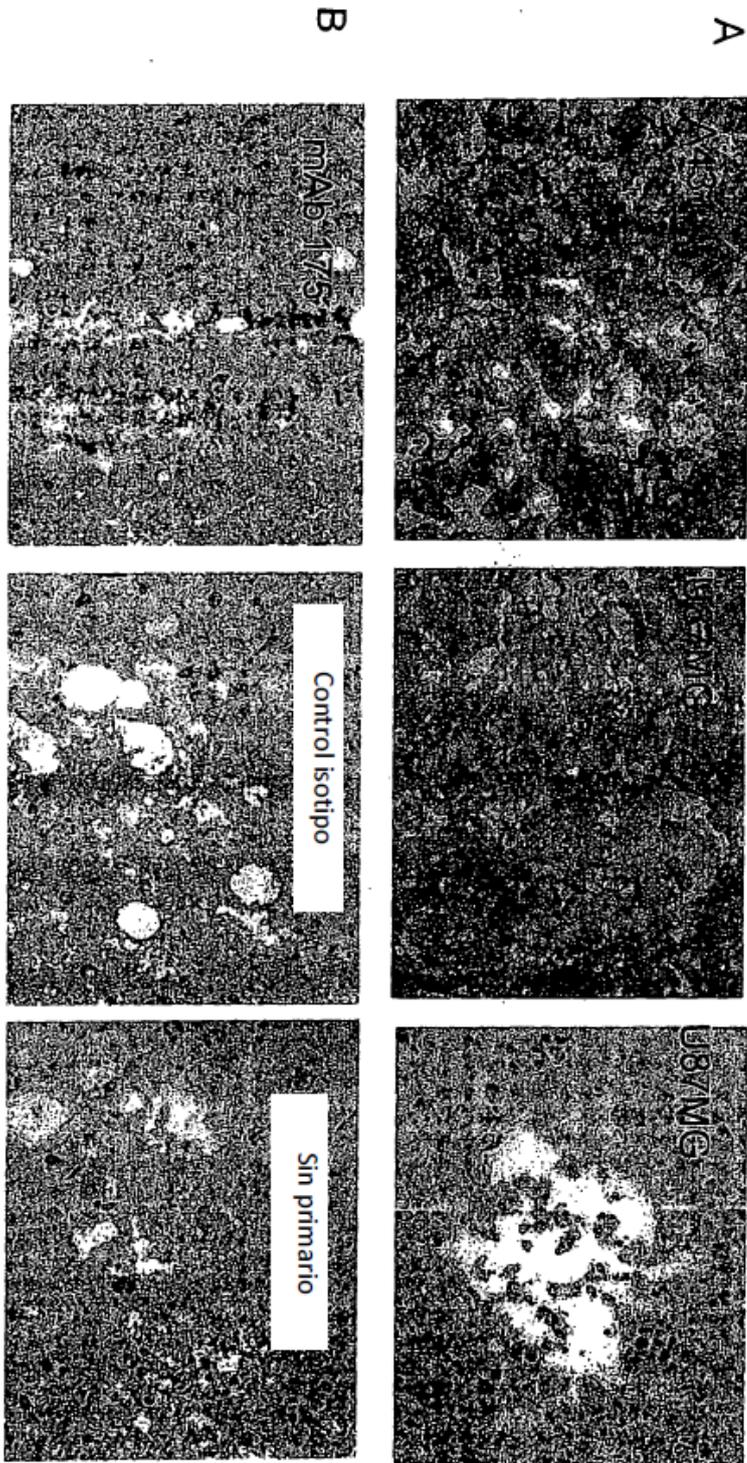


FIGURA 2

FIGURA 3

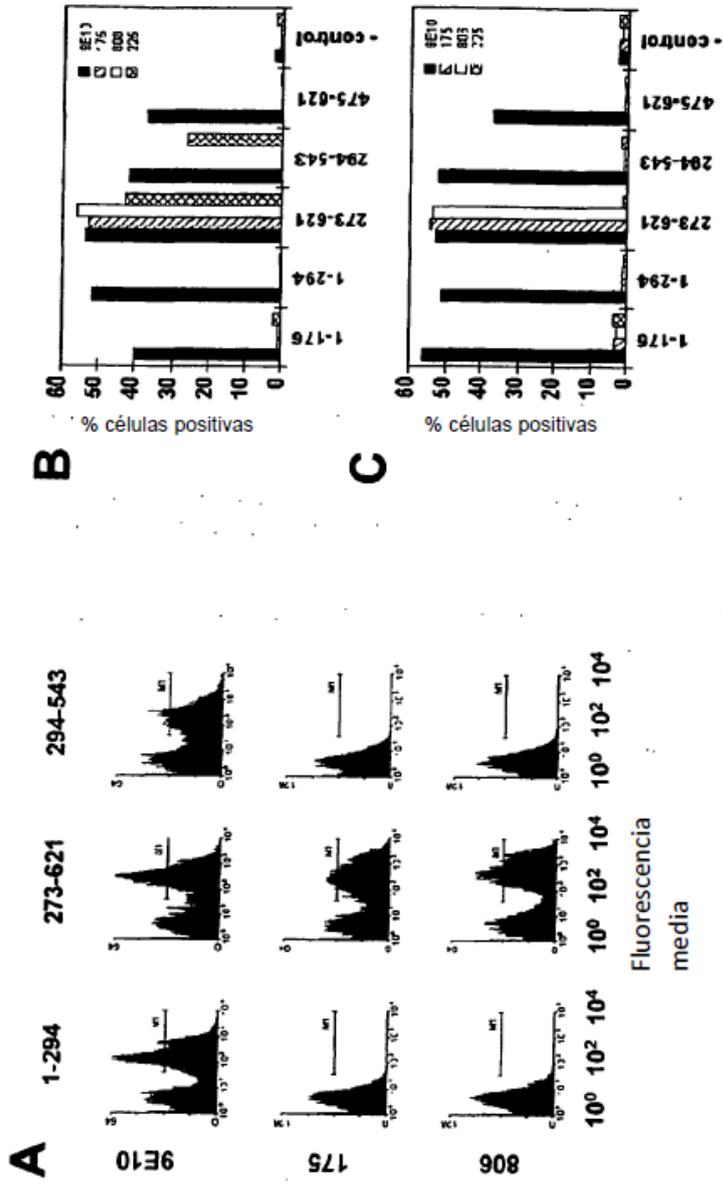


FIGURA 4

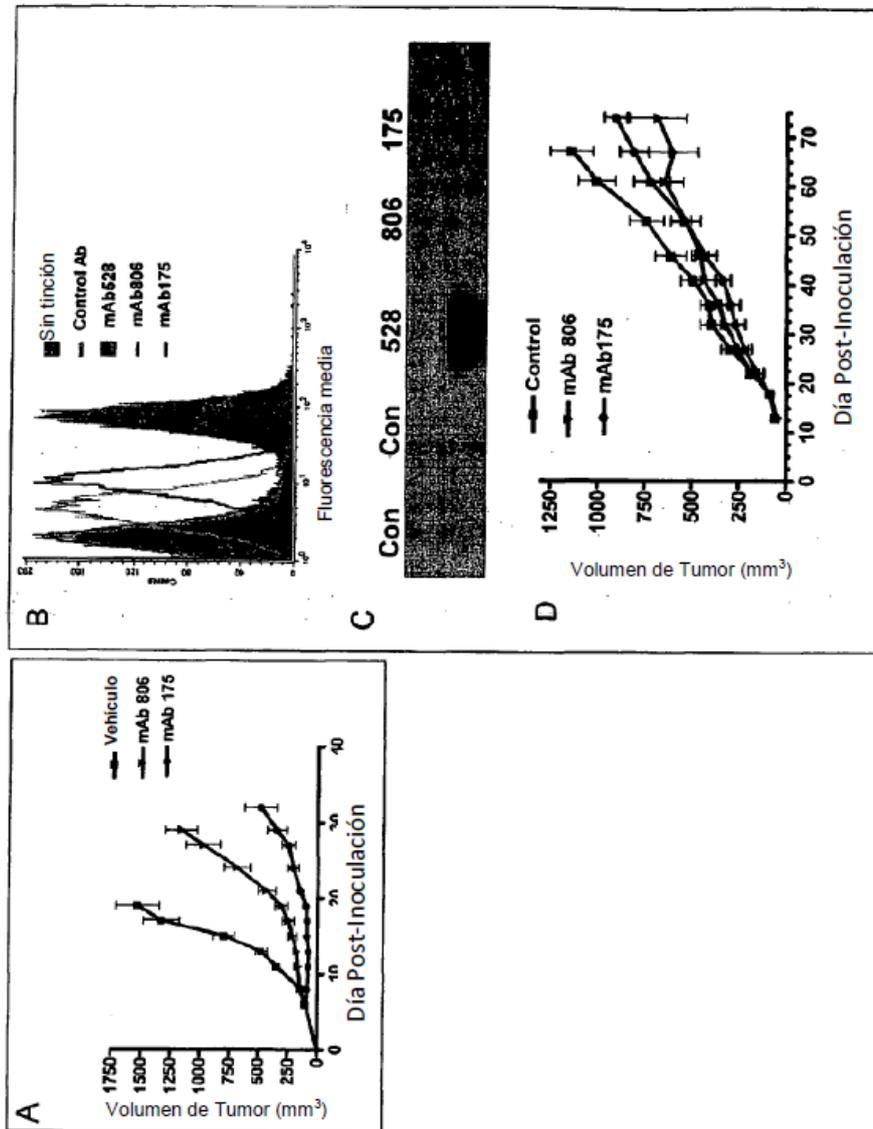


FIGURA 5

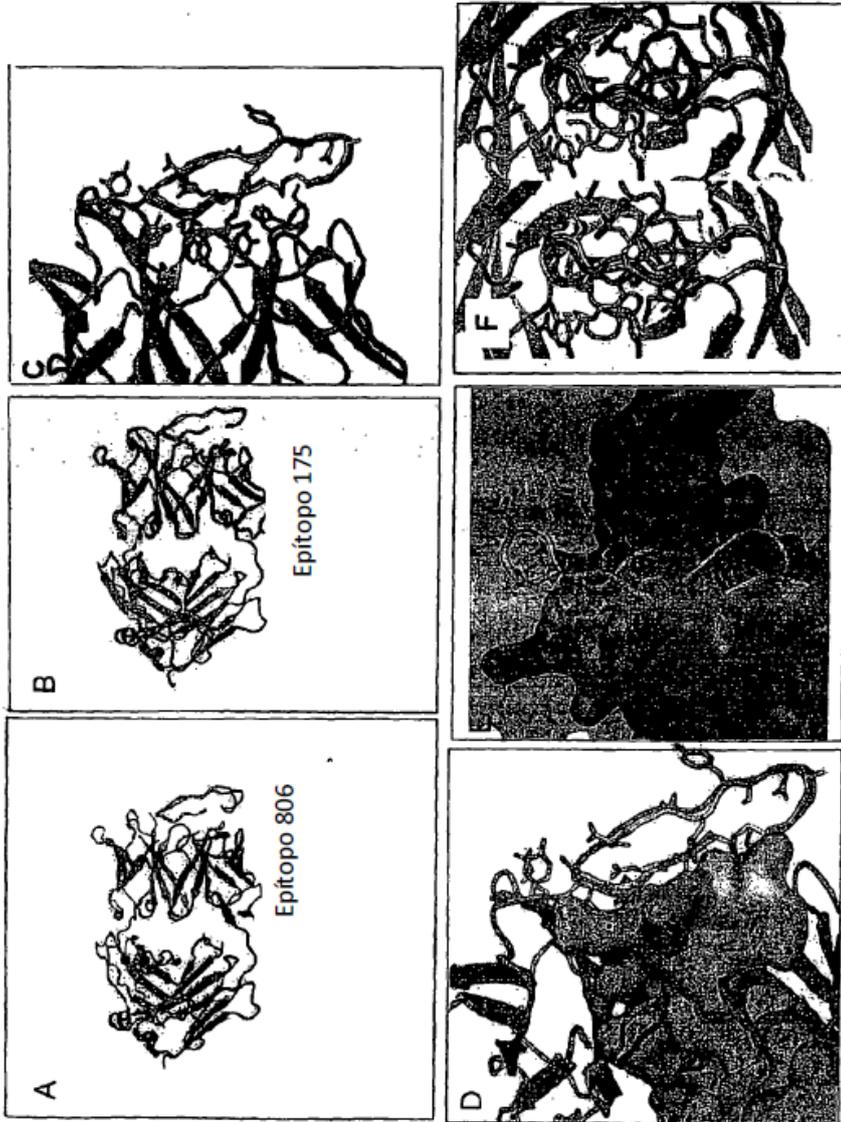


FIGURA 6-1

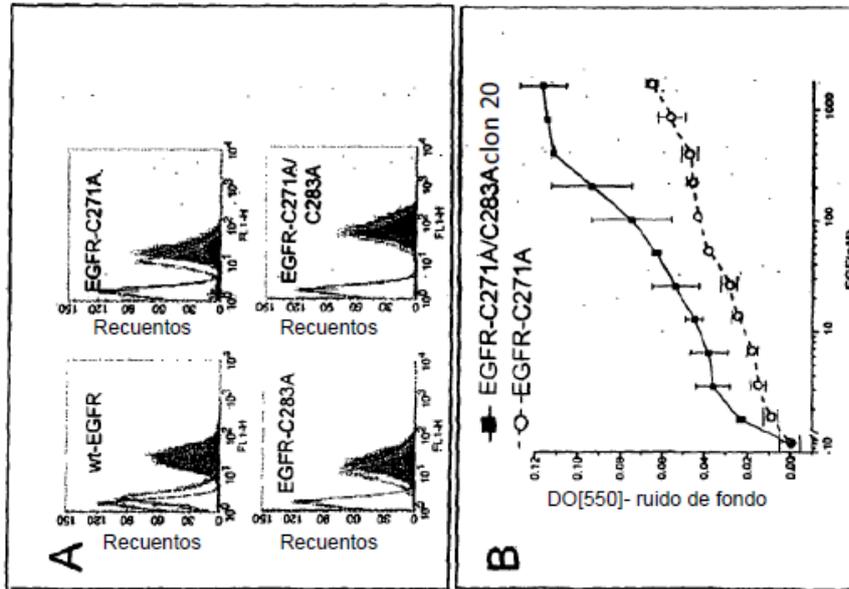


FIGURA 6-2

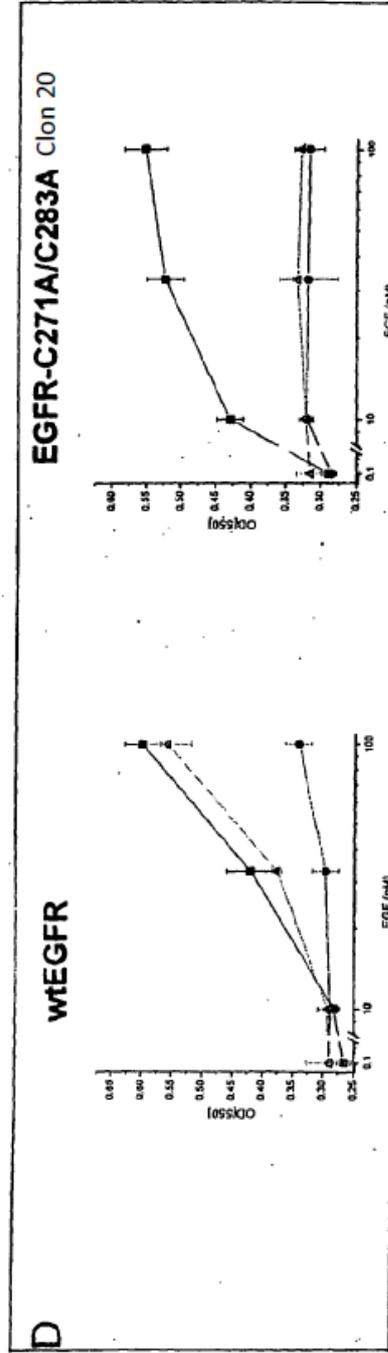
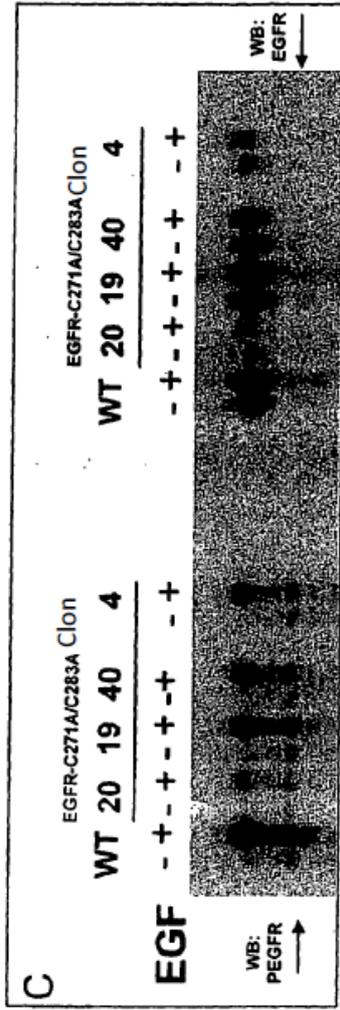


FIGURA 7

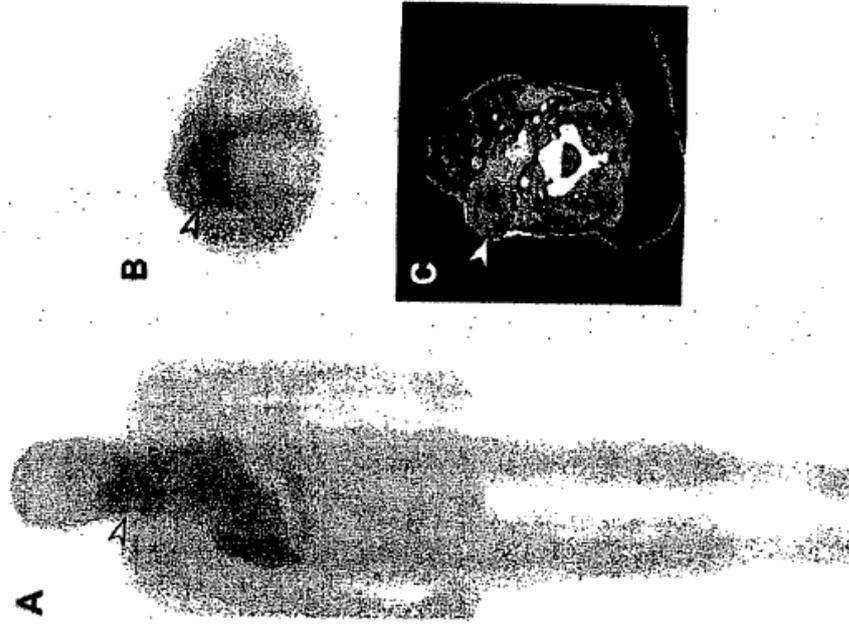


FIGURA 8

