

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 056**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2010 PCT/US2010/054545**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11059762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2010 E 10773511 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2493929**

54 Título: **Anticuerpos anti-EGFR y sus usos**

30 Prioridad:

28.10.2009 US 255632 P

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

25.10.2017

73 Titular/es:

**ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
1500 Seaport Boulevard
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**FORSYTH, CHARLES, MICHAEL;
DUBRIDGE, ROBERT B y
POWERS, DAVID B.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 639 056 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-EGFR y sus usos

5 **2. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-EGFR, a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-EGFR y a usos terapéuticos de tales anticuerpos.

10 **3. Antecedentes**

La terapia con anticuerpos monoclonales ha proporcionado una oportunidad para atacar y destruir tumores utilizando anticuerpos diseñados contra antígenos específicos de tumores. En general, la terapia con anticuerpos monoclonales estimula el sistema inmunológico de un paciente para atacar células tumorales malignas o impide el crecimiento tumoral bloqueando o inhibiendo receptores celulares específicos. El tratamiento requiere la identificación de un antígeno específico del tumor en una molécula de la superficie celular. Las moléculas representativas de la superficie celular objetivo de los ensayos clínicos incluyen donde provienen de varios linfomas/leucemias (tales como linfomas/leucemias de células T y/o células B) y tumores sólidos (tales como tumores epiteliales de mama, colon y pulmón). Se han publicado resultados prometedores en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico y el cáncer de cabeza y cuello con anticuerpos monoclonales humanizados, particularmente tratamientos dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, receptor de EGF), una proteína de señalización que normalmente controla la división celular.

El EGFR (también conocido como ErbB-1 y HER1 en seres humanos) es el receptor de la superficie celular de los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (familia de EGF) de ligandos de proteínas extracelulares (Herbst, 2004, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 59 (2 Supl.): 21-6). El receptor del factor de crecimiento epidérmico es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia de cuatro proteínas estrechamente relacionadas: EGFR (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4). Las mutaciones que afectan a la expresión o actividad del EGFR pueden dar lugar a cáncer. De hecho, los receptores de EGF están sobreexpresados en la mayoría de las neoplasias epiteliales, incluyendo las del colon y de recto. El EGFR se expresa de forma constitutiva en muchos tejidos epiteliales normales, incluyendo la piel y el folículo piloso.

El desarrollo de una terapia con anticuerpos monoclonales basada en el descubrimiento del papel de los receptores de EGF en la etiología de ciertos cánceres implicó en primer lugar el desarrollo de un anticuerpo de base murina. La inmunización de ratones con células de carcinoma epidermoide A431 humanas que expresan niveles altos de EGFR dio como resultado anticuerpos que se unían específicamente a la porción extracelular del EGFR (El-Gewely, 2006, Biotechnology Annual Review (Amsterdam, Elsevier) en la página 177). El anticuerpo monoclonal, conocido como MAb225, se unió específicamente al EGFR humano con una afinidad igual a su ligando, compitió con la unión al ligando y bloqueó la activación del receptor tirosina quinasa (Goldstein et al., 1995, Clin. Cancer Res. 1:1311-1318).

Los anticuerpos murinos tienen el potencial de generar una respuesta inmunogénica no deseada en los pacientes. Por lo tanto, el anticuerpo murino 225 se quimerizó con IgG1 humana para producir un anticuerpo monoclonal quimérico recombinante humano/de ratón conocido como C225 que tenía regiones constantes de origen de IgG1k humana y regiones murinas variables que se unen específicamente al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR). Se cree que C225 trabaja principalmente bloqueando la unión de EGF a EGFR, con lo que "priva" al tumor del factor de crecimiento necesario. C225 también se une específicamente al EGFR sobre las células normales e inhibe de forma competitiva la unión de EGF y otros ligandos, tales como factor de crecimiento transformante alfa. La unión da como resultado el bloqueo de la fosforilación y la activación de quinasas asociadas a receptores, dando como resultado la inhibición del crecimiento celular, la inducción de apoptosis y la disminución de la metaloproteínasa de matriz y la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

C225 se conoce comercialmente como Erbitux® (cetuximab) y está comercializado por ImClone y Bristol-Myers Squibb en Estados Unidos, y en otros lugares por Merck KgaA. La FDA aprobó Erbitux® en marzo de 2006 para su uso en combinación con radioterapia para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) o como agente único en pacientes que han recibido terapia previa basada en platino. Erbitux® también está indicado para el tratamiento del cáncer de colon metastásico en combinación con irinotecán (Camptosar®), un bloqueante de la ADN topoisomerasa. Lippow SM et al, Nat Biotechnol. 2007;25(10): 1171-6, introduce mutaciones que mejoran la afinidad en el cetuximab.

Se ha demostrado recientemente que el estado de mutación de un homólogo del oncogén viral del sarcoma de Kirsten (KRAS) es predictivo de respuesta al tratamiento con cetuximab en el cáncer colorrectal (Van Cutsem et al., 2008, J. Clin. Oncol 26 (May 20 suppl): Resumen 2). KRAS es una GTPasa con un papel en una serie de vías de transducción de señales. Las mutaciones en el gen que codifica KRAS, presente en más del 25 % de los cánceres colorrectales, son predictivas del éxito de los fármacos inhibidores del EGFR. La expresión del gen KRAS mutado da como resultado una respuesta disminuida a la terapia con inhibidores de EGFR. Las mutaciones en KRAS pueden

detectarse mediante diagnósticos de laboratorio comercialmente disponibles.

Erbitux® provoca una respuesta inmunológica en aproximadamente el 5 % de los pacientes. Dicha respuesta inmunológica puede dar como resultado una eliminación mediada por el complejo inmunitario de los anticuerpos o fragmentos de la circulación y hacer que la administración repetida sea inadecuada para la terapia, reduciendo de este modo el beneficio terapéutico para el paciente y limitando la readministración del anticuerpo. Además, el anticuerpo Erbitux® causa una erupción acneiforme en el 90 % de los pacientes, habiéndose hallado erupciones debilitantes en hasta un 10 % de los receptores de fármacos. Otros efectos secundarios significativos incluyen problemas en la superficie de las mucosas, malestar general, náuseas, fiebre, problemas gastrointestinales y cefalea (Chabner et al., 2008, Harrison's Manual of Oncology (New York: McGraw-Hill Medical), en las páginas 117-118). Finalmente, los problemas adicionales asociados con el uso de anticuerpos monoclonales específicos de tumores o selectivos de tumores, tales como Erbitux® como agentes terapéuticos, incluyen la variación antigénica del tumor, la destrucción ineficaz de las células después de la unión del anticuerpo monoclonal, la penetración ineficiente del anticuerpo en la masa tumoral y antígenos diana solubles que limpian el anticuerpo.

En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar anticuerpos monoclonales mejorados que interfieran con la señalización del receptor EGFR que superen uno o más de estos problemas, por ejemplo, generando variantes con mayor afinidad que Erbitux® que se pueden administrar a dosis reducidas (y, por lo tanto, cuya administración da como resultado una inmunogenicidad reducida en comparación con Erbitux®), o variantes con inmunogenicidad reducida y otros efectos secundarios en comparación con Erbitux®.

La mención o identificación de cualquier referencia en la sección 3 o cualquier otra sección de la presente solicitud no debe interpretarse como admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente divulgación.

4. SUMARIO

La presente descripción se refiere a anticuerpos anti-EGFR y a fragmentos de unión a anti-EGFR.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de unión a anti-EGFR de un anticuerpo que:

(a) comprende una secuencia V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 9 y una secuencia V_L correspondiente a la SEQ ID NO: 10 o una secuencia V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia V_L correspondiente a SEQ ID NO: 2; y

(b) tiene las siguientes sustituciones: G30Y en CDR-L1, o la combinación de sustituciones I51G en CDR-H2, Y98W en CDR-H3, G30Y en CDR-L1, y N92L en CDR-L3.

Los anticuerpos de la divulgación pueden dar como resultado respuestas de reacciones inmunogénicas reducidas (por ejemplo, células T y/o anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA)) cuando se usan terapéuticamente, ya sea porque son inherentemente menos inmunogénicos o porque tienen una afinidad de unión mejorada, por lo que se necesitan dosis más bajas. Además, se aumenta la eficacia terapéutica, ya sea porque se mejora la afinidad de unión o porque se reduce la inmunogenicidad de manera que se pueden administrar de un modo seguro dosis más altas o más dosis repetidas.

Generalmente, los anticuerpos de la divulgación están relacionados en lo que respecta a características estructurales y/o funcionales con el cetuximab, que comprende una cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, una cadena ligera (V_L) correspondientes a la SEQ ID NO: 2, tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (CDR), a las que se hace referencia en el presente documento (en orden amino a carboxi terminal) como CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5), y tres CDR de cadena ligera a las que se hace referencia en el presente documento (en orden amino a carboxi terminal) como CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 SEQ ID NO: 7) y CDR - L3 (SEQ ID NO: 8). Las secuencias de las CDR de cetuximab se muestran en las Figuras 1A y 1C, y su numeración se muestra en la Tabla 1 (para las CDR de cadena pesada) y en la Tabla 2 (para las CDR de cadena ligera). Cetuximab es un anticuerpo quimérico, cuyo anticuerpo murino parental se denomina "MAb225", y contiene epítopos inmunogénicos.

En una cierta realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de unión a anti-EGFR que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 9, y una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 10. Este anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión corresponde a una versión humanizada de MAb225 y también se denomina en el presente documento hu225. hu225 tiene tres CDR de cadena pesada, a las que se hace referencia en el presente documento (en orden amino a carboxi terminal) como CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y tres CDR de cadena ligera a las que se hace referencia en el presente documento (en orden amino a carboxi-terminal) como CDR - L1, CDR - L2 y CDR - L3. Las secuencias de las CDR de hu225 se muestran en las Figuras 1B y 1C, y su numeración se muestra en la Tabla 1 (para las CDR de cadena pesada) y en la Tabla 2 (para las CDR de cadena ligera). Las CDR de cetuximab y hu225 tienen secuencias de aminoácidos idénticas. hu225 tiene una inmunogenicidad reducida en comparación con

cetuximab.

La presente divulgación también se refiere a anticuerpos anti-EGFR y fragmentos de unión a anti-EGFR que tienen afinidad mejorada por EGR en comparación con hu225 y/o cetuximab.

5 Por ejemplo, en un aspecto, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR tienen las siguientes sustituciones de CDR en comparación con las correspondientes CDR de cetuximab o hu225: I51G en CDR-H2, Y98W en CDR-H3, G30Y en CDR-L1 y N92L en CDR-L3.

10 En ciertas realizaciones, distintas de una o más de las sustituciones o mutaciones de CDR anteriores, los anticuerpos anti-EGFR o los fragmentos de unión a anti-EGFR tienen una secuencia de V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de V_L correspondiente a la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones, distintas de dichas una o más de las sustituciones o mutaciones de CDR anteriores, los anticuerpos anti-EGFR o los fragmentos de unión a anti-EGFR tienen una secuencia de V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 9 y una secuencia de V_L correspondiente a la SEQ ID NO: 10.

15 En otros aspectos más, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación tienen una afinidad aumentada por el EGFR en comparación con cetuximab y/o hu225, preferentemente como se determina mediante clasificación celular activada por fluorescencia ("FACS"). Los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación pueden tener una afinidad que es al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,75 veces, al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces la afinidad de cetuximab y/o hu225, según se determina por FACS. En aspectos adicionales, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR pueden tener una afinidad de hasta 10 veces, hasta 15 veces, hasta 20 veces, hasta 25 veces, hasta 30 veces, hasta 40 veces, hasta 50 veces, o hasta 100 veces la de cetuximab y/o hu225, según lo determinado por FACS. Preferentemente, la afinidad de unión de un anticuerpo de la divulgación que contiene una o más sustituciones de CDR con respecto a las CDR de cetuximab o hu225 se evalúa en un anticuerpo de referencia que es idéntico en secuencia pero para dicha una o más sustituciones de CDR.

20 En aún otros aspectos, el anticuerpo anti-EGFR o anticuerpo anti-EGFR puede tener una afinidad que es de 2 a 1000 veces, de 10 a 100 veces, de 1,5 a 50 veces o de 2 a 30 veces mayor que la afinidad de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de V_L correspondiente a la SEQ ID NO: 2. En aún otros aspectos, el anticuerpo anti-EGFR o anticuerpo anti-EGFR puede tener una afinidad que es de 4 a 400 veces, 10 a 100 veces, de 1,5 a 50 veces o de 2 a 30 veces mayor que la afinidad de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 9 y una secuencia de V_L correspondiente a la SEQ ID NO: 10.

25 En algunos aspectos, los anticuerpos anti-EGFR o los fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación son anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a anti-EGFR de anticuerpos monoclonales, respectivamente. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-EGFR o los fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación son anticuerpos humanos o humanizados o fragmentos de unión a anti-EGFR de anticuerpos humanos o humanizados respectivamente. Los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación pueden ser una IgG, incluyendo IgG₁ o IgG₂. Los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación pueden estar no fucosilados.

30 Además, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR pueden incluir una o más mutaciones en la región Fc que aumenta o disminuye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC"). Los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR pueden incluir una o más mutaciones en la región Fc que aumenta la unión a Fc γ R o FcRn.

35 En algunos aspectos, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación tienen una inmunogenicidad reducida en comparación con el anticuerpo cetuximab. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión a anti-EGFR que comprende una secuencia de V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 9 y una secuencia de V_L correspondiente a la SEQ ID NO: 10.

40 En algunos aspectos, los anticuerpos anti-EGFR o los fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación están purificados. En aún otros aspectos más, los anticuerpos anti-EGFR o los fragmentos de unión a anti-EGFR se purifican hasta al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 % de homogeneidad.

45 En otro aspecto, los anticuerpos anti-EGFR o los fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación se proporcionan como conjugados de anticuerpo-fármaco.

50 En otros aspectos, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR se proporcionan con un vehículo farmacéuticamente aceptable como una composición farmacéutica. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-EGFR modificados que tienen afinidad incrementada por el EGFR en comparación con cetuximab o hu225 y/o inmunogenicidad reducida en comparación

con cetuximab.

También se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos anti-EGFR y los fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación, así como vectores que comprenden ácidos nucleicos. Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan células huésped procariontas y eucariotas transformadas con un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación, así como células huésped eucariotas (tales como mamíferos) manipuladas para expresar secuencias nucleotídicas. También se proporcionan procedimientos para producir anticuerpos anti-EGFR y fragmentos de unión a anti-EGFR cultivando células huésped.

Los anticuerpos anti-EGFR y los fragmentos de unión a anti-EGFR de la divulgación son útiles en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres epiteliales y enfermedad de Menetrier. En particular, los anticuerpos anti-EGFR son útiles en el tratamiento de cánceres epiteliales, tales como cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer oral, cáncer esofágico, cáncer vaginal, cáncer cervical, cáncer de bazo, cáncer testicular y cáncer de timo. Por lo tanto, los anticuerpos anti-EGFR y los fragmentos de unión a anti-EGFR son útiles para el tratamiento del cáncer, incluyendo el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y el cáncer colorrectal.

En un aspecto, un procedimiento de tratamiento de cáncer que comprende administrar a un ser humano que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión a anti-EGFR de la divulgación, un conjugado anticuerpo-fármaco de la divulgación, o una composición farmacéutica de la divulgación.

Debe observarse que los artículos indeterminados "un/uno" y "una" y el artículo determinado "el/la" se usan en la presente solicitud, como es habitual en las solicitudes de patente, para significar uno o más a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, el término "o" se usa en la presente solicitud, como es habitual en las solicitudes de patente, para significar el disyuntivo "o" o la conjunción "y".

Toda discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares incluidos en la presente memoria descriptiva se realiza exclusivamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente divulgación. No se debe tomar como admisión de que cualquiera o todas estas materias forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimientos generales habituales en el campo relevante a la presente divulgación, ya que existían en cualquier momento antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Las características y ventajas de la divulgación resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones de la misma.

5. Breve descripción de las tablas y figuras

La **tabla 1** muestra la numeración de los aminoácidos en las CDR de cadena pesada de cetuximab y hu225.

La **tabla 2** muestra la numeración de los aminoácidos en las CDR de cadena ligera de cetuximab y hu225.

La **tabla 3** muestra mutaciones en las CDR de la cadena pesada de cetuximab y hu225 que los estudios de unión preliminares indican una mayor afinidad por el EGFR.

La **tabla 4** muestra mutaciones en las CDR de la cadena ligera de cetuximab y hu225 que los estudios de unión preliminares indican una mayor afinidad por el EGFR.

La **tabla 5** muestra mutaciones candidatas en las CDR de la cadena pesada de cetuximab y hu225 para aumentar la afinidad por el EGFR.

La **tabla 6** muestra mutaciones candidatas en las CDR de la cadena ligera de cetuximab y hu225 para aumentar la afinidad por el EGFR.

La **tabla 7** muestra mutaciones candidatas adicionales en las CDR de la cadena pesada de cetuximab y hu225 para aumentar la afinidad por el EGFR.

La **tabla 8** muestra mutaciones candidatas adicionales en las CDR de la cadena ligera de cetuximab y hu225 para aumentar la afinidad por el EGFR.

La **tabla 9** muestra mutaciones en las CDR de cadena pesada de de cetuximab y hu225 que no afectan sustancialmente a la unión a EGFR y pueden incorporarse en los anticuerpos de la divulgación.

La **tabla 10** muestra mutaciones en las CDR de cadena ligera de de cetuximab y hu225 que no afectan sustancialmente a la unión a EGFR y pueden incorporarse en los anticuerpos de la divulgación.

La **tabla 11-1 a 11-2** muestra mutaciones conocidas en las CDR de la cadena pesada de cetuximab y hu225 que pueden incorporarse en los anticuerpos de la divulgación.

La **tabla 12** muestra mutaciones conocidas en las CDR de la cadena ligera de cetuximab y hu225 que pueden incorporarse en los anticuerpos de la divulgación.

La **tabla 13** muestra mutaciones conocidas en las CDR de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo Fv monocatenario que pueden incorporarse en los anticuerpos de la divulgación.

Las **tablas 14-1 a 14-3** muestran las afinidades de unión relativas de variantes de ejemplo de la divulgación en comparación con hu225 según se evaluó mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), análisis AlphaLISA®, análisis BIAcore y/o análisis de

ensayo de exclusión cinética (KinExA). Las **tablas 14-1 y 14-2** muestran la unión relativa de variantes de una sola sustitución con mayor afinidad por EGFR. La tabla **14-3** muestra la unión relativa de dos variantes de sustitución múltiple con mayor afinidad por EGFR.

Figuras 1A a 1C. La **figura 1A** muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadena pesada y ligera de cetuximab, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, con las regiones CDR en texto subrayado en negrita. La **figura 1B** muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadena pesada y ligera de hu225, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente, con las regiones CDR en texto subrayado en negrita. La **figura 1C** muestra las secuencias de CDR y los correspondientes identificadores de secuencia de cetuximab y hu225.

Las **figuras 2A-2B** muestran las afinidades de unión (CI_{50}) de cetuximab y hu225 a EGFR (Figura 2B), medidas en ensayos de competición FACS con cetuximab biotinilado (como se muestra en la Figura 2A).

La **figura 3** muestra los resultados del análisis FACS de las afinidades de unión de ciertas variantes de la divulgación. De izquierda a derecha, las huellas son de (i) hu225 de tipo silvestre (ensayo 1), (ii) hu225 de tipo silvestre (ensayo 2), (iii) hu225 variante Y59E y (iv) hu225 variante I51G.

Figura 4-1 a 4-2 muestra las secuencias de aminoácidos de todos los péptidos de VH y VL de cetuximab analizados como potenciales epítomos CD4⁺.

Figura 5-1 a 5-2 muestra las secuencias de aminoácidos de todos los péptidos de VH y VL de hu225 analizados como potenciales epítomos CD4⁺.

Figuras 6A-6B. La **figura 6A** muestra el índice de estimulación promedio calculado para todos los péptidos de V_H y V_L de cetuximab analizados como potenciales epítomos CD4⁺. La **figura 6B** muestra el índice de estimulación promedio calculado para todos los péptidos de V_H y V_L de hu225 analizados como potenciales epítomos CD4⁺.

6. Descripción detallada

6.1 Anticuerpos anti-EGFR

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-EGFR. A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" (Ab) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con, un antígeno particular, e incluye formas policlonales, monoclonales, modificadas genéticamente y modificadas de otro modo de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitaciones, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos) y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, incluyendo, por ejemplo, los fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG y scFv. Además, a menos que se indique lo contrario, se entiende que el término "anticuerpo monoclonal" (mAb) incluye tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación del animal y pueden tener menos unión de tejido no específica que un anticuerpo intacto (Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24:316).

El término "scFv" se refiere a un anticuerpo Fv de cadena única donde los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo tradicional se han unido para formar una cadena.

Las referencias a "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv o Fab. Las referencias a "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina de una inmunoglobulina, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Los anticuerpos (Abs) y las inmunoglobulinas (Igs) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad por la diana. Los "anticuerpos e inmunoglobulinas nativos" normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en el extremo amino, un dominio variable (V_H) seguido por una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene en el extremo amino un dominio variable (V_L) y un dominio constante en el extremo carboxi.

"Cetuximab" se refiere al anticuerpo quimérico humano/de ratón conocido como Erbitux®.

"hu225" se refiere a una versión humanizada de MA225, que es el anticuerpo parental del anticuerpo quimérico C225 (también conocido como cetuximab o Erbitux®).

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación se unen al EGFR humano e inhiben su actividad en una célula.

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación contienen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que están relacionadas en secuencia con las CDR del anticuerpo cetuximab y del anticuerpo hu225.

Las CDR también se conocen como regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera

como de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan el marco (FR). Como se conoce en la técnica, la posición/límite de aminoácidos que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de las diversas definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden considerarse posiciones hipervariables híbridas en el sentido de que estas posiciones pueden considerarse dentro de una región hipervariable bajo un conjunto de criterios mientras que se considera que están fuera de una región hipervariable bajo un conjunto diferente de criterios. Una o más de estas posiciones también pueden encontrarse en regiones hipervariables extendidas. La divulgación proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, en gran parte adoptando una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las regiones FR en el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión diana de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987)). Como se usa en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos de la inmunoglobulina se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de los residuos de aminoácidos de inmunoglobulinas de Kabat *et al.*, a menos que se indique lo contrario.

Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de cetuximab están representadas por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente. Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera también se representan en la Figura 1A. Las secuencias de las CDR de cetuximab, y sus correspondientes identificadores, se presentan en la Figura 1C. Cualquier secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 se puede usar en las composiciones y procedimientos de la presente divulgación.

Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de hu225 están representadas por SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente. Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera también se representan en la Figura 1B. Las secuencias de las CDR de hu225, que son idénticas a las secuencias de las CDR de cetuximab, y sus identificadores de secuencia se presentan en la Figura 1C. Cualquier secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10 se puede usar en las composiciones y procedimientos de la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona además fragmentos de anticuerpo anti-EGFR que comprenden secuencias de CDR que están relacionadas con las secuencias de CDR de cetuximab y de hu225. La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región variable o de unión a la diana. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Un fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un reconocimiento de diana completo y un sitio de unión. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación estrecha y no covalente (dímero V_H-V_L). Es en esta configuración en que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a la diana sobre la superficie del dímero V_H-V_L. A menudo, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión a la diana. Sin embargo, en algunos casos, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para una diana) puede tener la capacidad para reconocer y unirse a la diana. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de una sola cadena" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a la diana. Los "anticuerpos de dominio único" están compuestos por un solo dominio V_H o V_L que exhiben afinidad suficiente por la diana. En una realización específica, el anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de camélido (véase, por ejemplo, Riechmann, 1999, *Journal of Immunological Methods* 231:25-38).

El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH₁ la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen mediante la escisión del enlace disulfuro en las cisteínas bisagra del producto de digestión con pepsina de F(ab')₂. Los expertos en la técnica conocen acoplamientos químicos adicionales de fragmentos de anticuerpo.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación son anticuerpos monoclonales. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria, no está limitada a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un clon sencillo, incluido un clon eucariota, procariota o de fago, y no el procedimiento por el cual se produce. Los anticuerpos monoclonales en relación con la presente divulgación se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, incluido el uso de tecnologías de expresión en fagos, hibridoma y recombinante, o una combinación de las mismas. Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados o humanos.

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden ser anticuerpos quiméricos. El término anticuerpo "quimérico" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una

inmunoglobulina no humana, tal como anticuerpo de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulina humana, elegidas típicamente de un molde de inmunoglobulina humana. En la técnica se conocen los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos, Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202; las patentes de Estados Unidos N.º 5.807.715; 4.816.567; y 4,816.397.

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden ser humanizados. Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otros subdominios de unión a la diana de anticuerpos), que contienen secuencias mínimas derivadas de la inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también pueden comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de la secuencia consenso de una inmunoglobulina humana. Los procedimientos de humanización de anticuerpos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7; las patentes de Estados Unidos n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370 de Queen et al.; el documento EP239400; la publicación PCT WO 91/09967; la patente de Estados Unidos n.º 5,225,539; el documento EP592106; el documento EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498 (1991); Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; y la patente de Estados Unidos n.º 5.565.332.

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden ser anticuerpos humanos. Pueden ser deseables los anticuerpos anti-EGFR completamente "humanos" para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Como se usa en el presente documento, "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluidos procedimientos de expresión en fagos usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse las patentes de Estados Unidos n.º 4,444,887 y 4,716,111; y las publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741. También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; las patentes de Estados Unidos n.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Medarex (Princeton, NJ), Astellas Pharma (Deerfield, IL), Amgen (Thousand Oaks, CA) y Regeneron (Tarrytown, NY) se pueden comprometer para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita en lo que antecede. Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo (Jespers et al., 1988, Biotechnology 12:899-903).

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden ser primatizados. La expresión "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes de humano. En la técnica se conocen procedimientos para producir anticuerpos primatizados Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.658.570; 5.681.722; y 5.693.780.

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, a menudo humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En la presente divulgación, una de las especificidades de unión se puede dirigir al EGFR, la otra puede ser para cualquier otro antígeno, por ejemplo para una proteína de la superficie celular, receptor, subunidad receptora, antígeno específico de tejido, proteína derivada viralmente, una proteína de la envuelta codificada viralmente, una proteína derivada de bacterias o una proteína de la superficie bacteriana, etc.

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación incluyen anticuerpos derivatizados. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos derivatizados se han modificado típicamente mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína (véase la Sección 6.4 para una discusión sobre conjugados de anticuerpos) etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales, por ejemplo usando tecnología ambrx (véase, por ejemplo, Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10):1011-2).

En aún otra realización más de la divulgación, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos cuya secuencia se ha modificado para alterar al menos una función

efectora biológica mediada por la región constante con relación a la secuencia de tipo salvaje correspondiente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede modificarse para reducir al menos una función efectora biológica mediada por la región constante con relación a un anticuerpo no modificado, por ejemplo unión reducida al receptor Fc (FcγR). La unión a FcγR puede reducirse mutando el segmento de la región constante de la inmunoglobulina del anticuerpo en regiones particulares necesarias para las interacciones de FcγR (véase, por ejemplo, Canfield and Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491; y Lund et al., 1991, J. Immunol. 147:2657-2662). La reducción de la capacidad de unión a FcγR del anticuerpo también puede reducir otras funciones efectoras que dependen de las interacciones de FcγR, tales como opsonización y fagocitosis y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC").

En otras realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede modificarse para adquirir o mejorar al menos una función efectora biológica mediada por la región constante con relación a un anticuerpo no modificado, por ejemplo para potenciar las interacciones de FcγR (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0134709). Por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede tener una región constante que se une a FcγRIIA, FcγRIIB y/o FcγRIIIA con mayor afinidad que la correspondiente región constante de tipo salvaje.

Por lo tanto, los anticuerpos de la divulgación pueden tener alteraciones en la actividad biológica que dan lugar a una opsonización, fagocitosis o ADCC aumentada o disminuida. Dichas alteraciones son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las modificaciones en anticuerpos que reducen la actividad de ADCC se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.834.597. Una variante de disminución de la ADCC de ejemplo corresponde al "mutante 3" mostrado en la figura 3 de la patente de Estados Unidos n.º 5.834.597, donde el residuo 236 se ha delecionado y los residuos 234, 235 y 237 (utilizando numeración de UE) se sustituyen con alanitas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación tienen niveles bajos o carecen de fucosa. Los anticuerpos que carecen de fucosa se han correlacionado con una actividad de ADCC potenciada, especialmente a dosis bajas de anticuerpo. Véase Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-73. Los procedimientos para preparar anticuerpos sin fucosa incluyen el crecimiento en células YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). Las células YB2/0 expresan niveles bajos de ARNm de FUT8, que codifica α-1,6-fucosiltransferasa, una enzima necesaria para la fucosilación de polipéptidos.

En aún otro aspecto, los anticuerpos anti-EGFR o sus fragmentos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se han modificado para aumentar o reducir sus afinidades de unión al receptor Fc fetal, FcRn, por ejemplo, mediante la mutación del segmento de la región constante de inmunoglobulina en regiones concretas implicadas en las interacciones de FcRn (véase, por ejemplo, el documento WO 2005/123780). En realizaciones particulares, un anticuerpo anti-EGFR de la clase IgG está mutado de manera que al menos uno de los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido solo o en cualquier combinación de los mismos, tal como en las posiciones 250 y 428, o en las posiciones 250 y 314, o en las posiciones 314 y 428, o en las posiciones 250, 314 y 428, con las posiciones 250 y 428, una combinación específica. Para la posición 250, el residuo de aminoácido sustituido puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto a treonina, incluidos, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, valina, triptófano o tirosina. Para la posición 314, el residuo de aminoácido sustituido puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto a leucina, incluidos, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina valina, triptófano o tirosina. Para la posición 428, los residuos de aminoácido sustituidos puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto a metionina, incluidos, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina valina, triptófano o tirosina. Las combinaciones específicas de sustituciones de aminoácidos adecuadas se identifican en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos n.º 7.217.797. Dichas mutaciones aumentan la unión del anticuerpo a FcRn, que protege al anticuerpo de la degradación y aumenta su semivida.

En aún otros aspectos, un anticuerpo anti-EGFR tiene uno o más aminoácidos insertados en una o más de sus regiones hipervariables, por ejemplo, como se describe en Jung y Plücker, 1997, Protein Engineering 10(9):959-966; Yazaki et al., 2004, Protein Eng Des. Sel. 17(5):481-9. Epub 2004 Aug 17; y el documento US 2007/0280931.

En diversas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se han modificado para aumentar la expresión en huéspedes heterólogos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se han modificado para aumentar la expresión y/o la secreción en las células huésped heterólogas. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos se modifican para aumentar la expresión en bacterias, tales como *E. coli*. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos se modifican para aumentar la expresión en levaduras (Kieke et al., 1999, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96:5651-5656). En aún otras realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos se modifican para aumentar la expresión en células de insecto. En realizaciones adicionales, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos se modifican para aumentar la expresión en células de mamífero, tales como

células CHO.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se han modificado para aumentar la estabilidad de los anticuerpos durante la producción. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden modificarse para reemplazar uno o más aminoácidos, tales como asparagina o glutamina, que son susceptibles de desamidación no enzimática con aminoácidos que no sufren desamidación (Huang et al., 2005, Anal. Chem. 77:1432-1439). En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden modificarse para reemplazar uno o más aminoácidos que son susceptibles a la oxidación, tales como metionina, cisteína o triptófano, con un aminoácido que no sufre oxidación fácilmente. En aún otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden modificarse para reemplazar uno o más aminoácidos que son susceptibles a ciclación, tales como asparagina o ácido glutámico, con un aminoácido que no sufre ciclación fácilmente.

6.2 Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

La presente divulgación abarca moléculas de ácido nucleico y células huésped que codifican los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación.

Un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede prepararse mediante expresión recombinante de genes de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, una célula huésped se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinante que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina del anticuerpo, de forma que las cadenas ligera y pesada se expresan en la célula huésped y, opcionalmente, se secretan al medio donde se cultivan las células huésped, medio del cual se pueden recuperar los anticuerpos. Las metodologías de ADN recombinante estándar se usan para obtener genes de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, para incorporar estos ácidos nucleicos en vectores de expresión recombinantes y para introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989) y en la patente de Estados Unidos n.º 4.816.397.

En una realización, los anticuerpos anti-EGFR son similares al cetuximab pero para cambios en una o más CDR (a las que en el presente documento se hace referencia como que tienen secuencias "relacionadas con cetuximab"). En otra realización, los anticuerpos anti-EGFR son similares al hu225 pero para cambios en una o más CDR (a las que en el presente documento se hace referencia como que tienen secuencias "relacionadas con hu225"). Para generar ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos anti-EGFR, primero se obtienen fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada. Estos ADN pueden obtenerse mediante amplificación y modificación del ADN de la línea germinal o el ADNc que codifica las secuencias variables de las cadenas ligera y pesada, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera humanas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBASE"; véase también Kabat, E. A. et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227:116-198; y Cox et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:827-836). Un fragmento de ADN que codifica la región variable de las cadenas pesada o ligera de cetuximab o de hu225 puede sintetizarse y usarse como molde para la mutagénesis para generar una variante como se describe en el presente documento usando técnicas de mutagénesis de rutina; como alternativa, se puede sintetizar directamente un fragmento de ADN que codifica la variante.

Una vez que se han obtenido los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de V_H y V_L de cetuximab o relacionados con cetuximab, los segmentos de V_H y V_L de hu225 o relacionados con hu225, estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. La expresión "unido operativamente", como se usa en este contexto, está destinada a significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de un modo tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa mediante unión operativa del ADN que codifica la región V_H en otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH_1 , CH_2 , CH_3 y, opcionalmente, CH_4). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgA , IgE , IgM o IgD , pero, en ciertas realizaciones, es una región constante de IgG_1 o IgG_4 . Para un

gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica la región constante CH_1 de la cadena pesada.

5 El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como el gen de la cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica V_L en otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL . Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR
10 estándar. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero, en ciertas realizaciones, es una región constante kappa. Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L están unidos de forma operativa a otro fragmento que codifica un ligador flexible, por ejemplo que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4 -Ser)3, de modo que las secuencias V_H y V_L se puedan expresar en forma de una proteína monocatenaria contigua, con las regiones V_H y V_L unidas mediante el conector flexible (véase, por ejemplo,
15 Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554)..

Para expresar los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación, los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, obtenidos como se ha descrito en lo que antecede, se insertan en vectores de expresión
20 de modo que los genes están operablemente unidos a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "unido de forma operativa" quiere decir que un gen del anticuerpo está ligado en un vector tal que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirven a la función prevista de regulación de la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se escogen de modo que sean compatibles con la célula huésped usada para la expresión. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores distintos o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.
25

Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos estándar (por ejemplo, ligando sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y en el vector, o ligando los extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Antes de la inserción de las secuencias de las cadenas ligera o pesada relacionadas con cetuximab o de cetuximab, o de las secuencias de las cadenas ligera o pesada relacionadas con hu225 o de hu225, el vector de expresión puede llevar ya secuencias de las regiones constantes de anticuerpos. Por ejemplo, un abordaje a la conversión de las secuencias de V_H y V_L en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican la región constante de la cadena pesada
30 y la región constante de la cadena ligera, respectivamente, de forma que el segmento V_H esté unido operativamente al o los segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_L esté unido operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente, o como alternativa, el vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal esté unido dentro del marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulínica).
35
40

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la presente divulgación portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. Con la expresión "secuencia reguladora" se pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión proteica en células de mamífero, tal como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el potenciador/promotor del CMV), virus 40 de simios (SV40) (tal como el potenciador/promotor del SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)), y polioma. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales, y de sus secuencias, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.168.062 de Stinski, la patente de Estados Unidos n.º 4.510.245 de Bell et al., y la patente de Estados Unidos N.º 4.968.615 de Schaffner et al.
45
50
55

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped donde se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, puromicina, blasticidina, higromicina o metotrexato, a una célula huésped donde el vector se ha introducido. Entre
60
65

los genes marcadores seleccionables adecuados se incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped DHFR- con selección con metotrexato/amplificación) y el gen neo (para la selección de G418). Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el(los) vector(es) de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término “transfección” están destinadas a abarcar una amplia variedad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo electroporación, lipofección, precipitación con fosfato cálcico, transfección en DEAE-dextrano y similares.

Es posible expresar los anticuerpos de la divulgación en células huésped procarióticas o eucarióticas. En ciertas realizaciones, la expresión de anticuerpos se realiza en células eucariotas, por ejemplo, células huésped de mamífero, para la secreción óptima de un anticuerpo debidamente plegado e inmunológicamente activo. Ejemplos de células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células CHO DHFR-, descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS, células HKB y células SP2/0. Cuando los vectores de expresión que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo donde crecen las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando procedimientos de purificación proteica estándar. Las células huésped también se pueden usar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que variaciones sobre el procedimiento anterior entran dentro del alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifique la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo anti-EGFR de la presente divulgación.

También se puede usar tecnología de ADN recombinante para eliminar parte o todo el ADN que codifica una o las dos cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión a EGFR. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncado también están abarcadas por los anticuerpos de la divulgación.

Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales donde una cadena pesada y una ligera con un anticuerpo de la divulgación y las otras cadenas pesada y ligera son específicas de un antígeno diferente distinto de EGFR mediante reticulación de un anticuerpo de la divulgación a un segundo anticuerpo mediante procedimientos de reticulación química estándar. Los anticuerpos bifuncionales también pueden hacerse expresando un ácido nucleico diseñado para codificar un anticuerpo bifuncional.

En ciertas realizaciones, se pueden producir anticuerpos específicos duales, es decir anticuerpos que unen a EGFR y un antígeno no relacionado usando el mismo sitio de unión, mediante la mutación de residuos de aminoácidos en las CDR de la cadena ligera y/o de la cadena pesada. En diversas realizaciones, se pueden producir anticuerpos específicos duales que se unen a dos antígenos, tales como EGFR y HER2, mediante la mutación de residuos de aminoácidos en la periferia del sitio de unión al antígeno (Bostrom et al., 2009, Science 323:1610-1614). Los anticuerpos funcionales duales también pueden hacerse expresando un ácido nucleico diseñado para codificar un anticuerpo dual específico.

Para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación, la célula huésped se puede cotransfectar con dos vectores de expresión de la divulgación, donde el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Típicamente, los dos vectores contienen cada uno un marcador seleccionable separado. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifique ambos polipéptidos, de la cadena pesada y de la cadena ligera.

Una vez que se genera un ácido nucleico que codifica una o más porciones de cetuximab, hu225 o de un anticuerpo anti-EGFR con secuencias de CDR relacionadas con las secuencias de CDR de cetuximab o hu225, se pueden introducir otras alteraciones o mutaciones en la secuencia codificante, por ejemplo, para generar ácidos nucleicos que codifican anticuerpos con diferentes secuencias de CDR, anticuerpos con afinidad reducida por el receptor Fc, o anticuerpos de diferentes subclases.

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación también pueden producirse mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). También se pueden generar anticuerpos variantes utilizando una plataforma libre de células (véase, por ejemplo, Chu et al., Biochemia No. 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals)).

Una vez que se ha producido un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación mediante expresión recombinante, se puede purificar por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, de afinidad, particularmente de afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, proteína G o proteína Ly de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos anti-EGFR de la presente divulgación o fragmentos de los

mismos se pueden condensar con secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica por que facilitan la purificación.

Una vez aislado, un anticuerpo anti-EGFR puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alta resolución (véase, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work y Burdon, eds., Elsevier, 1980)), o mediante cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia).

6.3 Propiedades biológicas de los anticuerpos anti-EGFR

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación tienen ciertas actividades biológicas, tales como competir con cetuximab o con hu225 por la unión a EGFR o actividad de EGFR neutralizante.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación compiten con cetuximab por la unión a EGFR. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación compiten con hu225. La capacidad para competir por la unión a EGFR se puede analizar usando un ensayo competitivo. En un ejemplo de un ensayo competitivo, el EGFR se adhiere a una superficie sólida, por ejemplo una placa de micropocillos, poniendo en contacto la placa con una solución de EGFR (por ejemplo, a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante la noche a 4 °C). La placa se lava (por ejemplo, Tween 20 al 0,1 % en PBS) y se bloquea (por ejemplo, en Superblock, Thermo Scientific, Rockford, IL). Se añade una mezcla de cantidad subsaturante de cetuximab o hu225 biotinilado (80 ng/ml) y cetuximab o hu225 no marcado (el anticuerpo "de referencia"), o anticuerpo anti-EGFR competidor (el anticuerpo "de prueba") en dilución en serie (por ejemplo, a una concentración de 2,8 µg/ml, 8,3 µg/ml, o 25 µg/ml) en tampón ELISA (por ejemplo, 1 % de BSA y Tween 20 al 0,1 % en PBS) a los pocillos y las placas se incuban durante 1 hora con agitación suave. La placa se lava, se añade a cada pocillo 1 µg/ml de estreptavidina conjugada con HRP diluida en tampón ELISA y las placas se incuban durante 1 hora. Las placas se lavan y los anticuerpos unidos se detectan mediante la adición de sustrato (por ejemplo, TMB, Biofx Laboratories Inc., Owings Mills, MD). La reacción se termina mediante la adición de tampón de parada (por ejemplo, Bio Fx Stop Reagents, Biofx Laboratories Inc., Owings Mills, MD) y la absorbancia se mide a 650 nm usando un lector de microplacas (por ejemplo, VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). También se pueden usar variaciones en este ensayo competitivo para analizar la competencia entre un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y cetuximab o hu225. Por ejemplo, en ciertos aspectos, el anticuerpo anti-EGFR se usa como anticuerpo de referencia y cetuximab o hu225 se usan como anticuerpo de prueba. Adicionalmente, en lugar de EGFR soluble, se puede usar EGFR unido a membrana expresado sobre las superficies de las células (por ejemplo, células de mamífero) en cultivo. En la técnica se conocen otros formatos para ensayos de competición y pueden emplearse.

En varias realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación reduce la unión de hu225 marcado o de cetuximab marcado en al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, o un porcentaje que oscila entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación reduce la unión de hu225 marcado o cetuximab marcado en un 50 % a 70 %) cuando se usa el anticuerpo anti-EGFR a una concentración de 0,08 µg/ml, 0,4 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml o a una concentración que varía entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, a una concentración que varía de 2 µg/ml a 10 µg/ml.).

En diversas realizaciones, la unión de los anticuerpos de la divulgación a EGFR se puede determinar usando un ensayo de Savidyne KINEXA. En este ensayo, previamente se recubrieron perlas de Sepharose de flujo rápido activadas con NHS (GE Healthcare) con antígeno (50 µg de anticuerpo anti-EGFR por ml de perlas) y se bloquearon con 10 mg/ml de BSA en Tris-HCl 1 M, pH 8.0. A continuación se incuban 2 pM, 4 pM, 40 pM de un anticuerpo de la divulgación con diversas concentraciones (por ejemplo, 2,4 pM a 10 nM, diluciones en serie) de EGFR soluble en tampón de funcionamiento (PBS, Tween 20 al 0,005 % (v/v) y ovalbúmina 1 mg/ml) durante 10 horas a temperatura ambiente. Para determinar el anticuerpo libre presente en equilibrio, cada muestra se hace pasar a través de perlas recubiertas con EGFR soluble. La cantidad de anticuerpo unido a las perlas se cuantifica después pasando una solución de anticuerpo Fc antihumano de cabra (Jackson Immuno Research) marcado fluorescente (Cy5) diluido 1:4000 en tampón de ejecución sobre las perlas. La señal de fluorescencia medida es proporcional a la concentración del anticuerpo libre en equilibrio. En ciertas realizaciones, cada concentración de EGFR soluble se mide por duplicado. La constante de disociación del equilibrio (K_D) se puede obtener a partir de regresión no lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogéneo de un sitio de curva múltiple (software KINEXA).

La constante de la velocidad de asociación (k_{on}) para la unión a EGFR soluble también se puede determinar usando un ensayo de Savidyne KINEXA. Se mezclan dos anticuerpos pM con EGFR soluble 20 pM utilizando las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior. En varias ocasiones, las muestras se someten a análisis del anticuerpo libre utilizando las condiciones descritas anteriormente para la unión en equilibrio y, a continuación, la dependencia temporal resultante se ajusta usando el software KINEXA para determinar la velocidad de asociación (k_{on}). La constante de la velocidad de disociación (k_{off}) se calcula utilizando la expresión $k_{off} = K_D \times k_{on}$.

En otros aspectos, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación inhibe (o neutraliza) la actividad de EGFR en un

intervalo de ensayos *In vitro*, tal como proliferación celular, fosforilación de EGFR y apoptosis. Por ejemplo, en una realización, la actividad de EGFR analizada es la inducción de la proliferación de células de carcinoma epidérmico A431 (véase, por ejemplo, Sato et al, "Biological Effects in vitro of Monoclonal Antibodies to Human Epidermal Growth Factor Receptors", (1983), Mol. Biol. Med., 1, 511-529). En este ensayo, las células A431 se mantienen en DMEM más FBS al 10 %. El día 1, las células se colocan en PBS durante 20 minutos y se digieren con tripsina durante 5 minutos antes de sembrar en placas. Las células se siembran en placas a una densidad celular de 15.000 células por pocillo en un formato de 384 pocillos en placas de cultivo de células tratadas Greiner 384 TC usando un multidrop 384. El volumen medio final es de 50 μ l. Las placas de cultivo celular se cubren con cinta con orificios (Qiagen, Valencia, CA).. Las células se dejaron adherir durante la noche. El día dos se retira el medio de cultivo celular y se sustituye por 50 μ l de DMEM libre de rojo de fenol (sin FBS) ("pocillos de control") o DMEM y anticuerpo anti-EGFR ("pocillos de tratamiento") por duplicado a una concentración esperada de 2,5 μ g/ml. Dos pocillos de control se encuentran adyacentes a cada pocillo de tratamiento para un total de 192 pocillos de control. El día 3, se retira el medio y se reemplaza con DMEM libre de rojo de fenol que contiene el reactivo de proliferación celular MTS (Promega, Madison, WI, 1 ml/10 ml de medio). La absorbancia a 490 nm se registra después de 15 y 30 minutos. El valor medio para todos los tratamientos duplicados se divide por la media de todos los pocillos de control.

En ciertas realizaciones, la actividad analizada es la fosforilación de la tirosina quinasa EGFR. Tales ensayos de actividad se pueden realizar del siguiente modo. Las células A431 se cultivan hasta aproximadamente 70 % de confluencia en placas de 6 pocillos y se dejaron sin suero durante la noche en DMEM 0,5 % de FBS. A continuación, las células se incuban con diluciones de anticuerpo en presencia de EGF 100 nM (Upstate) durante una hora. Las células se lavan con PBS frío y se lisan con 0,5 ml de tampón de lisis. (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, 1 % de IGEPGAL CA-630, 0,25 % de desoxicolato de sodio al 0,25 %, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, vanadato de sodio 1 mM (NaVO₄), NaF 1 mM, cóctel de proteasa de 1/2 comprimido en 10 ml). El material insoluble se elimina por ultracentrifugación a 10.000 RPM durante 30 minutos. Los lisados celulares se ajustan para determinar la concentración de proteínas y las cantidades equivalentes de cada extracto se separan por SDS-PAGE. Los niveles de EGFR fosforilado se determinan mediante transferencia Western desarrollada con un anticuerpo anti-fosfo-EGFR (Upstate).

En otras realizaciones, la actividad del anticuerpo anti-EGFR se analiza mediante inducción de apoptosis de células A431. En este ensayo, las células A431 a 20.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos se incuban con 1,0 μ g/ml de anticuerpo anti - EGFR durante 0, 3, 7, 24 u 48 horas. La apoptosis se mide mediante ELISA para la fragmentación del ADN (Roche). La apoptosis basal de un anticuerpo no específico se resta de la media.

En la técnica se conocen otros formatos para ensayos de neutralización del EGFR y pueden emplearse.

En varias realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación neutraliza el EGFR en al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, o en un porcentaje que oscila entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación neutraliza la actividad de EGFR en un 50 % a 70 %) cuando se usa el anticuerpo anti-EGFR a una concentración de 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 0,1 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, o a una concentración que varía entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, a una concentración que varía de 1 μ g/ml a 5 μ g/ml).

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación es al menos 0,7 veces más eficaz, 0,8 veces más eficaz, al menos 0,9 veces más eficaz, al menos 1 vez más eficaz, al menos 1,1 veces más eficaz, al menos 1,25 veces más eficaz, al menos 1,5 veces más eficaz, al menos 2 veces más eficaz, al menos 5 veces más eficaz, al menos 10 veces más eficaz, al menos 20 veces más eficaz, al menos 100 veces más eficaz, al menos 100 veces más eficaz, al menos 200 veces más eficaz, al menos 500 veces más eficaz, al menos 1000 veces más eficaz que cetuximab o hu225 en la neutralización del EGFR o que tiene una eficacia En la neutralización del EGFR relativo a cetuximab o hu225 que varía entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 0,9 veces a 5 veces más eficaz que cetuximab o hu225 o de 2 veces a 50 veces más eficaz que cetuximab o hu225 en la neutralización del EGFR).

6.4 Propiedades cinéticas de los anticuerpos anti-EGFR

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación tienen una alta afinidad de unión por EGFR. En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-EGFR de la presente divulgación tienen constantes de velocidad de asociación específicas (valores de k_{on} K_a), constantes de velocidad de disociación (valores de k_{off} o K_d), constantes de afinidad (valores de K_A), constantes de disociación (valores de K_D) y/o valores de Cl_{50} . En ciertos aspectos, dichos valores se seleccionan de las siguientes realizaciones.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se une a EGFR con un K_A (k_{on}/k_{off}) De al menos $10^{10} M^{-1}$, al menos $4 \times 10^{11} M^{-1}$, al menos $10^{11} M^{-1}$, al menos $4 \times 10^{12} M^{-1}$, al menos $10^{12} M^{-1}$, al menos $4 \times 10^{13} M^{-1}$, al menos $10^{13} M^{-1}$, al menos $4 \times 10^{14} M^{-1}$, al menos $10^{14} M^{-1}$, al menos $4 \times 10^{15} M^{-1}$, al menos $10^{15} M^{-1}$, o con una K_A de cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, de $4 \times 10^{11} M^{-1}$ a $4 \times 10^{13} M^{-1}$ o de $4 \times 10^{12} M^{-1}$ a $4 \times 10^{15} M^{-1}$).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se une a EGFR con un una K_D (k_{off}/k_{on}) de 10^{-10} o menos, 4×10^{-11} M o menos, 10^{-11} M o menos, 4×10^{-12} M o menos, 10^{-12} M o menos, 4×10^{-13} M o menos, 10^{-13} M o menos, 4×10^{-14} M o menos, 10^{-14} M o menos, 4×10^{-15} M o menos, 10^{-15} M o menos, o con una K_D de cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, de 4×10^{-11} M a 4×10^{-13} M o de 4×10^{-12} M a 4×10^{-15} M).

En realizaciones específicas, el valor de K_D (k_{off}/k_{on}) se determina mediante ensayos bien conocidos en la técnica, *por ejemplo*, ELISA, calorimetría de titulación isotérmica (ITC), ensayo de polarización fluorescente o cualquier otro biosensor como BIAcore.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se une a EGFR e inhibe la unión de EGFR a su ligando EGF a una CI_{50} menor de 0,02 nM, menor de 0,01 nM, menor de 0,005 nM, menor de 0,002 nM, menor de 0,001 nM, menor de 5×10^{-4} nM, menor de 2×10^{-4} nM, menor de 1×10^{-4} nM, menor de 5×10^{-5} nM, menor de 2×10^{-5} nM, menor de 1×10^{-4} nM, menor de 5×10^{-6} nM, menor de 2×10^{-6} nM, menor de 1×10^{-6} nM, menor de 5×10^{-7} nM, menor de 2×10^{-7} nM, menor de 1×10^{-7} nM, o con una CI_{50} de cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 0,02 nM a 2×10^{-5} nM, o 5×10^{-5} nM a 1×10^{-7} nM). La CI_{50} puede medirse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo ELISA.

En ciertas realizaciones, las propiedades cinéticas de un anticuerpo de la divulgación son comparables o mejoradas con respecto a cetuximab o hu225 en un ensayo comparable. por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se une a EGFR con una velocidad k_{on} que varía de aproximadamente 0,5x a 1000x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, por ejemplo, una k_{on} de 0,75 de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,1x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,2x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,3x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,4x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,5x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,6x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,6x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,7x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,8x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 1,9x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 2x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 2,25x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 2,5x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 2,75x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 3x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 4x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 5x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 6x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 7x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 8x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 9x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 10x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 15x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 20x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 50x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 75x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 100x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 150x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 200x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, o una k_{on} que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo una k_{on} de 2x-75x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 5x-100x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 0,05x-1000x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, una k_{on} de 0,75x-250x de la k_{on} de cetuximab o de hu225, *etc*.

En diversas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se une a EGFR con una velocidad de k_{off} que varía de aproximadamente 0,001x a aproximadamente 3x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, por ejemplo, una k_{off} de 0,002x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,003x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,004x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,005x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,006x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,0075x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,01x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,025x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,05x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,075x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,1x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,25x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,5x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,75x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 1x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 1,25x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 1,5x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 1,75x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 2x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 2,25x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 2,5x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 3x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, o una k_{off} que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo una k_{off} de 0,01x to 1,25x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, una k_{off} de 0,05x to 2,5x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, o una k_{off} de 0,006x to 0,1 x de la k_{off} de cetuximab o de hu225, *etc*.

En otras realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se une a EGFR con un una K_A (k_{on}/k_{off}) que varía de aproximadamente 0,25x a aproximadamente 1000x de la K_A de cetuximab o de hu225, por ejemplo, una K_A de 0,5x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 0,75 de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 1x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 2x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 3x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 4x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 5x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 10x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 15x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 20x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 30x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 40x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 50x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 75x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 100x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 200x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 250x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 300x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 350x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 400x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 500x de la K_A de cetuximab o

de hu225, una K_A de 750x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 100x de la K_A de cetuximab o de hu225, o una K_A que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo una K_A de 0,75x to 100x de la K_A de cetuximab o de hu225, una K_A de 10x to 50x de la K_A de cetuximab o de hu225, o una K_A de 5x to 50x de la K_A de cetuximab o de hu225, *etc.*

5 En aún otras realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se une a EGFR con una K_D (k_{off}/k_{on}) que varía de aproximadamente 0,001x a 10x de la K_D de cetuximab o de hu225, o, por ejemplo, una K_D de 0,001x de la K_D de cetuximab o de hu225, a K_D de 0,002x de la K_D de cetuximab o de hu225, a K_D de 0,003x de la K_D de cetuximab o de hu225, a K_D de 0,004x de la K_D de cetuximab o de hu225, a K_D de 0,005x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,0075x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,01x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,025x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,05x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,075x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,1x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,2x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,3x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,4x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,5x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,75x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 1x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 1,5x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 2x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 3x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 4x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 5x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 7,5x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 10x de la K_D de cetuximab o de hu225, o una K_D que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo una K_D de 0,001x o 0,5x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,1x to 4x de la K_D de cetuximab o de hu225, una K_D de 0,05 to 1x de la K_D de cetuximab o de hu225, *etc.*

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se une a EGFR e inhibe la unión de EGFR a EGF o neutraliza la actividad de EGFR a un valor de CI_{50} que varía de aproximadamente 0,001x a 10x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, por ejemplo a un valor de CI_{50} de 0,01x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,05x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,1x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,2x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,3x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,4x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,5x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,6x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,7x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,8x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 0,9x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 1x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 1,5x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 2x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 3x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 4x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 5x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 7,5x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, a una CI_{50} de 10x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, o una CI_{50} que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo una CI_{50} de 0,01 a 0,2 de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, una IC_{50} de 0,1x a 1,5x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, una CI_{50} de 0,2x a 2x de la CI_{50} de cetuximab o de hu225, *etc.* . En ciertas realizaciones, una única sustitución de CDR puede dar como resultado las diferencias anteriores en la CI_{50} as en comparación con cetuximab o hu225, mientras que un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede comprender dicha sustitución y hasta 16 sustituciones de CDR adicionales en comparación con cetuximab o hu225.

40 6.5 Conjugados de anticuerpos

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación incluyen conjugados de anticuerpos que se han modificado, por ejemplo mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no interfiere en la unión a EGFR.

45 En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede conjugarse con un resto efector o un marcador. El término "resto efector", tal como se utiliza en el presente documento, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopia de RMN o ESR.

55 En un ejemplo, los anticuerpos anti-EGFR pueden conjugarse con un resto efector, tal como un agente citotóxico, un radionúclido o un resto de fármaco para modificar una respuesta biológica dada. El resto efector puede ser una proteína o polipéptido, tal como, por ejemplo, y sin limitación, una toxina (tal como abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas o toxina diftérica), una molécula de señalización (tal como as α -interferón, β -interferón), factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular), un agente trombótico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina) o un modificador de la respuesta biológica, tal como una citoquina o un factor de crecimiento (por ejemplo, interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor de crecimiento nervioso (NGF)).

65 En otro ejemplo, los restos efectores pueden ser citotoxinas o agentes citotóxicos. Ejemplos de citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona,

mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos.

5 Los restos efectores también incluyen, entre otros, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretanamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomycin), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), calicheamicinas o diocarmicinas) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

10 Otros restos efectores pueden incluir radionúclidos, tales como, pero sin limitaciones, ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 y fármacos tales como, pero sin limitaciones, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

15 Las técnicas para conjugar tales restos efectores a anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., en las páginas 623-53 (Robinson et al., eds., 1987)); Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83:67-123).

20 En un ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento del mismo se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), a través del extremo N o del extremo C del anticuerpo o internamente, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma, por ejemplo, al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína). El anticuerpo o fragmento del mismo puede estar unido a la otra proteína en el extremo N del dominio constante del anticuerpo. Se pueden usar procedimientos de ADN recombinante para crear tales fusiones, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745. En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida *in vivo*, y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a la albúmina o compuestos de unión a la albúmina tales como los descritos en el documento WO 2005/117984.

30 En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-EGFR se conjuga con una toxina de molécula pequeña. En ciertas realizaciones ejemplares, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se conjuga con dolostatina o un análogo o derivado peptídico de dolostatina, por ejemplo una auristatina (patentes de Estados Unidos n.º 5.635.483 y 5.780.588). El resto de fármaco de dolostatina o auristatina se puede unir al anticuerpo a través de su extremo N (amino), su extremo C (carboxilo) o internamente (documento WO 02/088172). Ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos al extremo N-terminal DE y DF, como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 7.498.298 (que divulga, por ejemplo, conectores y procedimientos de preparación de compuestos de monometilvalina, tales como MMAE y MMAF conjugados a conectores).

40 En otras realizaciones de ejemplo, las toxinas de molécula pequeña incluyen, pero no se limitan a, caliqueamicina, maytansina (patente de Estados Unidos n.º 5.208.020), tricoteno y CC1065. En una realización de la divulgación, el anticuerpo está conjugado con una o más moléculas de maytansina (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maytansina por molécula de anticuerpo). La maytansina puede, por ejemplo, convertirse en May-SS-Me que puede reducirse a May-SH3 y reaccionar con un anticuerpo (Chari et al., 1992, *Cancer Research* 52: 127-131) Para generar un conjugado de maitansinoide-anticuerpo o conjugado de fusión maitansinoide-Fc. Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse también incluyen, pero no se limitan a los mismos, $\gamma_1^1, \gamma_3^1, \gamma_3^1$ -N-acetil- γ_1^1 , PSAG, y θ_1^1 (Hinman et al., 1993, *Cancer Research* 53:3336-3342; Lode et al., 1998, *Cancer Research* 58:2925-2928; la patente de Estados Unidos n.º 5.714.586; la patente de Estados Unidos n.º 5.712.374; la patente de Estados Unidos n.º 5.264.586; la patente de Estados Unidos n.º 5.773.001).

50 Los anticuerpos de la divulgación también pueden conjugarse con liposomas para administración dirigida (véase, por ejemplo, Park et al., 1997, *Adv. Pharmacol.* 40:399-435; Marty & Schwendener, 2004, *Methods in Molecular Medicine* 109:389-401).

55 En un ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden unir a restos de poli (etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y los restos de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo amino de aminoácidos disponible o grupo amino terminal funcional situado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier amino libre, imino, tiol, hidroxilo o grupo carboxilo. Tales aminoácidos pueden producirse naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden manipularse en el fragmento utilizando procedimientos de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.219.996. Pueden usarse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG. Los restos de PEG pueden unirse covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína situado en el fragmento de anticuerpo. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar restos efectores apropiadamente activados, por ejemplo, derivados selectivos de tiol, tales como maleimidias y derivados de cisteína.

65 En un ejemplo específico, un conjugado de anticuerpo anti-EGFR es un fragmento Fab' modificado que está

PEGilado, es decir, tiene PEG (poli (etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento divulgado en el documento EP0948544. Véase también Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, 1992); Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications, (J. Milton Harris y S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D.C., 1997); y Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam and A. Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998); y Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54:531-545. El PEG se puede unir a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab' modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un solo grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede estar unido covalentemente al grupo maleimida ya cada uno de los grupos amina del residuo de lisina se puede unir un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por lo tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab' puede ser de aproximadamente 40.000 Da

La palabra "marcador" cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que puede conjugarse directa o indirectamente a un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación. El propio marcador puede ser detectable (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable. Los restos fluorescentes útiles incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Los marcadores enzimáticos útiles incluyen, pero no se limitan a los mismos, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares.

Los conjugados de anticuerpos anti-EGFR adicionales que son útiles para, entre otras cosas, fines diagnósticos, se describen en la Sección 6.5 más adelante.

6.6 Usos diagnósticos de los anticuerpos anti-EGFR

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación, incluyendo los anticuerpos que se han modificados, por ejemplo mediante biotilación, peroxidasa de rábano picante, o cualquier otro resto detectable (incluyendo los descritos en la Sección 6.4), pueden usarse ventajosamente con fines diagnósticos.

En particular, los anticuerpos anti-EGFR se pueden usar, por ejemplo, pero sin limitaciones, para purificar o detectar EGFR, incluyendo procedimientos diagnósticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen uso en inmunoensayos para medir de forma cualitativa y cuantitativa los niveles de EGFR en muestras biológicas. Véase, *por ejemplo*, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

La presente divulgación abarca además anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de los mismos conjugados con un agente diagnóstico. Los anticuerpos pueden usarse diagnósticamente, por ejemplo, para detectar la expresión de una diana de interés en células, tejidos o suero específicos; o para monitorizar el desarrollo o la progresión de una respuesta inmunológica como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar mediante acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones que usan varias tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente al anticuerpo (o fragmento del mismo) o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la materia. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tales como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, *glucosa* oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, puntos cuánticos o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

La divulgación proporciona la detección de la expresión de EGFR, que comprende poner en contacto una muestra biológica (células, tejido, o fluido corporal de un individuo) usando uno o más anticuerpos anti-EGFR de la divulgación (opcionalmente conjugado a un resto detectable) y detectar si o no la muestra es positiva para la expresión de EGFR, o si la muestra tiene una expresión alterada (por ejemplo, reducida o aumentada) en comparación con una muestra de control.

Las enfermedades que pueden diagnosticarse utilizando los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a las mismas, las enfermedades descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tejido o fluido corporal es sangre periférica, leucocitos de sangre periférica, tejidos de biopsia tales como biopsias de

mama o de ganglios linfáticos y tejido.

6.7 Procedimientos terapéuticos que utilizan anticuerpos anti-EGFR

5 6.7.1 Beneficios clínicos

Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación se pueden usar para tratar diversas neoplasias. En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden usarse para tratar la enfermedad de Menetrier.

10 Los anticuerpos de la divulgación son útiles en el tratamiento de tumores, incluyendo cánceres y tumores benignos. Más particularmente, los cánceres que son susceptibles de tratamiento por los anticuerpos de la divulgación incluyen aquellos que expresan exceso de EGFR. En ciertas realizaciones, los cánceres que son susceptibles al tratamiento con los anticuerpos divulgados en el presente documento incluyen cánceres de células epiteliales. En realizaciones
15 incluyen cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer oral, cáncer esofágico, cáncer vaginal, cáncer cervical, cáncer de bazo, cáncer testicular y cáncer de timo. En algunas realizaciones particulares, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación se usan para tratar el cáncer de cabeza y cuello en un paciente humano. En otras realizaciones particulares, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación se
20 usan para tratar el cáncer colorrectal en un paciente humano.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar cualquiera de las enfermedades anteriores en un paciente que lo necesite, que comprende: administrar al paciente un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación. Opcionalmente, dicha administración se repite, por ejemplo, después de un día, dos días, tres días,
25 cinco días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, ocho semanas, dos meses o tres meses. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente. La administración puede repetirse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más. Por ejemplo, de acuerdo con ciertos regímenes de dosificación, un paciente recibe terapia anti-EGFR durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, 6 meses, 1 año o más.
30 La cantidad de anticuerpo anti-EGFR administrado al paciente es, en ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, una cantidad "terapéuticamente eficaz" de anticuerpo EGFR puede administrarse como una dosis única o durante el transcurso de un régimen terapéutico, por ejemplo, a lo largo de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, un año o más. Los regímenes terapéuticos de ejemplo se describen en la Sección 6.9 a continuación.

De acuerdo con la presente divulgación, el tratamiento de una enfermedad abarca el tratamiento de pacientes ya diagnosticados con cualquier forma de la enfermedad en cualquier estadio o manifestación clínica; El retraso de la aparición o evolución o agravamiento o deterioro de los síntomas o signos de la enfermedad; y/o prevenir y/o reducir la gravedad de la enfermedad.

40 Un "sujeto" o "paciente" al que se administra el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación es, preferentemente, un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, etc.) o un primate (por ejemplo, mono o humano). En ciertas realizaciones, el sujeto o paciente es un ser humano. En ciertos aspectos, el ser humano es un paciente adulto. En otros aspectos, el ser humano es un paciente pediátrico.

45 6.8 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los agentes terapéuticos de combinación descritos en la Sección 6.8 a continuación. Las composiciones se suministrarán normalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del procedimiento deseado de administración a un paciente).

55 Los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden administrarse a un paciente mediante diversas vías, tales como por vía oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intraocular, tópica, intratecal e intracerebroventricular. La vía más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá del anticuerpo particular, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto.

60 Para el tratamiento de las indicaciones descritas en el presente documento, la dosis eficaz de un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede variar desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 500 mg/m² (es decir., de aproximadamente 0,003 a aproximadamente 13 mg/kg para un ser humano adulto medio que tiene un peso corporal de 60 kg y una superficie corporal de 1,6 m²) para una única administración (por ejemplo, bolo), múltiples administraciones o administración continua, o para lograr una concentración sérica de 0,01-5000 µg/ml,
65 concentración sérica una única administración (por ejemplo, bolo), múltiples administraciones o administración continua, o cualquier intervalo o valor efectivo en el mismo dependiendo de la afección a tratar, la vía de

administración y la edad, el peso y el estado del sujeto. En ciertas realizaciones, *por ejemplo*, para el tratamiento del cáncer, cada dosis puede variar desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 250 mg por metro² de superficie corporal, por ejemplo, de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg por metro² del área de superficie corporal, por ejemplo, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg por metro² del área de superficie corporal. El anticuerpo puede formularse como una solución acuosa y administrarse por inyección subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación por dosis. Dicha unidad puede contener, por ejemplo, pero sin limitación, de 0,1 mg a 5 g, por ejemplo, de 1 mg a 1 g, o de 10 a 50 mg. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en la divulgación pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo, por ejemplo, de la afección que se va a tratar o la vía de administración.

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden prepararse para el almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con vehículos excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables típicamente empleados en la técnica (todos los cuales se denominan en el presente documento "vehículos"), es decir, agentes tampón, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicadores, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos diversos. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol, ed. 1980). Tales aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

Los agentes tampón ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes a una concentración comprendida entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 50 mM. Los agentes tampón adecuados para su uso con la presente divulgación incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones de citrato (por ejemplo, citrato monode sodio-citrato de disodio, mezcla de ácido cítrico-citrato tride sodio, mezcla de ácido cítrico-citrato monode sodio, etc), tampones de succinato (por ejemplo, succinato monode sodio de ácido succínico, mezcla de ácido succínico - hidróxido de sodio, mezcla de succinato dide sodio- ácido succínico etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc), tampones de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico - fumarato monode sodio, mezcla de ácido fumárico - fumarato dide sodio, mezcla de fumarato monode sodio - fumarato dide sodio, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico - gliconato de sodio, mezcla de ácido glucónico - hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico- gluconato de potasio, etc), Tampón de oxalato (por ejemplo, mezcla ácido oxálico - oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico - hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico - oxalato de potasio, etc), tampones de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico -lactato de sodio, mezcla de ácido láctico - hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico - lactato de potasio, etc.) y tampones de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético - acetato de sodio, mezcla de ácido acético - hidróxido de sodio, etc.). Adicionalmente, se pueden usar tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Pueden añadirse conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y pueden añadirse en cantidades que varían de 0,2 % -1 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente divulgación incluyen fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio y alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol. Se pueden añadir isotonicificadores a veces conocidos como "estabilizantes" para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente divulgación e incluyen alcoholes de azúcares polivalentes, por ejemplo, alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizantes se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función desde un agente de carga a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcares polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos, tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc, azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tio-sulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 residuos o menos); proteínas, tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona monosacáridos, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos, tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos, tales como rafinosa; y polisacáridos, tales como dextrano. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 pesos por parte de peso de proteína activa.

Pueden añadirse tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica frente a la agregación inducida por agitación, que también permite que la formulación se exponga en la superficie de cizallamiento estresada sin causar la desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188 etc), polioles Pluronic, monoéteres de polioxietilensorbitano

(TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

- 5 Otros diversos excipientes adicionales incluyen agentes de carga (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y codisolventes.

10 La formulación del presente documento también puede contener un agente terapéutico combinado además del anticuerpo anti-EGFR de la divulgación. Ejemplos de agentes terapéuticos de combinación adecuados se proporcionan en la Sección 6.8 a continuación.

15 El programa de dosificación para la administración subcutánea puede variar de una vez cada seis meses a diario dependiendo de una serie de factores clínicos, incluyendo el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del paciente al anticuerpo anti-EGFR.

20 La dosificación de un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación a administrar variará de acuerdo con el anticuerpo particular, el tipo de enfermedad, el sujeto y la gravedad de la enfermedad, el estado físico del sujeto, el régimen terapéutico (por ejemplo, si se usa un agente terapéutico combinado), y la vía de administración seleccionada; un experto en la materia puede determinar fácilmente la dosis apropiada.

25 Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad óptima y la separación de dosis individuales de un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se determinará mediante la naturaleza y la extensión de la afección que se está tratando, la forma, la ruta y el sitio de administración, y la edad y el estado del sujeto particular que se está tratando, y que un médico finalmente determinará las dosificaciones apropiadas que se utilizarán. Esta dosificación puede repetirse tantas veces como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o la frecuencia de la dosis puede alterarse o reducirse de acuerdo con la práctica clínica normal.

6.9 Terapia combinada

30 A continuación se describen procedimientos combinatorios donde pueden utilizarse los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación. Los procedimientos combinados de la divulgación implican la administración de al menos dos agentes a un paciente, el primero de los cuales es un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación, y el segundo de los cuales es un agente terapéutico de combinación. El anticuerpo anti-EGFR y el agente terapéutico combinado pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado.

35 Los procedimientos de tratamiento combinado de la presente divulgación pueden dar como resultado un efecto mayor que aditivo, proporcionando beneficios terapéuticos donde ni el anticuerpo anti-EGFR ni el agente terapéutico combinado se administran en una cantidad que sea solo terapéuticamente eficaz.

40 En los presentes procedimientos, el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y el agente terapéutico combinado pueden administrarse concurrentemente, simultáneamente o sucesivamente. Como se usa en el presente documento, se dice que el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y el agente terapéutico combinado se administran sucesivamente si se administran al paciente el mismo día, por ejemplo, durante la misma visita del paciente. La administración sucesiva puede producirse con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas de separación. Por el contrario, se dice que el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y el agente terapéutico combinado se administran por separado si se administran al paciente en los diferentes días, por ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y el agente terapéutico combinado pueden administrarse a intervalos de 1, 2 o 3 días, de una semana, de 2 semanas o mensualmente. En los procedimientos de la presente divulgación, la administración del anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede preceder o seguir a la administración del agente terapéutico combinado.

50 Como ejemplo no limitativo, el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y el agente terapéutico combinado se pueden administrar simultáneamente durante un período de tiempo, seguido de un segundo periodo de tiempo donde la administración del anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y el agente terapéutico combinado se alterna.

55 Debido a los efectos potencialmente sinérgicos de administrar un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación y un agente terapéutico combinado, dichos agentes pueden administrarse en cantidades que, si uno o ambos agentes se administran solos, no son terapéuticamente eficaces.

60 En ciertos aspectos, el agente terapéutico combinado es un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un fármaco antirreumático, un agente antiinflamatorio, un agente radioterapéutico, un agente inmunosupresor o un fármaco citotóxico.

65 Se contempla que cuando se usan para tratar diversas enfermedades, los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación pueden combinarse con otros agentes terapéuticos adecuados para las mismas enfermedades o enfermedades similares. Cuando se usan para tratar el cáncer, los anticuerpos de la presente divulgación pueden usarse en combinación con terapias de cáncer convencionales, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia o

combinaciones de las mismas.

En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia tumoral de combinación con el anticuerpo de la divulgación incluyen antagonistas, por ejemplo anticuerpos, de otros factores que están implicados en el crecimiento tumoral, tales como HER2, HER3, HER4, VEGF o TNF- α .

A veces, para el tratamiento de cánceres puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización preferida, el anticuerpo anti-EGFR se coadministra con un agente inhibidor del crecimiento.

Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las que se usan actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y del anticuerpo anti-EGFR.

Para el tratamiento de cánceres, los agentes antiinflamatorios pueden utilizarse adecuadamente en combinación con los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación. Los agentes antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a los mismos, acetaminógeno, difenhidramina, meperidina, dexametasona, pentasa, mesalazina, asacol, fosfato de codeína, benilato, fenbufeno, naprosina, diclofenaco, etodolaco e indometacina, aspirina e ibuprofeno.

Para el tratamiento de cánceres, los agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse adecuadamente en combinación con los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a los mismos, moléculas radiactivas, toxinas, también denominadas citotoxinas o agentes citotóxicos, que incluye cualquier agente que sea perjudicial para la viabilidad de células, agentes y liposomas u otras vesículas que contienen compuestos quimioterapéuticos. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero sin limitación, 1-deshidrotestosterona, 5-fluorouracil decarbazina, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleucina, un anticuerpo anti- α 5 β 1 integrina, agentes alquilantes, alopurinol de soido, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC)), agentes antimetabólicos, cisplorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, diamino dicloro platino, antraciclina, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG vivo (intravesical), betametasona fosfato de soido y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfán, leucovorina cálcica, caliqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), clorambucilo, cisplatino, cladribina, colchicina, estrógenos conjugados, ciclofosfamida, ciclotosfamida, citarabina, citarabina, citocalasina B, citoxan, dacarbazina, dactinomicina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorrubicina HCl, citrato de daunorubicina, denileucina difitox, dexrazoxano, dibromomanitol, dihidroxiantracindiona, docetaxel, mesilato de dolasetrón, doxorubicina HCl, dronabinol, L-asparaginasa de *E coli*, eoloxicimab, emetina, epoetina- α , L-asparaginasa de *Erwinia*, estrógenos esterificados, estradiol, fosfato de soido de estramustina, bromuro de etidio, etinilestradiol, etidronato, factor etoposídico citroruram, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, gemcitabina HCl, glucocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, granisetrón Gcl, hidroxiiurea, idarubicina HCl, ifosfamida, interferón α -2b, irinotecán HCl, letroxol, leucovorina cálcica, acetato de leuprolida, levamisol HCl, lidocaína, lomustina, maytansinoide, mecloretamina HCl, acetato de mdroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán HCl, mercaptipurina, mesna, metotrexato, metiltestosterona, mitramicina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octreótido, ondansetrón HCl, paclitaxel, pamidronato dide soido, pentostatina, pilocarpina HCl, plimicina, polifeprosano 20 con implante de carmustina, porfímero de soido, procaína, procarbazona HCl, propranolol, rituximab, sargramostim, estreptozotocina, tamoxifen, taxol, tenipósido, tenopósido, testolactona, tetracaína, tiopa clorambucilo, tioguanina, tiotopa, topotecán HCl, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoin, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina.

Cualquier agente antiangiogénico puede usarse junto con los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación, incluyendo los enumerados por Carmeliet y Jain, 2000, Nature 407: 249 - 257. En ciertas realizaciones, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF u otro antagonista del receptor de VEGF, tal como variantes de VEGF, fragmentos del receptor de VEGF soluble, aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosina quinasas VEGFR y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o además de, un anticuerpo anti-VEGF puede coadministrarse al paciente.

En ciertas realizaciones, por ejemplo para tratar la enfermedad de Menetrier, se puede usar un anticuerpo anti-EGFR junto con un antagonista de TNF- α . Ejemplos de tales antagonistas de TNF- α incluyen, pero no se limitan a los mismos, receptores de TNF- α solubles; etanercept (ENBRELTM; Immunex) or o un fragmento, derivado o análogo del mismo; infliximab (REMICADE®; Centacor) o un derivado, análogo o fragmento de unión a antígeno del mismo; IL-10, que se sabe que bloquea la producción de TNF- α a través de macrófagos activados con interferón γ (Oswald et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8676-8680), TNFR-IgG (Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539); el producto murino TBP-1 (Serono/Yeda); la vacuna CytoTAb (Protherics); molécula antisentido 104838 (ISIS); el péptido RDP-58 (SangStat); talidomida (Celgene); CDC-801 (Celgene); DPC-333 (Dupont); VX-745 (Vertex); AGIX-4207 (AtheroGenics); ITF-2357 (Italfarmaco); NPI-13021-31 (Nereus); SCIO-469 (Scios); TACE targeter (Immunix/AHP); CLX-120500 (Calyx); tiazolopirim (Dynavax); auranofina (Ridaura) (SmithKline Beecham Pharmaceuticals); quinacrina (mepacrina diclorhidrato); tenidap (Enablex); melanina (Large Scale Biological); y agentes anti-p38 MAPK de Uriach. En diversas realizaciones, el antagonista de TNF- α es un anticuerpo.

En algunos aspectos, se puede usar un anticuerpo anti-EGFR junto con un inhibidor de la proteína tirosina quinasa (PTK) de molécula pequeña. En algunas realizaciones, el inhibidor de PTK es específico para la tirosina quinasa EGFR. En otras realizaciones, el inhibidor de PTK se une a más de una de la familia HER de tirosina quinasas (por ejemplo, EGFR, HER2 y/o HER4). En aún otras realizaciones, los inhibidores de PTK se unen e inhiben las tirosina quinasas de una o más proteínas que interactúan con o son reguladas por uno o más miembros de la familia HER, por ejemplo proteínas implicadas en una o más cascadas de señalización que se originan con uno o más miembros de la familia HER. En otras realizaciones, los inhibidores de la proteína tirosina quinasa útiles en las composiciones y procedimientos de la invención incluyen inhibidores de PTK que no se unen selectivamente a la familia HER de tirosina quinasas receptoras, sino que también se unen a los dominios de tirosina quinasa de otras familias de proteínas tales como VEGFR, PDGFR, y/o Raf.

En algunas realizaciones, la tirosina quinasa es una tirosina quinasa receptora, es decir, es un dominio intracelular de una proteína mayor que tiene un dominio de unión al ligando extracelular y se activa mediante la unión de uno o más ligandos. En ciertas realizaciones, la proteína tirosina quinasa es una tirosina quinasa no receptora. Los inhibidores de PTK para su uso en los procedimientos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de PTK útiles en los procedimientos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a gefitinib (ZD-1839, Iressa®), erlotinib (OSI-1774, Tarceva™), canertinib (CI-1033), vandetanib (ZD6474, Zactima®), tirfostina AG-825 (CAS 149092-50-2), lapatinib (GW-572016), sorafenib (BAY43-9006), AG-494 (CAS 133550-35-3), RG-13022 (CAS 149286-90-8), RG-14620 (CAS 136831-49-7), BIBW 2992 (Tovok), tirfostina 9 (CAS 136831-49-7), tirfostina 23 (CAS 118409-57-7), tirfostina 25 (CAS 118409-58-8), tirfostina 46 (CAS 122520-85-8), tirfostina 47 (CAS 122520-86-9), tirfostina 53 (CAS 122520-90-5), buteína (1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propen-1-ona 2',3,4,4'-tetrahidroxichalcona; CAS 487-52-5), curcumina ((E,E)-1,7-bis(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona; CAS 458-37-7), N4-(1-Bencil-1H-indazol-5-il)-N6,N6-dimetil-pirido-[3,4-d]-pirimidina-4,6-diamina (202272-68-2), AG-1478, AG-879, (3-(6-(3-trifluorometil-fenilamino)-pirimidin-4-ilamino)-fenil)-amida de ácido ciclopropanocarboxílico (CAS 879127-07-8), N8-(3-cloro-4-fluorofenil)-N2-(1-metilpiperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, 2HCl (CAS 196612-93-8), 4-(4-Benciloxianilino)-6,7-dimetoxiquinazolina (CAS 179248-61-4), N-(4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)pirido[3,4-d]pirimidin-6-il)2-butinamida (CAS 881001-19-0), EKB-569, HKI-272, y HKI-357.

En una realización específica, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se usa en combinación con terapia de radiación. Esta combinación es adecuada para, entre otros, el tratamiento inicial de pacientes con carcinoma de células escamosas avanzado local o regionalmente de cabeza y cuello.

En otra realización específica, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se usa como un solo agente después de una terapia sin éxito basada en platino. Este régimen es adecuado para, entre otros, el tratamiento de pacientes con carcinoma de células escamosas recurrente o metastásico de cabeza y cuello.

En aún otra realización específica, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se usa como terapias sin éxito basadas en irinotecán y basadas en oxaliplatino. Este régimen es adecuado para, entre otros, el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que sobreexpresa EGFR. Este régimen también es adecuado para, entre otros, el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que sobreexpresa EGFR que son intolerantes a terapias basadas en irinotecán.

En otra realización específica, el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se usa en combinación con irinotecán. Esta combinación es adecuada para, entre otros, el tratamiento de pacientes con carcinoma colorrectal metastásico que sobreexpresa EGFR que son resistentes a quimioterapia basada en irinotecán.

6.10 Regímenes terapéuticos

La presente divulgación proporciona regímenes terapéuticos que implican la administración de los anticuerpos anti-EGFR de la divulgación. El régimen terapéutico variará dependiendo de la edad, el peso y el estado de enfermedad del paciente. El régimen terapéutico puede continuar durante 2 semanas indefinidamente. En realizaciones específicas, el régimen terapéutico se continúa durante 2 semanas a 6 meses, de 3 meses a 5 años, de 6 meses a 1 o 2 años, de 8 meses a 18 meses, o similares. El régimen terapéutico puede ser un régimen de dosis no variable o un régimen de múltiples dosis variables.

Para los regímenes de dosificación de ejemplo descritos a continuación, el anticuerpo anti-EGFR puede administrarse como una solución estéril, sin conservantes para administración subcutánea.

Para el tratamiento del carcinoma de células escamosas avanzado local o regionalmente de cabeza y cuello en combinación con radioterapia, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede administrarse por vía intravenosa una semana antes del comienzo de la radioterapia a una dosis inicial de 0,1 a 500 mg/m² (por ejemplo de 0,003 a 13,3 mg/kg para un humano adulto medio que pesa 60 kg y que tiene una superficie corporal de 1,6 m²). En realizaciones específicas, la dosis inicial es de 0,1-400 mg/m², 0,25-300 mg/m², 0,5-250 mg/m², 1-200 mg/m², 1-150 mg/m², 2-100 mg/m², 5-75 mg/m², 8-50 mg/m², 10-350 mg/m², 15-300 mg/m², 20-250 mg/m², 30-200 mg/m² o 40-100 mg/m². Después de la dosis inicial, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación puede administrarse por vía

intravenosa semanalmente durante 6-7 semanas (es decir, La duración de la radioterapia) a una dosis de 0,1 a 300 mg/m² (es decir, de 0,003 a 8 mg/kg kg para un humano adulto medio que pesa 60 kg y que tiene una superficie corporal de 1,6 m²). En realizaciones específicas, la dosis posterior semanal es de 0,1 a 250 mg/m², tal como 0,5-200 mg/m², tal como 1-150 mg/m², tal como 2-100 mg/m², tal como 2.5-100 mg/m², tal como 5-75 mg/m², tal como 10-50 mg/m², tal como 15-150 mg/m², tal como 20-100 mg/m², tal como 30-125 mg/m², tal como 40-150 mg/m², o tal como 50-175 mg/m².

Para el tratamiento del carcinoma de células escamosas recurrente o metastásico de cabeza y cuello tras un tratamiento sin éxito con una terapia previa basada en platino, se administra un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación por vía intravenosa como agente único a una dosis inicial de 0,1 a 500 mg mg/m² (por ejemplo de 0,003 a 13,3 mg/kg para un humano adulto medio que pesa 60 kg y que tiene una superficie corporal de 1.6 m²). En realizaciones específicas, la dosis inicial es de 0,1-400 mg/m², 0,25-300 mg/m², 0,5-250 mg/m², 1-200 mg/m², 1-150 mg/m², 2-100 mg/m², 5-75 mg/m², 8-50 mg/m², 10-350 mg/m², 15-300 mg/m², 20-250 mg/m², 30-200 mg/m² o 40-100 mg/m². Después de la dosis inicial, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se administra por vía intravenosa una vez a la semana a una dosis de 0,1 a 300 mg/m² (es decir, de 0,003 a 8 mg/kg kg para un humano adulto medio que pesa 60 kg y que tiene una superficie corporal de 1,6 m²). En realizaciones específicas, la dosis posterior semanal es de 0,1 a 250 mg/m², tal como 0,5-200 mg/m², tal como 1-150 mg/m², tal como 2-100 mg/m², tal como 2.5-100 mg/m², tal como 5-75 mg/m², tal como 10-50 mg/m², tal como 15-150 mg/m², tal como 20-100 mg/m², tal como 30-125 mg/m², tal como 40-150 mg/m², o tal como 50-175 mg/m².

Para el tratamiento de cáncer colorrectal que expresa EGFR después de un tratamiento infructuoso con ambas terapias a base de irinotecán y a base de oxaliplatino o en pacientes que son intolerantes a regímenes basados en irinotecán, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se administra por vía intravenosa como un solo agente a una dosis inicial de 0,1 a 500 mg/m² (por ejemplo, de 0,003 a 13,3 mg/kg para un humano adulto medio que pesa 60 kg y que tiene una superficie corporal de 1,6 m²). En realizaciones específicas, la dosis inicial es de 0,1-400 mg/m², 0,25-300 mg/m², 0,5-250 mg/m², 1-200 mg/m², 1-150 mg/m², 2-100 mg/m², 5-75 mg/m², 8-50 mg/m², 10-350 mg/m², 15-300 mg/m², 20-250 mg/m², 30-200 mg/m² o 40-100 mg/m². Después de la dosis inicial, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se administra por vía intravenosa una vez a la semana a una dosis de 0,1 a 300 mg/m² (es decir, de 0,003 a 8 mg/kg kg para un humano adulto medio que pesa 60 kg y que tiene una superficie corporal de 1,6 m²). En realizaciones específicas, la dosis posterior semanal es de 0,1 a 250 mg/m², tal como 0,5-200 mg/m², tal como 1-150 mg/m², tal como 2-100 mg/m², tal como 2.5-100 mg/m², tal como 5-75 mg/m², tal como 10-50 mg/m², tal como 15-150 mg/m², tal como 20-100 mg/m², tal como 30-125 mg/m², tal como 40-150 mg/m², o tal como 50-175 mg/m².

Para el tratamiento del carcinoma colorrectal metastásico que expresa EGFR en pacientes que son refractarios a la quimioterapia basada en irinotecán se administra un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación por vía intravenosa como agente único a una dosis inicial de 0,1 a 500 mg/m² (por ejemplo de 0,003 a 13,3 mg/kg para un humano adulto medio que pesa 60 kg y que tiene una superficie corporal de 1,6 m²). En realizaciones específicas, la dosis inicial es de 0,1-400 mg/m², 0,25-300 mg/m², 0,5-250 mg/m², 1-200 mg/m², 1-150 mg/m², 2-100 mg/m², 5-75 mg/m², 8-50 mg/m², 10-350 mg/m², 15-300 mg/m², 20-250 mg/m², 30-200 mg/m² o 40-100 mg/m². Después de la dosis inicial, un anticuerpo anti-EGFR de la divulgación se administra por vía intravenosa una vez a la semana a una dosis de 0,1 a 300 mg/m² (es decir, de 0,003 a 8 mg/kg kg para un humano adulto medio que pesa 60 kg y que tiene una superficie corporal de 1,6 m²). En realizaciones específicas, la dosis posterior semanal es de 0,1 a 250 mg/m², tal como 0,5-200 mg/m², tal como 1-150 mg/m², tal como 2-100 mg/m², tal como 2.5-100 mg/m², tal como 5-75 mg/m², tal como 10-50 mg/m², tal como 15-150 mg/m², tal como 20-100 mg/m², tal como 30-125 mg/m², tal como 40-150 mg/m², o tal como 50-175 mg/m².

6.11 Kits diagnósticos y farmacéuticos

Se incluyen en la presente divulgación kits farmacéuticos que contienen los anticuerpos anti-EGFR (incluyendo conjugados de anticuerpos) de la divulgación. El kit farmacéutico es un envase que comprende el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación (por ejemplo, ya sea en forma liofilizada o como una solución acuosa) y uno o más de los siguientes:

- Un agente terapéutico combinado, por ejemplo, como se describe en la Sección 6.8 anterior;
- un dispositivo para administrar el anticuerpo anti - EGFR, por ejemplo, una pluma, una aguja y/o una jeringuilla; y
- agua de calidad farmacéutica o tampón para volver a suspender el anticuerpo si el anticuerpo está en forma liofilizada.

En ciertos aspectos, cada dosis unitaria del anticuerpo anti-EGFR se envasa por separado, y un kit puede contener una o más dosis unitarias (por ejemplo, dos dosis unitarias, tres dosis unitarias, cuatro dosis unitarias, cinco dosis unitarias, ocho dosis unitarias, diez dosis unitarias, o más). En una realización específica, las una o más dosis unitarias están alojadas cada una en una jeringa o pluma.

También se incluyen en el presente documento kits de diagnóstico que contienen los anticuerpos anti-EGFR (incluyendo conjugados de anticuerpo) de la divulgación. El kit diagnóstico es un envase que comprende el anticuerpo anti-EGFR de la divulgación (por ejemplo, ya sea en forma liofilizada o como una solución acuosa) y uno

o más reactivos útiles para realizar un ensayo diagnóstico. Cuando el anticuerpo anti-EGFR está marcado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o un tampón de lisis), y similares. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR incluido en un kit de diagnóstico se inmoviliza sobre una superficie sólida, o una superficie sólida (por ejemplo, un portaobjetos) donde el anticuerpo puede inmovilizarse se incluye en el kit. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En una realización específica, el anticuerpo y uno o más reactivos pueden proporcionarse (individualmente o combinados) como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo excipientes que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

7. Ejemplo 1: Comparación de la afinidad de unión de cetuximab (erbitux) y hu225 a EGFR

Las afinidades de unión relativas de cetuximab y hu225 a EGFR se determinaron mediante un ensayo de competición usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Las células A431 se cultivaron hasta 2×10^5 por pocillo de placas de 96 pocillos de fondo en V. Las células se lavaron con tampón de tinción para FACS (FSB). Comenzando con una concentración inicial de $10 \mu\text{g/ml}$ de cada uno de los anticuerpos competidores (cetuximab no marcado y hu225), se hicieron diluciones en serie 1:3. El cetuximab biotinilado se diluyó hasta una concentración final de $0,5 \mu\text{g/ml}$ (derivada de los resultados de titulación). A continuación, el cetuximab biotinilado se mezcló con cualquier anticuerpo competidor a diversas concentraciones y las mezclas se transfirieron a las placas de 96 pocillos que contenían las células A431. Las placas se incubaron después sobre hielo durante 1 hora, y después se lavaron dos veces con FSB. Se añadieron a los pocillos $25 \mu\text{l}$ de conjugado de etrepavidina-RPE (Biosource) diluido a $2,5 \mu\text{g/ml}$ en FSB y las placas se incubaron en hielo durante otros 30 minutos a oscuras. Las células se lavaron dos veces con FSB, y las células teñidas se resuspendieron con $200 \mu\text{l}$ de tampón de fijación (paraformaldehído al 1 %). Las muestras se leyeron utilizando un citómetro de flujo.

Los resultados de tres experimentos se muestran en la Figura 2 e indican que las afinidades de unión medidas (CI_{50}) de cetuximab y hu225 a EGFR son comparables. El término "chErbitux" se refiere a cetuximab.

8. Ejemplo 2: Identificación de variantes de hu225 con afinidad aumentada POR EGFR

El anticuerpo hu225 se sometió a un amplio análisis mutacional para identificar mutantes que habían aumentado la afinidad a EGFR en comparación con hu225 de tipo salvaje. El aumento de la afinidad de los candidatos mutantes de alta afinidad por EGFR en comparación con hu225 se analizó por FACS para confirmar su aumento relativo en la unión a EGFR en comparación con hu225.

8.1 Materiales y procedimientos

Para determinar la unión de variantes individuales a EGFR, se incubaron variantes de inmunoglobulina de hu225 mostradas en la superficie celular con EGFR soluble en condiciones subsaturantes (por debajo de K_D), y el grado de unión se cuantificó mediante FACS. Se construyeron variantes de hu225 individuales en el vector de presentación en la superficie de células de mamífero (Akamatsu et al., 2007, J. Immunol. Methods 327(1-2):40-52) y se transfirieron a una línea celular humana. Se mezclaron 400 ng de ADN plasmídico en $50 \mu\text{l}$ de medio sin suero-hibridoma (SFM) con $1 \mu\text{l}$ de Lipofectamina 2000 en $50 \mu\text{l}$ de hibridoma-SFM y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, esta mezcla se añadió a un pocillo de una placa de 24 pocillos, previamente sembrada 24 horas antes con 2×10^5 de la línea celular 293c18 derivada de riñón embrionario humano en $0,5 \text{ ml}$ de medio DME suplementado con suero bovino fetal al 10 % y $0,25 \text{ mg/ml}$ de G418. Después de 48 horas, se recogieron las células y se prepararon para la tinción con FACS.

Para la tinción FACS, se incubaron aproximadamente 5×10^5 células con EGFR-CLambda-AF647 1 nM (dominio extracelular de EGFR fusionado a CLambda y directamente conjugado con colorante Alexa Fluor 647) y una dilución 1/500 de Kappa-PE de cabra anti-humana (Southern Biotech # 2060-09) en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) más seroalbúmina bovina al 0,5 % (BSA), y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las células se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS frío + BSA al 0,5 %, se resuspendieron en $200 \mu\text{l}$ de PBS + formaldehído al 1 % y se analizaron en un BD FACS Calibur. Las células se acotaron para incluir solamente la población que expresa IgG y se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) del canal de unión (Alexa Fluor 647). La MFI para la unión de cada variante se comparó con hu225 de tipo salvaje para cada conjunto de muestras para normalizar la variabilidad experimento a experimento.

8.2 Resultados

Las tablas 3 y 4 muestran mutaciones en las CDR de las cadenas pesada y ligera de hu225 que los estudios de FACS indican una mayor afinidad por el EGFR. La unión de estas variantes de hu225 a EGFR se muestra en la Figura 3. Los resultados de los estudios de FACS se tabulan en las Tablas 14-1 y 14-2 como aumento de la afinidad por EGFR sobre hu225 de tipo salvaje.

Las Tablas 5 y 7 muestran mutaciones adicionales en las CDR de la cadena pesada de hu225 que los estudios preliminares indican que tienen mayor afinidad que hu225 por EGFR (datos no mostrados). Las Tablas 6 y 8 muestran mutaciones adicionales en las CDR de la cadena ligera de hu225 que los estudios preliminares indican que tienen mayor afinidad que hu225 por EGFR (datos no mostrados). Las Tablas 9 y 10 muestran respectivamente variantes de cadena pesada y variantes de cadena ligera que los estudios preliminares indican que tienen una afinidad por EGFR similar a la de hu225 (datos no mostrados).

9. Ejemplo 3: CARACTERIZACIÓN ADICIONAL DE VARIANTES DE HU225 CON AFFINIDAD AUMENTADA POR EGFR (ELISA, ALPHALISA® Y ESTUDIOS BIACORE)

9.1 Materiales y procedimientos

Para determinar la unión de variantes individuales a EGFR, se incubaron variantes de inmunoglobulina de hu225 mostradas en la superficie celular con EGFR soluble en condiciones subsaturantes (por debajo de K_D), y el grado de unión se cuantificó mediante FACS (como se describe en el Ejemplo 2 anterior), ELISA, alphaLISA y/o BIAcore.

El ELISA implica la unión de un anticuerpo de captura a un soporte de fase sólida, después de lo cual se añaden muestras que contienen antígeno en una matriz o tampón adaptado para minimizar la unión a la fase sólida. A continuación, se añade un anticuerpo marcado con enzima para la detección y determinación de afinidades de unión. El ELISA puede usarse para determinar la afinidad de unión de variantes individuales, por ejemplo, anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anticuerpos de la divulgación, a EGFR. Véase, por ejemplo, Patel et al. *Anticancer Research* 27, no. 5A:3355-3366, 2007; y Nix et al. in "Immunoassays, a Practical Approach," ed. J.P. Gosling, pp. 239-261, Oxford University Press, 2000).

AlphaLISA es análogo al ELISA: un analito es capturado por un anticuerpo biotinilado unido a perlas de donante recubiertas con estreptavidina y un segundo anticuerpo conjugado a perlasceptoras de AlphaLISA. La unión de los dos anticuerpos al analito acerca las perlas de donante y de aceptor. La irradiación con láser de las perlas donantes a 680 nm genera un flujo de oxígeno singlete, desencadenando una cascada de eventos químicos en perlasceptoras cercanas, lo que da lugar a una emisión quimioluminiscente a 615 nm. En inmunoensayos AlphaLISA competitivos, se utiliza un analito biotinilado unido a perlas de donante de estreptavidina con un anticuerpo conjugado a las perlasceptoras de AlphaLISA. El AlphaLISA también puede usarse para determinar la afinidad de unión de variantes individuales, por ejemplo, anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anticuerpos de la divulgación, a EGFR. Véase, por ejemplo, Ullman et al., *Clinical Chemistry* 42, no. 9:1518-1526, 1996; y Hideharu et al., *Cancer Science* 98, no. 8:1275-1280, 2007.

Los ensayos BIAcore determinan la unión usando la Resonancia de plasmón superficial (SPR), un fenómeno óptico que permite la detección de interactivos no marcados. El BIAcore es otro procedimiento para determinar la afinidad de unión de variantes individuales, por ejemplo, anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anticuerpos de la divulgación, a EGFR. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/0274114; and Che et al., *J. of Pharm. and Biomed. Analysis* 50, no. 2 (September 8, 2009):183-188.

KinExA (ensayo de exclusión cinética) mide la concentración de la molécula receptora (R) que no está en complejo en una mezcla de receptor, ligando (L) y complejo LR. La concentración de R sin complejos se mide exponiendo la mezcla en fase de solución a L inmovilizada en fase sólida durante un período de tiempo muy breve. El "tiempo de contacto" entre la mezcla en fase de solución y la fase sólida inmovilizada L se mantiene lo suficientemente corto como para que la disociación del complejo LR sea insignificante. Cuando la posibilidad de disociación significativa del complejo LR se excluye cinéticamente, solo el R sin complejos ("libre") puede unirse a la fase sólida. La cantidad de R libre que se une a la fase sólida (medida por emisión de fluorescencia a partir de un marcador secundario) es directamente proporcional a la concentración de R libre en la muestra en fase de solución. KinExA también puede usarse para determinar la afinidad de unión de variantes individuales, por ejemplo, anticuerpos anti-EGFR o fragmentos de unión a anticuerpos de la divulgación, a EGFR. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/0274114; y Darling, et al. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2:647-657, 2004.

9.2 Resultados

Los resultados de estos estudios de unión adicionales para ejemplos de variantes de sustitución única en las CDR de la cadena pesada se muestran en la Tabla 14-1. Los resultados para las variantes de sustitución única de ejemplo en las CDR de la cadena ligera se muestran en la Tabla 14-2. Los resultados para las variantes de sustitución múltiple de ejemplo están en las cadenas pesada y ligera y se muestran en la Tabla 14-3. Los resultados en las Tablas 14-1 a 14-3 se muestran como un incremento en la afinidad en comparación con hu225.

10. Ejemplo 4: Pruebas para las regiones del epítipo de células T CD4 + en cetuximab y cetuximab humanizado

10.1 Materiales y Procedimientos

10.1.1 Péptidos

Los péptidos se sintetizaron usando un formato multi-pin de Mimotopes (Adelaide, Australia). Las secuencias de las regiones variables de de las cadenas ligera y pesada de cetuximab y hu225 se sintetizaron como péptidos de 15 unidades que se solapan por 12 aminoácidos (Figuras 4 y 5, respectivamente) para un total de 134 péptidos. Los péptidos llegaron liofilizados y se volvieron a suspender en DMSO (Sigma-Aldrich) a aproximadamente 1-2 mg/ml. Los péptidos de reserva se mantuvieron congelados a -20 °C.

10.1.2 Células mononucleares de sangre periférica humana

Los productos de la capa leucocitaria del donante de la comunidad se adquirieron del Stanford Blood Center, Palo Alto, CA. El material de la capa leucocitaria se diluyó 1: 1 v: v con DPBS que no contenía calcio ni magnesio. El material de la capa leucocitaria (25-35 ml) se colocó en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml (Sarsted o Costar) con 12,5 ml de FicollPaque-PLUS (GE Healthcare). Las muestras se centrifugaron a 900 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfase. Se añadió DPBS para llevar el volumen final a 50 ml y las células se centrifugaron a 350 g durante 5 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en DPBS y se contaron.

10.1.3 Células dendríticas

Para el aislamiento de las células dendríticas, los frascos de cultivo T75 (Costar) se sembraron con 10^8 PBMC recién aisladas en un volumen total de 30 ml de medio AIM V (Invitrogen). El exceso de PBMC se congeló a -80 °C en 90 % de suero fetal de ternera (FCS), 10 % de DMSO a 5×10^7 células/ml. Los matraces T75 se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 2 horas. Las células no adherentes se retiraron, y la monocapa adherente se lavó con DPBS. Para diferenciar células dendríticas de monocitos, se añadieron 30 ml de medio AIM V que contenía 800 unidades/ml de GM-CSF (Sistemas R y D) y 500 unidades/ml de IL-4 (Sistemas R y D). Los matraces se incubaron durante 5 días. El día 5 se añadieron IL-1 α (endógeno) y TNF α (endógeno) a 50 pg/ml y 0,2 ng/ml. Los matraces se incubaron dos días más. El día 7, se recogieron las células dendríticas mediante la adición de 3 ml de EDTA 10 mM que contenía de 0,5 a 1,0 mg de mitomicina C (Sigma-Aldrich) para una concentración final de EDTA 10 mM y de mitomicina C de 16,5 a 33 μ g/ml. Los matraces se incubaron una hora adicional a 37 °C y 5 % de CO₂. Se recogieron células dendríticas y se lavaron en medio AIM V 2 - 3 veces.

10.1.4 Cultivo celular

El día 7, las PBMC autólogas previamente congeladas se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Las células se diluyeron inmediatamente en medio DPBS o AIM V y se centrifugaron a 350 g durante 5 minutos. Las células CD4⁺ se enriquecieron mediante selección negativa usando perlas magnéticas (Easy-Sep CD4⁺ Kit, Stem Cell Technologies). Las células T CD4⁺ autólogas y las células dendríticas se co-cultivaron a 2×10^5 células T CD4⁺ para 2×10^4 dendríticas por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Costar 9077). Se añadieron péptidos aproximadamente a 5 μ g/ml. Los pocillos de control contenían el vehículo DMSO (Sigma) solo a 0,25 % v: v. Los pocillos control positivos contenían DMSO al 0,25 % y toxoide tetánico (List Biologicals o CalBioChem) a 1 μ g/ml. Los cultivos se incubaron durante 5 días. El día 5, se añadieron 0,25 μ Ci por pocillo de timidina tritiada (Amersham o GE Healthcare). Los cultivos se cosecharon el día 6 a matrices de filtración usando una cosechadora de células Packard Filtermate Cell.. El recuento de centelleo se realizó usando un contador de centelleo Wallac MicroBeta 1450 (Perkin Elmer).

10.1.5 Análisis de datos

Los valores promedio de CPM de fondo se calcularon promediando los resultados individuales de 6 a 12 repeticiones. Se promediaron los valores de CPM de los cuatro pocillos de control positivo. Se promediaron los pocillos duplicados o triplicados para cada péptido. Se calcularon los valores del índice de estimulación para el control positivo y los pocillos de péptidos dividiendo los valores de CPM promedio experimentales por los valores de control promedio. Para su inclusión en el conjunto de datos, se requirió un índice de estimulación de más de 3,0 en los pocillos de control positivo del toxoide del tétanos. Se observó una respuesta para cualquier péptido que daba como resultado un índice de estimulación de 2,95 o mayor. Los péptidos se analizaron usando muestras de sangre periférica de un grupo de 106 donantes para los péptidos hu225 y 87 donantes para los péptidos de cetuximab. Se recopilaron respuestas a todos los péptidos. Para cada péptido analizado, se calculó el porcentaje del conjunto donante que respondió con un índice de estimulación de 2,95 o mayor. In Además, también se calculó el índice de estimulación promedio para todos los donantes.

10.2 Resultados

10.2.1 Identificación de epítomos de células T CD4⁺ en las regiones de VH y VL de cetuximab y cetuximab humanizado

Se identificaron péptidos de epítomos de células T CD4⁺ mediante un análisis del porcentaje de respuestas a los

- péptidos dentro de los conjuntos donantes. Se calculó el porcentaje de respuesta promedio para todos los péptidos analizados que describen las regiones variables de las cadenas pesadas y ligera de cetuximab y hu225. Se consideró una tasa de respuesta mayor o igual a la respuesta promedio de fondo más tres desviaciones estándar una CD4 potencial. El índice de estimulación promedio se calculó para todos los péptidos en el conjunto de datos.
- 5 Los datos para las regiones V_H y V_L del anticuerpo se muestran en la Figura 6. En la figura 6ª se muestran los datos compuestos para las regiones V_H y V_L de cetuximab El índice promedio general de estimulación es de $1,27 \pm 0,27$ desviaciones estándar. El porcentaje de respuesta promedio es de $4,72 \pm 4,38$ desviaciones estándar. La desviación estándar ancha se debe a la presencia de respuestas dentro del conjunto de datos que son muy altas tanto en el SI promedio como en el porcentaje de respuesta. Como el cetuximab es un anticuerpo quimérico, es probable que la
- 10 alta tasa de respuesta se deba a la derivación murina de las secuencias peptídicas. De acuerdo con esta interpretación, no hay prominentes péptido respuestas en el conjunto de datos de hu225 (Figura 6B). El índice de estimulación promedio en el conjunto de datos hu225 es de $1,22 \pm 0,14$, y el porcentaje promedio de respuesta es de $3,3 \pm 2,19$.
- 15 Estos resultados sugieren que el proceso de humanización tal como se realiza en las regiones V_H Y V_L del hibridoma M225 resultaron en una molécula de anticuerpo sin epítomos de células T colaboradoras ⁺ CD4⁺ detectables- La ausencia de epítomos de células T CD4⁺ es probable que confieran potencial inmunogénico reducido al producto del anticuerpo.
- 20 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> AKAMATSU, YOSHIKO
DUBRIDGE, ROBERT B.
POWERS, DAVID B.
- 25 <120> ANTICUERPOS ANTI-EGFR Y SUS USOS
- <130> 381493-229US
- 30 <140>
<141>
- <150> 61/255.632
35 <151> 28-10-2009
- <160> 387
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético
- <400> 1
- 50

ES 2 639 056 T3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 2

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 2

ES 2 639 056 T3

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

5 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 3

Asn Tyr Gly Val His
 1 5

15 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 4

25 Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

30 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

ES 2 639 056 T3

<400> 5

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

5 <210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

15 <210> 7
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 7

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

30 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 8

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

40 <210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 9

ES 2 639 056 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

<210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<400> 10

ES 2 639 056 T3

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 11

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser
 1 5 10 15

15 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 12

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro
 1 5 10 15

25 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 13

ES 2 639 056 T3

Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu
 1 5 10 15

5 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 14

Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg
 1 5 10 15

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

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 15

Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr
 1 5 10 15

25 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 16

Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe
 1 5 10 15

40 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 17

Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val
 1 5 10 15

50 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 639 056 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 18

5

Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 19

Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
1 5 10 15

20

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 20

Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln
1 5 10 15

30

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 21

Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
1 5 10 15

45

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 22

Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
1 5 10 15

55

<210> 23

ES 2 639 056 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 23

	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	Gly
10	1				5					10					15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 24

	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile
	1				5					10					15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 30 <400> 25

	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val	His	Trp
	1				5					10					15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 40 <400> 26

	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr
	1				5					10					15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 50 <400> 27

ES 2 639 056 T3

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln
1 5 10 15

5 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 28

Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg
1 5 10 15

15 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 29

Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly
1 5 10 15

25 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 30

Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly
1 5 10 15

40 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 31

Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
1 5 10 15

50 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

ES 2 639 056 T3

<400> 32

Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg
1 5 10 15

5

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 33

15

Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
1 5 10 15

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 34

His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

30

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 35

Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
1 5 10 15

40

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 36

50

Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala
1 5 10 15

55

<210> 37
<211> 15
<212> PRT

ES 2 639 056 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 37

Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly
1 5 10 15

10 <210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 38

Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser
1 5 10 15

20 <210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 39

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr
1 5 10 15

35 <210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 40

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly
1 5 10 15

45 <210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 41

55 <210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
1 5 10 15

ES 2 639 056 T3

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 42

10

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
1 5 10 15

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20

<400> 43

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe
1 5 10 15

25

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 44

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser
1 5 10 15

35

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45

<400> 45

Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg
1 5 10 15

50

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 46

ES 2 639 056 T3

Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

5 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 47

Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile
1 5 10 15

15 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 48

Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
1 5 10 15

25 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 49

Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp
1 5 10 15

40 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 50

Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

50 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 639 056 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 56

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu
1 5 10 15

10

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 57

Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser
1 5 10 15

20

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 58

Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala
1 5 10 15

35

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 59

Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser
1 5 10 15

45

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 60

55

Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr
1 5 10 15

ES 2 639 056 T3

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 61
 10
 Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr
 1 5 10 15
 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20
 <400> 62
 Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln
 1 5 10 15
 25
 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 63
 Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr
 1 5 10 15
 35
 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 64
 Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn
 1 5 10 15
 45
 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 55

ES 2 639 056 T3

<400> 65

Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
1 5 10 15

5

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 66

15

Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
1 5 10 15

20

<210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 67

Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu
1 5 10 15

30

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 68

Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly
1 5 10 15

40

<210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 69

Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr
1 5 10 15

55

<210> 70
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 639 056 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 70

Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr
1 5 10 15

10

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 71

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu
1 5 10 15

20

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 72

Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
1 5 10 15

35

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 73

Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10 15

45

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 74

55

Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
1 5 10 15

ES 2 639 056 T3

<210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 75
 10

```

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
1           5           10           15
    
```

 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20
 <400> 76

```

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
1           5           10           15
    
```

 25
 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 77

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1           5           10           15
    
```

 35
 <210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 45
 <400> 78

```

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1           5           10           15
    
```

 50
 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 55
 <400> 79

ES 2 639 056 T3

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 1 5 10 15

5 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 80

Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
 1 5 10 15

15 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 81

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 1 5 10 15

25 <210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 82

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
 1 5 10 15

40 <210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 83

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 1 5 10 15

50 <210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

ES 2 639 056 T3

<400> 84

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
1 5 10 15

5

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 85

15

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
1 5 10 15

<210> 86

<211> 15

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 86

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
1 5 10 15

30

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 87

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr
1 5 10 15

40

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50

<400> 88

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
1 5 10 15

55

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 639 056 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 89

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 90

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 90

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile
1 5 10 15

20

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 91

30

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp
1 5 10 15

<210> 92

35

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 92

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr
1 5 10 15

45

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 93

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln
1 5 10 15

55

ES 2 639 056 T3

<210> 94
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10

<400> 94

Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
1				5					10					15

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20

<400> 95

Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
1				5					10					15

25

<210> 96
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 96

Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15

35

<210> 97
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45

<400> 97

Asn	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
1				5					10					15

50

<210> 98
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 98

ES 2 639 056 T3

	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg
	1				5					10					15

5 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 99

	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
	1				5					10					15

15 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 100

	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
	1				5					10					15

25 <210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 101

	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile
	1				5					10					15

40 <210> 102
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 102

	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala
	1				5					10					15

50 <210> 103
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 639 056 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 103

5 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly
1 5 10 15

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 104

Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser
1 5 10 15

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 105

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr
1 5 10 15

30 <210> 106

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 106

40 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly
1 5 10 15

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 107

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
1 5 10 15

55 <210> 108

<211> 15

<212> PRT

ES 2 639 056 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 108

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp
1 5 10 15

10

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 109

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe
1 5 10 15

20

<210> 110

<211> 15

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 110

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
1 5 10 15

35

<210> 111

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 111

Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg
1 5 10 15

45

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 112

55

Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

<210> 113

ES 2 639 056 T3

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Thr Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys
1 5 10 15

5 <210> 118
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 118

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
1 5 10 15

15 <210> 119
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 119

Thr Ser Arg Leu Thr Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
1 5 10 15

30 <210> 120
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 120

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
1 5 10 15

40 <210> 121
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 121

Leu Thr Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

50 <210> 122
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 639 056 T3

<210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10 <400> 127

	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
	1				5					10					15

 <210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 128

	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
	1				5					10					15

 <210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 30 <400> 129

	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
	1				5					10					15

 <210> 130
 <211> 15
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 45 <400> 130

	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn
	1				5					10					15

 <210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 55 <400> 131

ES 2 639 056 T3

	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
	1				5					10					15

5 <210> 132
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 132

	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr
	1				5					10					15

15 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 133

25

	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Leu
	1				5					10					15

30 <210> 134
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 134

	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly
	1				5					10					15

40 <210> 135
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 135

	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr
	1				5					10					15

50 <210> 136
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 639 056 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 136

5

Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15

<210> 137

<211> 15

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 137

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu
1 5 10 15

20

<210> 138

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 138

Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
1 5 10 15

30

<210> 139

<211> 15

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 139

Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10 15

45

<210> 140

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50

<400> 140

Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10 15

55

<210> 141

ES 2 639 056 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 141

10 **Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln**
1 5 10 15

<210> 142
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 142

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

25 <210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 143

Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
1 5 10 15

35 <210> 144
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 144

45 **Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg**
1 5 10 15

50 <210> 145
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 145

ES 2 639 056 T3

Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
1 5 10 15

5 <210> 146
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 146

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
1 5 10 15

15 <210> 147
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 147

Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

25 <210> 148
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 148

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
1 5 10 15

40 <210> 149
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 149

Asn Tyr Gly Trp Ser
1 5

50 <210> 150
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 639 056 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 150

Asn Trp Gly Val His
1 5

10 <210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 151

Asn Tyr Asp Val His
1 5

25 <210> 152
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 152

Asn Tyr Glu Val His
1 5

40 <210> 153
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 153

Asn Tyr Ala Val His
1 5

55 <210> 154
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

65 <400> 154

Asn Trp Ala Val His
1 5

70 <210> 155
<211> 5

ES 2 639 056 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 155

Asn Trp Asp Val His
1 5

10 <210> 156
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 156

20 **Asn Trp Glu Val His**
1 5

25 <210> 157
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 157

Asn Tyr Asp Val His
1 5

35 <210> 158
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 158

45 **Val Ile Trp Ser Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser**
1 5 10 15

50 <210> 159
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 159

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

ES 2 639 056 T3

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Asp Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Ala Ser
1 5 10 15

5 <210> 165
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 165

Asn Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

15 <210> 166
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 166

25 <210> 167
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 167

Asn Ile Trp Ser Gly Gly Thr Pro Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

35 <210> 168
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 168

Val Ile Trp Ser Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Ala Ser
1 5 10 15

50 <210> 169
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 169

ES 2 639 056 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 169

5

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Ala	Ser
	1				5					10					15	

<210> 170
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 170

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Ser
	1				5					10					15	

<210> 171
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 171

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

<210> 172
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35

<400> 172

	Asn	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

<210> 173
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45

<400> 173

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Pro	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

<210> 174
 <211> 16

50

55

ES 2 639 056 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 174

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Glu Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

10 <210> 175
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 175

20 Val Ile Trp Ser Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Glu Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

25 <210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 176

Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asn Phe Ala Tyr
1 5 10

35 <210> 177
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 177

Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr
1 5 10

45 <210> 178
<211> 11
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 178

ES 2 639 056 T3

Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Asp Ala Tyr
1 5 10

5 <210> 179
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 179

Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Tyr Ala Tyr
1 5 10

15 <210> 180
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 180

Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

25 <210> 181
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
35 <400> 181

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

40 <210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 182

Arg Ala Ser Phe Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

50 <210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 639 056 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 183

5 Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

<210> 184

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 184

 Arg Ala Ser His Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

<210> 185

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 185

 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Leu His
 1 5 10

30 <210> 186

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 186

40 <210> 187

 Arg Ala Asp Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

<211> 11

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 187

 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Glu Asn Ile His
 1 5 10

ES 2 639 056 T3

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10

<400> 188

Arg Ala Asp Gln Ser Ile Gly Glu Asn Ile His
1 5 10

<210> 189
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20

<400> 189

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

25

<210> 190
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 190

Gln Gln Asn Asn Asp Trp Pro Thr Thr
1 5

35

<210> 191
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45

<400> 191

Gln Gln Asn Asn Glu Trp Pro Thr Thr
1 5

50

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 192

ES 2 639 056 T3

	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Ser
	1				5				
5	<210> 193 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial								
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 193								
	Gln	Gln	Asn	Asn	Asp	Trp	Pro	Thr	Ser
	1				5				
15	<210> 194 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial								
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 194								
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 194								
	Gln	Gln	Asn	Asn	Glu	Trp	Pro	Thr	Ser
	1				5				
30	<210> 195 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial								
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 195								
	Gln	Gln	Asn	Asn	Lys	Trp	Pro	Thr	Ser
	1				5				
40	<210> 196 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial								
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 196								
	His	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr
	1				5				
50	<210> 197 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial								
55	<220>								

ES 2 639 056 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 197

5 **Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr Thr**
 1 5

<210> 198

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 198

Ala Leu Thr Tyr Tyr Cys Tyr Glu Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 199

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 199

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Cys Tyr
 1 5 10

30

<210> 200

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 200

40

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile Cys
 1 5 10

<210> 201

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50

<400> 201

Val Tyr Gly Val His
 1 5

55

<210> 202

<211> 5

ES 2 639 056 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 202

10 **Asn Arg Gly Val His**
1 5

<210> 203
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 203

20 **Asn Tyr Gly Leu His**
1 5

<210> 204
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 204

35 **Asn Tyr Gly Asn His**
1 5

<210> 205
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 205

45 **Leu Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser**
1 5 10 15

<210> 206
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 206

Gln Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

ES 2 639 056 T3

<210> 207
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10 <400> 207

Val	Gly	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

 <210> 208
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 208

Val	Met	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

 25 <210> 209
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 209
 35

Val	Ser	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

 <210> 210
 <211> 16
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 45 <400> 210

Val	Gln	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

 50 <210> 211
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 211

ES 2 639 056 T3

Val Ile Gly Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

5 <210> 212
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 212

Val Ile Thr Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

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

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 213

25 Val Ile Trp Gln Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

30 <210> 214
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 214

Val Ile Trp Thr Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

40 <210> 215
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 215

Val Ile Trp Ser Gly Asp Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

50 <210> 216
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 639 056 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 216

5

Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 217
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 217

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Ala Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 218
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 218

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Asp Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

30

<210> 219
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 219

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Gly Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 220
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50

<400> 220

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

55

ES 2 639 056 T3

5
 <210> 221
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10
 <400> 221

Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

15
 <210> 222
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20
 <400> 222

Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Cys	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

25
 <210> 223
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 223

Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Glu	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

35
 <210> 224
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40
 <400> 224

Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Phe	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

45
 <210> 225
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50
 <400> 225

Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Phe	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

55
 <210> 225
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 225

ES 2 639 056 T3

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Gly Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

5 <210> 226
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 226

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Ser Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

15 <210> 227
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 227

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Trp Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

25 <210> 228
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 228

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asp Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

35 <210> 229
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 229

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Glu Ser
 1 5 10 15

45 <210> 230
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

ES 2 639 056 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

5 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 230

Ala Leu Thr Trp Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

10

<210> 231

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

20 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 231

Arg Val Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

25

<210> 232

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

35 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes.

<400> 232

40

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

45

<210> 233

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

55

<400> 233

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Thr Asn Ile His
1 5 10

ES 2 639 056 T3

<210> 234
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 234

15

Gln Gln Leu Asn Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 235
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 235

30

Gln Gln Asn Leu Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 236
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

45

<400> 236

50

Gln Gln Asn Arg Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 237
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

ES 2 639 056 T3

<400> 237

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Ala
1 5

5 <210> 238
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
15 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 238

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Asp
1 5

20 <210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
30 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 239

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Glu
1 5

35 <210> 240
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
45 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 240

50 Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Pro
1 5

<210> 241
<211> 16
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

5

<400> 241

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp His Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

10

<210> 242

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

20

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 242

Pro Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

25

<210> 243

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

35

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes.

<400> 243

40

Arg Cys Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 244

<211> 11

45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50

<220>

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

55

<400> 244

Arg Phe Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

ES 2 639 056 T3

<210> 245
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10
 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
 <400> 245
 15

Arg	Met	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
1				5					10	

 <210> 246
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 25
 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
 <400> 246
 30

Arg	Leu	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
1				5					10	

 <210> 247
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 40
 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
 45
 <400> 247

Arg	Ala	Ser	Trp	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
1				5					10	

 <210> 248
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 55
 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
 60
 <400> 248

ES 2 639 056 T3

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

5 <210> 249
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 249

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Trp Thr Asn Ile His
1 5 10

20 <210> 250
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 250

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Thr Asn Ile His

35 **1 5 10**

<210> 251
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

50 <400> 251

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Thr Asn Ile His
1 5 10

55 <210> 252
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 639 056 T3

5 <210> 256
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

15 <400> 256

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr His Ile His
1 5 10

20 <210> 257
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

30 <400> 257

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Ile
1 5

35 <210> 258
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

45 <400> 258

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Gly
1 5

50 <210> 259
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

60

ES 2 639 056 T3

<400> 259

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Leu
1 5

5

<210> 260
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 260

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr His
1 5

20

<210> 261
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 261

35

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Arg
1 5

<210> 262
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

50

<400> 262

Asp Tyr Gly Val His
1 5

55

<210> 263
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 639 056 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

5 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 263

Ile Tyr Gly Val His
1 5

10

<210> 264

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

20 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 264

Asn Tyr Gly Glu His
1 5

25

<210> 265

<211> 5

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

35 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 265

40

Asn Tyr Gly Gln His
1 5

<210> 266

<211> 16

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50

<220>

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 266

55

Glu Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 267

ES 2 639 056 T3

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

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 267

Ile	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

15 <210> 268
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 268

Val	Ala	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

30 <210> 269
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 269

Val	Cys	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

50 <210> 270
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 270

ES 2 639 056 T3

	Val	Ile	Trp	Asn	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

5 <210> 271
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

15 <400> 271

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Ala	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

20 <210> 272
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

30 <400> 272

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Glu	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

35 <210> 273
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

45 <400> 273

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	His	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

50 <210> 274
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

ES 2 639 056 T3

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 274

5

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Glu Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 275

<211> 16

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<220>

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

20

<400> 275

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Pro Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 276

25

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30

<220>

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

35

<400> 276

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Gln Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 277

40

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45

<220>

<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

50

<400> 277

Arg Ile Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

55

<210> 278

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 639 056 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

10 <400> 278

Arg Pro Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

15 <210> 279
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

25 <400> 279

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

30 <210> 280
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

40 <400> 280

Arg Tyr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

45 <210> 281
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

55 <400> 281

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Cys Thr Asn Ile His
1 5 10

ES 2 639 056 T3

5 <210> 282
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

15 <400> 282

Arg Ala Ser Gln Ser Ile His Thr Asn Ile His
 1 5 10

20 <210> 283
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

30 <400> 283

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys Thr Asn Ile His
 1 5 10

35 <210> 284
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

45 <400> 284

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gln Thr Asn Ile His
 1 5 10

50 <210> 285
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

60

ES 2 639 056 T3

<400> 285

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Thr Asn Ile His
1 5 10

5

<210> 286
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 286

Gln Gln Asn Lys Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

20

<210> 287
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

35

<400> 287

Gln Gln Asn Met Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

40

<210> 288
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

50

<400> 288

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Cys
1 5

55

<210> 289
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 639 056 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
 <400> 289

10 Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Lys
 1 5

<210> 290
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
 <400> 290
 25

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Asn
 1 5

<210> 291
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
 <400> 291
 40

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Gln
 1 5

<210> 292
 <211> 16
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
 55 <400> 292

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Val Thr Ser
 1 5 10 15

ES 2 639 056 T3

- 5 <210> 293
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 10 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
- 15 <400> 293
- Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Tyr Ala Tyr**
1 5 10
- 20 <210> 294
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 25 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
- 30 <400> 294
- Asn Trp Gly Val His**
1 5
- 35 <210> 295
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 40 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
- 45 <400> 295
- Asn Tyr Ala Val His**
1 5
- 50 <210> 296
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes
- 60

ES 2 639 056 T3

<400> 296

Asn Tyr Asp Val His
1 5

5 <210> 297
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 297

Asn Tyr Glu Val His
1 5

20 <210> 298
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 298

35 Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Pro Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

40 <210> 299
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

50 <400> 299

Val Ile Trp Ser Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

55 <210> 300
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 639 056 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

5 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 300

10 Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Glu Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

<210> 301

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

20 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 301

25 Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 302

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

35 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 302

40 Arg Ala Ser Glu Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

<210> 303

<211> 11

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

50 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 303

55 Arg Ala Ser Phe Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

ES 2 639 056 T3

5 <210> 304
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

15 <400> 304

Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

20 <210> 305
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

30 <400> 305

Arg Ala Asp Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

35 <210> 306
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

45 <400> 306

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Glu Asn Ile His
1 5 10

50 <210> 307
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

60

ES 2 639 056 T3

<400> 307

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

5 <210> 308
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

15 <400> 308

Gln Gln Asn Asn Asp Trp Pro Thr Thr
1 5

20 <210> 309
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

35 <400> 309

Gln Gln Asn Asn Glu Trp Pro Thr Thr
1 5

40 <210> 310
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes.

50 <400> 310

Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr Thr
1 5

55 <210> 311
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 639 056 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

5 <223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 311

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Ser
1 5

10

<210> 312
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20

<220>
<223> véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferentes

<400> 312

Ala Leu Thr Trp Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

25

<210> 313
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35

<400> 313

Arg Val Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

40

<210> 314
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 314

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

50

<210> 315
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

ES 2 639 056 T3

<400> 315

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Thr Asn Ile His
1 5 10

5 <210> 316
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 316

Gln Gln Leu Asn Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

15 <210> 317
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 317

Gln Gln Asn Leu Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

30 <210> 318
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 318

Gln Gln Asn Arg Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

40 <210> 319
<211> 9
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 319

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Ala
1 5

55 <210> 320
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 639 056 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 320

5

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Asp
 1 5

<210> 321
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 321

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Glu
 1 5

20

<210> 322
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 322

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp His Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15

30

<210> 323
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 323

Pro Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

45

<210> 324
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 324

Arg Cys Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

55

<210> 325

ES 2 639 056 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 325

10 **Arg Phe Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His**
1 5 10

<210> 326
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 326

Arg Met Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

25 <210> 327
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 327

Arg Leu Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

35 <210> 328
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 328

45 **Arg Ala Ser Trp Ser Ile Gly Thr Asn Ile His**
1 5 10

50 <210> 329
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 329

ES 2 639 056 T3

	Arg	Ala	Ser	Gln	Arg	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
	1				5					10	
5	<210> 330 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial										
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 330										
	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Trp	Thr	Asn	Ile	His
	1				5					10	
15	<210> 331 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial										
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 331										
	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Phe	Thr	Asn	Ile	His
25	1				5					10	
30	<210> 332 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial										
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 332										
	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Thr	Asn	Ile	His
	1				5					10	
40	<210> 333 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial										
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético <400> 333										
	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Met	Thr	Asn	Ile	His
	1				5					10	
50	<210> 334 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial										
55											

ES 2 639 056 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 334

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Asn Ile His
1 5 10

10 <210> 335
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 335

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Val Asn Ile His
1 5 10

20 <210> 336
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 336

30 **Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Glu Asn Ile His**
1 5 10

35 <210> 337
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 337

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr His Ile His
1 5 10

45 <210> 338
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 338

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Ile
1 5

55 <210> 339
 <211> 9

ES 2 639 056 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 339

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Gly
1 5

10 <210> 340
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 340

20 **Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Leu**
1 5

25 <210> 341
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 341

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr His
1 5

35 <210> 342
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 342

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Arg
1 5

45 <210> 343
<211> 5
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 343

Asp Tyr Gly Val His
1 5

ES 2 639 056 T3

5 <210> 344
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10 <400> 344

Ile Tyr Gly Val His
1 5

15 <210> 345
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 345

Thr Tyr Gly Val His
1 5

25 <210> 346
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 346

35 <210> 347
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

Asn Tyr Gly Glu His
1 5

40 <210> 347
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 347

Asn Tyr Gly Gln His
1 5

50 <210> 348
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 348

ES 2 639 056 T3

Glu Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

5 <210> 349
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 349

Ile Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

15 <210> 350
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 350

Val Ala Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

25 <210> 351
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 351

Val Cys Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

40 <210> 352
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 352

Val Ile Trp Asn Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

50 <210> 353
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 639 056 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 353

5

Val Ile Trp Ser Gly Ala Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser

1

5

10

15

<210> 354

<211> 16

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 354

Val Ile Trp Ser Gly Glu Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser

1

5

10

15

20

<210> 355

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 355

Val Ile Trp Ser Gly His Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser

1

5

10

15

30

<210> 356

<211> 16

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 356

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Glu Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser

1

5

10

15

45

<210> 357

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 357

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Pro Asn Thr Pro Phe Thr Ser

1

5

10

15

ES 2 639 056 T3

<210> 358
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10 <400> 358

Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Gln	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

 <210> 359
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 359

Arg	Ile	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
1				5					10	

 25 <210> 360
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 360
 35 <400> 360

Arg	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
1				5					10	

 <210> 361
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 45 <400> 361

Arg	Thr	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
1				5					10	

 50 <210> 362
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 362

ES 2 639 056 T3

Arg Tyr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

5 <210> 363
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 363

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Cys Thr Asn Ile His
1 5 10

15 <210> 364
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 364

Arg Ala Ser Gln Ser Ile His Thr Asn Ile His
1 5 10

25 <210> 365
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 365

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys Thr Asn Ile His
1 5 10

40 <210> 366
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 366

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gln Thr Asn Ile His
1 5 10

50 <210> 367
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 639 056 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 367

5 **Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Thr Asn Ile His**
 1 5 10

<210> 368

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 368

Gln Gln Asn Lys Asn Trp Pro Thr Thr
 1 5

<210> 369

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 369

Gln Gln Asn Met Asn Trp Pro Thr Thr
 1 5

30 <210> 370

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 370

40 <400> 370

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Cys
 1 5

<210> 371

<211> 9

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 371

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Lys
 1 5

55 <210> 372

<211> 9

<212> PRT

ES 2 639 056 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 372

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Asn
1 5

10

<210> 373

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 373

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Gln
1 5

20

<210> 374

<211> 5

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 374

Asn Tyr Gly Ser His
1 5

35

<210> 375

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 375

Val Val Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

45

<210> 376

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 376

55

Val Ile Trp Ser Gly Phe Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

ES 2 639 056 T3

<210> 377
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 377
 10

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

 <210> 378
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20
 <400> 378

	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ala	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
	1				5					10					15	

 <210> 379
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 30
 <400> 379

	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Phe
	1				5					10	

 <210> 380
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 40
 <400> 380

	Arg	Trp	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
	1				5					10	

 <210> 381
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 50
 <400> 381

	Arg	Trp	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
	1				5					10	

 <210> 381
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 381

ES 2 639 056 T3

Arg Ala Ser Thr Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

5 <210> 382
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 382

Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

15 <210> 383
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 383

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ala Thr Asn Ile His
1 5 10

25 <210> 384
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 384

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Asn Ile His
1 5 10

40 <210> 385
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
<400> 385

Tyr Ala Ser Glu Val Ile Ser
1 5

50 <210> 386
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

ES 2 639 056 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 386

5

Gln Gln Asn Asn Val Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 387

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 387

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Arg
1 5

20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti - EGFR o un fragmento de unión a anti - EGFR de un anticuerpo que:
 - 5 (a) comprende una secuencia V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 9 y una secuencia V_L correspondiente a la SEQ ID NO: 10 o una secuencia V_H correspondiente a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia V_L correspondiente a SEQ ID NO: 2; y
 - (b) tiene las siguientes sustituciones: G30Y in CDR-L1, o la combinación de sustituciones 151G en CDR-H2, Y98W en CDR-H3, G30Y en CDR-L1 y N92L en CDR-L3, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos de inmunoglobulina se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de residuos de aminoácidos de inmunoglobulinas de Kabat et al.
2. El anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión a anti-EGFR de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a anti-EGFR de un anticuerpo monoclonal, respectivamente.
3. El anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión a anti-EGFR de la reivindicación 1, que es una IgG, preferentemente una IgG₁ o una IgG₂.
4. El anticuerpo anti-EGFR o fragmentos de unión a anti-EGFR de la reivindicación 1, que no está fucosilado.
5. El anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión anti-EGFR de la reivindicación 1 que se purifica, preferentemente se purifica hasta al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de homogeneidad.
6. El anticuerpo de anti-EGFR o fragmento de unión anti-EGFR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que incluye una o más mutaciones en la región Fc que aumentan la actividad de ADCC.
7. El anticuerpo de anti-EGFR o fragmento de unión anti-EGFR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que incluye una o más mutaciones en la región Fc que aumentan la unión a FcγR.
8. El anticuerpo de anti-EGFR o fragmento de unión anti-EGFR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que incluye una o más mutaciones en la región Fc que aumentan la unión a FcRn.
9. El anticuerpo de anti-EGFR o fragmento de unión anti-EGFR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que incluye una o más mutaciones en la región Fc que disminuyen la actividad de ADCC.
10. Un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión a anti-EGFR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de unión a anti - EGFR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un conjugado anticuerpo - fármaco según la reivindicación 10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un ácido nucleico que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo anti - EGFR o fragmento de unión a anti - EGFR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
13. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12.
14. Una célula huésped procariota transfectada con un vector de acuerdo con la reivindicación 13.
15. Una célula huésped eucariota transformada con un vector de acuerdo con la reivindicación 13.
16. Una célula huésped eucariótica cultivada modificada genéticamente para expresar una o más secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión a anti-EGFR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, preferentemente donde dicha célula huésped eucariótica cultivada es una célula huésped de mamífero.
17. Un procedimiento para producir un anticuerpo anti - EGFR o fragmento de unión anti - EGFR que comprende recuperar el anticuerpo anti - EGFR o el anticuerpo de fragmento de unión anti - EGFR de la célula huésped eucariótica cultivada de las reivindicaciones 15 o 16.
18. Un anticuerpo anti - EGFR o un fragmento de unión a anti - EGFR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un conjugado anticuerpo - fármaco según la reivindicación 10, o una composición farmacéutica según la reivindicación 11 para su uso en una cantidad terapéuticamente eficaz en el tratamiento del cáncer en un humano.
19. Un anticuerpo anti-EGFR, un fragmento de unión a anti-EGFR, un conjugado anticuerpo-fármaco o composición

farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, donde el cáncer es carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, o cáncer colorrectal.

ES 2 639 056 T3

SEQ ID NO:	Cadena de anticuerpo	N.º de CDR	Residuo	Posición en la CDR	N.º de Kabat
3	Pesada	1	N	1	31
			Y	2	32
			G	3	33
			V	4	34
			H	5	35
4	Pesada	2	V	1	50
			I	2	51
			W	3	52
			S	4	53
			G	5	54
			G	6	55
			N	7	56
			T	8	57
			D	9	58
			Y	10	59
			N	11	60
			T	12	61
			P	13	62
			F	14	63
			T	15	64
			S	16	65
5	Pesada	3	A	1	95
			L	2	96
			T	3	97
			Y	4	98
			Y	5	99
			D	6	100
			Y	7	100a
			E	8	100b
			F	9	100c
			A	10	101
			Y	11	102

TABLA 1

SEQ ID NO:	Cadena de anticuerpo	N.º de CDR	Residuo	Posición en la CDR	N.º de Kabat
6	Ligera	1	R	1	24
			A	2	25
			S	3	26
			Q	4	27
			S	5	28
			I	6	29
			G	7	30
			T	8	31
			N	9	32
			I	10	33
			H	11	34
7	Ligera	2	Y	1	50
			A	2	51
			S	3	52
			E	4	53
			S	5	54
			I	6	55
			S	7	56
8	Ligera	3	Q	1	89
			Q	2	90
			N	3	91
			N	4	92
			N	5	93
			W	6	94
			P	7	95
			T	8	96
			T	9	97

TABLA 2

SV	N.º Kabat/ Posición en CDR	Sustituciones en la cadena pesada de mayor afinidad	
CDR-H1			
N	31 / 1	V	SEQ ID NO: 201
Y	32 / 2	R	SEQ ID NO: 202
V	34 / 4	L	SEQ ID NO: 203
		N	SEQ ID NO: 204
CDR-H2			
V	50 / 1	L	SEQ ID NO: 205
		Q	SEQ ID NO: 206
I	51 / 2	G	SEQ ID NO: 207
		M	SEQ ID NO: 208
		S	SEQ ID NO: 209
		Q	SEQ ID NO: 210
W	52 / 3	G	SEQ ID NO: 211
		T	SEQ ID NO: 212
S	53 / 4	Q	SEQ ID NO: 213
		T	SEQ ID NO: 214
G	55 / 6	D	SEQ ID NO: 215
N	56 / 7	G	SEQ ID NO: 216
T	57 / 8	A	SEQ ID NO: 217
		D	SEQ ID NO: 218
		G	SEQ ID NO: 219
		S	SEQ ID NO: 220
Y	59 / 10	A	SEQ ID NO: 221
		C	SEQ ID NO: 222
		E	SEQ ID NO: 223
		F	SEQ ID NO: 224
		G	SEQ ID NO: 225
		S	SEQ ID NO: 226
		W	SEQ ID NO: 227
N	60 / 11	D	SEQ ID NO: 228
T	64 / 15	E	SEQ ID NO: 229
CDR-H3			
Y	98 / 4	W	SEQ ID NO: 312

TABLA 3

SV	N.º Kabat/ Posición en CDR	Sustituciones en la cadena ligera la de mayor afinidad	
CDR-L1			
A	25 / 2	V	SEQ ID NO: 313
		S	SEQ ID NO: 314
G	30 / 7	Y	SEQ ID NO: 315
CDR-L3			
N	91 / 3	L	SEQ ID NO: 316
N	92 / 4	L	SEQ ID NO: 317
		R	SEQ ID NO: 318
T	97 / 9	A	SEQ ID NO: 319
		D	SEQ ID NO: 320
		E	SEQ ID NO: 321

TABLA 4

SV	N.º Kabat/ Posición en CDR	Sustituciones en la cadena pesada la de mayor afinidad	
CDR-H2			
Y	59 / 10	H	SEQ ID NO: 322

TABLA 5

SV	N.º Kabat/ posición en CDR	Sustituciones en la cadena ligera la de mayor afinidad	
CDR-L1			
R	24 / 1	P	SEQ ID NO: 323
A	25 / 2	C	SEQ ID NO: 324
		F	SEQ ID NO: 325
		M	SEQ ID NO: 326
		L	SEQ ID NO: 327
Q	27 / 4	W	SEQ ID NO: 328
S	28 / 5	R	SEQ ID NO: 329
G	30 / 7	W	SEQ ID NO: 330
		F	SEQ ID NO: 331
		T	SEQ ID NO: 332
		M	SEQ ID NO: 333
		S	SEQ ID NO: 334
T	31 / 8	V	SEQ ID NO: 335
		E	SEQ ID NO: 336
N	32 / 9	H	SEQ ID NO: 337
CDR-L3			
T	97 / 9	I	SEQ ID NO: 338
		G	SEQ ID NO: 339
		L	SEQ ID NO: 340
		H	SEQ ID NO: 341
		R	SEQ ID NO: 342

TABLA 6

ES 2 639 056 T3

SV	N.º Kabat/ posición en CDR	Sustituciones en la cadena pesada la de mayor afinidad	
CDR-H1			
N	31 / 1	D	SEQ ID NO: 343
		I	SEQ ID NO: 344
		T	SEQ ID NO: 345
V	34 / 4	E	SEQ ID NO: 346
		Q	SEQ ID NO: 347
CDR-H2			
V	50 / 1	E	SEQ ID NO: 348
		I	SEQ ID NO: 349
I	51 / 2	A	SEQ ID NO: 350
		C	SEQ ID NO: 351
S	53 / 4	N	SEQ ID NO: 352
G	55 / 6	A	SEQ ID NO: 353
		E	SEQ ID NO: 354
		H	SEQ ID NO: 355
T	57 / 8	E	SEQ ID NO: 356
Y	59 / 10	P	SEQ ID NO: 357
		Q	SEQ ID NO: 358

TABLA 7

SV	N.º Kabat/ posición en CDR	Sustituciones en la cadena ligera la de mayor afinidad	
CDR-L1			
A	25 / 2	I	SEQ ID NO: 359
		P	SEQ ID NO: 360
		T	SEQ ID NO: 361
		Y	SEQ ID NO: 362
G	30 / 7	C	SEQ ID NO: 363
		H	SEQ ID NO: 364
		K	SEQ ID NO: 365
		Q	SEQ ID NO: 366
		R	SEQ ID NO: 367
CDR-L3			
N	92 / 4	K	SEQ ID NO: 368
		M	SEQ ID NO: 369
T	97 / 9	C	SEQ ID NO: 370
		K	SEQ ID NO: 371
		N	SEQ ID NO: 372
		Q	SEQ ID NO: 373

TABLA 8

SV	N.º Kabat/ posición en CDR	Sustituciones en la cadena pesada neutra	
CDR-H1			
V	34 / 4	S	SEQ ID NO: 374
CDR-H2			
I	51 / 2	V	SEQ ID NO: 375
G	55 / 6	F	SEQ ID NO: 376
N	56 / 7	S	SEQ ID NO: 377
N	60 / 11	A	SEQ ID NO: 378
CDR-H3			
Y	102 / 11	F	SEQ ID NO: 379

TABLA 9

SV	N.º Kabat/ posición en CDR R	Sustituciones en la cadena ligera neutra	
CDR-L1			
A	25 / 2	W	SEQ ID NO: 380
Q	27 / 4	T	SEQ ID NO: 381
S	28 / 5	F	SEQ ID NO: 382
G	30 / 7	A	SEQ ID NO: 383
T	31 / 8	R	SEQ ID NO: 384
CDR-L2			
S	54 / 5	V	SEQ ID NO: 385
CDR-L3			
N	93 / 5	V	SEQ ID NO: 386
T	97 / 9	R	SEQ ID NO: 387

TABLA 10

SEQ ID NO.	CDR-VH1					SEQ ID NO.	CDR-VH2										SEQ ID NO.	CDR-VH3																						
	31	32	33	34	35		50	51	52	53	54	55	56	57	58	59		60	61	62	63	64	65	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102						
	N	Y	G	V	H	V	I	W	S	G	G	N	T	D	Y	N	T	P	F	T	S	A	L	T	Y	Y	D	Y	E	F	A	Y								
3						4																5																		
3						158					A											5																		
3						159											S	L	K			5																		
3						160												L				5																		
3						161											S	V	K	G		5																		
3						4																176			D															
3						4																177			D															
3						4																178			D															
3						4																179			D															
149						162	W	S					Y				P	S	L	K		5																		
3						158						A										180			D															
3						163						S										180			D															
3						164														A		180			D															
3						165																179			D															
3						166																179			D															
3						167																177			D															
3						167																179			D															
150						4																176			D															
150						4																180			D															
151						4																180			D															
152						4																180			D															
153						4																180			D															
154						4																176			D															
155						4																180			D															
155						4																176			D															
155						4																179			D															
150						168						A										180			D															

TABLE 11-1

SEQ ID NO.	CDR-VH1					SEQ ID NO.	CDR-VH2										SEQ ID NO.	CDR-VH3																			
	31	32	33	34	35		4	50	51	52	53	54	55	56	57	58		59	60	61	62	63	64	65	5	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	
3	N	Y	G	V	H		V	I	W	S	G	G	N	T	D	Y	N	T	P	F	T	S	S	A	L	T	Y	Y	D	Y	E	F	A	Y			
150		W				168						A									A					D											
150		W				164							D								A																
156		W	E			158						A																									
154		W	A			158						A																									
155		W	D			169															A																
155		W	D			170						A									N																
150		W				158						A																									
150		W				166								P																							
150		W				171							T																								
155		W	D			167							T	P																							
155		W	D			158						A																									
155		W	D			165																															
155		W	D			172						A	P																								
155		W	D			171							T																								
155		W	D			165																															
157			D			173								P																							
3						158						A																									
3						174											E																				
3						175						A																									

TABLE 11-2

SEQ ID NO:		CDR-VH3										SEQ ID NO:		CDR-VL1											
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102			24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
		A	L	T	Y	Y	D	Y	E	F	A	Y			R	A	S	Q	S	I	G	T	N	I	H
5																									
198							C																		C
199										C															

TABLA 13

ES 2 639 056 T3

Residuo SV	Sustitución	N.ºKabat/ Posición en CDR	Incremento sobre SV por FACS	Incremento sobre SV por ELISA	Incremento sobre SV por AlphaLISA	Incremento sobre SV por BIAcore
CDR-H1						
N	V (SEQ ID NO: 201)	31 / 1	3,6	2	2,2	2
Y	R (SEQ ID NO: 202)	32 / 2	3,6	1,8	4,3	-
G	D (SEQ ID NO: 151)	33 / 3	11,1	-	-	-
G	A (SEQ ID NO: 153)	33 / 3	5,5	-	-	-
V	N (SEQ ID NO: 204)	34 / 4	4,2	-	-	-
V	L (SEQ ID NO: 203)	34 / 4	3,5	-	-	-
CDR-H2						
V	L (SEQ ID NO: 205)	50 / 1	7,6	1,9	3,8	-
V	Q (SEQ ID NO: 206)	50 / 1	7,0	-	-	-
I	G (SEQ ID NO: 207)	51 / 2	6,4	-	4,6	-
I	Q (SEQ ID NO: 210)	51 / 2	3,4	-	-	-
I	M (SEQ ID NO: 208)	51 / 2	3,5	-	-	-
I	S (SEQ ID NO: 209)	51 / 2	2,6	-	-	-
W	G (SEQ ID NO: 211)	52 / 3	5,0	1,5	1,8	-
W	T (SEQ ID NO: 212)	52 / 3	4,0	-	-	-
S	Q (SEQ ID NO: 213)	53 / 4	4,0	1,4	1,1	-
S	T (SEQ ID NO: 214)	53 / 4	3,1	-	-	-
G	D (SEQ ID NO: 215)	55 / 6	5,5	1,6	2	-
N	G (SEQ ID NO: 216)	56 / 7	5,2	-	-	-
T	P (SEQ ID NO: 173)	57 / 8	6,6	-	-	-
T	G (SEQ ID NO: 219)	57 / 8	4,8	1,8	3,8	-
T	D (SEQ ID NO: 218)	57 / 8	2,3	-	-	-
T	S (SEQ ID NO: 220)	57 / 8	2,1	-	-	-
T	A (SEQ ID NO: 217)	57 / 8	1,9	-	-	-
Y	E (SEQ ID NO: 223)	59 / 10	4,3	1,9	1,4	2,3
Y	S (SEQ ID NO: 226)	59 / 10	3,6	-	-	-
Y	W (SEQ ID NO: 227)	59 / 10	2,6	-	-	-
Y	A (SEQ ID NO: 221)	59 / 10	2,3	-	-	-
Y	F (SEQ ID NO: 224)	59 / 10	2,1	-	-	-
Y	C (SEQ ID NO: 222)	59 / 10	2,2	-	-	-
Y	G (SEQ ID NO: 225)	59 / 10	1,9	-	-	-
N	D (SEQ ID NO: 228)	60 / 11	3,0	-	-	-
F	V (SEQ ID NO: 292)	63 / 14	1,9	-	-	-
T	E (SEQ ID NO: 229)	64 / 15	1,9	-	-	-
CDR-H3						
T	D (SEQ ID NO: 301)	97 / 3	13,0	-	-	-
Y	W (SEQ ID NO: 230)	98 / 4	1,9	2,1	3,7	1,8
F	Y (SEQ ID NO: 293)	100c / 9	3,2	-	-	-

TABLA 14-1

Residuo SV	Sustitución	N.ºKabat/ Posición en CDR	Incremento sobre SV por FACS	Incremento sobre SV por ELISA	Incremento sobre SV por AlphaLISA	Incremento sobre SV por BIAcore
CDR-1						
A	V (SEQ ID NO: 231)	25 / 2	4,5	1,9	3,0	-
A	S (SEQ ID NO: 232)	25 / 2	2,3	-	-	-
Q	Y (SEQ ID NO: 304)	27 / 4	2,7	-	-	-
G	Y (SEQ ID NO: 233)	30 / 7	7,5	3,9	4,8	4,8
CDR-1?						
N	L (SEQ ID NO: 234)	91 / 3	2,3	1,6	2,0	-
N	L (SEQ ID NO: 235)	92 / 4	3,0	1,7	2,2	-
N	R (SEQ ID NO: 236)	92 / 4	3,1	-	-	-
N	E (SEQ ID NO: 309)	93 / 5	2,6	-	-	-
N	A (SEQ ID NO: 310)	93 / 5	2,4	-	-	-
T	A (SEQ ID NO: 237)	97 / 9	2,4	-	-	-
T	S (SEQ ID NO: 311)	97 / 9	6,6	-	-	-
T	D (SEQ ID NO: 238)	97 / 9	5,0	-	-	-
T	E (SEQ ID NO: 239)	97 / 9	3,5	-	-	-

TABLA 14-2

Variante Comb.	SV	N.º Kabat/ posición en CDR		Sustitución	Incremento sobre SV por ELISA	Incremento sobre SV por AlphaLISA	Incremento sobre SV por KinExa
Comb. 1	I	51/2	VH	G (SEQ ID NO: 207)	18,7	7,0	24,0
	Y	98/4		W (SEQ ID NO: 230)			
	G	30/7	VL	Y (SEQ ID NO: 233)			
	N	92/4		L (SEQ ID NO: 235)			
Comb. 2	N	31/1	VH	V (SEQ ID NO: 201)	3,4	3,0	-
	V	50/1		L (SEQ ID NO: 205)			
	A	25/2	VL	V (SEQ ID NO: 231)			
	N	91/3		L (SEQ ID NO: 234)			

TABLA 14-3

C225 (Cetuximab) VH (SEQ ID NO:1)
 Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I T C T V S G F S L T **N Y G V H** W V R Q S P G K G L E W
 L G **V I W S G G N T D Y N T P F T S** R L S I N K K D N S K S Q V F F K M N S L Q S N D T A I Y Y
 C A R **A L T Y Y D Y E F A Y** W G Q G T L V T V S A

C225 (Cetuximab) VL (SEQ ID NO:2)
 D I L L T Q S P V I L S V S P G E R V S F S C **R A S Q S I G T N I H** W Y Q Q R T N G S P R L L
 I K **Y A S E S I S** G I P S R F S G S G T D F T L S I N S V E S E D I A D Y C **Q Q N N N W**
P T T F G A G T K L E L K R

FIGURA 1A

Hu225 (M225 humanizado) VH (SEQ ID NO: 9)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A S G F S L T **N Y G V H** W V R Q A P G K G L E W
 L G **V I W S G G N T D Y N T P F T S** R R L T I N K K D N S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
 C A R **A L T Y Y D Y E F A Y** W G Q G T L V T V S S

Hu225 (M225 humanizado) VL (SEQ ID NO: 10)
 D I L L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C **R A S Q S I G T N I H** W Y Q Q K P G Q A P R L L
 I K **Y A S E S I S** G I P D R F S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C **Q Q N N N W**
P T T F G Q G T K L E I K R

FIGURA 1B

Cadena de anticuerpo	N.º de CDR	Secuencia	SEQ ID NO.
Pesada	1	NYGVH	3
Pesada	2	VIWGGNTDYNTPFTS	4
Pesada	3	ALTYDYEFAY	5
Ligera	1	RASQSIGTNIH	6
Ligera	2	YASESIS	7
Ligera	3	QQNNNWPTT	8

FIGURA 1C

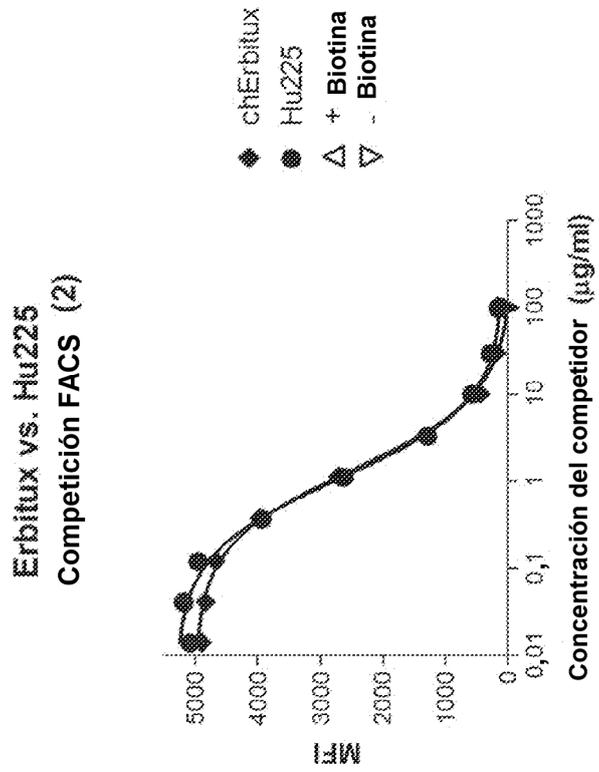
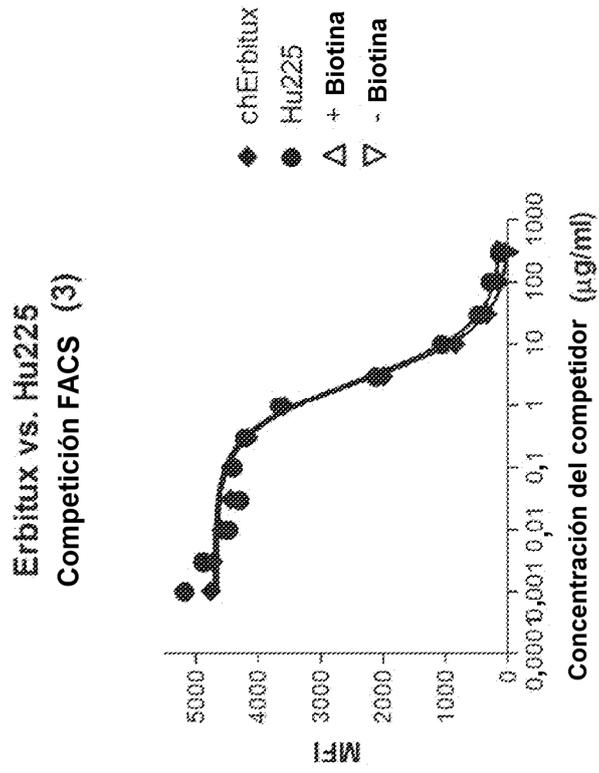


FIGURA 2A

CI 50 ($\mu\text{g/ml}$)

Anticuerpo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	SD
Erbitux (cetuximab)	2,14	1,35	2,54	2,01	0,6
Hu225	1,71	1,06	2,62	1,79	0,4

FIGURA 2B

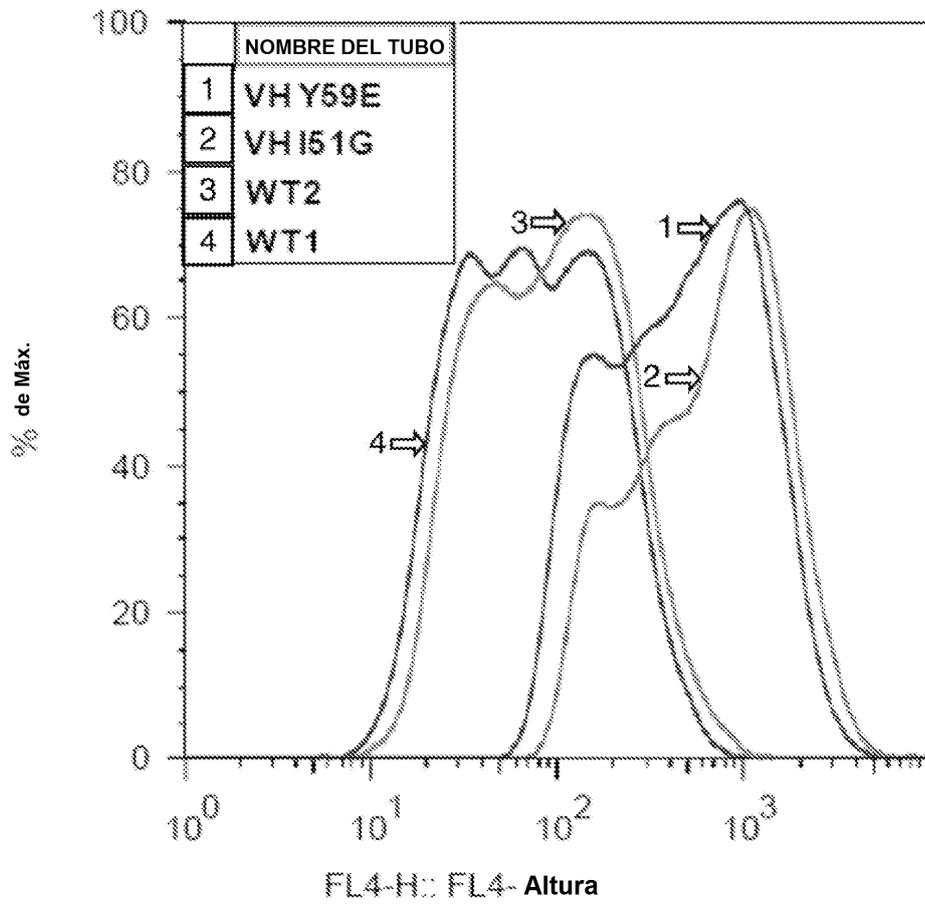


FIGURA 3

ES 2 639 056 T3

Péptidos de V _H y V _L de Cetuximab			
SEQ ID NO:	V _H	SEQ ID NO:	V _L
11	QVQLKQSGPGLVQPS	12	DILLTQSPVILSVSP
13	LKQSGPGLVQPSQSL	14	LTQSPVILSVSPGER
15	SGPGLVQPSQSL SIT	16	SPVILSVSPGERVVSF
17	GLVQPSQSL SITCTV	18	ILSVSPGERVSFSCR
19	QPSQSL SITCTVSGF	20	VSPGERVSFSCRASQ
21	QSL SITCTVSGFSLT	22	GERVSFSCRASQSIG
23	SITCTVSGFSLTNYG	24	VSFSCRASQSIGTNI
25	CTVSGFSLTNYGVHW	26	SCRASQSICTNIHWY
27	SGFSLTNYGVHWVRQ	28	ASQSIGTNIHWYQQR
29	SLTNYGVHWVRQSPG	30	SIGTNIHWYQQR TNG
31	NYGVHWVRQSPGKGL	32	TNIHWYQQR TNGSPR
33	VHWVRQSPGKGLEWL	34	HWYQQR TNGSPRLLI
35	VRQSPGKGLEWLGVI	36	QQR TNGSPRLLIKYA
37	SPGKLEWLGVIWSG	38	TNGSPRLLIKYASES
39	KGLEWLGVIWSGGNT	40	SPRLLIKYASESISG
41	EWLGIWSGGNTDYN	42	LLIKYASESISGIPS
43	GVIWSGGNTDYNTPF	44	KYASESISGIPSRFS
45	WSGGNTDYNTPF TSR	46	SESTSGIPSRFSGSG
47	GNTDYNTPF TSRLSI	48	ISGIPSRFSGSGSGT
49	DYNTPF TSRLSINKD	50	IPSRFSGSGSGTDFT

FIGURA 4-1

Péptidos de V _H y V _L de Cetuximab analizados			
SEQ ID NO:	V _H	SEQ ID NO:	V _L
51	TPFTSRLSINKDNSK	52	RFGSGSGTDFTLISI
53	TSRLSINKDNSKSQV	54	GSGSGTDFTLSINSV
55	LSINKDNSKSQVFFK	56	SGTDFTLSINSVESE
57	NKDNSKSQVFFKMNS	58	DFTLSINSVESEDIA
59	NSKSQVFFKMNSLQS	60	LSINSVESEDIADYY
61	SQVFFKMNSLQSNDDT	62	NSVESEDIADYYCQQ
63	FFKMNSLQSNDDTAIY	64	ESEDIADYYCQQNNN
65	MNSLQSNDDTAIYYCA	66	DIADYYCQQNNNWPT
67	LQSNDDTAIYYCARAL	68	DYYCQQNNNWPTTFG
69	NDTAIYYCARALTY	70	CQQNNNWPTTFGAGT
71	AIYYCARALTYDY	72	NNNWPTTFGAGTKLE
73	YCARALTYDYEFAY	74	NNWPTTFGAGTKLEL
75	RALTYDYEFAYWGQ		
76	ALTYDYEFAYWGQG		

FIGURA 4-2

ES 2 639 056 T3

Péptidos de V _H y V _L Hu225 s analizados			
SEQ ID NO:	V _H	SEQ ID NO:	V _L
77	EVQLVESGGGLVQPG	78	DILLTQSPGTLSLSP
79	LVESGGGLVQPGGSL	80	LTQSPGTLSLSPGER
81	SGGGLVQPGGSLRLS	82	SPGTLSLSPGERATL
83	GLVQPGGSLRLSCAA	84	TLSSLSPGERATLSCR
85	QPGGSLRLSCAASGF	86	LSPGERATLSCRASQ
87	GSLRLSCAASGFSLT	88	GERATLSCRASQSIG
89	RLSCAASGFSLTNYG	90	ATLSCRASQSIGTNI
91	CAASGFSLTNYGVHW	92	SCRASQSIGTNIHWY
93	SGFSLTNYGVHWVRQ	94	ASQSIGTNIHWYQQK
95	SLTNYGVHWVRQAPG	96	SIGTNIHWYQQKPGQ
97	NYGVHWVRQAPGKGL	98	TNIHWYQQKPGQAPR
99	VHWVRQAPGKLEWL	100	HWYQQKPGQAPRLLI
101	VRQAPGKLEWLGVI	102	QQKPGQAPRLLIKYA
103	APGKLEWLGVIWSG	104	PGQAPRLLIKYASES
105	KLEWLGVIWSGGNT	106	APRLLIKYASESISG
107	EWLGVIWSGGNTDYN	108	LLIKYASESISGIPD
109	GVIWSGGNTDYNTPF	110	KYASESISGIPDRFS
111	WSGGNTDYNTPFTR	112	SEESISGIPDRFSGSG
113	GNTDYNTPFTRSLTI	114	ISGIPDRFSGSGSGT
115	DYNTPFTRSLTINKD	116	IPDRFSGSGSGTDFT
117	TPFTRSLTINKDNSK	118	RFSGSGSGTDFTLTI

FIGURA 5-1

Péptidos de V_H y V_L Hu225 s analizados			
SEQ ID NO:	V_H	SEQ ID NO:	V_L
119	TSRLTINKDNSKNTV	120	GSGSGTDFTLTISRL
121	LTINKDNSKNTVYLQ	122	SGTDFTLTISRLEPE
123	NKDNSKNTVYLQMNS	124	DFTLTISRLEPEDFA
125	NSKNTVYLQMNSLRA	126	LTISRLEPEDFAVYY
127	NTVYLQMNSLRAEDT	128	SRLEPEDFAVYYCQQ
129	YLQMNSLRAEDTAVY	130	EPEDFAVYYCQQNNN
131	MNSLRAEDTAVYYCA	132	DFAVYYCQQNNNWPT
133	LRAEDTAVYYCARAL	134	VYYCQQNNNWPTTFG
135	EDTAVYYCARALTY	136	CQQNNNWPTTFGQGT
137	AVYYCARALTYDYDYE	138	NNNWPTTFGQGTKLE
139	YCARALTYDYDYEFAY	140	NWPTTFGQGTKLEIK
141	RALTYDYDYEFAYWGQ	142	DILLTQSPGTLSLSP
143	TYDYDYEFAYWGQGT	144	LTQSPGTLSLSPGER
145	DYEFAYWGQGTLVTV	146	SPGTLSLSPGERATL
147	EFAYWGQGTLVTVSS	148	TLSLSPGERATLSCR

FIGURA 5-2

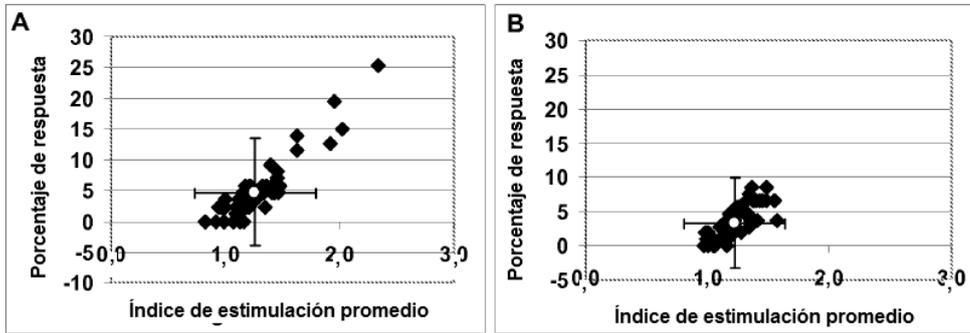


FIGURA 6