

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 299**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01) A61P 37/02	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)	
C12N 1/15	(2006.01)	
C12N 1/21	(2006.01)	
C12N 5/10	(2006.01)	
G01N 33/53	(2006.01)	
C07K 1/22	(2006.01)	
A61K 39/395	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2013 PCT/CN2013/086661**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14075576**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013 E 13855456 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2921503**

54 Título: **Anticuerpo humano anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico humano y gen codificante y aplicación del mismo**

30 Prioridad:

16.11.2012 CN 201210465918

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2018

73 Titular/es:

**SHANGHAI SAIYUAN BIO-TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
Room 2530, Second floor, No. 20, Lane 77,
YueYang Road, Xuhui District
Shanghai 200031, CN**

72 Inventor/es:

**SUN, ZHIWEI;
WANG, SHUANG;
SUN, JIURU;
ZHANG, CHANG;
QIU, WEIYI y
FAN, TIEJIONG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 689 299 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo humano anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico humano y gen codificante y aplicación del mismo

5

Campo de la técnica

La invención se refiere a la preparación y aplicación de un anticuerpo humano modificado genéticamente para el tratamiento, y se refiere principalmente a un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico humano específico y el gen codificante (ácidos nucleicos) y aplicación del mismo.

10

Técnica antecedente

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro de la familia de genes del factor de crecimiento epidérmico (erbB) y tiene una influencia significativa en el desarrollo de distintos cánceres, tales como el cáncer de mama, cáncer de colon, tumor de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer prostático. Muchos estudios domésticos y en el extranjero demostraron que el anticuerpo contra el EGFR puede inhibir la ruta de transducción de la señal de EGFR bloqueando eficazmente la unión del ligando extracelular, y tiene un efecto terapéutico sobre los tumores humanos que expresaban distintos EGFR, especialmente el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (80 %-100 %), cáncer colorrectal (25 %-77 %), cáncer de pulmón de células no pequeñas (40 %-80 %) y cáncer pancreático. Actualmente el receptor del factor de crecimiento epidérmico es una de las dianas terapéuticas de tumores más profundamente estudiadas y con mayor interés, y es uno de los puntos calientes de investigación del tratamiento de tumores actual para utilizar medios modificados genéticamente para desarrollar un anticuerpo monoclonal anti-EGFR. Se conocen anticuerpos anti-EGFR por los documentos WO 02/100348 y WO 2011/156617. Heitner et al. (J. IMMUNOL. METH., vol. 248, no. 1-2, 1 de febrero de 2001, páginas 17-30) que desvelan el aislamiento de un anticuerpo anti-EGFR de una biblioteca de fagos de presentación. Actualmente, se han aprobado por la FDA americana dos anticuerpos anti-EGFR terapéuticos, a saber, el anticuerpo quimérico anti-EGFR de ratón-humano Cetuximab (nombre comercial: Erbitux) y el anticuerpo anti-EGFR completamente humano Panitumumab, respectivamente, que se utilizan para el tratamiento del cáncer colorrectal y tumor de cabeza y cuello. En 2005, se concedió al anticuerpo anti-EGFR humano, Nimotuzumab (nombre comercial: TAIXINSHENG), un nuevo certificado como medicina de clase 1 por la Administración China de Fármacos y Alimentos (CFDA). Los anticuerpos que se han desarrollado contra la diana comprenden un anticuerpo monoclonal humano, el Pertuzumab, los anticuerpos humanos Zalutumumab y Necitumumab, etc. Aunque los epítomos antigénicos a los que se unen son diferentes, todos pueden tener un papel en la inhibición de las funciones biológicas mediadas por el EGFR.

15

20

25

30

35

El anticuerpo humano es la última dirección del desarrollo de un anticuerpo terapéutico, y el uso de un anticuerpo humano en clínica puede reducir al máximo la inmunogenicidad del anticuerpo, prolongar el periodo de semivida del anticuerpo *in vivo*, y media la regulación inmunitaria, el efecto de ADCC y CDC mediante el fragmento Fc de inmunoglobulina humana, y de esta manera aumenta el efecto biológico del anticuerpo. El medio principal para el desarrollo del anticuerpo humano comprende la tecnología de bibliotecas de anticuerpos y la tecnología de ratones transgénicos. Actualmente, la gran capacidad de la tecnología de bibliotecas de anticuerpos está bien establecida, especialmente la tecnología de bibliotecas de anticuerpos en fagos de presentación ha producido satisfactoriamente varios anticuerpos completamente humanos que se venden en el mercado. En una biblioteca de anticuerpo de gran capacidad construida, la biblioteca de anticuerpos semi-sintéticos de la compañía CAT y la biblioteca de anticuerpos completamente sintéticos de la compañía Marphosys AG son las más representativas y los ejemplos más satisfactorios. En particular, se han obtenido decenas de anticuerpos candidatos con valor en desarrollo mediante la tecnología HuCAL GOLD de la compañía Marphosys AG, y ahora hay 17 proyectos entrando en un estadio clínico. La mayor ventaja de dicha tecnología es que puede optimizar la biblioteca de anticuerpos mediante un diseño razonable, y el gen de la estructura de los anticuerpos de la misma es una estructura en caja reemplazable que facilita la optimización y modificación posterior del anticuerpo. Basándose en dicha ventaja, la biblioteca HuCAL hasta ahora ha actualizado la biblioteca de anticuerpos de la misma hasta la tercera generación, por lo cual la capacidad de la biblioteca alcanza $4,5 \times 10^{10}$ y en la cual se puede explorar anticuerpos con alta afinidad con una afinidad hasta de nivel de pM. Por lo tanto, tecnológicamente, el uso de la tecnología de bibliotecas de anticuerpos para obtener un anticuerpo humano terapéutico está bien establecida hoy día, y se considera uno de los medios técnicos más satisfactorios actualmente para el desarrollo de un anticuerpo terapéutico. Mediante la optimización y exploración de la tecnología, el solicitante inventó un método altamente eficaz para la unión del ADN y la conversión, y lo aplicó a una construcción de una biblioteca de anticuerpos en fagos de gran capacidad. Se ha construido una biblioteca de recursos de anticuerpos humanos de cadena única en fago completamente sintética de gran capacidad con una capacidad de la biblioteca de hasta $1,35 \times 10^{10}$ (ZL.200910091261.8), y se han explorado múltiples anticuerpos específicos contra diferentes dianas de la biblioteca de anticuerpos. El anticuerpo Ame55 de la presente invención se exploró y se obtuvo de la biblioteca de anticuerpos.

40

45

50

55

60

Sumario de la invención

65

La presente invención proporciona un anticuerpo humano anti-EGFR humano, en el que la región variable de

cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 20 y la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 21, o un anticuerpo que tiene una sustitución de aminoácidos en la región variable de cadena ligera del mismo que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 20, y/o en la región variable de cadena pesada del mismo que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 21, de la siguiente manera:

(1) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Gly y el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ser,

(2) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Lys y el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ser,

(3) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Gly y el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ala,

(4) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Lys y el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ala,

(5) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Lys, el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ser, y el aminoácido de la posición 107 de la SEQ ID NO 21 se sustituye con Ser,

(6) el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ala, o

(7) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Lys, el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ala, y el aminoácido de la posición 107 de la SEQ ID NO 21 se sustituye con Ser.

La presente divulgación proporciona secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-EGFR humano y fragmentos activos de los mismos.

La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o los fragmentos activos del mismo descritos anteriormente.

La presente divulgación proporciona adicionalmente aplicaciones del anticuerpo y los fragmentos activos del mismo descritos anteriormente en los fármacos para el tratamiento de tumores malignos que expresan EGFR y enfermedades autoinmunitarias.

Un anticuerpo modificado de cadena sencilla anti-EGFR humano específico (fragmento variable de cadena sencilla, svFv) de la presente divulgación se explora en la biblioteca de gran capacidad de anticuerpos de cadena sencilla sintéticos completamente humanos por bioselección múltiples veces mediante la utilización de tecnología de presentación en superficie de fagos. En una realización de la presente invención, las regiones variables de cadena ligera y sencilla del anticuerpo como se definen en las reivindicaciones se introducen en vectores pABL y pABGI de expresión transitoria de anticuerpos intactos para células de mamífero respectivamente, y se lleva a cabo la expresión de secreción transitoria para obtener IgG1 de Ame55 por co-transfección en células HEK 293T.

El patrón de secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo proporcionada por la presente divulgación es FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Aquí, FR1-4 representan 4 regiones marco conservadas, y CDR1-3 representan 3 regiones hipervariables. FR1-4 se pueden aislar de una secuencia de región constante (por ejemplo, los aminoácidos que se utilizan comúnmente en una cadena ligera, una cadena pesada, subclases o subfamilias de una inmunoglobulina humana), aislarse de la región marco conservada de un anticuerpo individual, o producirse combinando diferentes genes de regiones marco conservadas, por ejemplo, numerosas secuencias de región marco conservadas de anticuerpos humanos incluidas en bibliotecas tales como Kabat, etc.

Entre estas, la región variable de cadena pesada es el subgrupo de inmunoglobulina humana de la familia VH V de cadena pesada humana, y la región variable de cadena ligera es la familia Lambda III. Con respecto a las regiones CDR de las cadenas ligera y pesada, se obtienen un gran número de mutantes por cribado de alanina y mutación de otros aminoácidos similares, y los resultados con respecto a la evaluación de mutantes de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera demostraba que: la secuencia de CDRL1 es SGDX1LGDKYX2X3 (SEQ ID NO 1). Aquí, X1 puede ser Ala, Gly, Asn, Lys, preferentemente Lys y Gly; X2 puede ser Ala, Val, e Ile, preferentemente Ala; y X3 puede ser Ser y Tyr, preferentemente Ser. La secuencia de CDR2L puede ser EDX1KRPS (SEQ ID NO 2). Aquí X1 puede ser Ser, Thr, Ala y Gly, preferentemente Ser. La secuencia de CDRL3 puede ser X1X2WDX3DWX4MP (SEQ ID NO 3). Aquí, X1 es Ser, Ala, Gly, Leu, Asn, Tyr y Gln, preferentemente Ser; X2 puede ser Val, Ser, Ala y Leu, preferentemente Ser o Ala; X3 puede ser Gly, Ala y Pro, preferentemente Gly; y X4 puede ser Gly y Ser, preferentemente Gly. Los resultados con respecto a la evaluación de mutantes de las CDR2 y CDR3 de cadena pesada demostraban que: la secuencia de CDRH2 es X1IIPX2DSDTRYSPSFQ (SEQ ID NO 5). Aquí, X1 puede ser Gly y Ser, preferentemente Gly. X2 puede ser Gly y Ser, preferentemente Gly. La secuencia de CDR3H es GIYPSNVX1V (SEQ ID NO 6). Aquí, X1 puede ser Ala, Ser y Gly, preferentemente Ser o Ala. El cribado de alanina se llevó a cabo en las regiones CDR de cadena ligera y pesada del anticuerpo, y los resultados demostraban que las CDR3 de cadena ligera y pesada, la CDR1 de cadena ligera y la CDR2 de cadena pesada son esenciales para la unión del anticuerpo al EGFR, en las que el cambio de solo un único aminoácido puede producir varias veces o decenas de veces de cambio de afinidad. Por favor, véase el Ejemplo 5 para los detalles.

El anticuerpo humano anti-EGFR humano proporcionado por la presente divulgación tiene una región variable de cadena ligera que contiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3.

5 En un aspecto adicional, la región variable de cadena ligera del mismo contiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.

En otro aspecto adicional, la región variable de cadena ligera del mismo contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 7.

10 Adicionalmente, el anticuerpo humano anti-EGFR humano proporcionado por la presente divulgación tiene una región variable de cadena pesada que contiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.

15 En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada del mismo también contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4.

En un aspecto adicional más, la región variable de cadena pesada del mismo contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 8.

20 Los anticuerpos humanos anti-EGFR humano proporcionados por la presente invención incluye un anticuerpo de cadena sencilla Fab, mini anticuerpo, anticuerpo quimérico o anticuerpos intactos de IgG1, IgG2, IgA, IgE, IgG4, IgD.

El anticuerpo humano anti-EGFR humano Ame55 proporcionado por la presente invención tiene la región variable de cadena pesada de V_{H5} y la región variable de cadena ligera de V_{L3} , y el subtipo de anticuerpo es IgG1.

25 El anticuerpo humano anti-EGFR humano proporcionado por la presente divulgación tiene la región variable de cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3 y la región variable de cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 6.

30 El anticuerpo humano anti-EGFR humano proporcionado por la presente divulgación tiene la región variable de cadena ligera que contienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3 y la región variable de cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.

35 Preferentemente, el anticuerpo humano anti-EGFR humano proporcionado por la presente divulgación tiene la región variable de cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 7 y la región variable de cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 8.

40 El anticuerpo humano anti-EGFR humano proporcionado por la presente divulgación se puede unir al EGFR humano con una afinidad de al menos 10^8 M. El anticuerpo inhibe la unión de un ligando del EGFR al EGFR humano. El anticuerpo se une a las células que expresan EGFR; las células pueden ser células cancerosas de piel humana, células humanas de cáncer de hígado, células humanas de cáncer de colon, células humanas de cáncer de cuello uterino, células de cáncer ovárico, células humanas de cáncer de pulmón, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de mama, células de cáncer renal, células de cáncer de próstata, células escamosas de neoplasias de cabeza y cuello, células de cáncer pancreático, células tipo fibroblastos de la membrana sinovial o queratinocitos.

45 La presente divulgación proporciona los ácidos nucleicos que codifican los mencionados anticuerpos.

Las secuencias de nucleótidos del gen que codifica los ácidos nucleicos la región variable de cadena ligera son:

- 50
- 1) la secuencia de ADN de SEQ ID NO 9;
 - 2) las secuencias de nucleótidos que se hibridan con la secuencia de ADN definida en 1) en condiciones rigurosas y que codifican la región variable de cadena ligera;
 - 3) Las secuencias de nucleótidos que tienen más de un 70 % de homología con la secuencia de ADN definida en 1) y que codifican la región variable de cadena ligera.

55 En la presente divulgación, "condiciones rigurosas" se refiere a: (1) la hibridación y elución bajo fuerza iónica baja y temperatura alta, por ejemplo, $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1 % de SDS, 60 °C; o (2) durante la hibridación, se añade un desnaturalizante, tal como un 50 % (v/v) de formamida, 0,1 % de suero fetal bovino/0,1 Ficoll, 42 °C, etc.; o (3) hibridación solamente cuando la homología entre dos secuencias esté el menos por encima del 70 %, preferentemente al menos por encima del 80 %, más preferentemente por encima del 90 %, más preferentemente por encima del 95 %.

60 En el que las secuencias de nucleótidos del gen que codifica la región variable de cadena pesada son:

- 65
- 1) la secuencia de ADN de SEQ ID NO 10;
 - 2) las secuencias de nucleótidos que se hibridan con la secuencia de ADN definida en 1) en condiciones

rigurosas y que codifican la región variable de cadena pesada;

3) Las secuencias de nucleótidos que tienen más de un 70 % de homología con la secuencia de ADN definida en 1) y que codifican la región variable de cadena pesada.

- 5 Además, considerando la degeneración de codones, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación pueden ser, pero no se limitan a, las SEQ ID NO 9 y 10, por ejemplo, la secuencia del gen que codifica el anticuerpo descrito anteriormente se puede modificar en la región codificante del mismo sin cambiar la secuencia de aminoácidos para obtener un gen que codifique el mismo anticuerpo. Un experto en la técnica puede sintetizar artificialmente un gen modificado de acuerdo con la preferencia de codón de un huésped que
10 exprese el anticuerpo, de manera que se mejore la eficacia de expresión del anticuerpo.

La presente divulgación también proporciona un vector de expresión que contiene los ácidos nucleicos descritos anteriormente.

- 15 La presente divulgación proporciona una bacteria huésped, una célula huésped o un casete de expresión que contiene el vector de expresión descrito anteriormente.

Un método para la preparación del anticuerpo descrito anteriormente, que comprende: explorar un anticuerpo de cadena sencilla específico anti-EGFR utilizando una tecnología de biblioteca de anticuerpo de presentación en fago
20 para obtener los genes de la región variable de cadena pesada y cadena ligera, y la clonación de los genes en un vector de expresión de anticuerpo intacto, y llevando a cabo la expresión del anticuerpo intacto mediante un sistema de expresión de mamífero u otro sistema de expresión para obtener el anticuerpo proteico intacto del mismo.

Se proporcionan aplicaciones del anticuerpo descrito anteriormente en la preparación de fármacos para el
25 tratamiento de enfermedades con EGFR como diana.

Los fármacos son fármacos antitumorales, fármacos antiinflamatorios o fármacos para tratar enfermedades autoinmunitarias.

30 Los fármacos o reactivos de detección que contienen el anticuerpo descrito anteriormente también pertenecen al ámbito de protección de la presente invención, que se define en el sentido más amplio como se define en las reivindicaciones. Además, los fármacos o reactivos de detección que contienen el anticuerpo descrito anteriormente se pueden preparar mezclando uno o más de otros anticuerpos junto con el anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación para obtener una preparación mezclada. El uno o más de otros anticuerpos en la mezcla de anticuerpos
35 pueden ser otros anticuerpos contra otro antígeno o diferentes epítopos de EGFR. Las investigaciones prueban que la combinación de fármacos contra múltiples dianas relacionadas con una enfermedad es una dirección de investigación importante para un anticuerpo terapéutico, por ejemplo, las combinaciones de anticuerpos contra dos dianas EGFR y VEGFR y contra dos dianas EGFR y ErbB2 tienen un efecto antitumoral sinérgico (Pennell NA, Lynch TJ. *The Oncologist*. 2009, 14: 399-411; Galer CE, Corey CL, Wang ZY, et al. *Head Neck*. 2011, 33(2): 189-198; Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, et al. *British J Cancer*, 2007, 97,494-501); y la combinación de anticuerpos contra diferentes epítopos de EGFR también tiene un efecto antitumoral definido (Pedersen MW, Jacobsen HJ, Koefoed K, et al. *Cancer Res*. 2010, 70: 588-597), por lo tanto, la preparación de mezcla de anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación y otros anticuerpos también se encuentra en el ámbito de protección de la presente
40 invención.

45 La presente invención también proporciona un fármaco de anticuerpo dirigido, que comprende el anticuerpo humano anti-EGFR humano mencionado anteriormente como se define en las reivindicaciones unido a un agente citotóxico en distintas formas.

50 Las formas de unión distintas son el marcado de anticuerpo, entrecruzamiento *in vitro* o acoplamiento molecular.

El agente citotóxico incluye moléculas químicas, isótopos radioactivos, polipéptidos, toxinas y otras sustancias que tienen las propiedades de destruir células o inducir apoptosis.

55 Los anticuerpos proporcionados por la presente invención son anticuerpos intactos o distintos anticuerpos modificados genéticamente en otras formas. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR puede ser un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo. La propia molécula de anticuerpo se puede utilizar para el tratamiento y el diagnóstico. El anticuerpo puede estar marcado, entrecruzado o acoplado y sometido a expresión en fusión con otras proteínas o moléculas polipeptídicas para formar un complejo (tal como una sustancia citotóxica, una toxina radioactiva y/o una
60 molécula química, etc.) para el diagnóstico y tratamiento.

La presente invención proporciona adicionalmente los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo, un vector de expresión, una tecnología de control relacionada para la transfección por el vector de la célula huésped, la célula huésped, un procedimiento de expresión y recuperación del anticuerpo en un sobrenadante del cultivo celular. La
65 presente invención también proporciona una composición y una molécula o solución de suministro farmacológicamente aceptable que contiene el anticuerpo. La composición terapéutica de la presente aplicación está

estéril y se puede congelar a baja temperatura.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-EGFR, que puede inhibir una o más de las bioactividades inducidas por el EGFR. El anticuerpo actúa bloqueando la unión del EGFR al ligando del mismo, actúa destruyendo las células que expresan EGFR, o actúa consumiendo el EGFR de la superficie celular mediante la internalización del complejo formado por la unión al EGFR. Todas las funciones de interferencia que posee el antagonista del EGFR se debería considerar igualmente como el fin de la presente invención.

Las secuencias de SEQ ID NO 1-8 desveladas en el presente documento comprenden una "modificación de secuencia conservada", es decir, la modificación de secuencia de aminoácidos y nucleótidos no afecta obviamente ni cambia las características de unión del anticuerpo o de la secuencia de aminoácidos que contiene el anticuerpo. La modificación de secuencia conservada comprende la sustitución, adición, o eliminación de nucleótidos y un aminoácido. Las modificaciones se pueden introducir en las SEQ ID NO 1-8 mediante tecnologías convencionales de la técnica tal como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Por ejemplo, un ejemplo ilustrativo de modificaciones conservadas es la modificación que se consigue llevando a cabo un cribado de alanina en la región CDR del anticuerpo y llevando a cabo una mutación en los aminoácidos de sitios parciales, como se describe en el ejemplo de la presente solicitud. La sustitución conservada de aminoácidos comprende la sustitución de un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar u otros restos de aminoácidos. En la técnica, se han definido las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias comprenden aminoácidos con cadenas laterales básicas (tales como lisina, arginina, histidina), aminoácidos con cadenas laterales ácidas (tales como el ácido aspártico, ácido glutámico), aminoácidos con cadenas laterales sin carga polar (tales como glicina, asparaginato, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), aminoácidos con cadenas laterales no polares (tales como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), aminoácidos con cadenas ramificadas P (tales como treonina, valina, isoleucina), y aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (tales como tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, otro resto de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales se utiliza preferentemente para sustituir el resto de aminoácido no esencial en el anticuerpo anti-EGFR humano.

Por lo tanto, los siguientes anticuerpos se consideran que se encuentran en el alcance de la presente divulgación: el anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos desvelada en el presente documento y/o el anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos que se devela en el presente documento, incluyendo el anticuerpo codificado básicamente por una secuencia modificada similar por la secuencia conservada, o que contiene una secuencia similar modificada por la secuencia conservada.

La presente divulgación proporciona una molécula biespecífica o multiespecífica, es decir, una molécula que comprende el anticuerpo descrito anteriormente una parte de unión al antígeno del mismo.

La presente invención proporciona una proteína de fusión de un anticuerpo con otras proteínas y/o polipéptidos, que comprenden un complejo del anticuerpo mencionado anteriormente que se proporciona por la presente invención y otras proteínas o moléculas polipeptídicas que tienen una cierta función.

Además, la proteína de fusión se prepara uniendo el ácido nucleico del anticuerpo con el de otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo, gen de inmunotoxina o citocina para construir un vector de expresión recombinante, y obtener una molécula recombinante de fusión proteica mediante una célula de mamífero u otro sistema de expresión.

El anticuerpo Ame55 descrito en la presente divulgación tiene buenas perspectivas de aplicación en tratamiento, que se manifiestan principalmente como la actividad de unión específica del anticuerpo con el EGFR humano recombinante, y la unión específica del anticuerpo con el EGFR natural en la superficie de células A431. El anticuerpo ha demostrado tener una buena especificidad mediante ELISA y experimentos inmunohistoquímicos; y los resultados de la transferencia de Western demostraban que solamente se une específicamente al EGFR no reductor, y no se une o se une débilmente al EGFR reductor.

La capacidad de unión del anticuerpo al EGFR de distintas formas se detecta utilizando el sistema Biacore, y los resultados demuestran que la afinidad KD de la proteína de fusión del anticuerpo con la región extracelular del EGFR recombinante-Fc es de 0,23 nM (Biacore3000). El análisis por citometría de flujo muestra que la afinidad de unión relativa del anticuerpo con el EGFR de la superficie de células A431 es mayor que la del anticuerpo comercializado TAIXINSHENG (nimotuzumab), y es equivalente al que se comercializa como Erbitux. Se demuestra en los ejemplos de la presente divulgación que la afinidad de unión del anticuerpo contra EGFR de la presente divulgación con el EGFR humano no es mayor de 1 nM y la afinidad del mutante del mismo es no más de 10 nM.

El anticuerpo puede inhibir la unión de Erbitux al EGFR *in vitro*, y el Erbitux también puede inhibir la unión del anticuerpo al EGFR. Esto da a entender que el anticuerpo puede solaparse con el epítipo del Erbitux en la estructura espacial. El anticuerpo puede inhibir competitivamente la unión del EGF al EGFR.

El anticuerpo puede obviamente inhibir la actividad de migración de las células A431. Los resultados del ensayo de

cicatrización de un rasguño celular revelan que el anticuerpo puede obviamente inhibir la cicatrización de un rasguño en la célula A431 a una concentración de 5-50 µg/ml. Por lo que, el anticuerpo obviamente inhibe el crecimiento de las células A431.

- 5 El anticuerpo tiene un efecto obvio de inhibición sobre el crecimiento de A431 en el trasplante tumoral, y cuando el anticuerpo se administra a un ratón a la dosificación de 1 mg/3 d, la tasa de inhibición tumoral puede alcanzar más del 90 %, y cuando se administra a un ratón a la dosificación de 0,2 mg/3 d, la tasa de inhibición tumoral puede alcanzar más del 60 %.
- 10 Los anticuerpos mutantes con un aumento de afinidad de más de 5 veces se pueden obtener por mutagénesis dirigida al sitio específico del anticuerpo, se aumentan adicionalmente las actividades de inhibición tumoral *in vivo* de los anticuerpos mutantes, y cuando se administran algunos anticuerpos tales como AmeA2, AmeA2C3, AmeA2C3-HI2, AmeA2C1, AmeA1C1 a la dosis de 0,2 mg/3 d, la actividad de inhibición tumoral es más del 80 %.
- 15 Se obtiene en la presente solicitud un anticuerpo humano intacto anti-EGFR y una serie de anticuerpos mutantes con afinidad sin cambios o mejorada explorando utilizando una tecnología de biblioteca de gran capacidad de anticuerpos completamente sintéticos, y se ha demostrado que los anticuerpos como se define en las reivindicaciones todos se unen específicamente al EGFR e inhiben la función biológica del mismo. Utilizando el gen de la región variable del anticuerpo anti-EGFR humano intacto modificado genéticamente obtenido anteriormente y el gen de anticuerpo intacto que posee la característica genética del anticuerpo, se puede expresar el anticuerpo y producirse en células procariotas, células de levaduras, células eucariotas, y en cualquier sistema recombinante, o utilizando cualquier otro gen reconstruido basándose en el mismo y que contiene el gen de anticuerpo, se obtienen productos de anticuerpo que tienen bioactividad inhibidora del EGFR; o utilizando el complejo obtenido mediante el método de marcado *in vivo* o entrecruzamiento, se preparan fármacos de anticuerpos específicos para el tratamiento clínico de tumores malignos que sobre-expresan o que expresan EGFR mutante y/o enfermedades autoinmunitarias.
- 20
- 25

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra el análisis de la especificidad del anticuerpo Ame55 en fago.
- 30 La Figura 2 muestra un electroforetograma SDS-PAGE de Ame55 tratado por purificación en una etapa de columna de Proteína A, en la que, 1: Pr Marcador; 2: Erbitux; 3: Ame55; 4: Nimotuzumab.
- La Figura 3 muestra la unión del Ame55 al EGFR identificado por transferencia de Western, en la que, 1: EGFR no desnaturalizado-Erbitux; 2: EGFR desnaturalizado-Erbitux; 3: EGFR no desnaturalizado-Ame55; 4: EGFR desnaturalizado-Ame55; 5: EGFR no desnaturalizado-Nimotuzumab; 6: EGFR desnaturalizado-Nimotuzumab.
- 35 La Figura 4 incluye imágenes que muestran el ensayo de inmunofluorescencia indirecta para las citomixinas de Ame55 y A431, en la que, A: avastin-A431; B: Ame55-A431; C: Erbitux-A431; D: Nimotuzumab-A431.
- La Figura 5 es un gráfico que muestra el análisis de unión de Ame55 a EGFR sobre la superficie de células A431 por citometría de flujo, en la Figura 5A, concentración de anticuerpo: 3 µg/ml; en la Figura 5B: concentración de anticuerpo 0,3 µg/ml; En la Figura 5C: concentración de anticuerpo: 0,03 µg/ml, 1 representa el anticuerpo Nimotuzumab; 2 representa el anticuerpo Ame55; 3 representa el anticuerpo Erbitux.
- 40 La Figura 6 es un gráfico que muestra la afinidad del Ame55 al EGFR-Fc como se mide por Biacore.
- La Figura 7 muestra la inhibición competitiva por Ame55 y Erbitux, en la que, la Figura 7A: 1: unión de EGFR-Fc; 2: lavado con PBST; 3: unión de Ame55; 4: lavado con PBST; Figura 7B: 1: unión de EGFR-Fc; 2: lavado con PBST; 3: unión de Erbitux; 4: lavado con PBST; Figura 7C: 1: unión de EGFR-Fc; 2: lavado con PBST; 3: unión a Erbitux; 4: lavado con PBST; Figura 7D: 1: unión de EGFR-Fc; 2: lavado con PBST; 3: unión de Ame55; 4: lavado con PBST; para la Figura 7A y Figura 7B, la fase fija es Ame55, para la Figura 7C y la Figura 7D, la fase fija es Erbitux.
- 45 La Figura 8 es un gráfico que muestra la inhibición competitiva de la unión de EGF al EGFR por el Ame55. 1: control blanco; 2: la relación molar de Ame55 respecto a EGFR es 3:1; 3: la relación de Ame55 respecto a EGFR es 2:1; 4: la relación molar de Ame55 respecto a EGFR es 1:1; 5: Ame55; 6: EGFR; 7: la relación molar de Erbitux respecto a EGFR es 3:1; 8: la relación molar de Erbitux respecto a EGFR es 2:1; 9: la relación molar de Erbitux respecto a EGFR es 1:1; 10: Erbitux; 11: la relación molar de un anticuerpo de control no relacionado respecto a EGFR es 3:1; 12: la relación molar de un anticuerpo de control no relacionado es de 2:1; 13: la relación molar de un anticuerpo de control no relacionado es de 1:1; 14: anticuerpo de control no relacionado.
- 50 La Figura 9 es un gráfico que muestra la inhibición de Ame55, Erbitux, Nimotuzumab, Adalimumab y control blanco sobre la capacidad de las células A431.
- La Figura 10 es un gráfico que muestra la inhibición de Ame55, Erbitux, Nimotuzumab y control PBS sobre el crecimiento de las células A431.
- La Figura 11 es un gráfico que muestra la inhibición de Ame55 sobre el crecimiento tumoral en ratones que albergan un tumor con A431.
- 60 La Figura 12 es un gráfico que muestra la inhibición de Ame55 sobre el tumor en ratones que albergan un tumor con A431.
- La Figura 13 es un gráfico que muestra la inhibición de Ame55 sobre el tumor en ratones que albergan un tumor con A431.
- 65 La Figura 14 es un gráfico que muestra la comparación de actividad inhibidora de Ame55 y anticuerpos mutantes del mismo sobre el crecimiento tumoral en ratones que albergan un tumor, A: observación dinámica del volumen

tumoral; B: resultados estadísticos de la medición del peso tumoral. 1: Ame55; 2: AmeA1C1; 3: AmeA1C3; 4: AmeA1C3-HI2; 5: AmeA2; 6: AmeA2C1; 7: AmeA2C3; 8: AmeA2C3-HI2; 9: Erbitux; 10: IgG de control.

La Figura 15 es un gráfico que muestra el ensayo de afinidad del mutante Ame-9B formado por la combinación de la cadena ligera de Ame55 con otra cadena pesada no relacionada.

5 La Figura 16 es una vista esquemática de los vectores plasmídicos pABL y pABGI para la expresión transitoria en eucariotas.

Descripción de las realizaciones preferidas

10 Los siguientes ejemplos describen adicionalmente la presente divulgación, sin embargo, no se debería entender que limitan la invención. Las modificaciones y sustituciones de los métodos, procedimientos o condiciones de la invención hechas sin alejarse de la invención se encuentran en el alcance de la invención.

15 A menos que se indique particularmente, los medios de la técnica utilizados en los ejemplos son los bien conocidos por el experto en la técnica. Todos los materiales, reactivos y similares que se utilizan en los siguientes ejemplos pueden estar disponibles en el mercado, a menos que se establezca expresamente otra cosa.

Ejemplo 1. Cribado de anticuerpos específicos en una biblioteca de anticuerpos en fagos

20 I. Materiales y métodos

1. Materiales: Se construyó una biblioteca de gran capacidad de anticuerpos de cadena sencilla en fagos completamente sintéticos por la academia militar de la armada de liberación del pueblo chino de ciencias médicas (ZL200910091261.8), y la capacidad de la biblioteca alcanzaba $1,35 \times 10^{10}$. Los antígenos para el
25 cribado de la biblioteca de anticuerpos eran proteínas de fusión EGFR-Fc purificados (a una concentración de 1 mg/ml) expresado en células de mamífero construidas y la cepa era XLI-Blue (Stratagene, EE. UU.); el fago utilizado era M13K07 (Invitrogen, EE. UU.). Los vectores de expresión en eucariotas pABGI y pABL se almacenaron a temperatura ambiente, y la información de la estructura del vector se muestra en la Figura 16. Las
30 células de mamífero HEK293T se adquirió en Invitrogen.

2. Métodos

2.1 Expresión y purificación de la proteína de fusión EGFR-Fc

35 Se escogió como objetivo la región extracelular de longitud completa de EGFR, que se adquirió en Sino Biological Inc. (secuencia NCBI: NM005228.3). Se diseñaron el cebador directo y el cebador inverso como se muestran en la SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12. Se llevó a cabo la amplificación por PCR para obtener los genes de longitud completa de la región extracelular que se clonaron en el vector de expresión en eucariotas pABGI en los sitios de las
40 enzimas de restricción EcoRI y NheI. Se llevó a cabo la secuenciación del plásmido recombinante construido para identificar la validez del mismo y después se extrajo el plásmido. Se transfectaron las células HEK293T para llevar a cabo la expresión transitoria, se purificó el sobrenadante después de la expresión utilizando una columna de afinidad en Proteína A, y se cuantificó la proteína del producto purificado por el método de Bradford.

2.2 Expresión y purificación de EGFR-his

45 Esta etapa se llevó a cabo basándose en el método de la sección 2.1. Se diseñó el cebador EGRR1 (SEQ ID NO 13). Se utilizaron los cebadores EGFRF y EGRR1 para amplificar los genes de longitud completa de la región extracelular del EGFR, que se clonaron en el vector de expresión en eucariotas pABGI en los sitios de las enzimas de restricción EcoRD y BamHI. Se llevó a cabo la secuenciación del plásmido recombinante construido para
50 identificar la validez del mismo y después se extrajo el plásmido. Se transfectaron las células HEK293T con el plásmido para llevar a cabo la expresión transitoria, se purificó el sobrenadante después de la expresión utilizando una columna de afinidad de Ni⁺, y se cuantificó la proteína del producto purificado por el método de Bradford.

2.3 Presentación de la biblioteca de anticuerpos en fagos, que se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones de
55 uso de la selección de fagos recombinantes de Pharmacia (N° de Cat. XY-040-00-05) con una modificación mínima. Los detalles de la modificación son los siguientes:

60 Se tomó la biblioteca de anticuerpos crioconservada y se cultivó en 200 ml de medio 2xYTCG (concentración de glucosa del 0,5 %) a 37 °C hasta una $DO_{600} = 0,5$. Se añadió el fago auxiliar M13K07 con una relación de $MOI=20:1$ y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min. Se llevó a cabo el cultivo con agitado lento de 150 rpm a 37 °C durante 1 h, se añadió kanamicina hasta alcanzar la concentración final de 50 µg/ml, y se añadió IPTG para alcanzar la concentración final de 0,1 mmol/l. Se llevó a cabo el cultivo con agitado a 220 rpm a 30 °C durante 10-12 h. Al día siguiente, se recolectó el sobrenadante del cultivo por centrifugación y se le añadió 1/5 de volumen de
65 tampón PEG8000 (20 % de PEG + 2,5 mol/l de NaCl). Después de mezclarlo uniformemente, el sobrenadante mezclado se colocó en hielo durante 45 min para la precipitación de los fagos. Se llevó a cabo la centrifugación a 10000 g a 4 °C durante 20 min, y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 5 ml de tampón

PBS que contenía un 2 % de BSA y un 15 % de glicerol, y se crioconservó la suspensión a -70 °C para su uso.

2.4 Determinación del título de fagos

5 Se seleccionaron monoclonos de la bacteria huésped (XL1-Blue) y se sembraron en medio de cultivo LB, seguido por cultivo con agitado a 37 °C hasta la fase logarítmica ($DO_{600} = 0,5$). Se tomaron 50 μ l de suspensión de fagos preparada y se diluyó en un gradiente de 10 veces con medio de cultivo LB. Las células bacterianas huésped en fase logarítmica se añadieron en la suspensión que se había diluido una vez, seguido por el cultivo con agitado a 37 °C y a 150-180 rpm durante 1 h. Se revistió una placa de LB con 100 o 200 μ l de líquido de bacterias cultivadas y se cultivó a 37 °C durante una noche. Al día siguiente, se hizo el recuento del número de colonias y se calculó el título.

2.3 Bioselección del anticuerpo anti-EGFR específico, que se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones de uso de la selección de fagos recombinantes de Pharmacia (N.º de Cat. XY-040-00-05) con modificaciones mínimas. Los detalles de la modificación son los siguientes:

15 Se diluyó el antígeno proteico EGFR-Fc recombinante hasta 20 μ g/ml con tampón de revestimiento, y se utilizó la solución de dilución para revestir tubos inmunitarios, con 1 ml/tubo. Los tubos inmunitarios se revistieron a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, los tubos inmunitarios se lavaron con PBS dos veces, con 2 min para cada uno, y entonces se bloquearon con un 2 % de BSA a 37 °C durante 2 h. La biblioteca de anticuerpos en fago pre-bloqueada se añadió en tubos inmunitarios bloqueados y se mantuvieron a 4 °C durante una noche. Las soluciones de los tubos inmunitarios se desecharon y se llevó a cabo el lavado. La primera ronda de lavado implica el lavado con PBST 10 veces, unos 5 min/vez, y se lavaron con PBS 5 veces, unos 5 min/vez; la segunda ronda de lavado implica el lavado con PBS 15 veces, con 5 min/vez, y PBS 10 veces, con 5 min/vez; la tercera ronda de lavado implica el lavado con PBST 15 veces, con 5 min/vez, y PBS + NaCl 15 veces, con 5 min/vez. Se añadió 1 ml de glicina-HCl a 0,2 mol/l (pH 2,2) para la elución. Después de llevar a cabo la elución a temperatura ambiente durante 10 min, se neutralizó inmediatamente la solución hasta un pH 7,4 con 1 mol/l de Tris. Se llevó a cabo la infección directa de *E. coli* XL1-Blue a 37 °C, y el cultivo con agitado a 150 rpm durante 1 h. Se revistió la placa 2xYTCTG con la solución bacteriana residual y se cultivó durante una noche a 37 °C. Se tomó la colonia bacteriana con medio líquido 2xYTCTG. Se cargó una cantidad apropiada de la solución bacteriana en 100 ml de medio líquido 2xYTCTG, y se llevó a cabo el cultivo con agitado a 37 °C hasta una $DO_{600} = 0,5$. Se añadieron los fagos auxiliares a una relación de MOI=20:1 y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se llevó a cabo el cultivo con agitado a 150 rpm durante 1 h a 30 °C. Se añadió a la solución el mismo volumen de medio 2xYTCTG, con kanamicina hasta una concentración final de 50 μ g/ml, y con IPTG hasta una concentración final de 0,15 mM. Después se cultivó la solución en el agitador a 200 rpm a 30 °C durante 10 h. Se recolectó el sobrenadante mediante centrifugación y se añadió 1/5 del volumen de solución de tampón PEG800 (un 20 % de PEG + 2,5 mol/l de NaCl). Después de mezclarla homogéneamente, se colocó la solución en hielo durante 45 min para precipitar los fagos. La solución se centrifugó a 10000 g durante 20 min, y se eliminó el sobrenadante. Se re-suspendió la precipitación en 5 ml de tampón PBS que contenía un 2 % de BSA y se crioconservó a -70 °C para su uso. Se determinó el título de 3 partes de fagos, se combinaron en proporción y se pusieron en la próxima selección.

2.5 Identificación de clones positivos por ELISA de fago

Los clones seleccionados se colocaron en placas de 96 pocillos de pocillo profundo, con 250 μ l de medio 2xTYCTG por pocillo. Después del cultivo con agitado a 37 °C hasta la $DO_{600} = 0,5$, se añadieron 1×10^8 ufc de fagos auxiliares y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min. Se llevó a cabo el cultivo con agitado a 37 °C y a 150 rpm durante 1 h, y se añadió el mismo volumen de 2xYTCTKI (kanamicina de 50 μ g/ml, IPTG de 0,2 mmol/l). Se llevó el cultivo con agitado a 30 °C durante una noche. Al día siguiente, se recolectó el sobrenadante mediante centrifugación, se añadió BSA a una concentración final del 2 %, se añadió Tween-20 a una concentración final del 0,1 %, y se mantuvo a 37 °C durante 15 para su uso. Se diluyó el antígeno (EGFR) con la solución de revestimiento a 1 μ g/ml, se añadió a una placa de ensayo de 96 pocillos, con 50 μ l/pocillo, para el revestimiento durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, la solución de revestimiento se desechó. La placa de ensayo se aclaró dos veces con PBST y una vez con PBS, 3 min para cada aclarado. La placa se bloqueó con un 2 % de BSA + un 0,1 % de Tween-20 a 37 °C durante 2 h, con 200 μ l/pocillo. Se desechó la solución de bloqueo, y entonces se añadió a cada pocillo el anticuerpo monoclonal en fago bloqueado a 37 °C con 50 μ l/pocillo y se mantuvo durante 1 h. El líquido se desechó. La placa se aclaró dos veces con PBST y una vez con PBS, con 200 μ l/pocillo, 5 min por cada aclarado. Se diluyó el anticuerpo anti-M13 murino marcado con HRP con PBST a una relación de dilución 1:5000. Al mismo tiempo, se añadió BSA a una concentración final del 2 % y se pre-bloqueó el anticuerpo a 37 °C durante 30 min. El líquido se desechó y la placa de ensayo se aclaró dos veces con PBST y una vez con PBS, con 200 μ l/pocillo, 5 min para cada aclarado. Se desechó la solución de aclarado. Se añadió la solución de desarrollo de sustrato OPD, con 50 μ l/pocillo, y se mantuvo a temperatura ambiente para el desarrollo. El desarrollo se terminó con H_2SO_4 2 N. Se midieron los valores de absorbancia con un lector de microplacas.

Tampón de revestimiento (pH 9,6): Na_2CO_3 1,59 g, $NaHCO_3$ 2,93 g, suplementado con agua doblemente destilada hasta 1 l;

65 Solución de bloqueo: 1xPBS + 2 % BSA + 0,1 % Tween-20; solución de lavado: 1xPBS + 0,1 % de Tween-20;

Solución de dilución de sustrato OPD: 25,7 ml 0,2 M de Na₂HPO₄ (28,4 g/l), 24,3 ml de ácido cítrico 0,1 M (19,2 g/l), 50 ml de agua destilada.

2.6 Conversión del anticuerpo de cadena sencilla en fago en anticuerpo intacto:

5 Se utilizaron los vectores pABGI y pABL para clonar los genes de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (por ejemplo, la SEQ ID NO 10) y de la cadena ligera (por ejemplo, SEQ ID NO 9) respectivamente. Se utilizaron los cebadores H5F (SEQ ID NO 14) y HR (SEQ ID NO 15) para amplificar el gen de la región variable, respectivamente; y se utilizaron el L3F (SEQ ID NO 16) y LR (SEQ ID NO 17) para amplificar el gen de la región variable de V λ 3. El gen de la región variable de V λ 3 se clonó en el vector pABL utilizando los sitios de corte de enzimas de restricción BsrGI e HindIII. El gen de la región variable de VH5 se clonó en el vector pABL utilizando los sitios de las enzimas de restricción AfIII y NheI. Se transformó la *E. coli* DH5 α con el plásmido recombinante. Se llevaron a cabo la PCR de la solución bacteriana y la identificación por secuenciación del plásmido recombinante para obtener los vectores de expresión de la cadena ligera y pesada del anticuerpo intacto construido correctamente. Después de la extracción del plásmido en grandes cantidades, se transfectaron las células HEK293T con las cadenas ligera y pesada del anticuerpo con una relación molar de 1:1 para llevar a cabo la expresión transitoria del anticuerpo intacto, el sobrenadante después de la expresión se purificó en columna de afinidad de Proteína A, y después se sometieron los anticuerpos purificados al análisis electroforético y ensayos de afinidad y especificidad.

20 II. Resultados

1. Selección e identificación del anticuerpo Ame55 en fago

25 Los anticuerpos monoclonales obtenidas de la tercera selección se identificaron para obtener el anticuerpo en fago específico. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo de cadena sencilla Ame55 se muestran como la SEQ ID NO 18 y SEQ ID NO 19. Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo Ame55 de cadena sencilla se muestran como las SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 10, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo de cadena sencilla Ame55 se muestran como las SEQ ID NO 20 y SEQ ID NO 21, respectivamente.

35 La especificidad de Ame55 se analizó a nivel del fago utilizando el EGFR-Fc como antígeno positivo, y CD4-D2, AHC, TNF, VEGF, TTC, PBS como antígeno de control. La placa de ensayo se revistió a 4 °C durante una noche. Se añadió el sobrenadante de los fagos y se ensayó la actividad de unión específica del sobrenadante de fagos Ame55 por ELISA utilizando un anticuerpo anti-M13 marcado con HRP como anticuerpo secundario. Los resultados demostraron que el Ame55 solo se une especialmente al EGFR-Fc (Figura 1).

2. Expresión y purificación del anticuerpo intacto

40 Los genes de la región variable de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo Ame55 en fago se clonaron respectivamente en los vectores de expresión transitoria pABL y pABGI del anticuerpo intacto para construir los vectores de expresión recombinante del anticuerpo intacto. La expresión secretora transitoria de las células de mamífero se consiguió con el sistema de expresión transitoria de HEK293T. Las muestras proteicas de anticuerpo intacto se obtuvieron mediante purificación a través de una columna de Proteína A con un peso molecular de 150 kD.

(Figura 2)

50 Ejemplo 2. Ensayo de actividad de unión de Ame55

I. Materiales y métodos

55 1. Materiales: se adquirieron las células escamosas de cáncer epidérmico humanas en el banco celular Shanghai, Academia china de ciencias; el Erbitux (CT), un producto de Merck y Co. Inc, Alemania; el Nimotuzumab (Hr-3) era un anticuerpo anti-EGFR humano comercializado por Beijing Baitai Biotech Pharmaceuticals Co., Ltd.; el Avastin (Bevacizumab, rhuMAB-VEGF) se adquirió en Roche, Alemania, El chip CM5 era un producto de GE, y el sensor de captura de Fc de anti-inmunoglobulina humana y el sensor de estreptavidina se adquirieron en ForteBio, Inc.(Shanghai). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano se adquirió en Sinobio Bio, Inc., Shanghai. La línea celular FreeStyleTM293-F, el medio de expresión y los reactivos de transfección se adquirieron en Invitrogen.

II. Método

65 2.1 Ensayo de fluorescencia de la actividad de unión de los anticuerpos contra EGFR sobre la superficie celular de A431

- (1) Se sembraron las células A431 en una placa de 96 pocillos con 10^4 células/pocillo.
- (2) Después del cultivo durante una noche, el medio se desechó y entonces se llevó a cabo el lavado con PBS dos veces.
- 5 (3) Se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5 % (formulación en PBS) a 37 °C durante 1 h y entonces se colocaron a 4 °C.
- (4) El anticuerpo primario que se va a medir se diluyó con un 5 % de leche desnatada en polvo (formulación en PBST) hasta 1 µg/ml, y se pre-bloqueó a 37 °C durante 30 min y entonces se colocaron a 4 °C. Se utilizaron Erbitux (Ct) y Nimotuzumab (Hr-3), que son fármacos comerciales, como anticuerpos de control positivo, y avastin (Avs) como anticuerpo de control negativo.
- 10 (5) La solución de bloqueo se desechó y se añadió el anticuerpo bloqueado y se incubó a 4 °C durante 1 h.
- (6) Se llevó a cabo el lavado con PBST 3 veces a 240 rpm, con 3 min/vez.
- (7) Se desechó el sobrenadante, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG humana de cabra marcado con FITC que se había pre-bloqueado con un 5 % de leche desnatada en polvo y se unió a 4 °C durante 30 min.
- (8) Se llevó a cabo el lavado con PBST 3 veces a 240 rpm, con 3 min/vez.
- 15 (9) Se llevó a cabo la observación bajo el microscopio de fluorescencia.

2.2 Transferencia de Western

- (1) Se aplicó una electroforesis en gel SDS-PAGE reductora y no reductora al antígeno EGFR-his, y las concentraciones de gel para la ejecución eran del 10 % respectivamente;
- 20 (2) las proteínas se transfirieron del gel a la membrana de nitrocelulosa por el método semi-seco. Después de terminar la electroforesis, el gel de electroforesis se transfirió a la membrana de nitrocelulosa durante 2 h mediante el método de transferencia eléctrica semi-seco a 20 mA. Después de la transferencia a la membrana, se bloqueó la membrana con un 5 % de leche desnatada a 37 °C durante 2 h;
- 25 (3) después de bloquear la membrana, se recortó la membrana y se añadieron 10 g/ml de Ct, hR-3 y Ame55 respectivamente para su unión a 4 °C durante una noche;
- (4) se llevó a cabo el lavado con TSBT 4 veces, con 10 min/vez;
- (5) se añadió el anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcado con HRP (que se había pre-bloqueado a 37 °C durante 30 min) diluido con un 5 % de leche en polvo desnatada a 1:5000, y se incubaron a 37 °C durante 40 min;
- 30 (6) después de la incubación del anticuerpo secundario, se llevó a cabo el lavado con TBST 3 veces, con 10 min/vez;
- (7) desarrollo: Se añadió el fluido luminoso ECL al mismo y se llevó a cabo el desarrollo y exposición en una sala oscura.
- 35

2.3 Medición de afinidad del anticuerpo por el sistema Biacore 3000

Se formularon 10 mM de NaAC con un pH de pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0 y pH 5,5. Los anticuerpos que se iban a medir se diluyeron las veces apropiadas y se pre-concentraron en el chip CM5. La solución NaAc con el pH óptimo se seleccionó como solución de dilución de revestimiento, y se determinó la concentración de dilución del anticuerpo, que era la más adecuada para el revestimiento.

Revestimiento: los anticuerpos que se van a medir se diluyeron con la solución NaAC con el pH óptimo. Se seleccionó la concentración de dilución óptima, se seleccionó un canal en el chip CM5 para el acoplamiento, en el que el valor diana del acoplamiento del anticuerpo era de 2000 RU, y se seleccionó otro canal como control. Las condiciones experimentales incluían una temperatura de 25 °C, caudal de 20 µl/min y HBS-EP (pH 7,4, Bia certificado) como solución tampón. Después de que el anticuerpo de acoplamiento-chip alcanzaba el valor diana, se bloqueó la superficie del chip.

Análisis de las condiciones de regeneración: Se hizo que fluyeran 100 nM de EGFR-Fc a través de la superficie del chip, de manera que se una a los anticuerpos de la superficie del chip. Después de la estabilización se hicieron fluir sucesivamente 10 mM de glicina-HCl a pH 3,5, pH 2,5, pH 2,0, pH 1,5 y tampón salino de borato a pH 8,5 a través de la superficie del chip hasta que se conseguía el efecto de regeneración óptimo, de manera que se pueda determinar la condición de regeneración óptima.

Análisis dinámico de unión del anticuerpo al antígeno: se midió la concentración de antígeno EGFR-Fc por el método de Broford. Se diluyó el antígeno con solución tampón HBS-EP. Se tomaron diluciones de EGFR-Fc con diferentes concentraciones (se tomaron 5 concentraciones de diluciones diferentes entre 0-100 nM) y se hicieron fluir por los canales de anticuerpos que se van a medir y los canales de anticuerpo de control con un caudal de 20 µl/min, con un tiempo de unión de 3 min, un tiempo de estabilización de 1 min y un tiempo de disociación de 15 in. Las condiciones de regeneración para cada ciclo incluían: 10 mM de glicina-HCl a pH 1,5 y un tampón salino de borato a un pH 8,5, caudal de 20 µl/min. Cada solución se regeneró durante 30 s.

Cálculo de constante de afinidad: La constata cinética de unión del anticuerpo al antígeno se calculó por el modelo de unión de ajuste de Lagmuir del sensorgrama resultante con la relación 1:1 utilizando el software 4 de análisis de Bia-evaluación.

2.4 Citometría de flujo

(1) Las células con tripsinización en EDTA en buen estado de crecimiento se re-suspendieron en PBS pre-enfriado, se hizo en recuento después del lavado, y se formuló en una concentración de 6×10^6 células/ml. La solución resultante se subdividió en tubos de centrifuga de 1,5 ml, con 100 μ l/tubo, y los tubos se colocaron en hielo.

(2) El anticuerpo que se va a medir se diluyó con PBS pre-enfriado hasta 150 μ g/ml, 15 μ g/ml, 1,5 μ g/ml. Se tomaron 100 μ l de cada solución de dilución y se mezclaron con las células pre-enfriados respectivamente, y se incubaron en hielo durante 40 min.

(3) La mezcla resultante se centrifugó en la centrifuga pre-enfriada a 4 °C, se extrajo ligeramente el sobrenadante, se añadió 1 ml de solución de PBS pre-enfriado para lavar 3 veces.

(4) Se añadió un anticuerpo secundario pre-bloqueado de conejo anti-IgG humana-FITC diluido con una relación de 1:100 en cada tubo y se incubaron los tubos en hielo durante 30 min.

(5) La etapa (3) se repitió y se llevó a cabo el lavado 3 veces.

(6) Se añadieron 500 μ l de solución PBS pre-enfriada en cada tubo con las células, se redujo y batió ligera y uniformemente, se colocaron las muestras en hielo y se llevó a cabo el análisis fluorométrico mediante un citómetro de flujo. La muestra sin anticuerpo que se iba a medir se utilizó como control.

II. Resultados

1. El anticuerpo Ame55 se une específicamente al EGFR no desnaturalizado

Se aplicó una electroforesis en gel SDS-PAGE reductora y no reductora al EGFR-his. Se llevó a cabo la transferencia de Western utilizando 10 μ g/ml de Ame55, Erbitux y Nimotuzumab como anticuerpos primarios y anti-IgG humana de cabra marcado con HRP como anticuerpo secundario, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 3. El Ame55 solo se une específicamente al EGFR no desnaturalizado.

2. El Ame55 se une específicamente al EGFR en la superficie de células A431.

Se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia celular utilizando las células A431 que expresa EGFR como antígeno, el Ame55, el anticuerpo Avastin no relacionado, el anticuerpo de control Erbitux y Nimotuzumab como anticuerpos primarios, y anti-IgG humana de cabra como anticuerpo secundario. Los resultados se muestran en la Figura 4, e indican que el Ame55 (B en la Figura 4), el anticuerpo Erbitux de control positivo (C en la Figura 4) y Nimotuzumab (D en la Figura 4) pueden unirse específicamente a EGFR en la superficie de células A431, pero el anticuerpo Avastin de control negativo (A en la Figura 4) no se unía. La unión de Ame 55 a las células A431 se analizó adicionalmente por citometría de flujo. Los resultados indican que este anticuerpo, en cierto intervalo de concentración, se une a las células A431 de una manera dependiente de la dosis. En el caso de una concentración de menos de 1 μ g/ml, la intensidad de fluorescencia de Ame55 está entre la del control Erbitux y Nimotuzumab (Figura 5A, Figura 5B y Figura 5C).

3. Medición de afinidad de Ame55 por EGFR-Fc por Biacore 3000.

Se revistió con Ame55 la superficie del chip CM5. La afinidad de Ame55 por EGFR-Fc se midió por el sistema Biacore 3000 utilizando concentraciones diferentes de EGFR-Fc como fase móvil. Los resultados se muestran en la Figura 6. La constante de afinidad K_D después del ajuste es de 0,231 nM, en la que $K_a = 4,21 \times 10^5$, $K_d = 9,73 \times 10^5$.

Ejemplo 3. Actividad *in vitro* y análisis del epítipo de Ame55

I. Método

1. Ensayo de inhibición de unión de anticuerpo competitiva

Se revistió con Ame55 como fase fija el chip CM5, en el que las condiciones para el revestimiento y regeneración se muestran en el método del Ejemplo 2. Se hicieron fluir 50 nM de EGFR-Fc como la primera fase móvil a través del canal de muestra con una duración de 3 min. Con el lavado con PBS-T durante 3 min, se hizo fluir Erbitux como segunda fase móvil a través del canal de muestra con una duración de 3 min y se lavó entonces el canal de muestra con PBST durante 3 min. Además, se llevó a cabo el experimento anterior de nuevo utilizando 1000 nM de Ame55 como segunda fase móvil, que se utilizó como control de inhibición auto-competitiva. De la misma manera, se repitió el experimento anterior utilizando Erbitux como fase fija.

2. Ensayo de inhibición competitiva de la unión de EGF a EGFR

Se revisitó con EGF a 1 μ g/pocillo en una placa de 96 pocillos durante una noche a 4 °C. Se mezclaron Ame55, el anticuerpo Erbitux de control positivo y el anticuerpo de control no relacionado (anticuerpo anti-IL-6R seleccionado en la presente divulgación) con 2,5 μ g/pocillo de EGFR-Fc con una relación molar de 3:1, 2:1 y 1:1, respectivamente,

y se pre-bloquearon a 37 °C durante 30 min, y se añadieron a la placa ELISA revestida con EGF bloqueado, para la unión a 37 °C durante 1 h. Se llevó a cabo el lavado con PBST 3 veces y con PBS una vez, con 5 min/vez. Se utilizó un anti-IgG humana de cabra marcado con HRP pre-bloqueado como anticuerpo secundario y se hizo reaccionar a 37 °C durante 30 min. Después del lavado con PBST y PBS, se añadió la solución de desarrollo del sustrato OPD para el desarrollo. La reacción se paró por la adición de H₂SO₄ 2 N, y se midió el valor de la absorbancia a una DO de 450 nm.

3. Ensayo de cicatrización de rasguños en células A431

Se marcaron líneas rectas en el fondo de una placa de 6 pocillos, para hacer secciones de un quinto de cada pocillo. Se sembraron las células A431 en la placa de 6 pocillos marcados con 10⁵ células/pocillo. Cuando las células entraban en la fase logarítmica, la superficie de las células se marcó con una línea perpendicular a las líneas rectas utilizando una pipeta de 200 µl. Después del marcado se lavó la superficie dos veces con PBS, y se añadió a cada pocillo el anticuerpo Ame55 que se va a medir, el anticuerpo Erbitux de control positivo y el anticuerpo Adalimumab de control negativo (Abbott, EE. UU.) hasta alcanzar una concentración final de 25 g/ml. Se estableció un pocillo blanco como control blanco. En el momento de observación de 0 h, 12 h y 24 h, se hizo la localización fija con las líneas rectas y se tomaron fotos para el proceso dinámico.

4. Ensayo de inhibición del crecimiento de A431

1) siembra de las células: las células A431 se tripsinizaron, se redujeron completamente y se contaron, y se ajustó la concentración celular a 5000 células/ml con medio de cultivo 1640 que contenía un 0,5 % de suero de recién nacido bovino, se añadieron a una placa de 96 pocillos con 200 µl por pocillo (finalmente se distribuyeron uniformemente 800-1000 células en cada pocillo), y se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 24 h hasta que las células se extendían completamente hasta la adherencia;

2) Cultivo a la adición del anticuerpo que se va a medir: el sobrenadante de la placa de 96 pocillos se desechó, y la placa se lavó con PBS una vez. Se prepararon 200 nM de Erbitux (CT), Nimotuzumab (hR3) y Ame55, y se utilizó PBS como control, seguido por la adición de estos en la placa de 96 pocillos con 200 µl/pocillo en 3 pocillos múltiples para cada concentración. Se dieron 5 piezas de placas de 96 pocillos en paralelo, se cultivaron a 37 °C con un 5 % de CO₂, y entonces se intercambiaron las soluciones el día 3 y respectivamente. Una placa de cultivo se seleccionó aleatoriamente para la tinción los días 0, 3, 4, 5, 6 y 7.

3) Tinción con cristal violeta: el medio de la placa de 96 pocillos se eliminó y se lavó una vez la placa con PBS; se añadieron a cada pocillo 100 µl de paraformaldehído al 4 % y se mantuvieron durante 15 min a temperatura ambiente para la inmovilización; se retiró el formaldehído y se añadió una solución de cristal violeta al 0,5 % diluido en PBS (que se había formado diluyendo la solución de cristal violeta al 5 % formulada con alcohol etílico absoluto 10 veces), con 100 µl/pocillo, entonces se mantuvo la placa a temperatura ambiente durante 15 min para la tinción; la solución de cristal violeta se retiró y se sumergió la placa en agua del grifo y se lavó varias veces; la placa se sumergió en agua destilada a temperatura ambiente, y se lavó en el agitador horizontal a 560 r/min durante 15 min; se eliminó la humedad y la placa se secó durante una noche.

4) Determinación de la densidad celular: las 6 placas de 96 pocillos el día 1 a 7 se recolectaron para la decoloración y la determinación del valor de la DO para los mismos lotes, se añadieron 200 µl de solución de Sorenson a cada pocillo; las placas se colocaron en el agitador horizontal a 400 r/min durante 30 min para la decoloración; se tomaron 100 µl de la solución de cada pocillo y se añadieron en una nueva placa de 96 pocillos, y se midió el valor de la absorbancia a 590 nm con un valor de absorbancia a 630 nm como referencia interna. Se trazó la curva de crecimiento celular.

Método de formulación de Sorenson: Solución A: se disolvieron 8,967 g de natrium citricum en 305 ml de agua ultrapura; Solución B: 195 ml de HCl 0,1 N (1,6 ml de HCl al 38 % se añadieron a 193,4 ml de agua ultrapura, que se conoce como "adición de ácido en agua"). Solución C: 500 ml de alcohol etílico al 95 % (se añadieron 475 ml de alcohol etílico absoluto con 25 ml de agua ultrapura); Se mezclaron las soluciones A + B + C hasta un volumen total de 1 litro.

II. Resultados

1. Inhibición competitiva de la unión de Ame55 y Erbitux al EGFR

Se analizaron preliminarmente los epítomos de dos anticuerpos, las condiciones para el análisis incluían: utilización de Ame55 como fase fija y EGFR como primera fase móvil (1), lavado con PBST durante un periodo de tiempo (2) utilización de Ame55 (A) y Erbitux (B) como segunda fase móvil (3), entonces se lava de nuevo con PBST (4); por el contrario, utilizando Erbitux como fase fija y EGFR como la primera fase móvil (1), lavado con PBST durante un periodo de tiempo (2), utilizando Ame55 (D) y Erbitux (C) como segunda fase móvil (3), lavando entonces de nuevo con PBST (4). Los resultados (véase las Figuras 7A, 7B, 7C y 7D) indican que el EGFR unido a Ame55 no se puede unir adicionalmente a Erbitux (las Figuras 7B y 7A muestran la auto-inhibición del control de Ame55). Es decir, el Ame55 puede inhibir la unión de EGFR a Erbitux. Por el contrario, al unirse a Erbitux, el EGFR no se une más al Ame55 (las Figuras 7D y 7C muestran la auto-inhibición del control de Erbitux). Es decir, el Erbitux también puede inhibir la unión del EGFR a Ame55. Los resultados revelan que puede haber una inhibición competitiva de los

epítopos antigénicos entre dos anticuerpos. Esto se debe probablemente a que los dos epítopos antigénicos tienen una estructura altamente similar o una estructura idéntica.

2. Inhibición competitiva de unión del EGF al EGFR por el Ame55

La inhibición competitiva de la unión de EGF al EGFR por el Ame55 se analizó por ELISA competitivo. El resultado indica que el Ame55 inhibe significativamente la unión de EGF al EGFR cuando la relación de EGFR respecto al anticuerpo es 1:1, 1:2 y 1:3, pero el control negativo no tiene efecto inhibitor. La actividad inhibitora de Ame55 era menor que la de Erbitux como control a la misma concentración (véase la Fig. 8).

3. Inhibición de la migración de células A431 por Ame55

Como se ha descrito por el método 3 del ejemplo, se observaron dinámicamente 25 µg/ml del grupo de anticuerpos experimental durante 24 h en sitios fijados para la cicatrización de rasguño celular (Figura 9). Para la inhibición de la migración celular de A431, el Ame55 presentaba la misma actividad inhibitora que el Erbitux, mientras que otro anticuerpo de control negativo, el Adalimumab, un fármaco de anticuerpos disponible en el mercado contra el TNFα no tiene actividad inhibitora sobre la migración de células A431. Los resultados indican que, en la Figura 10, el Ame55 tiene la función de inhibición de la activación biológica de EGFR, revelando que tiene un buen efecto en la aplicación terapéutica de metástasis clínica.

4. Inhibición del crecimiento de células A431 por Ame55

Las células que expresan EGFR, tales como A431, actúan sobre el EGFR por el EGF autocrino y por tanto activan la ruta corriente abajo, que da lugar a la desfosforilación del receptor y promoviendo el crecimiento y migración celular. En consecuencia, el efecto de Ame55 sobre el crecimiento de células que expresan EGFR se evaluó adicionalmente por el ensayo de proliferación de células A431, y se observó continuamente la tendencia del crecimiento celular. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el método 4 del ejemplo. Los resultados indican que, en la Figura 10, el Ame55 tiene un efecto de inhibición sobre el crecimiento de células A431, pero el grado de inhibición de Ame55 es menor que el del anticuerpo de control Erbitux, y es comparable a otro anticuerpo de control Nimotuzumab.

Ejemplo 4: Detección de la actividad de inhibición tumoral *in vivo* de Ame55

Se inocularon en la espalda 47 ratones hembras intactos atímicos (de aproximadamente 20 g) con 100 µl de células A431 a una concentración de 5×10^7 . Cuando el tumor creció hasta 50-150 mm³, se pesaron los ratones, se midió el tamaño tumoral y se agruparon en 4 grupos, es decir, el grupo de solución salina normal, el grupo de Erbitux, el grupo de Adalimumab y el grupo de Ame55, respectivamente, en los que el Erbitux es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR comercializado y se estableció como control positivo; el Adalimumab es un fármaco de anticuerpo anti-TNFα y se estableció como control negativo; y la solución salina normal se estableció como control de alojamiento tumoral. La dosis de anticuerpo para la administración era de 1 mg/ratón, una vez cada 3 días, y antes de cada administración, los ratones se pesaron y se midió el tamaño tumoral. El método de cálculo del tumor es: $\pi/6 \times \text{diámetro largo}^2 \times \text{diámetro corto}^2$. Tras 36 días, los ratones se sacrificaron para recolectar los tumores, se pesaron los tumores y entonces se llevó a cabo el análisis estadístico.

Se adoptó el trasplante del tumor de células A431 como objetivo de investigación para evaluar el efecto de la inhibición de Ame55 sobre el crecimiento tumoral en un ratón que alberga un tumor. Los resultados muestran que Ame55 tiene un efecto de inhibición significativo sobre el crecimiento del tumor por trasplante de A431 a la dosis de 1 mg/ratón (Figura 11); y los resultados de peso tumoral que se obtuvieron después de la administración continua de 6 veces y el cese de administración para la observación durante 4 semanas, demostraba que: el peso tumoral medio del grupo de control era de 3,65 g, el peso tumoral medio del grupo Ame55 era de 0,32 g, y su tasa de inhibición tumoral estaba por encima del 90 % (Figuras 12 y 13).

Ejemplo 5: Método de evaluación de la región variable de cadena ligera y pesada de Ame55 mutante

1. Cribado de alanina

Se diseñaron los cebadores para mutagénesis dirigida al sitio respectivamente para llevar a cabo el cribado en las CDRL1, CDRL3, CDRH2 y CDRH3, y si había una alanina en el sitio, se mutaba la alanina en Gly y Ser respectivamente. El método utilizado en el método de mutagénesis dirigida al sitio para el plásmido, con referencia al documento [WANG Ronghao, CHEN Ruichuan, LIU Runzhong. A modified method of quickly site-directed mutagenesis. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2008, Vol 47, sup 2, 282-285].

2. Detección de afinidad del anticuerpo mediante ForteBio QKe

La proteína de fusión EGFR-Fc se biotiniló utilizando un kit de biotina, y el EGFR-Fc biotinilado se diluyó con PBS hasta una concentración de 100 nM, y se revistió la superficie de un sensor de estreptavidina durante 20 min. El sensor se limpió utilizando HEPES EP durante 5 min, y se colocaron el anticuerpo mutante y el anticuerpo Ame55

parental que se iban a detectar en los poros de detección a una concentración de 20 nM en los huecos de detección, y se unieron a EGFR-Fc en la superficie del sensor limpio de estreptavidina durante 10 min. Después de alcanzar el equilibrio de unión, se disoció el complejo en HEPES EP, en el que el tiempo de disociación era de 20 min. Se adoptó el software ForteBio para llevar a cabo el análisis de afinidad.

5

3. Comparación de la actividad de inhibición tumoral del anticuerpo mutante y parental

El método experimental era el mismo que en el Ejemplo 4, y el grupo y la dosificación se estableció de la siguiente manera: control de solución salina normal, control de Erbitux, control de anticuerpo parental Ame55 y distintos anticuerpos mutantes de Ame55 (Ametumumabs) tales como AmeA1C1, AmeA1C3, AmeA1C3-HI2, AmeA2, AmeA2C1, AmeA2C3, AmeA2C3-HI2, 10 grupos en total, 8 ratones por cada grupo, dosis para la administración era de 0,2 mg/ratón, 3 d/vez, en el que la administración se llevó a cabo 6 veces, y 6 días después de detener la administración de fármaco, los ratones se sacrificaron para recolectar los tumores para pesarlos.

10

15 II. Resultados

1. Análisis de afinidad de los mutantes

Basándose en la secuencia de aminoácidos de Ame55, estas mutaciones se llevaron a cabo para aminoácidos parciales de las regiones variables de cadena ligera y pesada y regiones marco conservadas. Los mutantes se diseñaron por cribado de alanina y mutación dirigida al sitio. Se utilizó un sistema de interacción molecular proteica ForteBio QK^e para el cribado adicional y se evaluó la afinidad de los mutantes. Los resultados demostraban (Figura 1) que, en comparación con el anticuerpo parental Ame55, los múltiples sitios de aminoácidos de las CDR1 y CDR3 de cadenas ligeras y CDR2 y CDR3 de cadenas pesadas eran esenciales para el mantenimiento de la capacidad de unión del anticuerpo al EGFR, por cuya razón puede ser que el aminoácido en el sitio participe directamente en la interacción, o que el aminoácido en el sitio sea esencial para mantener la estructura espacial correcta completa del anticuerpo. Entre los sitios en los que se modificaron los aminoácidos, los aminoácidos de la cadena ligera en el sitio 26 y el sitio 89, y los aminoácidos de la cadena pesada en el sitio 54 y el sitio 107 eran los más importantes. Después de la sustitución de un único aminoácido primeramente, la presente divulgación descubrió que después de modificar el aminoácido de cadena ligera en el sitio 89 de Val a Ala o Ser, aumentaba la afinidad unas 4 veces, y después de la combinación adicional de Gly o Lys del sitio 26 de la cadena ligera, la afinidad se mejoró adicionalmente más de 5 veces en comparación con la afinidad del anticuerpo parental; o después de que se sustituyeran los aminoácidos de los sitios 54 y el sitio 107 de la cadena pesada por Ser respectivamente, y se expresaran en combinación con la cadena ligera 89A/S, las afinidades de los anticuerpos mejoraban en diferentes grados basándose en la 89A/S. Con el fin de confirmar adicionalmente el efecto de la mejora de afinidad sobre la bioactividad del anticuerpo, se evaluó adicionalmente la actividad *in vivo* de los siguientes 7 anticuerpos mutantes: AmeA1C1 (la cadena ligera mutada tiene Gly en el sitio 26 y Ser en el sitio 89), AmeA1C3 (la cadena ligera mutada tiene Lys en el sitio 26 y Ser en el sitio 89), AmeA1C3-HI2 (la cadena ligera mutada tiene Lys en el sitio 26 y Ser en el sitio 89, mientras que la cadena pesada mutada tiene Ser en el sitio 107), AmeA2 (la cadena ligera mutada tiene Gly en el sitio 89), AmeA2C1 (la cadena ligera mutada tiene Gly en el sitio 26 y Ala en el sitio 89), AmeA2C3 (la cadena ligera mutada tiene Lys en el sitio 26 y Ala en el sitio 89) y AmeA2C3-HI2 (la cadena ligera mutada tiene Lys en el sitio 26 y Ala en el sitio 89, mientras que la cadena pesada mutada tiene Ser en el sitio 107).

20

25

30

35

40

2. Comparación de la actividad de inhibición tumoral entre mutantes y Ame55

Con el fin de evaluar adicionalmente la diferencia entre las actividades de los mutantes y el anticuerpo parental, la dosis de administración se disminuyó a una dosificación baja de 0,2 µg/ratón, y se compararon las actividades de inhibición del tumor de varios mutantes con afinidad mejorada a diferentes grados y los anticuerpos parentales en los ratones con tumores trasplantados. Los resultados mostraban que el peso tumoral medio del grupo de anticuerpo de control era de 1,854 g; a la dosificación de administración de 0,2 µg/ratón, la actividad de inhibición tumoral del grupo de anticuerpo parental Ame 55 (el peso medio del tumor era 0,71 g) disminuía hasta aproximadamente un 60 %; además, la actividad de inhibición tumoral de los anticuerpos mutantes era obviamente mejor que la del anticuerpo parental, y las tasas de inhibición tumoral de los mismos eran del 67 %-93 %, respectivamente, y las actividades de algunos anticuerpos eran equivalentes a las del anticuerpo comercial Erbitux (tasa de inhibición tumoral del 91 %). Los resultados indican que la mejora de la afinidad de los mutantes es beneficiosa además para la mejora de la bioactividad *in vivo* de los mismos. Las condiciones de crecimiento tumoral y el análisis estadístico del peso tumoral de los diferentes grupos se muestran en la Figura 14.

45

50

55

Tabla 1. Tabla estadística para la condición de cambio de afinidad de mutantes de Ame55

60

Cadena ligera		Cadena pesada	
Sitio de la mutación	Cambio de afinidad	Sitio de la mutación	Cambio de afinidad

ES 2 689 299 T3

13A	1	50A	Sin unión
26G(C1)	0,5	50R	Sin unión
26N(C2)	1	51A	>10
26K(C3)	0,3	52A	Sin unión
G28P	>100	52D	>10
29E	>100	53A	5
321	1	54A	>10
32V	2	54S	0,5
33Y	2	55A	>100
51G	1	56A	1
55P	2	57A	Sin unión
88Q	2	57Y	Sin unión
88A	>10	58A	>10
88Y	5	59A	>10
88L	5	59N	>10
88G	3	60A	5
88N	>10	66H	1
89S(A1)	0,5	99A	>10
89A(A2)	0,25	99S	>10
89L	5	100A	5
90A	>10	101A	4
91A	>10	102A	Sin unión
92A	2	103A	Sin unión
92S	4	104A	3
92P	1	105 A	>10
93A	>10	106A	>10
94A	>10	107G	1,5
95A	>10	107S	0,2
95S	>10	108A	5
96A	>10		

97A	>10		
26G+89S	<0,3		
26K+89S	<0,2		
26G +89A	<0,2		
26K +89A	<0,1		
Nota: en la comparación del anticuerpo mutante con el anticuerpo parental, la afinidad del anticuerpo parental se establece en 1, y se calcula las veces de reducción de la afinidad,			

Ejemplo 6: Detección de la capacidad de unión específica de la cadena ligera de Ame55 al EGFR

5 Con el fin de verificar si la cadena ligera de Ame55 tiene una capacidad de unión específica para EGFR, se combinó una cadena ligera de Ame55 individual (la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 20) con una cadena pesada de un anticuerpo de la familia de la línea germinal genética VH3 (la secuencia era la de la SEQ ID NO 22) del ejemplo, y se expresó transitoriamente en un sistema de expresión transitoria en HEK293, de manera que se obtenía otro nuevo anticuerpo, el Ame-9B que contiene la cadena ligera de Ame55 por purificación en columna de Proteína A. La capacidad de unión de Ame-9B al EGFR se detectó mediante un sistema de interacción proteica Fortebio, con referencia al Ejemplo 5 para el método específico. Los resultados demostraron que aunque la afinidad del Ame-9B disminuía (aproximadamente unas 6 veces), el Ame-9B aún mantenía la capacidad de unión al EGFR (en referencia a la Figura 15).

Aplicación industrial

15 La afinidad de unión del anticuerpo de la presente divulgación por el EGFR humano no es mayor de 1 nM, y la afinidad de los mutantes del mismo es no mayor de 10 nM; y la identificación de la actividad inmunitaria y la bioactividad del anticuerpo proteico IgG está completada, verificando que el anticuerpo de la presente divulgación tiene una buena bioactividad de inhibición del crecimiento tumoral de un modelo de ratón que alberga un tumor de células A431 que expresan EGFR. El anticuerpo de la presente divulgación proporciona fármacos de anticuerpos específicos para prevenir y tratar un tumor dirigiéndose al EGFR y otras enfermedades tales como enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Shanghai Serum Biotechnology CO., LTD., Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, PLA.
 <120> Anticuerpos humanos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico y genes codificantes y aplicación de los mismos
 30 <130>KHP13312488.0
 <160> 22
 <170> Patent in versión 3.5
 <210> 1
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213>CDRL1 de EGFR
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 40 <223> Xaa=Ala o Gly o Asn o Lys
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10).. (10)
 <223> Xaa=Ala o Val o Ile
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11).. (11)
 <223> Xaa=Ser o Tyr
 50 <400> 1

ES 2 689 299 T3

Ser Gly Asp Xaa Leu Gly Asp Lys Tyr Xaa Xaa
 1 5 10

5 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> CDRL2 de EGFR
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 10 <223> Xaa=Ser o Thr o Ala o Gly
 <400> 2

Glu Asp Xaa Lys Arg Pro Ser
 1 5

15 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> CDRL3 de EGFR
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 20 <223> Xaa=Ser o Asn o Ala o Gly o Leu o Tyr o Gln
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa=Ser o Val o Ala o Leu
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa=Gly o Ala o Pro
 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa=Gly o Ser
 <400> 3

Xaa Xaa Trp Asp Xaa Asp Trp Xaa Met Pro
 1 5 10

35 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 40 <213> CDRH1 de EGFR
 <400> 4

Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

45 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> CDRH2 de EGFR
 <220>
 50 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa=Gly o Ser
 <220>

ES 2 689 299 T3

<221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa=Gly o Ser
 <400> 5

5

Xaa Ile Ile Tyr Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Gln

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> CDRH3 de EGFR
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa=Ala o Ser o Gly
 <400> 6

10

15

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asn Val Xaa Val
 1 5 10

20

<210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-EGFR
 <220>

25

<221> VARIANTE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa= Ala o Gly o Asn o Lys
 <220>

30

<221> VARIANTE
 <222>(32)..(32)
 <223> Xaa= Ala o Val o Ile
 <220>

35

<221> VARIANTE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa=Ser o Tyr
 <220>

40

<221> VARIANTE
 <222> (51)..(51)
 <223> Xaa=Ser o Thr o Ala o Gly
 <220>

45

<221> VARIANTE
 <222> (88)..(88)
 <223> Xaa=Ser o Asn o Ala o Gly o Leu o Tyr o Gln
 <220>

50

<221> VARIANTE
 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa= Ser o Val o Ala o Leu
 <220>

55

<221> VARIANTE
 <222> (92)..(92)
 <223> Xaa=Gly o Ala o Pro
 <220>

<221> VARIANTE
 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa=Gly o Ser
 <400> 7

ES 2 689 299 T3

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

100

105

5 <210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-EGFR
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49)..(49)
 10 <223> Xaa=Gly o Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa=Gly o Ser
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (107)..(107)
 <223> Xaa=Ala o Ser o Gly
 20 <400> 8

ES 2 689 299 T3

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

5 <210> 9
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> gen codificante de la región variable de cadena ligera del anticuerpo Ame55 de cadena sencilla
 <400> 9

agctacgaac tgaccagacc gccgagcgtg tcggtggcgc cgggtcagac cgcgcgtatc 60
 acctgctcgg gcgatgcgct gggcgataaa tacgcgagct ggtatcagca gaaaccgggt 120
 caggcaccgg tgctggtgat ttacgaagat tctaaacgcc cgtctggcat cccggaacgc 180
 tttagcggct cgaattcggg caacaccgg accctgacca ttagcggcac ccaggcggag 240
 gatgaggcgg actattactg ctcggtgtgg gatggcgact gggggatgcc tgtgtttgce 300
 ggtggcacca aactgaccgt gctgggc 327

10 <210> 10
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> gen codificante de la región variable de cadena pesada del anticuerpo Ame55 de cadena sencilla
 15 <400> 10

gaagttcaac tggttcaaag tggcgggaa gtgaagaac cgggcgaaag tctgaaaatt 60
 agttgcaaag gctctggtta ttcttttacg tcttattgga tcggctgggt tcgtcagatg
 120
 ccgggtaaag gtctggaatg gatgggtatt atttatccgg gtgatagtga tacgcgttat 180
 tctccagatt ttcagggtca ggttactatt agtcagata aaagcatcag caccgcgtat 240
 ctgcagtgga gttctctgaa agcgagtgat accgcgatgt attattgcgc acgtggtatt 300
 atttatcett ctaatgtcgc tgtctggggt cagggcactc tggtgaccgt gtcagac 357

<210> 11
 <211> 49

ES 2 689 299 T3

<212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 11
 5 gaattagaat tcgccgccac catgcgaccc tcgggaacgg ccggggcag 49
 <210> 12
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 12
 10 gaatagctag ctccattcgt tggacagcct tcaagacctg 40
 <210> 13
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 13
 15 gaaggatcct taatggtgat gatggtgatg gctccattcg ttggaca 47
 <210> 14
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 14
 20 gcgccctta agggcgtgca gtgcgaagtt caactgggtc aaagc 45
 <210> 15
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 15
 25 cggtgctagc gctcgacacg gtcaccagag t 31
 <210> 16
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 16
 30 caagtgata ggatcatggg caagctacga actgaccag cggc 44
 <210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 17
 35 cggtaagctt ggtgccaccg ccaaacac 28
 <210> 18
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> secuencia de aminoácidos del anticuerpo Ame55 de cadena sencilla
 40 <400> 18
 45

ES 2 689 299 T3

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Val Trp Asp Gly Asp Trp Gly Met
 85 90 95
Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly Gly
 100 105 110
Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser
 115 1 125
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 130 135 140
Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
14 150 155 160
Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175
Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro
 180 185 190
Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr
 19 200 205
Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
 210 215 220
Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asn Val Ala Val Trp Gly
22 230 235 240
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

5 <210> 19
<211> 747
<212> ADN
<213> secuencias de nucleótidos del anticuerpo Ame55 de cadena sencilla
<400> 19

ES 2 689 299 T3

```

agctacgaac tgacceagcc gccgagcgtg teggtggcgc cgggtcagac cgcgcgtatc      60
acctgctcgg gcgatgcgct gggegataaa tacgcgagct ggtatcagca gaaaccgggt      120
caggcaccgg tgctggatgat ttacgaagat tetaaacgcc cgtctggeat ccgggaacgc      180
tttagcggct cgaattcggg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac ccaggcggag      240
gatgaggcgg actattactg ctccggtgtgg gatggcgact gggggatgcc tgtgtttggc      300
ggtggcacca aactgaccgt gctgggcagc ggcgctoga ccataacttc gtataatgta      360
tactatacga agttatcgag ctccgggcagc gaagttcaac tggttcaaag tggtcggaa      420
gtgaagaaac cgggcgaaag tctgaaaatt agttgcaaag gctctgggta ttcttttacg      480
tcttattgga tcggctgggt tcgtcagatg cegggtaaag gctctggaatg gatgggtatt      540
atztatccgg gtgatagtga tacgcggttat tctccagatt ttcagggtca ggttactatt      600
agtgcagata aaagcatcag caccgcgtat ctgcagtgga gttctctgaa agcgagtgat      660
accgcgatgt attattgcgc acgtgggtatt atttatcett ctaatgtcgc tgtctggggt      720
cagggcactc tggtgaccgt gtcgagc      747

```

5 <210> 20
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo Ame55 de cadena sencilla
 <400> 20

```

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

```

15 <210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo Ame55 de cadena sencilla
 <400> 21

ES 2 689 299 T3

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

5 <210> 22
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> secuencia de aminoácidos de la VH3 de cadena pesada del anticuerpo de la familia del gen de la línea germinal
 <400> 22

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano anti-EGFR humano, en el que la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 20 y la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 21, o un anticuerpo que tiene sustituciones de aminoácidos en la región variable de cadena ligera del mismo que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 20, y/o en la región variable de cadena pesada del mismo que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 21, de la siguiente manera:
- (1) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Gly y el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ser,
- (2) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Lys y el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ser,
- (3) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Gly, y el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ala,
- (4) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Lys, y el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ala,
- (5) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Lys, el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ser, y el aminoácido de la posición 107 de la SEQ ID NO 21 se sustituye con Ser,
- (6) el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ala, o
- (7) el aminoácido de la posición 26 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Lys, el aminoácido de la posición 89 de la SEQ ID NO 20 se sustituye con Ala y el aminoácido de la posición 107 de la SEQ ID NO 21 se sustituye con Ser.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo de cadena sencilla, Fab, mini anticuerpo, anticuerpo quimérico o anticuerpos intactos de inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgA, IgE, IgM, IgG4, IgD.
3. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
4. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las secuencias de nucleótidos del gen que codifica la región variable de cadena ligera es la secuencia de ADN de la SEQ ID NO 9.
5. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las secuencias de nucleótidos del gen que codifica la región variable de cadena pesada es la secuencia de ADN de la SEQ ID NO 10.
6. Un vector de expresión que contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5.
7. Una bacteria huésped, una célula huésped y un casete de expresión que contienen el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une al EGFR expresado en la membrana celular; y la célula puede ser una célula humana de cáncer de piel, una célula humana de cáncer de hígado, una célula humana de cáncer de colon, una célula humana de cáncer de cuello uterino, una célula de cáncer ovárico, una célula humana de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer renal, una célula de cáncer de próstata, una célula escamosa de neoplasia de cabeza y cuello, una célula de cáncer pancreático, una célula tipo fibroblasto de la membrana sinovial o un queratinocito.
9. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, para su uso en un método para el tratamiento de tumores que expresan EGFR, enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunitarias.
10. Fármacos o reactivos de detección que contienen el anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.
11. Los fármacos o los reactivos de detección de acuerdo con la reivindicación 10, en donde se preparan mezclando otro u otros anticuerpos con el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para obtener una preparación mezclada.
12. Una molécula de fármaco de anticuerpo dirigido, que comprende el anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 unido a un agente citotóxico de distintas formas.
13. La molécula de fármaco de anticuerpo dirigido de acuerdo con la reivindicación 12, en la que las distintas formas de unión son el marcado del anticuerpo, el entrecruzamiento *in vitro* o el acoplamiento molecular.
14. La molécula de fármaco de anticuerpo dirigido de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el agente citotóxico comprende moléculas químicas, isótopos radioactivos, polipéptidos, toxinas y otras sustancias que tienen

propiedades de destrucción celular o de inducción de apoptosis.

5 15. Una proteína de fusión de un anticuerpo con otras proteínas y/o polipéptidos, en donde la proteína de fusión comprende un complejo del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 y otras moléculas proteicas o polipeptídicas.

10 16. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la proteína de fusión se prepara uniendo el ácido nucleico que codifica el anticuerpo al gen de la inmunotoxina, del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o de la citocina para construir un vector de expresión recombinante, y la obtención de una molécula de proteína de fusión recombinante por parte de una célula de mamífero u otro sistema de expresión.

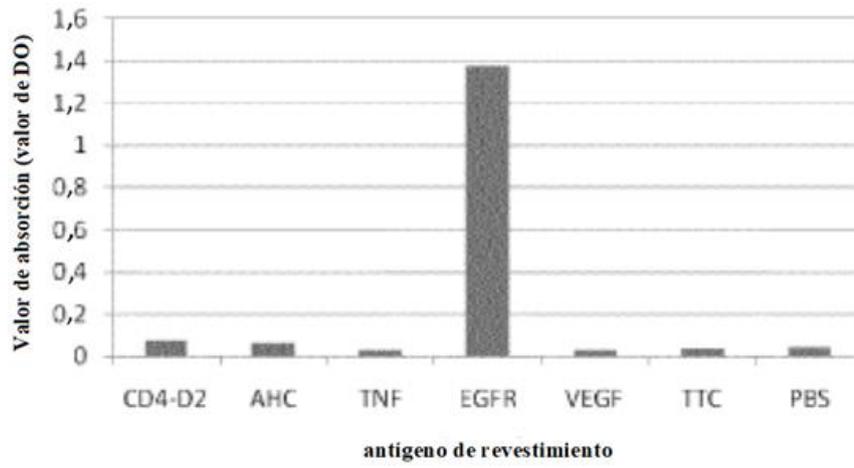


Fig. 1

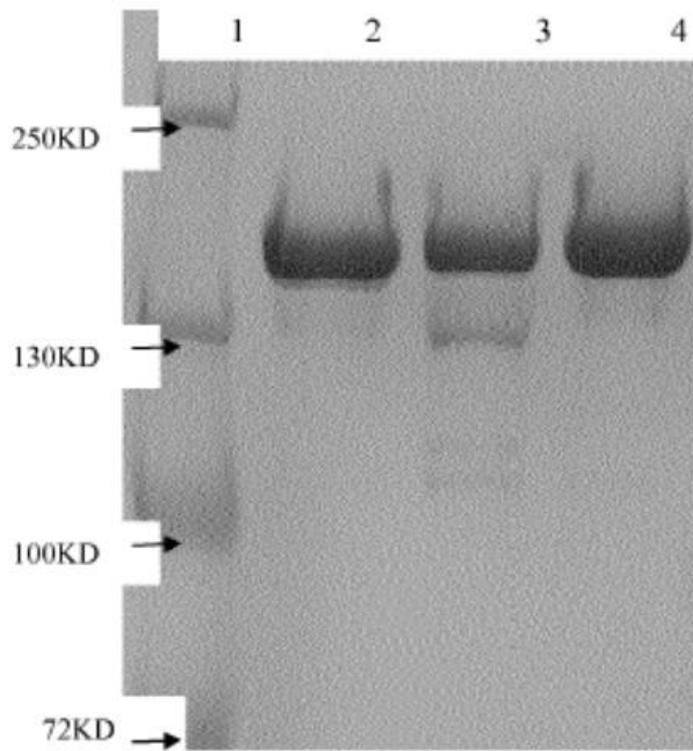


Fig. 2



Fig. 3

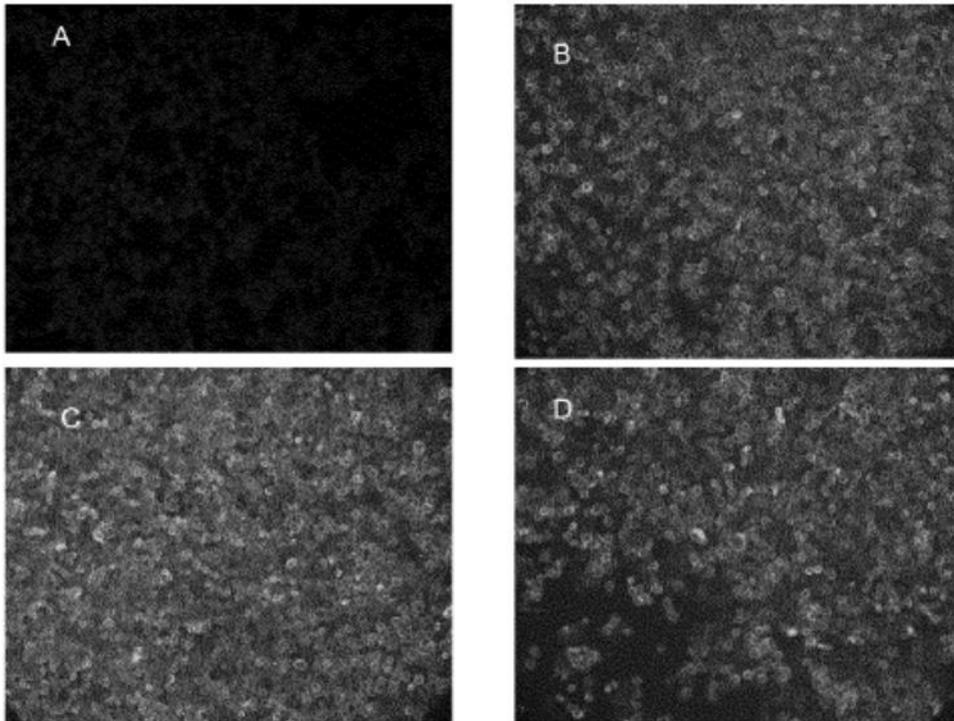


Fig. 4

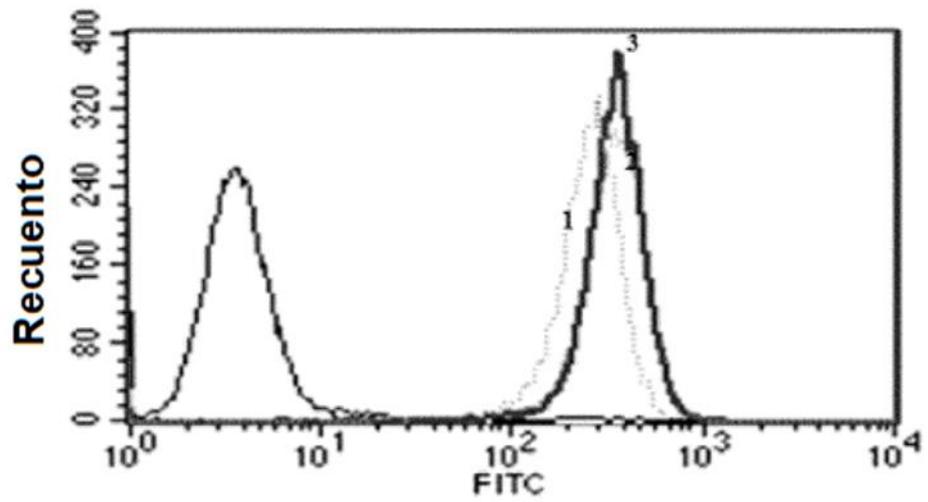


Fig. 5A

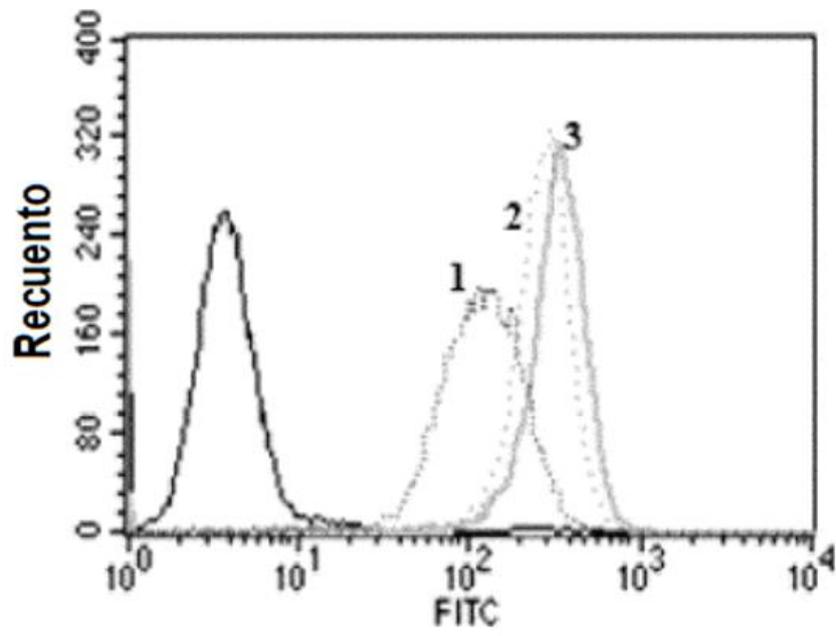


Fig. 5B

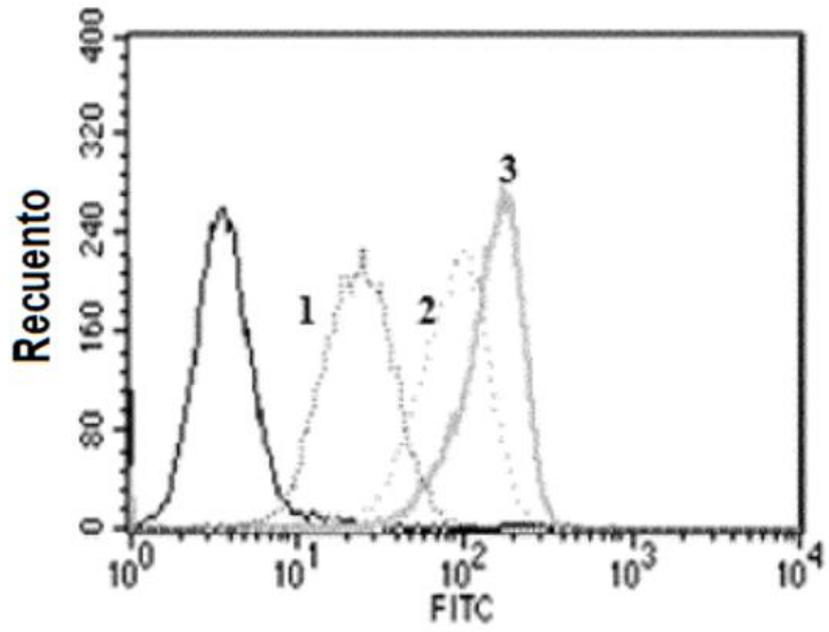


Fig. 5C

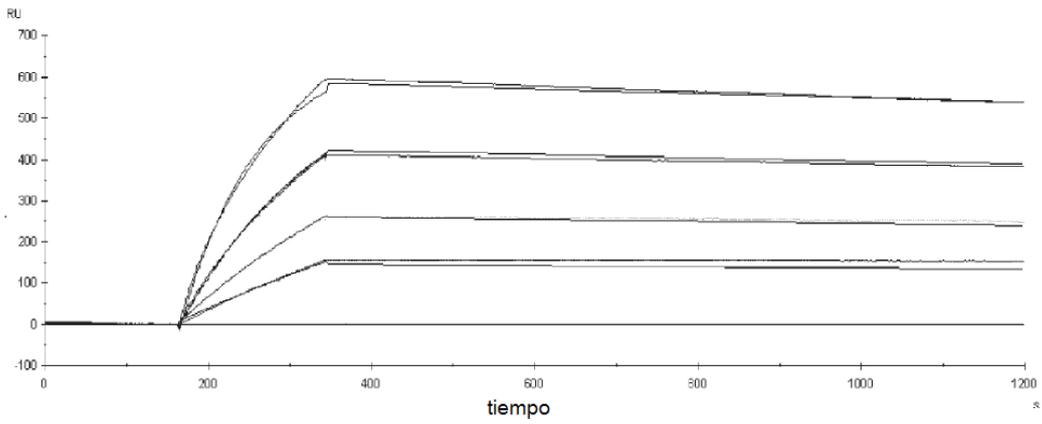


Fig. 6

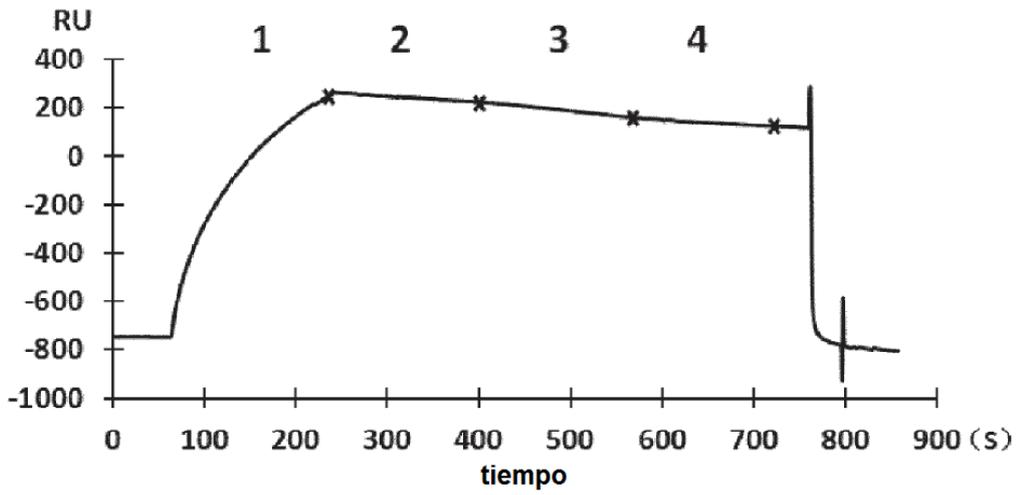


Fig. 7A

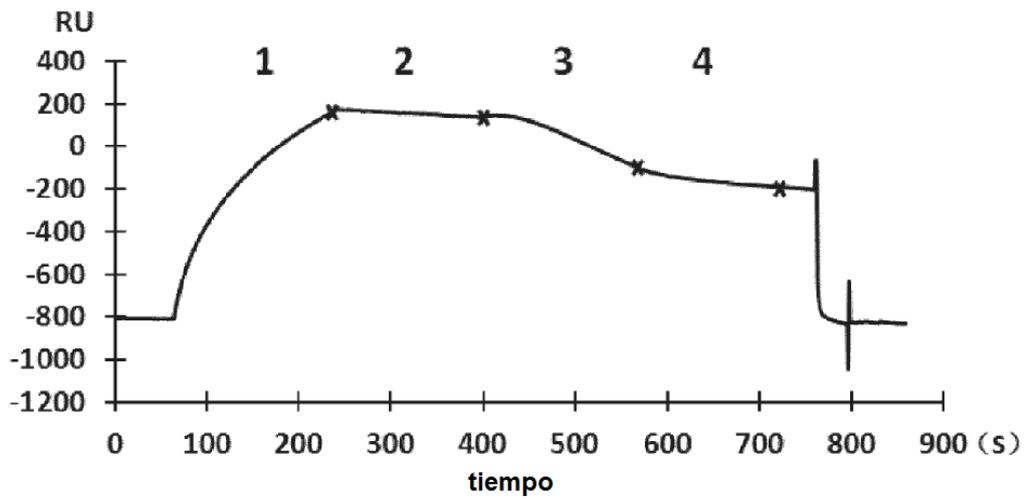


Fig. 7B

D

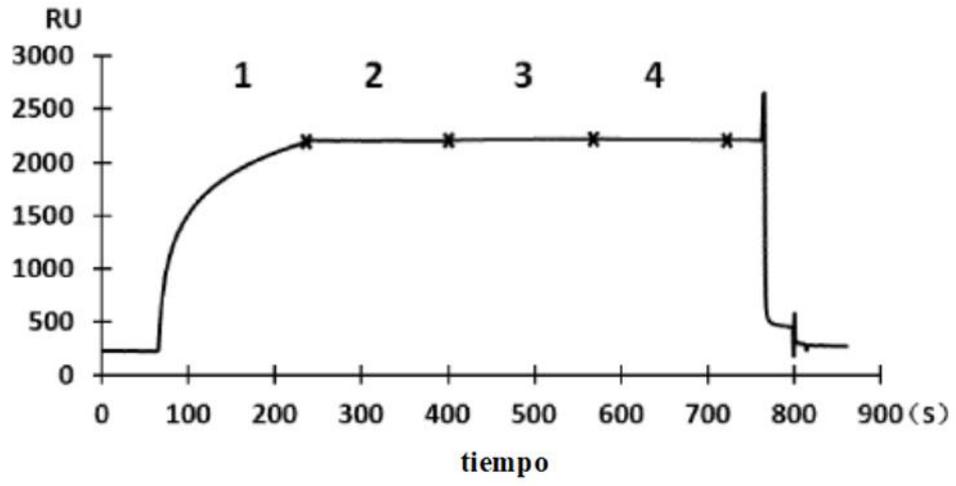


Fig. 7C

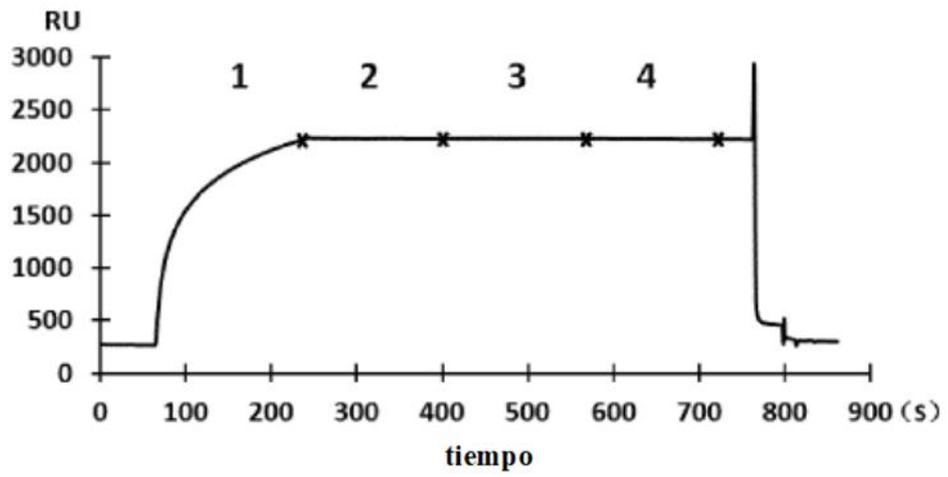


Fig. 7D

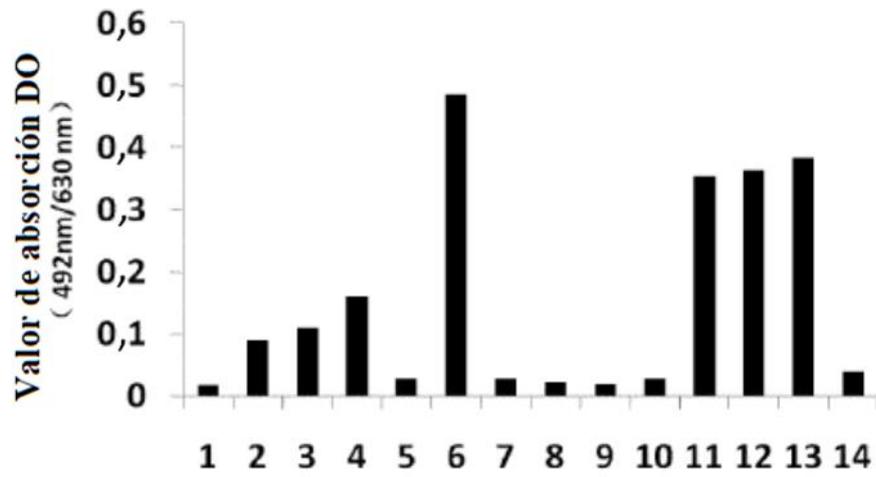


Fig. 8

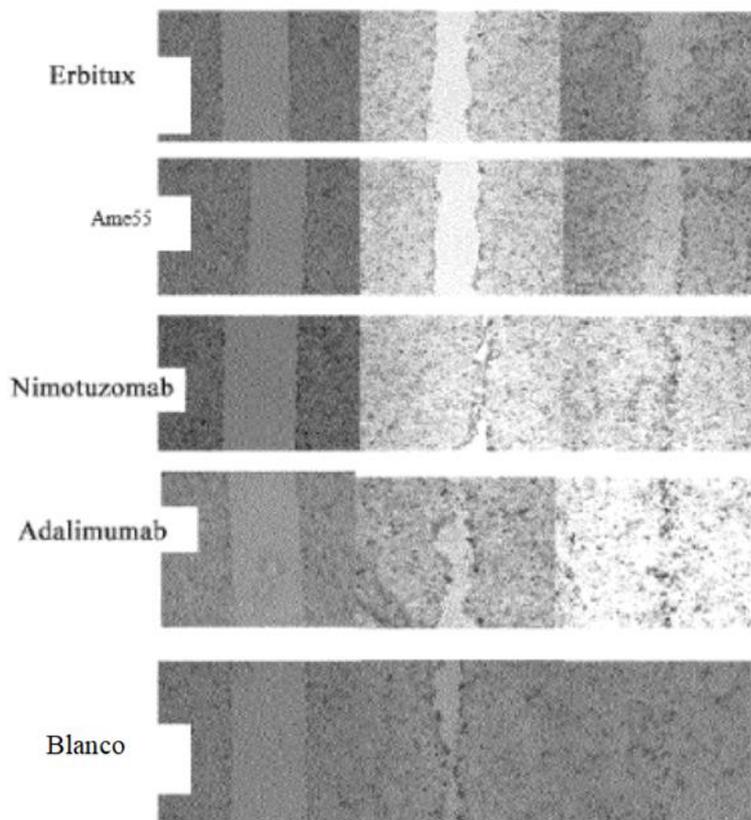


Fig. 9

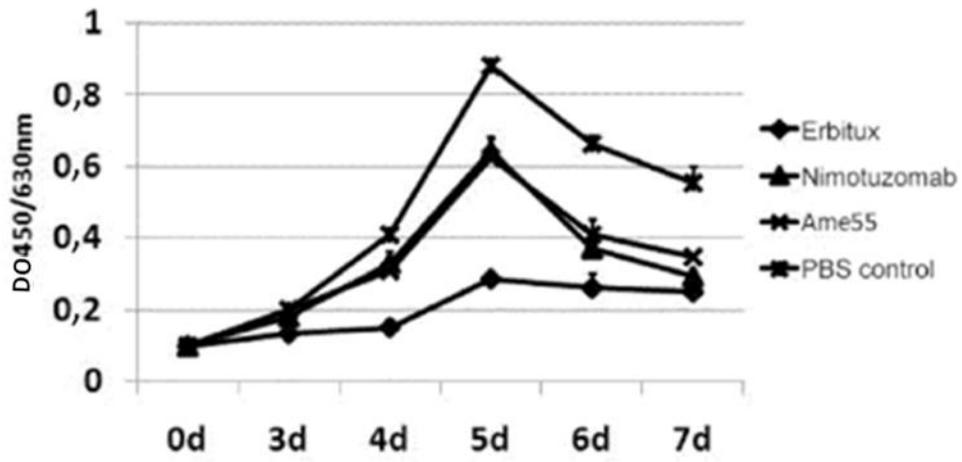


Fig. 10

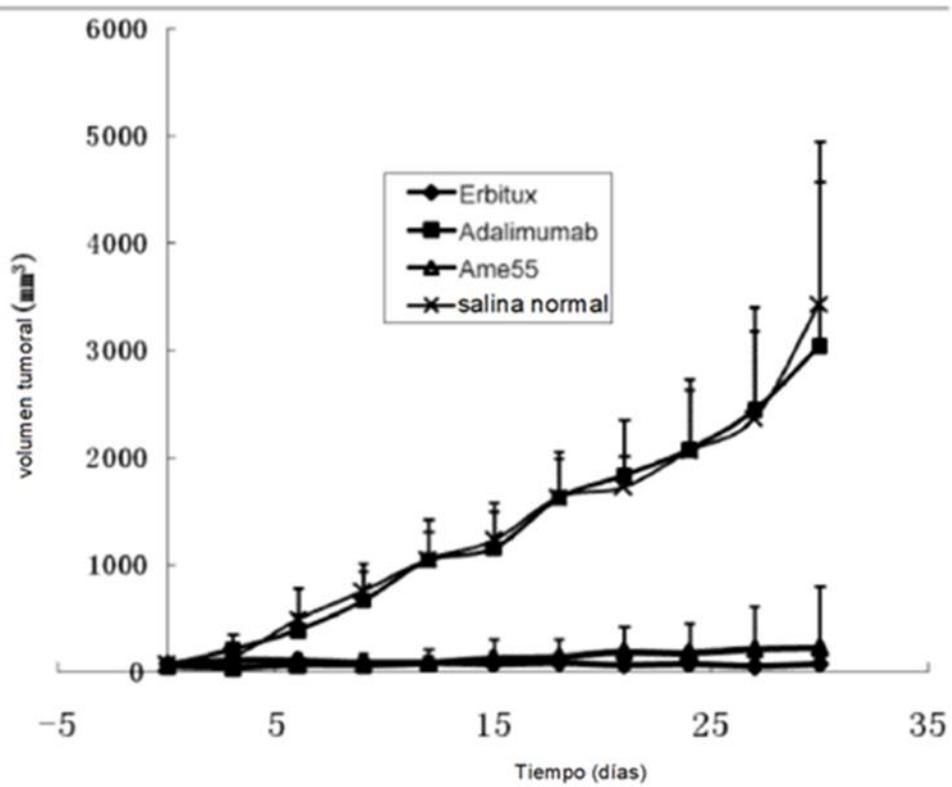


Fig. 11

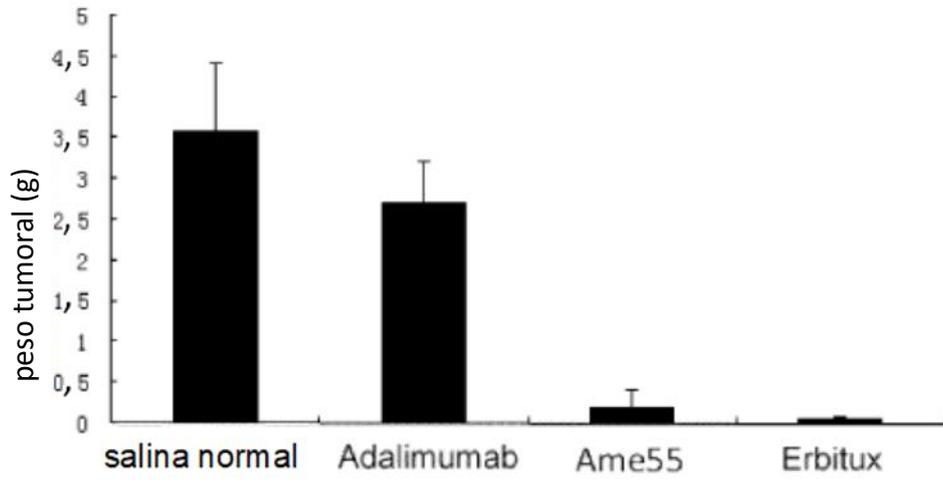


Fig. 12

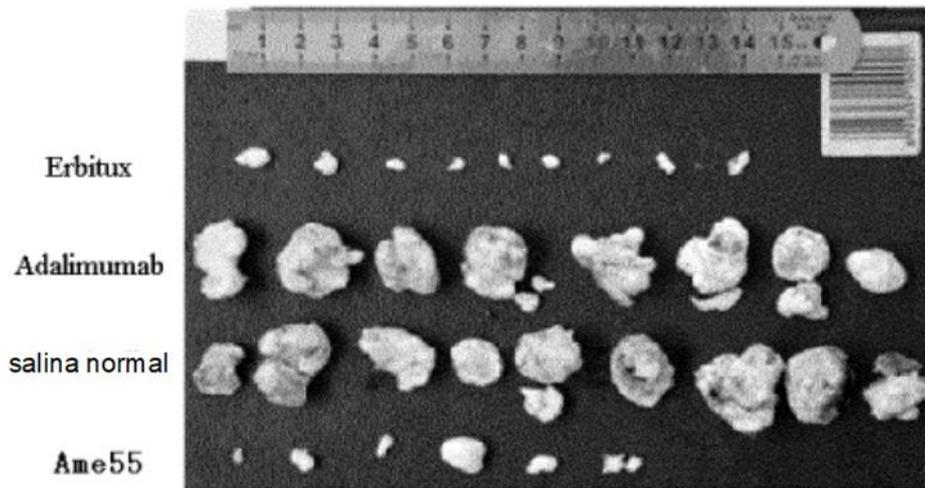


Fig. 13

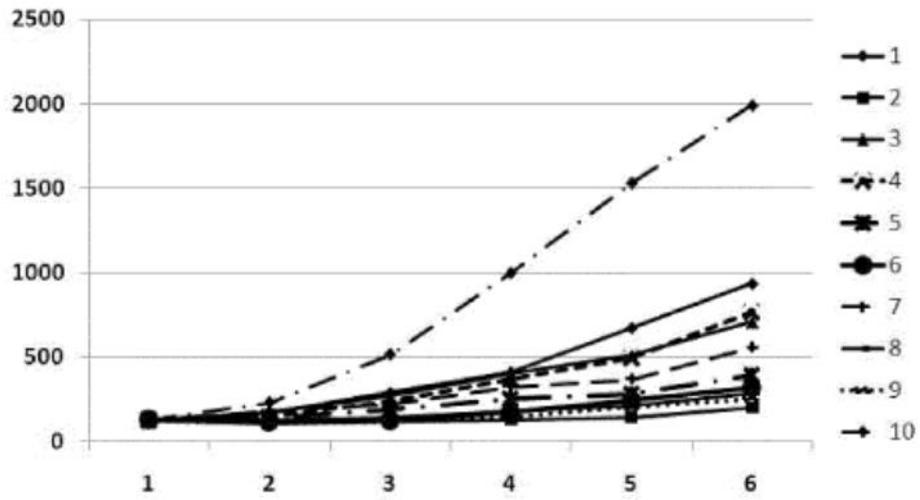


Fig. 14A

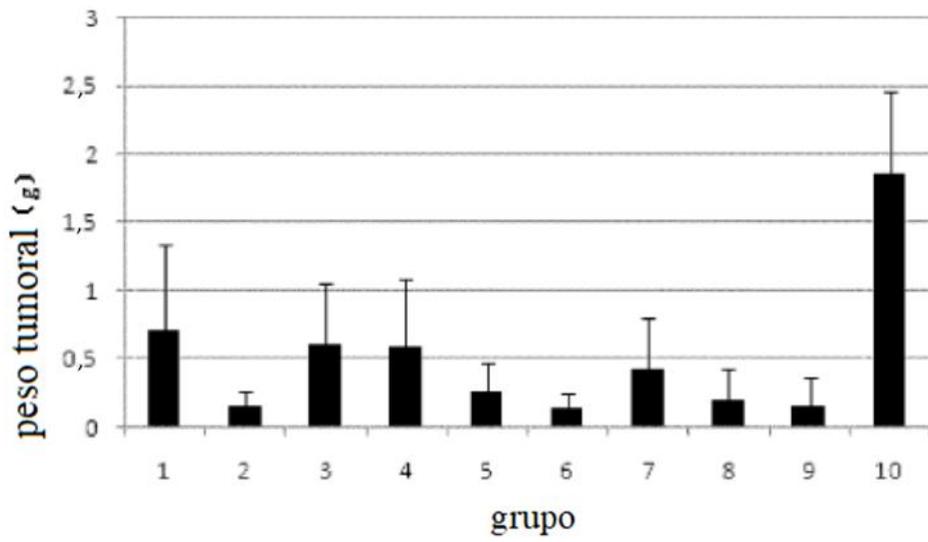


Fig. 14B

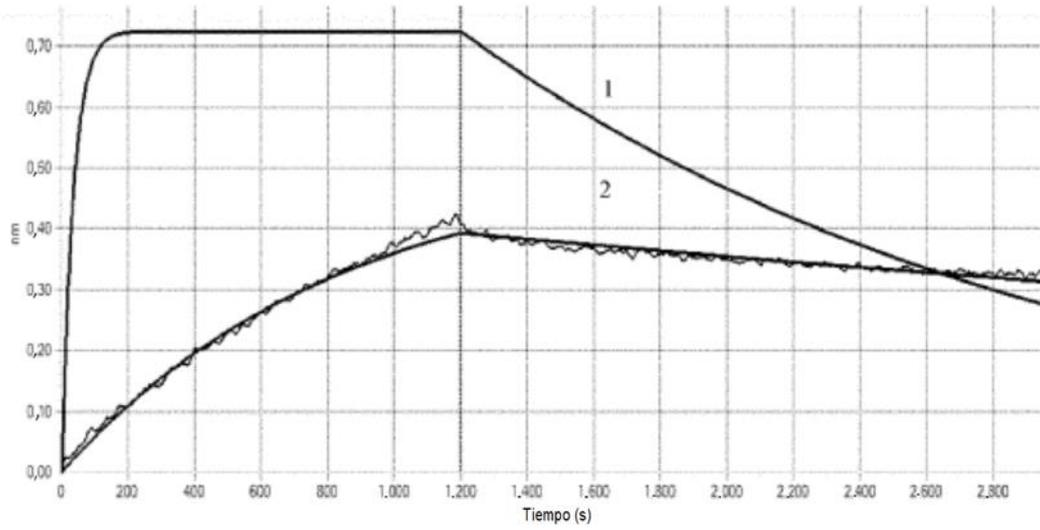


Fig. 15

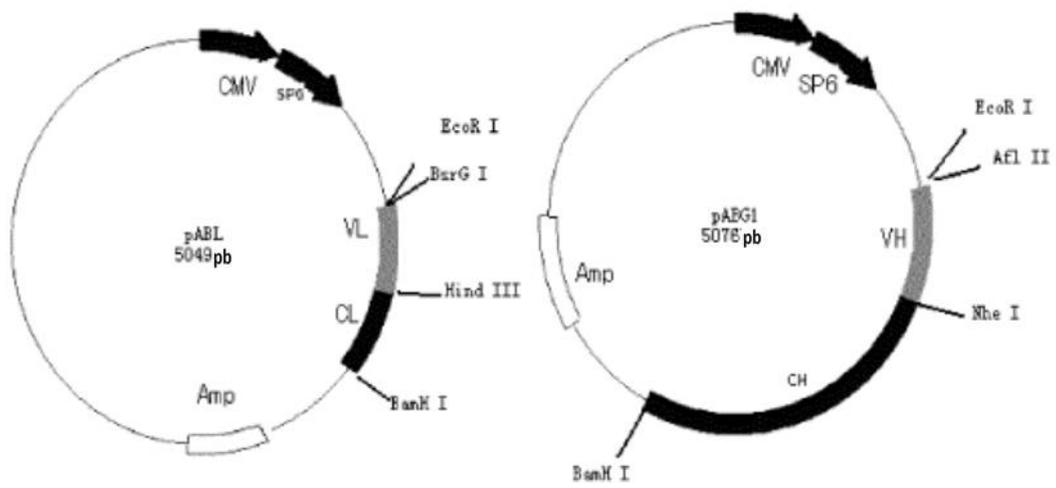


Fig. 16