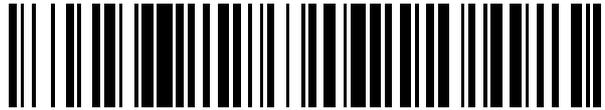


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 126**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/US2015/019722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138460**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15712472 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3126388**

54 Título: **Anticuerpos ANTI-EGFRVIII y usos de los mismos**

30 Prioridad:

11.03.2014 US 201461950963 P

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

26.12.2019

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**KIRSHNER, JESSICA R.;
MACDONALD, DOUGLAS;
THURSTON, GAVIN;
MARTIN, JOEL H.;
DELFINO, FRANK;
NITTOLI, THOMAS y
KELLY, MARCUS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 736 126 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos ANTI-EGFRVIII y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos humanos que se unen específicamente a los mutantes de delección del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, de sus siglas en inglés) humano, en particular, al mutante de delección de clase III, EGFRVIII, y a los métodos terapéuticos y de diagnóstico para usar estos anticuerpos.

Antecedentes

La sobreexpresión y/o la amplificación génica del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF, de sus siglas en inglés), o EGFR, se han informado en múltiples tumores humanos, incluidos los de mama, ovario, vejiga, cerebro y varios carcinomas escamosos (Wong, A.J. et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6899-6903; Harris et al., 1992, Natl. Cancer Inst. Monogr. 11:181-187). Sin embargo, el direccionamiento del EGFR como un método terapéutico antineoplásico ha sido problemático, ya que muchos tejidos normales también expresan este receptor y pueden ser dirigidos junto con las dianas neoplásicas. Mientras tanto, se ha informado de que muchos glioblastomas que tienen amplificación génica del EGFR con frecuencia contienen reordenamiento genético (Ekstrand, A.J. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4309-4313; Wong A.J. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2965-2969). En un estudio, se encontró que 17 de los 44 glioblastomas tenían una o más alteraciones en la secuencia de codificación del EGFR y todos estos casos contenían EGFR amplificado, mientras que ninguno de los 22 casos sin amplificación génica mostró ninguna anomalía de secuencia específica del tumor (Frederick, L. et al., 2000, Cancer Res 60:1383-1387). El mismo estudio también mostró que se pueden detectar múltiples tipos de mutaciones del EGFR en tumores individuales.

La variante de clase III del EGFR (EGFRVIII, de sus siglas en inglés) es la variante del EGFR encontrada con mayor frecuencia en el glioblastoma (Bigner et al., 1990, Cancer Res 50:8017-8022; Humphrey et al., 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87:4207-4211; Yamazaki et al., 1990, Jap J Cancer Res 81:773-779; Ekstrand et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4309-4313; Wikstrand et al., 1995, Cancer Res 55:3140-3148; y Frederick et al., 2000, Cancer Res 60:1383-1387). La EGFRVIII se caracteriza por una eliminación de los exones 2-7 del gen EGFR, lo que da como resultado una eliminación en el marco de 801 pares de bases de la región de codificación, es decir, la eliminación de 6-273 restos de aminoácidos (basado en los números de restos del EGFR maduro), así como la generación de una nueva glicina en la unión de fusión (Humphrey et al., 1988, Cancer Res 48:2231-2238; Yamazaki *et al.*, 1990, *supra*). Se ha demostrado que la EGFRVIII tiene una actividad cinasa débil pero constitutivamente activa, independiente del ligando, así como una tumorigenicidad mejorada (Nishikawa et al., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:7727-7731; y Batra et al., 1995, Cell Growth and Differentiation 6:1251-1259). Además de los gliomas, se ha detectado EGFRVIII en el carcinoma ductal e intraductal de mama (Wikstrand et al., 1995, Cancer Res 55: 3140-3148), carcinomas de pulmón de células no pequeñas (García de Palazzo et al., 1993, Cancer Res 53:3217-3220), carcinomas de ovario (Moscatello et al., 1995, Cancer Res 55: 5536-5539), cáncer de próstata (Olapade-Olaopa et al., 2000, British J Cancer 82:186-194) y carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello (Tinhofer et al., 2011, Clin Cancer Res 17(15):5197-5204). Por el contrario, estos y otros estudios informan que los tejidos normales no expresan la EGFRVIII (García de Palazzo *et al.*, 1993, *supra*; Wikstrand *et al.*, 1995, *supra*; y Wikstrand et al., 1998, J Neuro Virol 4:148-158). La naturaleza de la EGFRVIII altamente específica del tumor lo convierte en una diana especialmente útil para tratar los cánceres y tumores que expresan esta molécula.

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos del EGFR humano se muestran en las SEQ ID NO: 145 y 146, respectivamente, y la secuencia de aminoácidos de la EGFRVIII se muestra en la SEQ ID NO: 147. Los anticuerpos contra EGFRVIII se describen en, por ejemplo, los documentos US 5.212.290, US 7.736.644, US 7.589.180 y US 7.767.792. El documento WO 2009/067242 describe el anticuerpo 11F8 anti-EGFRVIII. El documento WO 2006/009694 describe el anticuerpo cetuximab anti-EGFRVIII. Freeman *et al.* (*J. Clin. Oncol.* 26 (Suplemento 15): 14536, 2008) describe panitumumab y cetuximab. El documento WO 2005/010151 describe la unión de anticuerpos anti-EGFRVIII dentro del péptido de unión. El documento US 2009/269343 describe anticuerpos que se unen a EGFR y anti-EGFRVIII. El documento WO 2010/096434 describe los anticuerpos AcM806, 528 y DH8.3 anti-EGFRVIII. Modjtahedi et al. (*Int. J. Cancer* 105(2): 273-280, 2003) describe el anticuerpo ICR62 anti-EGFR. Jiang et al. (*J. Biol. Chem.* 286(7): 5913-5920) describe el anticuerpo CH12 anti-EGFRVIII.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la EGFRVIII humana, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una combinación de secuencias de aminoácidos de HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48. Los anticuerpos de la invención son útiles, entre otras cosas, para dirigirse a células tumorales que expresan EGFRVIII. Los anticuerpos anti-EGFRVIII de la invención, y las porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse solos en forma no modificada, o pueden incluirse como parte de un conjugado anticuerpo-fármaco o un anticuerpo

biespecífico.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención que se une específicamente a EGFRvIII y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo humano recombinante o fragmento del mismo. En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición que es una combinación del anticuerpo anti-EGFRvIII y un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combine de forma ventajosa con un anticuerpo anti-EGFRvIII. La presente invención también proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, de sus siglas en inglés) que comprenden el anticuerpo anti-EGFRvIII conjugado con un agente citotóxico. Las terapias de combinación, formulaciones conjuntas y ADC ejemplares que implican los anticuerpos anti-EGFRvIII de la presente invención se desvelan en otra parte en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) para su uso en un método para tratar un cáncer, reducir el crecimiento del tumor y/o causar la regresión del tumor en un paciente, comprendiendo el ADC un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y una citotoxina, en donde (a) el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del ADC se une específicamente a EGFRvIII pero no se une al péptido de unión de la SEQ ID NO: 148 o al péptido de la SEQ ID NO: 165, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una combinación de secuencias de aminoácidos de HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de las SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48, y el método comprende administrar a un paciente que lo necesite el ADC; o (b) el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del ADC se une específicamente a EGFRvIII y también se une al péptido de unión de la SEQ ID NO: 148 y/o al péptido de la SEQ ID NO: 165, y el método comprende administrar a un paciente que lo necesite el ADC y un ADC adicional que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y una citotoxina, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del segundo ADC se une específicamente a EGFRvIII pero no se une al péptido de unión de la SEQ ID NO: 148 o al péptido de la SEQ ID NO: 165, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo del ADC adicional comprende una combinación de secuencias de aminoácidos de HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de las SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48.

Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender únicamente una parte de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv) y pueden modificarse para afectar a la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Los anticuerpos anti-EGFRvIII enumerados en las Tablas 1 y 2 en el presente documento se desvelan en el presente documento. La Tabla 1 expone los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (HCVR), las regiones variables de cadena ligera (LCVR), las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3), y las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares. La Tabla 2 expone los identificadores de secuencia de ácido nucleico de las HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo un par de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1 emparejada con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1. Los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se desvelan en el presente documento, comprendiendo un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares enumerados en la Tabla 1. En casos determinados, el par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR se selecciona del grupo que consiste en: 2/20, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, y 130/138.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

5 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

10 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

15 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

20 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

25 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

30 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 emparejada con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1. En casos determinados, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares enumerados en la Tabla 1.

40 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares enumerados en la Tabla 1. En determinados casos, el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; y 132-134-136-140-142-144.

50 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII se desvelan en el presente documento, comprendiendo un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR como se define mediante cualquiera de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, se incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a EGFRvIII, comprendiendo el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contenido dentro de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en: 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; y 370/378. Los métodos y técnicas para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica y se pueden usar para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR específicas desveladas en el presente documento. Las convenciones ejemplares que se pueden usar para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales y la definición de AbM es un compendio entre las estrategias de Kabat y Chothia. Véanse, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); y Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). También están disponibles bases de datos públicas para identificar las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

65 Las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-EGFRvIII o porciones de los mismos también se

desvelan en el presente documento. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1 se desvelan en el presente documento; en determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1 se desvelan en el presente documento; en determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1 se desvelan en el presente documento; en determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 se desvelan en el presente documento; en determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 se desvelan en el presente documento; en determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1 se desvelan en el presente documento; en determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1 se desvelan en el presente documento; en determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1 se desvelan en el presente documento; en determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR se desvelan en el presente documento, en donde la HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3 es como se define mediante cualquiera de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares enumerados en la Tabla 1.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR se desvelan en el presente documento, en donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, LCDR1-LCDR2-LCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos de LCDR1-LCDR2-LCDR3 es como se define mediante cualquiera de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares enumerados en la Tabla 1.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR y una LCVR se desvelan en el presente documento, en donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, y en donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1. En casos determinados, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia polinucleotídica

seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma. En casos determinados, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y una LCVR, en donde la HCVR y la LCVR proceden del mismo anticuerpo anti-EGFRvIII enumerado en la Tabla 1.

Los vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-EGFRvIII se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, la presente divulgación incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR y/o CDR como se expone en la Tabla 1. También se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación las células hospedadoras en las que se han introducido dichos vectores, así como los métodos para producir los anticuerpos o porciones de los mismos mediante el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que permitan la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y la recuperación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos así producidos.

La presente invención incluye anticuerpos anti-EGFRvIII que tienen un patrón de glucosilación modificado. En algunas realizaciones, puede ser útil la modificación para eliminar sitios de glucosilación indeseables, o un anticuerpo que carezca de una fracción de fucosa presente en la cadena de oligosacárido, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase, Shield et al., (2002) JBC 277:26733). En otras aplicaciones, puede hacerse modificación de la galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Los métodos terapéuticos para destruir células tumorales o para inhibir o atenuar el crecimiento de células tumorales usando un anticuerpo anti-EGFRvIII o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo se desvelan en el presente documento. Los métodos terapéuticos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo a un sujeto que lo necesite. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejore, mitigue, inhiba o prevenga mediante el direccionamiento de EGFRvIII y/o la inhibición de la señalización celular mediada por ligando a través de EGFRvIII.

Otras realizaciones se harán evidentes tras la revisión de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra los resultados de la transferencia Western del EGFR y EGFRvIII utilizando anticuerpos anti-EGFRvIII [es decir, H1H1863N2(Fuc-), y Controles I y II en la **Figura 1a**; y H1H1911, H1H1912 y H1H1915 en la **Figura 1b**], o anticuerpo anti-His, en condiciones reducidas (paneles superiores) y no reducidas (paneles inferiores). Carriles 1 y 6: 10 µl del modelo BENCHMARK™ (INVITROGEN™); Carriles 2 y 7: 400 ng de hEGFR-mmh (SEQ ID NO: 154); Carriles 3 y 8: 400 ng de hEGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152); y Carriles 4, 5, 9 y 10: espaciador. Control I: Anticuerpo peptídico de unión anti-EGFRvIII humana (IgG1) desvelado en la Patente de Estados Unidos N.º 7.736.644; y Control II: Anticuerpo quimérico anti-EGFRvIII/EGFR desvelado en la Patente de Estados Unidos N.º 7.589.180.

La **Figura 2** muestra las características de unión de H1H1863N2(Fuc-). El péptido de unión EGFRvIII o el péptido de los restos 311-326 de EGFR ("péptido EGFR311-326"), cada uno de los cuales se marcó mediante un enlazador con biotina en el extremo C, se capturó en puntas de OCTET® recubiertas con estreptavidina en un instrumento FORTEBIO® OCTET® RED y reaccionó con H1H1863N2(Fuc-) o Control I-III. Controles I y II: Lo mismo que arriba; y Control III: Anticuerpo anti-EGFRvIII humanizado (hIgG1) desvelado en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2010/0056762. (□): Péptido de unión EGFRvIII marcado con biotina en el extremo C (SEQ ID NO: 149); y (■): Péptido de unión EGFR311-326 marcado con biotina en el extremo C (SEQ ID NO: 151).

La **Figura 3** muestra la internización del AcM anti-EGFRvIII por células HEK293 que expresan EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII). Los anticuerpos anti-EGFRvIII unidos a la superficie celular y los anticuerpos de control se detectaron mediante un anticuerpo secundario conjugado con colorante (Fab); se adquirieron imágenes a 40x y se cuantificaron vesículas internizadas. Controles I y II: Lo mismo que arriba; y Control IV: Anticuerpo quimérico anti-EGFR desvelado en la Patente de Estados Unidos N.º 7.060.808. (□): Internización a 37 °C; y (■): Internización a 4 °C.

La **Figura 4** muestra la unión e internización del anticuerpo H1H1863N2(Fuc-) anti-EGFRvIII por tumores B16F10.9 o tumores B16F10.9 que expresan EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII) que se xenoinjertaron en ratones inmunodeficientes combinados graves (SCID, de sus siglas en inglés). El anticuerpo anti-EGFRvIII o anticuerpo de control de isotipo unido a la superficie celular (**Figura 4a**) o unido a la superficie celular más internizado (**Figura 4b**), se detectó mediante un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con alofococianina (hFc-APC) usando citometría de flujo. Se muestran las intensidades medias de fluorescencia (MIF) a los 10 minutos (□), 4 horas (▣) y 24 horas (■), después de la inyección del anticuerpo.

La **Figura 5** muestra los resultados del análisis farmacocinético para el anticuerpo H1H863N2(Fuc+) anti-EGFRvIII (**Fig. 5d**) y los anticuerpos de control (como se describió anteriormente), es decir, Control I (**Fig. 5b**), Control III (**Fig. 5c**) y Control IV (**Fig. 5a**), en ratones de tipo silvestre (●) o ratones que expresan EGFR humano (■).

Descripción detallada

5 Antes de describir la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a los métodos ni a las condiciones experimentales descritos en particular, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

10 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia a la cual pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar del valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, como se utiliza en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

20 Definiciones

25 El término "EGFRVIII", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la variante de clase III del EGFR humano que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 147, o un fragmento biológicamente activo de la misma, que exhibe cualquier característica específica para EGFRVIII, en oposición a aquellas en común con el EGFR normalmente expresado, a menos que se indique específicamente lo contrario. La EGFRVIII carece de los restos de aminoácidos 6 a 273 del EGFR maduro (es decir, la SEQ ID NO: 146 sin el péptido señal, es decir, los restos 1-24) y contiene un nuevo resto de glicina en la posición 6 entre los restos de aminoácidos 5 y 274.

30 Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas en el presente documento pretenden referirse a la versión humana de la respectiva proteína, polipéptido o fragmento de proteína, a menos que se especifique explícitamente que son de una especie no humana. Por lo tanto, la expresión "EGFRVIII" significa EGFRVIII humana a menos que se especifique que sea de una especie no humana, por ejemplo, "EGFRVIII de ratón", "EGFRVIII de mono", etc.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "EGFRVIII expresada en la superficie celular" significa una o más proteínas EGFRVIII, o el dominio extracelular de las mismas, que se expresa en la superficie de una célula *in vitro* o *in vivo*, de modo que al menos una porción de una proteína EGFRVIII se expone al lado extracelular de la membrana celular y es accesible a una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. Una "EGFRVIII expresada en la superficie celular" puede comprender o consistir en una proteína EGFRVIII expresada en la superficie de una célula que normalmente expresa la proteína EGFRVIII. Como alternativa, "EGFRVIII expresada en la superficie celular" puede comprender o consistir en la proteína EGFRVIII expresada en la superficie de una célula que normalmente no expresa EGFRVIII humana en su superficie pero se ha modificado genéticamente de forma artificial para expresar EGFRVIII en su superficie.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-EGFRVIII" incluye tanto anticuerpos monovalentes con una especificidad única, como anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer brazo que se une a EGFRVIII y un segundo brazo que se une a un segundo antígeno (diana), en donde el brazo anti-EGFRVIII comprende cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se exponen en la Tabla 1 en el presente documento. La expresión "anticuerpo anti-EGFRVIII" también incluye conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un anticuerpo anti-EGFRVIII o porción de unión a antígeno del mismo conjugada a un fármaco o toxina (es decir, un agente citotóxico). La expresión "anticuerpo anti-EGFRVIII" también incluye conjugados anticuerpo-radionúclido (ARC, de sus siglas en inglés) que comprenden un anticuerpo anti-EGFRVIII o porción de unión a antígeno del mismo conjugada a un radionúclido.

55 El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés) que se une específicamente a o interacciona con un antígeno particular (por ejemplo, EGFRVIII). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_L1). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, de sus siglas en inglés). Cada V_H y V_L está compuesta

por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes realizaciones de la invención, las FR del anticuerpo anti-EGFRvIII (o porción de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de forma natural o artificial. Una secuencia consenso de aminoácidos se puede definir basándose en un análisis paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se utiliza en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden proceder, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas, usando cualquier técnica convencional adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables, y opcionalmente constantes, de anticuerpo. Dicho ADN se conoce y/o se puede adquirir fácilmente en, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, fagotecas de anticuerpos), o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

Los ejemplos no limitativos de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas genomanipuladas, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de un dominio, anticuerpos de dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de CDR injertada, díacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (p. ej., nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, de sus siglas en inglés) y dominios IgNAR variables de tiburón, también están abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno," como se usa en el presente documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que está adyacente a o en fase con una o más secuencias marco. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L pueden situarse uno respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener los dímeros V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

En determinadas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones no limitativas, a modo de ejemplo, de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; y (xiv) V_L-C_L. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ejemplares enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar unidos directamente entre sí o pueden estar unidos mediante una región bisagra completa o parcial o enlazadora. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que producen una unión flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante uno o más enlaces disulfuro).

Como ocurre con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser mono-específicos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en los que cada dominio variable puede unirse específicamente a un antígeno diferente o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico ejemplares divulgados en el presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención usando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden funcionar mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). "Citotoxicidad dependiente de complemento" (CDC) se refiere a lisis de células que expresan antígeno por un anticuerpo de la invención en presencia del complemento. "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una reacción

mediada por células, en que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y de ese modo da lugar a la lisis de la célula diana. La CDC y la ADCC pueden medirse usando ensayos que son bien conocidos y están disponibles en la técnica. (Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.500.362 y 5.821.337 y Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). La región constante de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo de fijar el complemento y mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por lo tanto, el isotipo de un anticuerpo puede seleccionarse basándose en si se desea que el anticuerpo medie la citotoxicidad.

10 En determinadas realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-EGFRvIII de la invención son anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en que las secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

20 Los anticuerpos de la invención pueden, en algunas realizaciones, ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se han preparado, expresado, creado o aislado por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante introducido por transfección en una célula hospedadora (descrito más adelante con más detalle), anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante de anticuerpos humanos combinatorios (descritos más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de, y están relacionadas con, las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con heterogeneidad de bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción de cuatro cadenas estable de aproximadamente 150-160 kDa en la que los dímeros se mantienen juntos por un enlace disulfuro intercatenario de cadena pesada. En una segunda forma, los dímeros no están unidos mediante enlaces disulfuro intercatenarios y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta de una cadena ligera y pesada acopladas covalentemente (semianticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de purificación por afinidad.

45 La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intacta se debe a, pero sin limitación, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de un único aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) hasta los niveles normalmente observados usando una bisagra de IgG1 humana. La presente invención incluye anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región bisagra, C_H2 o C_H3, que pueden ser deseables, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o retirado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en la que existe de forma natural o se produce de forma natural el anticuerpo, es un "anticuerpo aislado" para los fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con determinadas realizaciones, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

Los anticuerpos anti-EGFRvIII develados en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las que procedían los anticuerpos. Dichas mutaciones pueden averiguarse fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento con secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo,

bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. Los anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se obtienen a partir de cualquiera de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento, en las que uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que se obtuvo el anticuerpo, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o en una sustitución de aminoácido conservativa del resto o restos de la línea germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se mencionan en el presente documento colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la técnica, partiendo con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera desveladas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En casos determinados, todos los restos marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L mutan de vuelta a los restos encontrados en la secuencia de la línea germinal humana de la que se obtuvo el anticuerpo. En otros casos, únicamente determinados restos mutan de vuelta a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, únicamente los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros casos, uno o más de los restos marco y/o CDR se mutan al resto o restos correspondientes de una secuencia de la línea germinal diferente (es decir, una secuencia de la línea germinal que es diferente de la secuencia de la línea germinal de la que se obtuvo originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro de las regiones marco y/o CDR, por ejemplo, en las que determinados restos individuales están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular mientras que otros restos determinados que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal pueden ensayarse fácilmente con respecto a una o más propiedades deseadas tales como, mejor especificidad de unión, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonista o agonistas mejoradas o potenciadas (según pueda ser el caso), menor inmunogenicidad, etc. Dentro de la presente divulgación se incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general.

La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-EGFRvIII que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR desveladas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-EGFRvIII que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservativas relativas a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR expuestas en la Tabla 1 en el presente documento.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátopo. Un único antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno o puede tener diferentes efectos biológicos. Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce por yuxtaposición espacial de aminoácidos de diferentes segmentos de cadena de polipéptido lineal. Un epítopo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En determinadas circunstancias, un epítopo puede incluir fracciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinean de forma óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente un 95 % y, más preferentemente, al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencias, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinados casos, codificar un polipéptido que tenga la misma, o sustancialmente similar, secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Aplicada a polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco por defecto, comparten al menos un 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos un 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo-alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que

contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre que son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un remplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 desvelada en Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445. Un remplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

10 La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se menciona como identidad de secuencia, se mide normalmente usando un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas acopla secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos muy relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA usando parámetros por defecto o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 y Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

25 Unión dependiente de pH

La presente invención incluye anticuerpos anti-EGFRvIII con características de unión dependientes de pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFRvIII de la presente invención puede exhibir una unión reducida a EGFRvIII a pH ácido en comparación con pH neutro. Como alternativa, los anticuerpos anti-EGFRvIII de la invención pueden exhibir una unión mejorada a EGFRvIII a pH ácido en comparación con pH neutro. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH inferiores a aproximadamente 6,2, por ejemplo, aproximadamente 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0, o menos. Como se usa en el presente documento, la expresión "pH neutro" significa un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

En determinados casos, la "unión reducida a EGFRvIII a pH ácido en comparación con el pH neutro" se expresa en términos de una relación del valor K_D de la unión del anticuerpo a EGFRvIII a pH ácido al valor K_D de la unión del anticuerpo a EGFRvIII a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede considerarse que exhibe "unión reducida a EGFRvIII a pH ácido en comparación con pH neutro" para los fines de la presente invención si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo exhibe una relación K_D ácida/neutra de aproximadamente 3,0 o mayor. En determinadas realizaciones ilustrativas, la relación K_D ácida/neutra para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede ser aproximadamente 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 o mayor.

Los anticuerpos con características de unión dependientes de pH pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la selección de una población de anticuerpos para determinar la unión reducida (o mejorada) a un antígeno particular a pH ácido en comparación con el pH neutro. Además, las modificaciones del dominio de unión a antígeno en el nivel de aminoácidos pueden producir anticuerpos con características dependientes de pH. Por ejemplo, mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, dentro de una CDR) con un resto de histidina, se puede obtener un anticuerpo con unión a antígeno reducida a pH ácido en relación con pH neutro.

Anticuerpos anti-EGFRvIII que comprenden variantes Fc

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-EGFRvIII que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que potencian o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-EGFRvIII que comprenden una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, en donde la mutación(es) aumenta la afinidad del dominio Fc a FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Dichas mutaciones pueden dar como resultado un aumento en la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitativos de dichas modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/I/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F), y 434. En una realización, la modificación comprende una modificación

428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T, y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P). En otra realización más, la modificación

5 comprende una modificación 265A (por ejemplo, D265A) y/o 297A (por ejemplo, N297A).

Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-EGFRvIII que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S);

10 257I y 311I (por ejemplo, P257I y Q311I); 257I y 434H (por ejemplo, P257I y N434H); 376V y 434H (por ejemplo, D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (por ejemplo, T307A, E380A y N434A); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Todas las combinaciones posibles de las anteriores mutaciones del dominio Fc, y otras mutaciones dentro de los dominios variables de anticuerpos desveladas en el presente documento, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

15 La presente invención también incluye anticuerpos anti-EGFRvIII que comprenden una región constante (C_H) de cadena pesada quimérica, en donde la región C_H quimérica comprende segmentos procedentes de las regiones C_H de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden comprender una región C_H quimérica que comprende parte o la totalidad de un dominio C_H2 procedente de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con parte o la totalidad de un dominio C_H3 procedente de una molécula de

35 **Conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC)**

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un anticuerpo anti-EGFRvIII o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado a una fracción terapéutica tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico o un radioisótopo.

40 Los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para el crecimiento, viabilidad o propagación de las células. Los ejemplos de agentes citotóxicos y agentes quimioterapéuticos adecuados que pueden conjugarse con anticuerpos anti-EGFRvIII de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen, por ejemplo, 1-(2-cloroetil)-1,2-dimetanosulfonil hidrazida, 1,8-dihidroxiciclo [7,3,1]trideca-4,9-dieno-2,6-diyono-13-ona, 1-deshidrotestosterona, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 9-amino camptotecina, actinomicina D, amanitinas, aminopterina, anguidina, antraciclina, antramycin (AMC), auristatinas, bleomicina, busulfán, ácido butírico, calicheamicinas, camptotecina, carminomicinas, carmustina, cemadotinas, cisplatino, colchicina, combretastatinas, ciclofosfamida, citarabina, citocalasina B, dactinomicina, daunorrubicina, dacarbazina, diacetoxipentildoxorrubicina, dibromomanitol, dihidroxiantracindiona, disorazoles, dolastatina, doxorubicina, duocarmicina, equinomicinas, eleuterobinas, emetina, epotilonas, esperamicina, estramustinas, bromuro de etidio, etopósido, fluorouracilos, geldanamycinas, gramicidina D, glucocorticoides, Irinotecán, leptomicinas, leurosinas, lidocaína, lomustina (CCNU), maitansinoides, mecloretamina, melfalán, mercaptopurinas, metopterinas, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, N8-acetil espermidina, podofilotoxinas, procaína, propranolol, pteridinas, puromicina, pirrolobenzodiazepinas (PDB), rizoxinas, estreptozotocina, talisomicinas, taxol, tenopósido, tetracaína, tioepa clorambucilo, tomamicinas, topotecán, tubulisina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, y derivados de cualquiera de los anteriores. De acuerdo con

55 determinadas realizaciones, el agente citotóxico que se conjuga con un anticuerpo anti-EGFRvIII es un maitansinoide tal como DM1 o DM4, un derivado de tomamicina o un derivado de dolastatina. Otros agentes citotóxicos conocidos en la técnica se contemplan dentro del alcance de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, toxinas proteicas tales como la ricina, toxina de *C. difficile*, exotoxina de pseudomonas, ricina, toxina diftérica, toxina botulínica, briodina, saporina, toxinas de hierba carmín (es decir, fitolaccatoxina y fitolaccigenina), y otras tales como las expuestas en Sapra et al., Pharmacol. & Therapeutics, 2013, 138:452-469.

60 La presente invención también incluye conjugados de anticuerpo-radionúclido (ARC) que comprenden anticuerpos anti-EGFRvIII conjugados a uno o más radionúclidos. Los radionúclidos ejemplares que se pueden usar en el contexto de este aspecto de la invención incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, ²²⁵Ac, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ²²⁷Th, ²²²Rn, ²²³Ra, ²²⁴Ra, y ⁹⁰Y.

En determinadas realizaciones de la presente invención, se proporcionan ADC que comprenden un anticuerpo anti-EGFRvIII conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, cualquiera de los agentes citotóxicos desvelados anteriormente) a través de una molécula enlazadora. Se puede usar cualquier molécula enlazadora o tecnología enlazadora conocida en la técnica para crear o construir un ADC de la presente invención. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador escindible. De acuerdo con otras realizaciones, el enlazador es un enlazador no escindible. Los enlazadores ejemplares que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, enlazadores que comprenden o consisten en, por ejemplo, MC (6-maleimidocaproilo), MP (maleimidopropanoilo), val-cit (valina-citrulina), val-ala (valina-alanina), sitio dipeptídico en el enlazador escindible por proteasa, ala-phe (alanina-fenilalanina), sitio dipeptídico en el enlazador escindible por proteasa, PAB (p-aminobenziloxicarbonilo), SPP (4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo), SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo), SIAB ((4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo), y variantes y combinaciones de los mismos. Se desvelan ejemplos adicionales de enlazadores que pueden usarse en el contexto de la presente invención, por ejemplo, en el documento US 7.754.681 y en Ducry, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21:5-13, y las referencias allí citadas.

La presente invención comprende ADC en los que un enlazador conecta un anticuerpo anti-EGFRvIII o una molécula de unión a antígeno a un fármaco o citotoxina a través de una unión a un aminoácido particular dentro del anticuerpo o molécula de unión a antígeno. Ejemplos de uniones de aminoácidos que se pueden usar en el contexto de este aspecto de la invención incluyen, por ejemplo, lisina (véase, por ejemplo, el documento US 5.208.020; el documento US 2010/0129314; Hollander et al., *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; el documento WO 2005/089808; el documento US 5.714.586; el documento US 2013/0101546; y el documento US 2012/0585592), cisteína (véase, por ejemplo, el documento US 2007/0258987; el documento WO 2013/055993; el documento WO 2013/055990; el documento WO 2013/053873; el documento WO 2013/053872; el documento WO 2011/130598; el documento US 2013/0101546; y el documento US 7.750.116), selenocisteína (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/122039; y Hofer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451-12456), formilglicina (véase, por ejemplo, Carrico et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, y Rabuka et al., *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), aminoácidos no naturales (véase, por ejemplo, los documentos WO 2013/068874 y WO 2012/166559), y aminoácidos ácidos (véase, por ejemplo, el documento WO 2012/05982). Los enlazadores también pueden conjugarse con una proteína de unión a antígeno mediante la unión a carbohidratos (véase, por ejemplo, el documento US 2008/0305497, y Ryan et al., *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130) y enlazadores disulfuro (véase, por ejemplo, el documento WO 2013/085925, el documento WO 2010/010324, el documento WO 2011/018611, y Shaunak et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312-313).

Cualquier método conocido en la técnica para conjugar una fracción química con un péptido, polipéptido u otra macromolécula se puede usar en el contexto de la presente invención para elaborar un ADC anti-EGFRvIII como se describe en el presente documento. Un método ejemplar para la conjugación de anticuerpo-fármaco a través de un enlazador se expone en el Ejemplo 12 en el presente documento. Los expertos en la materia apreciarán las variaciones en este método ejemplar y se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

De acuerdo con determinadas realizaciones, la presente invención proporciona ADC, en donde el anticuerpo anti-EGFRvIII (por ejemplo, el anticuerpo designado H1H1863N2) se conjuga con una composición de fármaco-enlazador como se expone en el documento WO2014/145090 (por ejemplo, el compuesto "7", también denominado en el presente documento "M0026") (véase también el Ejemplo 12, en el presente documento).

45 Mapeo de epítomos y tecnologías relacionadas

El epítomo al que se unen los anticuerpos descritos en el presente documento puede consistir en una sola secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una proteína EGFRvIII. Como alternativa, el epítomo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) de EGFRvIII. En algunos casos, el epítomo se ubica en o cerca del dominio de unión a ligando de EGFRvIII. En otros casos, el epítomo se ubica fuera del dominio de unión a ligando de EGFRvIII, por ejemplo, en una ubicación en la superficie de EGFRvIII en la que un anticuerpo, cuando se une a dicho epítomo, no interfiere con la unión del ligando a EGFRvIII.

La presente invención, de acuerdo con determinadas realizaciones, se refiere a anticuerpos anti-EGFRvIII que se unen específicamente a EGFRvIII (y no se unen a EGFR), en donde los anticuerpos reconocen el péptido de unión EGFRvIII (por ejemplo, SEQ ID NO: 148). Dichos anticuerpos pueden denominarse en el presente documento "aglutinantes de péptidos de unión", "anticuerpos de unión a péptidos EGFRvIII", y similares. La presente invención, de acuerdo con otras realizaciones, se refiere a anticuerpos anti-EGFRvIII que se unen específicamente a EGFRvIII (y no se unen a EGFR), en donde los anticuerpos no reconocen el péptido de unión EGFRvIII (por ejemplo, no reconocen el péptido de unión de la SEQ ID NO: 148, y/o no reconocen el péptido de la SEQ ID NO: 165). Dichos anticuerpos pueden denominarse en el presente documento "aglutinantes conformacionales", "aglutinantes conformacionales de epítomos EGFRvIII" y similares.

Pueden usarse diversas técnicas conocidas para los expertos en la materia para determinar si un anticuerpo "interacciona con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas ejemplares incluyen, por

ejemplo, ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies*, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis mutacional de barrido con alanina, análisis de transferencias de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), y análisis de escisión de péptidos. Además, pueden emplearse métodos tales como escisión de epítomos, extracción de epítomos y modificación química de antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interacciona un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio hidrógeno/deuterio implica el marcaje con deuterio de la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere a agua para permitir que tenga lugar el intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los restos excepto los restos protegidos por el anticuerpo (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión por proteasa y análisis de espectrometría de masas, revelando de esta manera los restos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interacciona el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

T En el presente documento se desvelan anticuerpos anti-EGFRvIII que se unen al mismo epítomo que cualquiera de los anticuerpos específicos ejemplares descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se exponen en la Tabla 1 del presente documento). En el presente documento también se desvelan anticuerpos anti-EGFRvIII que compiten por la unión a EGFRvIII con cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se exponen en la Tabla 1 del presente documento).

Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítomo que, o compite por la unión con, un anticuerpo anti-EGFRvIII de referencia usando métodos rutinarios conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de ensayo se une al mismo epítomo que un anticuerpo anti-EGFRvIII de referencia, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína EGFRvIII. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de ensayo de unirse a la molécula EGFRvIII. Si el anticuerpo de ensayo puede unirse a EGFRvIII después de la unión por saturación con el anticuerpo anti-EGFRvIII de referencia, puede concluirse que el anticuerpo de ensayo se une a un epítomo diferente del anticuerpo anti-EGFRvIII de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de ensayo no puede unirse a la molécula EGFRvIII después de la unión por saturación con el anticuerpo anti-EGFRvIII de referencia, entonces el anticuerpo de ensayo puede unirse al mismo epítomo que el epítomo al que se une el anticuerpo anti-EGFRvIII de referencia. Entonces puede realizarse experimentación rutinaria adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la ausencia observada de unión del anticuerpo de ensayo se debe, de hecho, a la unión al mismo epítomo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la ausencia de la unión observada.

Los experimentos de este tipo pueden realizarse usando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión de anticuerpos disponible en la técnica. En algunos casos, dos anticuerpos se unen al mismo epítomo (o a epítomos solapantes) si, por ejemplo, un exceso en un factor de 1, 5, 10, 20 o 100 de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos un 50 %, pero preferentemente en un 75 %, 90 % o incluso un 99 %, medida en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). Como alternativa, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítomo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácido en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Se considera que dos anticuerpos tienen "epítomos solapantes" si únicamente un subconjunto de las mutaciones de aminoácido que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

Para determinar si un anticuerpo compite por la unión (o compite de forma cruzada por la unión) con un anticuerpo anti-EGFRvIII de referencia, se realiza la metodología de unión descrita anteriormente en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína EGFRvIII en condiciones de saturación seguido por la evaluación de la unión del anticuerpo de ensayo a la molécula EGFRvIII. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de ensayo se una a una molécula EGFRvIII en condiciones de saturación seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula EGFRvIII. Si, en ambas orientaciones, únicamente el primer anticuerpo (de saturación) puede unirse a la molécula EGFRvIII, entonces se concluye que el anticuerpo de ensayo y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a EGFRvIII. Como apreciará un experto en la materia, es posible que un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia no se una necesariamente al mismo epítomo que el anticuerpo de referencia, sino que puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia mediante la unión a un epítomo solapante o adyacente.

Preparación de anticuerpos humanos

Los anticuerpos anti-EGFRvIII de la invención pueden ser anticuerpos completamente humanos. Los métodos para generar anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos monoclonales completamente humanos son conocidos en la técnica. Cualquiera de dichos métodos conocidos puede usarse en el contexto de la presente invención para preparar anticuerpos humanos que se unan específicamente a EGFRvIII humana.

Usando la tecnología VELOCIMUNE™, por ejemplo, o cualquier otro método conocido similar para generar

anticuerpos monoclonales completamente humanos, los anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra EGFRvIII se aíslan inicialmente teniendo una región variable humana y una región constante de ratón. Como en la siguiente sección experimental, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para las características deseables, entre las que se incluyen la afinidad, la actividad de bloqueo del ligando, la selectividad, el epítipo, etc. Si es necesario, las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada, por ejemplo, IgG1 o IgG4 de tipo silvestre o modificada, para generar un anticuerpo anti-EGFRvIII completamente humano. Aunque la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad de diana residen en la región variable. En determinados casos, los anticuerpos anti-EGFRvIII completamente humanos se aíslan directamente de los linfocitos B positivos para el antígeno.

Bioequivalentes

Los anticuerpos anti-EGFRvIII y fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos, pero que conservan la capacidad de unirse a EGFRvIII humana. Dichos anticuerpos variantes y fragmentos de anticuerpo comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia precursora, pero muestran actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Asimismo, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-EGFRvIII de la presente divulgación abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia desvelada, pero que codifican un anticuerpo anti-EGFRvIII o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo anti-EGFRvIII o fragmento de anticuerpo de la divulgación. Anteriormente se han analizado ejemplos de dichas secuencias variantes de aminoácido y ADN.

Dos proteínas de unión a antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, en una sola dosis o en múltiples dosis. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su tasa de absorción y aún pueden considerarse bioequivalentes porque dichas diferencias en la tasa de absorción son intencionadas y se reflejan en el marcaje, no son esenciales para obtener las concentraciones eficaces del fármaco en el organismo en, por ejemplo, el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacológico particular estudiado.

En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente importantes en su seguridad, pureza y potencia.

En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o eficacia disminuida, en comparación con la terapia continuada sin dicho cambio.

En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos comunes de acción para la afección o afecciones de uso, en la medida en que dichos mecanismos sean conocidos.

La bioequivalencia puede demostrarse por métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos, en los que se mide la concentración del anticuerpo o sus metabolitos en sangre, plasma, suero u otro líquido biológico como una función del tiempo; (b) un ensayo *in vitro* que se ha correlacionado con y es razonablemente predictivo de datos de biodisponibilidad *in vivo* en seres humanos; (c) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en el que se mide el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

Las variantes bioequivalentes de anticuerpos anti-EGFRvIII de la divulgación pueden construirse, por ejemplo, generando diversas sustituciones de restos o secuencias o eliminando restos terminales o internos o secuencias no necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, pueden eliminarse restos de cisteína no esenciales para la actividad biológica, o remplazarse con otros aminoácidos, para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpo anti-EGFRvIII que comprenden cambios de aminoácido que modifican las características de glucosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o retiran la glucosilación.

Selectividad de especie y reactividad cruzada de especie

La presente invención, de acuerdo con determinadas realizaciones, proporciona anticuerpos anti-EGFRvIII se unen a EGFRvIII humana, pero no a EGFRvIII de otras especies. La presente invención también incluye anticuerpos anti-EGFRvIII que se unen a EGFRvIII humana y a EGFRvIII de una o más especies no humanas. Por ejemplo, los

anticuerpos anti-EGFRVIII de la invención pueden unirse a EGFRVIII humana y pueden unirse o no, según sea el caso, a uno o más EGFRVIII de ratón, rata, cobaya, hámster, jerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, macaco cangrejero, tití, macaco de la India o chimpancé. De acuerdo con determinadas realizaciones ejemplares de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-EGFRVIII que se unen específicamente a EGFRVIII humana y EGFRVIII de macaco cangrejero (por ejemplo, *Macaca fascicularis*). Otros anticuerpos anti-EGFRVIII de la invención se unen a EGFRVIII humana, pero no se unen, o se unen solo débilmente, a EGFRVIII de macaco cangrejero.

Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Los anticuerpos anti-EGFRVIII de la presente invención pueden unirse a o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse de forma funcional (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una segunda especificidad de unión.

La presente invención incluye anticuerpos biespecíficos en los que un brazo de una inmunoglobulina se une a EGFRVIII humana, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para un segundo antígeno. En determinadas realizaciones, el brazo de unión a EGFRVIII se une a EGFRVIII humana y bloquea la unión del ligando a EGFRVIII. En otras realizaciones, el brazo de unión a EGFRVIII se une a EGFRVIII humana pero no bloquea la unión del ligando a EGFRVIII.

Un formato de anticuerpo biespecífico ejemplar que puede usarse en el contexto de la presente invención implica el uso de un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio C_H3 de Ig, en el que el primer y el segundo dominio C_H3 de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en el que al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una realización, el primer dominio C_H3 de Ig está unido a proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a proteína A tal como una modificación H95R (por numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Otras modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG4. Dentro del alcance de la presente invención se contemplan variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente.

Otros formatos biespecíficos ejemplares que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpos, fusiones IgG-scFv, dominio variable dual (DVD) -Ig, Cuadroma, pomos en agujeros, cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con pomos en agujeros, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)cuerpo, cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, formatos biespecíficos Fab (DAF)-IgG y Mab² de doble acción (véase, por ejemplo, Klein et al. 2012, *AcM* 4:6, 1-11, y las referencias citadas en el presente documento, para una revisión de los formatos anteriores). Los anticuerpos biespecíficos también se pueden construir utilizando la conjugación péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en donde aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal se usan para generar conjugados de oligonucleótidos-anticuerpos específicos del sitio que luego se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (Véase, por ejemplo, Kazane et al., *J. Am. Chem. Soc.* [*Epub: 4 de diciembre de 2012*]).

Formulación terapéutica y administración

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-EGFRVIII o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia, administración, tolerancia y similares mejoradas. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido para todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Véase también, Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA* (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

La dosis de anticuerpo administrada a un paciente puede variar dependiendo de la edad y las dimensiones del

paciente, la enfermedad diana, las condiciones, la vía de administración y similares. La dosis preferida se calcula normalmente de acuerdo con el peso corporal o el área superficial del cuerpo. En un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar por vía intravenosa el anticuerpo de la presente invención, normalmente en una única dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, pueden ajustarse la frecuencia y la duración del tratamiento. Las dosificaciones eficaces y posologías para administrar anticuerpos anti-EGFRvIII pueden determinarse empíricamente; por ejemplo, puede controlarse el progreso del paciente por evaluación periódica, y ajustarse la dosis en consecuencia. Además, pueden realizarse aumentos de escala de las dosificaciones entre especies usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y vías orales. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede suministrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa convencionales. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración de pluma preparado tiene aplicaciones en la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de administración de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y remplazarse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de administración de pluma entonces puede reutilizarse. En un dispositivo de administración de pluma desechable, no hay un cartucho reemplazable. En cambio, el dispositivo de administración de pluma desechable viene prellenado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, el dispositivo completo se desecha.

Numerosos dispositivos de administración de pluma y autoinyector reutilizables tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, RU), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly y Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de administración de pluma desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.), y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar solo algunos.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, anteriormente citado; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos; véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. En otra realización más, un sistema de liberación controlada puede ubicarse en las proximidades de la diana de la composición, requiriendo por tanto solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pág. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión por Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos para el público. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal, descrita anteriormente, en un medio acuoso estéril o un medio oleoso convencionalmente usado para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que puede usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleaginoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de semilla de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección así preparada se introduce

preferentemente en una ampolla apropiada.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente contenida generalmente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo mencionado anteriormente esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas farmacéuticas.

Usos terapéuticos de los anticuerpos

La presente invención incluye composiciones para su uso en un método para tratar un cáncer o tumor que expresa EGFRvIII. Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto que lo necesite una composición terapéutica que comprende el anticuerpo anti-EGFRvIII de la invención o un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-EGFRvIII de la invención. La composición terapéutica también puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos y ADC de la invención son útiles, entre otras cosas, para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con o mediado por la expresión o actividad de EGFRvIII, o se pueden tratar mediante el bloqueo de la interacción entre EGFRvIII y un ligando de EGFR o la inhibición de otro modo de la actividad y/o señalización de EGFRvIII, y/o la promoción de la internización del receptor y/o la disminución del número de receptores en la superficie celular. Por ejemplo, los anticuerpos y ADC de la presente invención son útiles para el tratamiento de tumores que expresan EGFRvIII y/o que responden a la señalización mediada por ligando. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención también pueden usarse para tratar tumores primarios y/o metastásicos que surgen en el cerebro y las meninges, orofaringe, el árbol pulmonar y bronquial, el tracto gastrointestinal, el sistema reproductor masculino y femenino, el músculo, hueso, la piel y anejos cutáneos, el tejido conjuntivo, bazo, el sistema inmunitario, las células que forman la sangre y la médula ósea, el hígado y el sistema urinario, y órganos sensitivos especiales tales como el ojo. En determinadas realizaciones, los anticuerpos y ADC de la invención se usan para tratar uno o más de los siguientes cánceres: carcinoma de células renales, carcinoma de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, gliomas malignos, osteosarcoma, cáncer colorrectal, cáncer gástrico (por ejemplo, cáncer gástrico con amplificación MET), mesotelioma maligno, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer microcítico de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, sarcoma sinovial, cáncer de tiroides, cáncer de mama o melanoma.

En el contexto de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-EGFRvIII puede administrarse como una monoterapia (es decir, como el único agente terapéutico) o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales (cuyos ejemplos se describen en otra parte en el presente documento).

De acuerdo con realizaciones específicas, la presente invención proporciona composiciones para su uso en un método para tratar un cáncer, reducir el crecimiento del tumor y/o causar la regresión del tumor en un paciente. Los métodos pueden comprender administrar a un paciente un primer conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) solo o en combinación con un segundo anticuerpo anti-EGFRvIII o ADC. El primer ADC comprenderá normalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo y una citotoxina, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del primer ADC se une específicamente a EGFRvIII pero no se une al péptido EGFRvIII de unión de la SEQ ID NO: 148 o al péptido de la SEQ ID NO: 165 (es decir, el primer ADC comprende un anticuerpo de unión a EGFRvIII conformacional). En realizaciones en las que se administra un segundo anticuerpo o ADC, el segundo anticuerpo o ADC normalmente comprenderá un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo y una citotoxina, en donde el segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a EGFRvIII y también se une al péptido EGFRvIII de unión de SEQ ID NO: 148 y/o al péptido de SEQ ID NO: 165 (es decir, el segundo anticuerpo o ADC comprende un anticuerpo de unión a péptido de unión EGFRvIII). Cuando se usan dos ADC anti-EGFRvIII separados en el contexto de este aspecto de la invención, ambos ADC pueden, en determinadas realizaciones, comprender el mismo agente citotóxico o la misma clase de agente citotóxico. En otras realizaciones en las que se usan dos ADC anti-EGFRvIII separados, cada ADC puede comprender un agente citotóxico diferente y/o una clase diferente de agente citotóxico. Las realizaciones ejemplares no limitativas de este aspecto de la invención se exponen en el presente documento en el Ejemplo 14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del primer ADC (es decir, el anticuerpo de unión a EGFRvIII conformacional) comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46 y 48, o la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 34 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 42.

Terapias combinadas y formulaciones

La presente invención incluye composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-EGFRvIII de la invención en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales, y métodos de tratamiento que comprenden administrar dichas combinaciones a sujetos que lo necesiten.

Los anticuerpos anti-EGFRvIII de la presente invención se pueden formular conjuntamente con y/o administrar en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales seleccionados del grupo que consiste en: un antagonista de PRLR (por ejemplo, un anticuerpo anti-PRLR o inhibidor de molécula pequeña de PRLR), un antagonista de EGFR (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR [por ejemplo, cetuximab o panitumumab] o inhibidor de molécula pequeña de EGFR [por ejemplo, gefitinib o erlotinib]), un antagonista de otro miembro de la familia EGFR tal como Her2/ErbB2, ErbB3 o ErbB4 (por ejemplo, anti-ErbB2 [por ejemplo, trastuzumab o T-DM1 {KADCYLA®}], anticuerpo anti-ErbB3 o anti-ErbB4 o inhibidor de molécula pequeña de la actividad de ErbB2, ErbB3 o ErbB4), un antagonista de cMET (por ejemplo, un anticuerpo anti-cMET), un antagonista de IGF1R (por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF1R), un inhibidor de B-raf (por ejemplo, vemurafenib, sorafenib, GDC-0879, PLX-4720), un inhibidor de PDGFR- α (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR- α), un inhibidor de PDGFR- β (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR- β o inhibidor de cinasa de molécula pequeña tal como, por ejemplo, mesilato de imatinib o malato de sunitinib), un inhibidor del ligando de PDGF (por ejemplo, anticuerpo anti-PDGF-A, -B, -C o -D, aptámero, ARNip, etc.), un antagonista de VEGF (por ejemplo, un VEGF-Trap tal como aflibercept, véase, por ejemplo, el documento US 7087411 (también mencionado en el presente documento como "proteína de fusión inhibidora de VEGF"), anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab), un inhibidor de cinasa de molécula pequeña del receptor de VEGF (por ejemplo, sunitinib, sorafenib o pazopanib)), un antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-DLL4 desvelado en el documento US 2009/0142354 como REGN421), un antagonista de Ang2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-Ang2 desvelado en el documento US 2011/0027286 como H1H685P), un antagonista de FOLH1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-FOLH1), un antagonista de STEAP1 o STEAP2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-STEAP1 o un anticuerpo anti-STEAP2), un antagonista de Tmprss2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-Tmprss2), un antagonista de MSLN (por ejemplo, un anticuerpo anti-MSLN), un antagonista de CA9 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CA9), un antagonista de uroplakin (por ejemplo, un anti-uroplakin [por ejemplo, anticuerpo anti-UPK3A]), un antagonista de MUC16 (por ejemplo, un anticuerpo anti-MUC16), un antagonista de antígeno Tn (por ejemplo, un anticuerpo anti-Tn), un antagonista de CLEC12A (por ejemplo, un anticuerpo anti-CLEC12A), un antagonista de TNFRSF17 (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNFRSF17), un antagonista de LGR5 (por ejemplo, un anticuerpo anti-LGR5), un antagonista de CD20 monovalente (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD20 monovalente tal como rituximab), un anticuerpo PD-1, un anticuerpo PD-L1, un anticuerpo CD3, un anticuerpo CTLA-4, etc. Otros agentes que pueden administrarse beneficiosamente en combinación con las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa, y los inhibidores de citocinas, incluyendo inhibidores de citocina de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 o a sus receptores respectivos.

La presente invención incluye composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-EGFRvIII descritos en la invención en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CytosanTM); alquilantales tales como busulfán, improfulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clorofazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como las aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antisuiparrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSKTM; razoxana; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TaxolTM, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TaxotereTM; Aventis Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos que incluyen tamoxifeno, raloxifeno, inhibidores de la aromatasa 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y

goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Los anticuerpos anti-EGFRvIII de la invención también pueden administrarse y/o formularse conjuntamente en combinación con antivíricos, antibióticos, analgésicos, corticoesteroides, esteroides, oxígeno, antioxidantes, inhibidores de COX, cardioprotectores, quelatos metálicos, IFN-gamma y/o AINE.

El o los componentes terapéuticamente activos adicionales, por ejemplo, cualquiera de los agentes enumerados anteriormente o derivados de los mismos, pueden administrarse justo antes de, simultáneamente con o poco después de la administración de un anticuerpo anti-EGFRvIII de la presente invención; (para los fines de la presente divulgación, dichos regímenes de administración se consideran la administración de un anticuerpo anti-EGFRvIII "en combinación con" un componente terapéuticamente activo adicional). La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-EGFRvIII de la presente invención se formula conjuntamente con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte en el presente documento.

Regímenes de administración

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo anti-EGFRvIII (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-EGFRvIII y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales mencionados en el presente documento) puede administrarse en dosis múltiples a un sujeto durante un período de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de un anticuerpo anti-EGFRvIII de la invención. Como se usa en el presente documento, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de anticuerpo anti-EGFRvIII se administra al sujeto en un diferente punto en el tiempo, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una única dosis inicial de un anticuerpo anti-EGFRvIII, seguida por una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-EGFRvIII, y opcionalmente seguidas por una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-EGFRvIII.

Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias", y "dosis terciarias", se refieren a la secuencia temporal de administración del anticuerpo anti-EGFRvIII de la invención. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al inicio del régimen de tratamiento (también mencionada como la "dosis basal"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener la misma cantidad de anticuerpo anti-EGFRvIII, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. En determinadas realizaciones, sin embargo, la cantidad de anticuerpo anti-EGFRvIII contenida en la dosis inicial, secundaria y/o terciaria varía entre sí (por ejemplo, ajustada hacia arriba o hacia abajo según sea apropiado) durante el curso del tratamiento. En determinadas realizaciones, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dosis se administran al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguidas de dosis posteriores que se administran con menos frecuencia (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

En determinadas realizaciones ejemplares de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra de 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La expresión "la dosis inmediatamente anterior", como se utiliza en el presente documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis de anticuerpo anti-EGFRvIII que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender administrar a un paciente cualquier cantidad de dosis secundarias y/o terciarias de un anticuerpo anti-EGFRvIII. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se administra únicamente una sola dosis secundaria al paciente. En otras realizaciones, se administran al paciente dos o más dosis secundarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más). Asimismo, en determinadas realizaciones, se administra únicamente una sola dosis terciaria al paciente. En otras realizaciones, se administran al paciente dos o más dosis terciarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más). El régimen de administración puede llevarse a cabo indefinidamente a lo largo de la vida de un sujeto en particular, o hasta que dicho tratamiento ya no sea terapéuticamente necesario o ventajoso.

En realizaciones que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente de 1 a 2 semanas o de 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. De forma similar, en realizaciones que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria puede administrarse al paciente de 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En determinadas realizaciones de la invención, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar en el curso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ajustarse durante el curso de tratamiento por un médico dependiendo de las necesidades del paciente individual después de examen clínico.

La presente invención incluye regímenes de administración en los que se administran de 2 a 6 dosis de carga a un paciente en una primera frecuencia de (por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguido de la administración de dos o más dosis de mantenimiento al paciente con menos frecuencia. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la invención, si las dosis de carga se administran con una frecuencia de una vez al mes, entonces las dosis de mantenimiento se pueden administrar al paciente una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, etc.

Usos de diagnóstico de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-EGFRvIII de la presente invención también pueden usarse para detectar y/o medir EGFRvIII, o células que expresan EGFRvIII, en una muestra, por ejemplo, con fines de diagnóstico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFRvIII, o fragmento del mismo, puede usarse para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por la expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión, subexpresión, ausencia de expresión, etc.) de EGFRvIII. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para EGFRvIII pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-EGFRvIII de la invención, en donde el anticuerpo anti-EGFRvIII está marcado con un marcador detectable o molécula indicadora. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo anti-EGFRvIII no marcado en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está marcado de forma detectable por sí mismo. El marcador detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; una fracción fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como una fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano rústico o luciferasa. Los ensayos ejemplares específicos que pueden usarse para detectar o medir EGFRvIII en una muestra incluyen ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Las muestras que pueden usarse en ensayos de diagnóstico de EGFRvIII de acuerdo con la presente divulgación incluyen cualquier tejido o muestra de fluido que se puede obtener de un paciente que contiene cantidades detectables de proteína EGFRvIII o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. Generalmente, se medirán los niveles de EGFRvIII en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente no afectado por una enfermedad o afección asociada con niveles o actividad de EGFRvIII anómalos) para establecer inicialmente un nivel de referencia, o patrón, de EGFRvIII. Este nivel de referencia de EGFRvIII después puede compararse con los niveles de EGFRvIII medidos en muestras obtenidas de individuos de los que se sospecha que tienen un trastorno o afección relacionado con EGFRvIII.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados, pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos anti-EGFRvIII

Se obtuvieron anticuerpos anti-EGFRvIII mediante la inmunización de un ratón VELOCIMMUNE® (es decir, un ratón diseñado por ingeniería genética que comprende ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana) con un inmunógeno que comprende el dominio extracelular de EGFRvIII. Los anticuerpos del primer conjunto incluyen los anticuerpos designados como H1H2194P, H1H2195P, H2M1863N2, H2M1911N, H2M1912N, H2M1915N, H2M1917N, H2M1918N y H3M1913N (como se muestra en las Tablas 1 y 2).

La respuesta inmunitaria de anticuerpo se controló por un inmunoensayo específico de EGFRvIII. Cuando se consiguió una respuesta inmunitaria deseada, se recogieron los esplenocitos y se fusionaron con células de mieloma de ratón para conservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se criaron y seleccionaron para identificar líneas celulares que producían anticuerpos específicos para EGFRvIII. Usando esta técnica, se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-EGFRvIII (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón). Además, varios anticuerpos anti-EGFRvIII completamente humanos se aislaron directamente de linfocitos B positivos para antígenos sin fusión a células de mieloma, como se describe en el documento US 2007/0280945A1.

Por separado, también se preparó H1H1863N2 con fucosilación reducida ["H1H1863N2(Fuc-)"] en una línea de células hospedadoras CHO que se describió como "8088" en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2010/0304436A1. En resumen, las secuencias de cadena ligera y cadena pesada de H1H1863N2 se clonaron en vectores de expresión. Dos millones de células 8088 se transfectaron con los plásmidos de cadena ligera y pesada, y el vector pR4004 que contiene el gen que codifica Cre. Las células transfectadas que sobrevivieron a la selección con 400 µg/ml de higromicina se adaptaron para crecer en suspensión en un medio sin suero y sin fucosa. Las células que

expresaban la proteína fluorescente EGFP pero no DsRed o ECFP de las células transfectadas se aislaron mediante citometría de flujo. Las células clasificadas se sembraron en un matraz agitador a 4×10^5 células/ml y, tres días después, se recogió el medio de cultivo y la proteína del anticuerpo [es decir, H1H1863N2(Fuc-)] se purificó mediante cromatografía de Proteína A. El análisis de espectrometría de masas del H1H1863N2(Fuc-) resultante confirmó que la fucosa central se eliminó en relación con el anticuerpo original H1H1863N2(Fuc+). Las designaciones, "H1H1863N2" y "H1H1863N2(Fuc+)" en el presente documento, indican el anticuerpo original sin modificaciones de fucosilación.

Determinadas propiedades biológicas de los anticuerpos anti-EGFRvIII ejemplares generados de acuerdo con los métodos de este ejemplo se describen en detalle en los ejemplos expuestos a continuación.

Ejemplo 2. Secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera

La Tabla 1 expone los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de anticuerpos anti-EGFRvIII seleccionados. Los correspondientes identificadores de secuencia de ácido nucleico se exponen en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de secuencia de aminoácidos

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H2195P	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M1863N2	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M1911N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M1912N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M1915N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M1917N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M1918N	114	116	118	120	122	124	126	128
H3M1913N	130	132	134	136	138	140	142	144

Tabla 2: Identificadores de secuencia de ácido nucleico

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H2195P	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M1863N2	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M1911N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M1912N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M1915N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M1917N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M1918N	113	115	117	119	121	123	125	127
H3M1913N	129	131	133	135	137	139	141	143

Los anticuerpos se denominan normalmente en el presente documento de acuerdo con la siguiente nomenclatura: prefijo Fc (por ejemplo, "H1H", "H2M", "H3M", etc.), seguido de un identificador numérico (por ejemplo, "2194", "2195", "1863", etc.), seguido de un sufijo "P" o "N", como se muestra en las Tablas 1 y 2. Por lo tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede denominarse en el presente documento como, por ejemplo, "H1H2194N," "H2M1911N," "H3M1913N," etc. Los prefijos H1H, H2M y H3M en las designaciones de anticuerpos usadas en el presente documento indican el isotipo particular de la región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo "H1H" tiene un Fc de IgG1 humana, un anticuerpo "H2M" tiene un Fc de IgG2 de ratón, y un anticuerpo "H3M" tiene un Fc de IgG3 de ratón, (todas las regiones variables son completamente humanas como se indica por la primera "H" en la designación del anticuerpo). Como apreciará un experto en la materia, un anticuerpo que tenga un isotipo Fc particular puede convertirse en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con un Fc de IgG1 de ratón puede convertirse en un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluidas las CDR), indicados por los identificadores numéricos mostrados en las Tablas 1 y 2, seguirán siendo los mismos, y se espera que las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

Construcciones de control usadas en los siguientes Ejemplos

Se incluyeron construcciones de control en los siguientes experimentos con fines comparativos: Control I: Anticuerpo anti-EGFRvIII humana (IgG 1) con dominios variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias de aminoácidos correspondientes a las SEQ ID NO: 142 y 144, respectivamente, del anticuerpo "13.1.2" desvelado en la Patente de Estados Unidos N.º 7.736.644; Control II: Anticuerpo anti-EGFRvIII quimérico (hlgG1) con dominios

variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias de aminoácidos correspondientes a las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente, del anticuerpo "ch806" desvelado en la Patente de Estados Unidos N.º 7.589.180; Control III: Anticuerpo anti-EGFRvIII humanizado (hIgG 1) con dominios variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias de aminoácidos correspondientes a las SEQ ID NO: 42 y 47, respectivamente, del anticuerpo "hu806" desvelado en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2010/0056762; Control IV: un anticuerpo anti-EGFR quimérico con dominios variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de los dominios correspondientes de "C225", como se expone en el documento US 7.060.808; y Control V: Anticuerpo anti-EGFRvIII humana (hIgG1) con dominios variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias de aminoácidos correspondientes a las SEQ ID NO: 2 y 19, respectivamente, del anticuerpo "131" de la Patente de Estados Unidos N.º 7.736.644 B2. Se sabe que el anticuerpo "13.1.2" es específico para el péptido de unión (SEQ ID NO: 148) de EGFRvIII; y se sabe que los anticuerpos "ch806" y "hu806" se unen a los restos 311-326 (SEQ ID NO: 165) de EGFR (SEQ ID NO: 146), que está amplificado o sobreexpresado, o los restos 44-59 de EGFRvIII (SEQ ID NO: 147).

15 Ejemplo 3. Determinación de la afinidad de unión de EGFRvIII

Las afinidades de unión y constantes cinéticas de anticuerpos anti-EGFRvIII monoclonales humanos se determinaron por resonancia de plasmón de superficie a 37 °C. Las mediciones se realizaron en un instrumento T100 BIACORE™. Los anticuerpos, expresados como Fc de IgG1 humana (es decir, designaciones "H1H"), se capturaron en una superficie del sensor de Fc antihumano (formato de captura de AcM), y las proteínas monoméricas [EGFR-mmh (SEQ ID NO: 154) y EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152)] o diméricas [EGFR-mFc (SEQ ID NO: 155) y EGFRvIII-mFc (SEQ ID NO: 153)] solubles se inyectaron sobre la superficie. En el formato captura de receptor, se capturó EGFRvIII-mFc o EGFR-mFc, en el chip BIACORE™ y los anticuerpos respectivos fluyeron. Las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) cinéticas se determinaron mediante el procesamiento y el ajuste de los datos a un modelo de unión 1:1 utilizando el programa informático de ajuste de curvas Scrubber 2.0. Las constantes en equilibrio de disociación de unión (K_D) y las semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinéticas como: $K_D (M) = k_d/k_a$; y $t_{1/2} (min) = \ln 2 / (60 * k_d)$.

Los resultados se presentan en las Tablas 3 y 4. SU = sin unión en las condiciones probadas; NP = no probado.

Tabla 3 (Cinética de unión de los anticuerpos Fc humanos)

Unión a 37 °C/Formato de captura de AcM					
Ac	Analito	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (M)$	$T_{1/2}$
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mmh	1.97E+04	8.95E-03	4.54E-07	1,3
	EGFR-mmh	NP	NP	NP	NP
	EGFRvIII-mFc	7.28E+04	8.07E-04	1.11E-08	14
	EGFR-mFc	NP	NP	NP	NP
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mmh	3.02E+04	1.02E-02	3.39E-07	1,1
	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mFc	1.12E+05	6.42E-04	5.73E-09	18
	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU
H1H1911N	EGFRvIII-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mFc	SU	SU	SU	SU
	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU
H1H1912N	EGFRvIII-mmh	1.83E+04	1.64E-02	8.99E-07	0,7

(continuación)

Unión a 37 °C/Formato de captura de AcM					
Ac	Analito	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)	T _{1/2}
	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mFc	2.04E+04	9.71E-04	4.77E-08	12
	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU
H1H1913N	EGFRvIII-mmh	1.63E+02	1.14E-03	7.03E-06	10
	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mFc	1.40E+04	3.16E-04	2.26E-08	37
H1H1915N	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
H1H2194P	EGFRvIII-mFc	SU	SU	SU	SU
	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mmh	8.10E+04	1.37E-03	1.70E-08	8
	EGFR-mmh	7.60E+04	9.60E-04	1.26E-08	12
H1H2195P	EGFRvIII-mFc	9.54E+04	2.22E-04	2.33E-09	52
	EGFR-mFc	8.10E+04	1.99E-04	2.43E-09	58
	EGFRvIII-mmh	6.48E+04	6.94E-04	1.07E-08	17
	EGFR-mmh	5.66E+04	5.23E-04	9.20E-09	22
Control I	EGFRvIII-mFc	1.02E+05	1.13E-04	1.10E-09	103
	EGFR-mFc	9.20E+04	1.89E-04	2.05E-09	61
	EGFRvIII-mmh	1.29E+05	1.53E-01	1.19E-06	0,1
Control II	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mFc	7.15E+04	7.36E-03	1.03E-07	1,6
	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mmh	4.90E+04	7.33E-03	1.50E-07	2
Control III	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mFc	2.02E+05	4.08E-04	2.02E-09	28
	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mmh	8.57E+04	5.16E-03	6.02E-08	2,2
Control V	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mFc	2.52E+05	2.98E-04	1.18E-09	39
	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mmh	1.94E+05	1.59E-02	8.20E-08	1
Control V	EGFR-mmh	SU	SU	SU	SU
	EGFRvIII-mFc	1.91 E+05	3.71 E-04	1.95E-09	31
	EGFR-mFc	NP	NP	NP	NP

Tabla 4 (Cinética de unión de los anticuerpos Fc humanos)

Unión a 37 °C/Formato de captura de receptor					
Ac	Receptor capturado	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)	T _{1/2}
H1H1863N2(Fuc+)	EGFRvIII-mFc	9.00E+05	2.06E-04	2.30E-10	56
	EGFR-mFc	2.11E+05	1.82E-01	8.65E-07	0,1
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mFc	1.01E+06	2.15E-04	2.10E-10	54
	EGFR-mFc	1.99E+05	4.67E-01	2.34E-06	0,02
H1H1911N	EGFRvIII-mFc	3.29E+04	6.43E-04	1.95E-08	18
	EGFR-mFc	7.77E+03	1.74E-03	2.24E-07	7
H1H1912N	EGFRvIII-mFc	9.90E+04	5.37E-04	5.40E-09	22
	EGFR-mFc	3.99E+04	9.14E-04	2.29E-08	13
H1H1913N	EGFRvIII-mFc	6.30E+04	1.00E-06	1.58E-11	11550
	EGFR-mFc	5.93E+03	1.00E-06	1.69E-10	11550
H1H1915N	EGFRvIII-mFc	1.00E+05	3.28E-04	3.20E-09	35
	EGFR-mFc	4.35E+04	8.01E-03	1.84E-07	1,4
H1H2193N	EGFRvIII-mFc	2.17E+05	5.85E-05	2.68E-10	197
	EGFR-mFc	2.04E+05	9.15E-05	4.47E-10	126
H1H2194N	EGFRvIII-mFc	1.88E+05	7.38E-05	3.94E-10	157
	EGFR-mFc	1.87E+05	7.07E-05	3.80E-10	163
H1H2195N	EGFRvIII-mFc	2.37E+05	2.53E-05	1.06E-10	456
	EGFR-mFc	2.25E+05	5.20E-05	2.31E-10	222
Control I	EGFRvIII-mFc	4.46E+05	4.04E-03	9.06E-09	2,9
	EGFR-mFc	SU	SU	SU	SU

(continuación)

Unión a 37 °C/Formato de captura de receptor					
Ac	Receptor capturado	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)	T _{1/2}
Control II	EGFRvIII-mFc	1.25E+06	7.31E-05	5.90E-11	158
	EGFR-mFc	4.44E+05	1.46E-04	3.29E-10	79
Control III	EGFRvIII-mFc	1.49E+06	1.00E-06	6.70E-13	11550
	EGFR-mFc	2.86E+05	6.17E-05	2.15E-10	187

Como se muestra en las Tablas 3 y 4, varios anticuerpos mostraron selectividad por EGFRvIII y no se unieron a EGFR de tipo silvestre en el formato de captura de AcM. En el formato de captura de receptor (Tabla 4), H1H863N2, H1H1915N y Control I mostraron la mayor selectividad.

Experimento 4: Especificidad de anticuerpos determinada por ELISA

Para caracterizar adicionalmente los AcM anti-hEGFRvIII, se examinó su especificidad de unión mediante ELISA. Las placas se recubrieron con uno de los siguientes: EGFR-mmh (SEQ ID NO: 154); EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152); y un péptido de unión (péptido J) (SEQ ID NO: 148). Para los péptidos de unión que se unieron a biotina en el extremo C (SEQ ID NO: 149) o en el extremo N (SEQ ID NO: 150) a través de un enlazador, las placas se recubrieron previamente con avidina. Además, se recubrió un péptido irrelevante (péptido de control) con o sin biotina en su extremo N. Se añadieron anticuerpos anti-EGFRvIII, así como un anticuerpo de control de isotipo, a las placas recubiertas y se dejaron incubar durante 1 hora a 25 °C. Luego, se lavaron las placas y se detectaron AcM anti-EGFRvIII unidos con anticuerpos anti-Fc humanos conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Las placas se desarrollaron con una solución de sustrato de tetra-metil-bencidina (TMB) para producir una reacción colorimétrica y se neutralizaron con ácido sulfúrico antes de leer la absorbancia a 450 nm en un lector de placas VICTOR™ X5. El análisis de los datos usó un modelo de respuesta a dosis sigmoideo dentro del programa informático PRISM™. El valor de CE₅₀ calculado, definido como el 50 % de la concentración de anticuerpo requerida para desarrollar la respuesta máxima, se usó como un indicador de la potencia de unión. Los resultados se muestran en la Tabla 5. NP: No probado. Controles I-III: Como se ha descrito anteriormente.

Tabla 5

Anticuerpo	CE50 (nM)						
	EGFR-mmh (25 °C)	EGFRvIII-mmh (25 °C)	Péptido J	Péptido J con biotina en el extremo C	Péptido J con biotina en el extremo N	Péptido de control	Péptido de control con biotina en el extremo N
H1H1863N2(Fuc-)	> 10	0,0766	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1863N2(Fuc+)	> 10	0,113	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1911N	9,06	0,0748	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1912N	0,0405	0,0118	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1913N	2,55	2,14	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1915N	> 10	0,167	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H2193P	0,0040	0,0035	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H2194P	0,0037	0,0032	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H2195P	0,0052	0,0049	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
Control I	> 10	0,0094	0,118	0,0153	0,0106	> 10	> 10
Control II	0,0095	0,0057	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
Control III	0,0079	0,0048	NP	NP	NP	NP	NP
Control de Isotipo	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10

Los anticuerpos H1H1863N2, H1H1915 y Control I mostraron una fuerte unión a EGFRvIII pero no una unión (> 10 nM) a EGFR de tipo silvestre. Ninguno de los anticuerpos, excepto el Control I (que tiene las secuencias que corresponden a las secuencias de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo "13.1.2" procedente de ratones inmunizados con péptido de unión (Patente de Estados Unidos N.º 7.736.644), mostró unión a los péptidos de unión.

Ejemplo 5: Transferencia Western de EGFR y EGFRvIII utilizando anticuerpos anti-EGFRvIII

Uno de los anticuerpos, H1H1863N2, se probó para determinar sus características de unión con transferencias Western en condiciones tanto reducidas como no reducidas. EGFR-mmh (SEQ ID NO: 154) o EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152) se cargó en geles de Tris-Glicina SDS PAGE, se ejecutó y luego se transfirió a nitrocelulosa. Después del bloqueo, las membranas se cortaron por la mitad y se probaron con anticuerpos anti-EGFRvIII o anticuerpos anti-His. Los controles I y II son como los descritos anteriormente.

Tal como se muestra en la Figura 1a, H1H1862N2 (Fuc-) no se une a EGFRvIII o EGFR-mmh reducido o no reducido y, por lo tanto, tiene un epítipo conformacional a EGFRvIII. Por el contrario, el Control II se une tanto al EGFR de tipo

silvestre como a la variante III en condiciones reducidas y no reducidas, mientras que el Control I, un aglutinante de péptidos de unión, es específico para EGFRvIII. Tanto el control I como el II, en contraste con H1H1863N2, tienen epítomos de unión lineal. La Figura 1b muestra otros anticuerpos contra EGFRvIII, que muestran comportamientos mixtos en transferencias Western.

5

Ejemplo 6: Unión de péptidos EGFR/EGFRvIII y ensayos de competencia de anticuerpos

H1H1863N2(Fuc-) se probó para determinar sus características de unión mediante unión de péptidos y ensayos de competencia de anticuerpos. Para los experimentos de unión de péptidos, el péptido de unión EGFRvIII (SEQ ID NO: 148) se marcó a través de un enlazador con biotina en su extremo C [es decir, LEEKKGNVVDHGGGGSK (SEQ ID NO: 149)-biotina] o el péptido que consiste en los restos 311-326 de EGFR (el "péptido EGFR 311-326"; SEQ ID NO: 165) marcado a través de un enlazador con biotina en su extremo C [es decir, CGADSYEMEEDGVRKCGGGGSK (SEQ ID NO: 151)-biotina] se capturó a ~ 0,4 nM de densidad utilizando puntas OCTET® recubiertas con estreptavidina en un instrumento FORTEBIO® OCTET® RED. Después de la captura del péptido, las puntas recubiertas se colocaron en soluciones 1 µM de anticuerpo y se registraron las respuestas de unión (véase Figura 2). Los controles I-III son los mismos que los descritos anteriormente.

Como se predijo, el Control I se unió al péptido de unión con biotina en el extremo C y los Controles II y III se unieron al péptido EGFR 311-326 con biotina en el extremo C. H1H1863N2(Fuc-) no pudo unirse a ninguno de los péptidos.

Para la competencia cruzada de anticuerpos, se capturaron -200 unidades de resonancia (UR) de hEGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152) en una superficie BIACORE™ recubierta con un anticuerpo policlonal antipentahistidina de alta densidad (n.º de catálogo 34660, QUIAGEN). Usando una metodología de inyección simultánea, el hEGFRvIII-mmh capturado se saturó con una inyección de 5 minutos de 500 nM de un primer AcM inmediatamente seguido de otra inyección de 5 minutos de un segundo AcM (500 nM) que se complementó con 500 nM del primer AcM. La unión significativa, expresada como UR, del segundo AcM se interpretó que no compite por la unión con el primer AcM. Para los experimentos de control, se utilizaron AcM emparejados con isotipo como primer AcM o como segundo AcM. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

30

Tabla 6

Superficie BIACORE™ (Primer Anticuerpo)	Unión del segundo anticuerpo (UR)			
	Respuesta de unión de H1H1863N2(Fuc-)	Respuesta de unión del control I	Respuesta de unión del control II	Respuesta de unión del control III
EGFRvIII solo	270	234	247	247
Complejo EGFRvIII - H1H1863N2 (Fuc-)	5	253	191	208
Complejo EGFRvIII - Control I	291	5	258	272
Complejo EGFRvIII - Control II	225	252	6	25
Complejo EGFRvIII - Control III	223	254	13	7

H1H1863N2(Fuc-) no compitió con ninguno de los anticuerpos de control I-III para unirse a la superficie de captura de hEGFRvIII-mmh. Como se esperaba, los controles II y III, de los cuales se sabe que se unen a los restos 311-326 de EGFR, compitieron entre sí por la unión a la superficie de captura de EGFRvIII-mmh.

35

Ejemplo 7: Selectividad de unión a células de anticuerpos anti-EGFRvIII

Para determinar la especificidad de los AcM anti-EGFRvIII, su unión a HEK293, células HEK293 que expresan EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII) y células A431, se analizaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, de sus siglas en inglés). Las células HEK293/EGFRvIII se prepararon mediante la transfección de células HEK293 con vectores de ADN resistentes a neomicina que expresaban constitutivamente hEGFRvIII de longitud completa (SEQ ID NO: 147) utilizando el reactivo de transfección LIPOFECTAMINE™ 2000 (INVITROGEN™). Dos días después de la transfección, las células se colocaron bajo la selección de G418 durante aproximadamente dos semanas. Las poblaciones que expresaban positivamente EGFRvIII se aislaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células HEK293 que expresan ~ 3 x 10⁶ copias de EGFRvIII por célula se utilizaron en el experimento. En resumen, los anticuerpos anti-EGFRvIII a 10 µg/ml se incubaron con células durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron, se incubaron con un anticuerpo secundario, es decir, F(ab')₂ de cabra

45

5 marcado con ficoeritrina (PE) contra IgG humana (n.º de catálogo 109-116-170, Jackson ImmunoResearch Laboratories), seguido de un lavado final antes del análisis FACS. En otro conjunto de experimentos, los anticuerpos anti-EGFRvIII se conjugaron directamente a través de sus restos de lisina con el colorante fluorescente, el colorante ALEXA FLUOR® 488 (INVITROGEN™), eliminando así la etapa que utiliza el anticuerpo secundario. Los resultados de las células HEK293 y las células HEK293/EGFRvIII que usan anticuerpos anti-EGFRvIII marcados directamente se muestran en la Tabla 7 y los que usan el anti-Fc (humano o de ratón) marcado con PE secundario se muestran en la Tabla 8. Los resultados de las células A431 que usan anticuerpos anti-EGFRvIII marcados directamente se muestran en la Tabla 9 y los que usan el anti-Fc (humano o de ratón) marcado con PE secundario se muestran en la Tabla 10. Los controles I, II, III, IV y V se describen anteriormente. MFI: Intensidad media de fluorescencia.

10

Tabla 7

Anticuerpo	MFI de HEK293 parental	MFI de HEK293/EGFRvIII	Relación (MFI de EGFRvIII/MFI parental)
Sin teñir	3548	4005	1,1
H1H1863N2 (Fuc-)	3776	361000	95,6
H1H1863N2 (Fuc +)	3805	360000	94,6
H1H1911N	3593	55064	15,3
H1H1912N	3727	122000	32,7
H1H1913N	4801	239000	49,8
H1H1915N	3461	73413	21,2
Control I	3559	258000	72,5
Control II	3582	313000	87,4
Control IV	24954	439000	17,6

Tabla 8

Anticuerpo	MFI de HEK293 parental	MFI de HEK293/EGFRvIII	Relación (MFI de EGFRvIII/MFI parental)
Sin teñir	819	920	1,1
anti-IgG humana con PE	1027	1106	1,1
H1H1863N2 (Fuc-)	1671	301000	180,1
H1H1911N	1812	107000	59,1
H1H2194P	981	18583	18,9
H1H2195P	1176	13517	11,5
Control I	1480	272000	183,8
Control II	1015	313000	308,4
Control IV	23325	354000	15,2
Control V	11732	997062	85,0

15

Tabla 9

Anticuerpo	MFI de A431	Veces por encima de lo ya registrado
Sin teñir	6708	1,0
H1H1863N2 (Fuc-)	26036	3,9
H1H1911N	15984	2,4
H1H1912N	14343	2,1
H1H1915N	8440	1,2
Control I	9652	1,4
Control II	15716	2,3
Control III	71514	10,7
Control IV	962000	143,4

Tabla 10

Anticuerpo	MFI de A431	Veces por encima de lo ya registrado
Sin teñir	1314	0,9
anti-IgG humana con PE	1428	1,0
H1H1863N2 (Fuc-)	3385	2,4
H1H1911N	3140	2,2
H1H2194P	2291	1,6
H1H2195P	2227	1,6
Control I	1448	1,0
Control II	5576	3,9
Control IV	395000	276,6
Control V	4240	3,0

Varios anticuerpos anti-EGFRvIII mostraron una clara preferencia de unión por la línea celular HEK293/EGFRvIII sobre las células HEK293 parentales cuando se detectaron utilizando anticuerpos anti-EGFRvIII marcados directamente (Tabla 7) o un anti-IgG humana marcada con PE (Tabla 8). La mayoría de los anticuerpos cuando se incubaron con células A431 (30 minutos a 4 °C) mostraron una unión mínima o nula, a excepción de los anticuerpos Controles III y IV (Tablas 9 y 10).

Ejemplo 8: Internización de AcM anti-EGFRvIII por células HEK293/EGFRvIII

Se incubaron AcM anti-EGFRvIII (10 µg/ml) con células HEK293/EGFRvIII (véase el Ejemplo 7, *supra*) durante 2 horas en hielo seguido de dos lavados con PBS. Las células se sometieron luego a una incubación de 30 minutos en hielo con fragmentos Fab anti-IgG humana conjugados con DYLIGHT™ 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) seguida de dos lavados adicionales con PBS. Los anticuerpos se dejaron internizar durante 1 hora a 37 °C en un tampón de internización (PBS + FBS) o se mantuvieron a 4 °C. Las células se fijaron en formaldehído al 4 % y los núcleos se tiñeron con colorante de ADN DRAQ5® (Cell Signaling Technology, Inc.). Las imágenes se adquirieron a 40x en el sistema de alto contenido IMAGEEXPRESS™ (Molecular Devices) y las vesículas internizadas se cuantificaron utilizando el programa informático Columbus (Perkin Elmer). Los resultados se muestran en la Tabla 11 y la Figura 3.

Tabla 11

Ac	Intensidad fluorescente de las vesículas a 4 °C		Intensidad fluorescente de las vesículas a 37 °C	
	Media	± DT	Media	± DT
H1H1863N2(Fuc-)	29896	8333	617184	46823
H1H1911N	29834	11879	280439	61121
H1H1912N	4912	1774	370201	12205
Control I	21981	4613	263506	28067
Control II	20339	5644	615239	144397
Control IV	92311	19386	1078196	106073

Se produjo una internización consistente a 37 °C para H1H1863N2, Control II y Control IV. También se observó internización para H1H1911N, H1H1912N y Control I.

Ejemplo 9: Unión del anticuerpo anti-EGFRvIII al xenoinjerto tumoral U87/EGFRvIII

Para determinar adicionalmente la especificidad de H1H1863N2, se preparó la línea celular U87 de glioblastoma humano que expresa EGFRvIII como se describe para las células HEK293/EGFRvIII en el Ejemplo 7. En el experimento se usaron células U87 que expresan ~ 1,5 x 10⁵ copias de EGFRvIII por célula (U87/EGFRvIII). Las células U87/EGFRvIII (3 x 10⁶ células) se xenoinjertaron en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y los tumores se dejaron crecer hasta que se obtuvo tamaño medio de 200-300 mm³. Los ratones se inyectaron con H1H1863N2(Fuc-) o control de isotipo a través de la vena de la cola. A los 10 minutos, 4 horas y 24 horas después de la inyección del anticuerpo, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tumores y se colocaron en PBS. Los tumores se disociaron inmediatamente y se tiñeron con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con alofocianina (APC) (hFc-APC). Las células teñidas se lavaron 3 veces con PBS de flujo que contenía suero de ternera fetal al 2 % y azida de sodio al 0,1 %. Los tumores en los puntos temporales de 10 minutos y 4 horas se fijaron durante la noche y luego

se midieron mediante citometría de flujo. Los tumores recogidos en el punto temporal de 24 horas se midieron sin estar fijados. Todas las muestras se recolectaron en un ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® (Accuri Cytometers, Inc.) y se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI). Los resultados se muestran en la Tabla 12. Los valores de MFI son el promedio de 2-3 repeticiones biológicas ± el error estándar de la media (EEM).

5

Tabla 12

Tiempo después de la inyección	MFI ± EEM (U87/EGFRvIII)	
	Control de Isotipo	H1H1863N2(Fuc-)
10 minutos	708 ± 4	2259 ± 115
4 horas	741 ± 34	10620 ± 2881
24 horas	664 ± 34	27923 ± 3297

En comparación con el control de isotipo, el anticuerpo H1H1863N2(Fuc-) se unió a las células tumorales U87/EGFRvIII de manera eficaz y dependiente del tiempo.

10

Ejemplo 10: Unión del anticuerpo anti-EGFRvIII al xenoinjerto tumoral B16F10.9/EGFRvIII

Los ratones SCID se implantaron con cincuenta mil células de melanoma murino B16F10.9 o B16F10.9 que sobreexpresa EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII). Las células B16F10.9/EGFRvIII se prepararon como se describe para las células HEK293/EGFRvIII en el Ejemplo 7. Se usan células B16F10.9 que expresan ~ 1,5 x 10⁵ copias de EGFRvIII por célula para este experimento. Los tumores se dejaron crecer durante aproximadamente 14 días, hasta que se obtuvo un tamaño medio de 200-300 mm³. Luego, los ratones se inyectaron con H1H1863N2(Fuc-) o control de isotipo a través de la vena de la cola. A los 10 minutos, 4 horas y 24 horas después de la inyección del anticuerpo, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tumores y se colocaron en PBS. Los tumores se disociaron inmediatamente y se tiñeron con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con alofococianina (hFc-APC). Las células teñidas se lavaron 3X con PBS de flujo (1xPBS, suero de ternera fetal al 2 %, azida de sodio al 0,1 %), se fijaron y se permeabilizaron usando métodos estándar. La citometría de flujo se utilizó para detectar H1H1863N2(Fuc-) unido a la superficie celular y el análisis se realizó con el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc.). Los resultados se muestran en la Tabla 13 y la Figura 4a. Para detectar tanto los anticuerpos unidos a la superficie celular como los unidos intracelularmente, las células se tiñeron por segunda vez utilizando el mismo anticuerpo anti-Fc humano (hFc-APC) después de las etapas de fijación y permeabilización. Esto permitió detectar el anticuerpo intracelular. Los resultados se muestran en la Tabla 14 y la Figura 4b. Todas las muestras se recolectaron en un ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® y se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI). La MFI para cada muestra se informó después de restar la MFI del control no teñido. Los valores de MFI son el promedio de dos repeticiones biológicas (N = 2) ± el error estándar de la media (EEM). * N = 1 para este punto temporal.

15

20

25

30

Tabla 13

Tiempo después de la inyección	MFI ± EEM (B16F10.9/EGFRvIII) - Tinción de superficie			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	Control de Isotipo	H1H1863N2(Fuc-)	Control de Isotipo	H1H1863N2(Fuc-)
10 minutos	74 ± 67	56 ± 2	128 ± 49	2003 ± 216
4 horas	80 ± 15	195 ± 52	54 ± 21	4224 ± 610
24 horas	79 ± 21	155 ± 42	72*	5692 ± 595

Tabla 14

Tiempo después de la inyección	MFI ± EEM (B16F10.9/EGFRvIII) - Tinción de superficie e interna			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	Control de Isotipo	H1H1863N2(Fuc-)	Control de Isotipo	H1H1863N2(Fuc-)
10 minutos	132 ± 92	117 ± 18	155 ± 44	2627 ± 192
4 horas	165 ± 22	422 ± 106	120 ± 22	7785 ± 782
24 horas	135 ± 11	281 ± 51	132*	9578 ± 852

35

H1H1863N2(Fuc-) se unió eficazmente a la superficie de las células B16F10.9 que expresan EGFRvIII de una manera

dependiente del tiempo, mientras que la unión del control de isotipo fue mínima. El aumento en la unión total (es decir, unión a la superficie celular más unión interna) de H1H1863N2(Fuc-), en comparación con su unión a la superficie celular solamente, indicó que los anticuerpos unidos a la superficie celular fueron eficazmente internizados por las células B16F10.0.

5

Ejemplo 11: Farmacocinética de los anticuerpos anti-EGFRvIII en ratones

Para determinar la selectividad *in vivo* de los anticuerpos anti-EGFRvIII, se llevó a cabo un estudio farmacocinético utilizando ratones de tipo silvestre ("ratones TS") que expresan EGFR de ratón de forma natural, y ratones EGFR humanizados ("ratones hEGFR") que expresan EGFR humano. Los ratones procedían de cepas cruzadas con antecedentes que contenía C57BL6 (75 %) y 129Sv (25 %). Las cohortes contenían 5 ratones TS o hEGFR. Todos los anticuerpos se administraron por vía subcutánea a una dosis de 0,2 mg/kg. Las muestras de sangre se recogieron a las 0 horas, 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días y 30 días después de la administración. Los niveles en suero de anticuerpos humanos se determinaron mediante ELISA de sándwich. En resumen, un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico de Fc) (Jackson ImmunoResearch) se recubrió en placas de 96 pocillos a una concentración de un µg/ml y se incubó durante la noche a 4 °C. Después de bloquear las placas con BSA, las muestras de suero en diluciones en serie de seis dosis y los estándares de referencia de los respectivos anticuerpos en diluciones en serie de doce dosis se añadieron a la placa y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar para eliminar el anticuerpo no unido, los anticuerpos humanos capturados se detectaron utilizando el mismo anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico de Fc) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch) y se desarrollaron mediante tetrametilbencidina colorimétrica estándar (TMB) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Las absorbancias a 450 nm se registraron en un lector de placas y la concentración de hIgG en muestras de suero se calculó utilizando la curva estándar de referencia generada en la placa de muestras. Los anticuerpos de ratón antihumanos (MAHA, de sus siglas en inglés) se midieron utilizando métodos estándar y generalmente fueron bajos.

Las figuras 5a-5d muestran las gráficas de la concentración de anticuerpos frente al tiempo para los cuatro anticuerpos probados. Se sabe que el Control IV ("AcM C225") se une al EGFR humano pero no a su homólogo de ratón. Como se esperaba, este anticuerpo mostró un rápido aclaramiento en ratones hEGFR y un aclaramiento lento (es decir, sin aclaramiento mediado por la diana) en ratones TS (Fig. 5a). Se sabe que el Control I ("AcM 13.1.2") se une al péptido de unión EGFRvIII "LEEKKGNYVVDH" que no está presente en el EGFR humano o de ratón. El anticuerpo no se une al EGFR humano o de ratón *in vivo*. Como se esperaba, este anticuerpo mostró tasas de aclaramiento farmacocinético lentas idénticas en ambos tipos de ratones (Fig. 5b) y no se observó un aclaramiento mediado por la diana. El anticuerpo de control III ("AcM hu806") mostró un mayor aclaramiento en ratones con hEGFR en comparación con ratones TS (Fig. 5c). Este hallazgo es consistente con su capacidad para unirse a hEGFR *in vitro* según lo determinado por Biacore (véase el Ejemplo 3, Tabla 4) y FACS (Ejemplo 7, Tabla 9). La Figura 5d muestra el aclaramiento de H1H1863N2(Fuc+). Este anticuerpo, similar al control I, mostró tasas de aclaramiento lento idénticas en ambos tipos de ratones. Por lo tanto, H1H1863N2 no se une a EGFR humano o de ratón *in vivo*.

Ejemplo 12: Un conjugado de anticuerpo anti-EGFRvIII-fármaco inhibe el crecimiento tumoral en modelos de aloinjerto de cáncer de mama positivos para EGFRvIII *in vivo*

En este ejemplo, se probaron dos conjugados de anticuerpo-fármaco diferentes del anticuerpo H1H1863N2 anti-EGFRvIII ejemplar para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Se produjo un primer ADC mediante la conjugación de H1H1863N2 con la toxina maitansinoide DM1 a través de un enlazador de MCC no escindible (véase, por ejemplo, el documento US 5.208.020 y la publicación de solicitud de Estados Unidos nº 2010/0129314) para producir "H1H1863N2-MCC-DM1". Se produjo un segundo ADC mediante la conjugación de H1H1863N2 con una versión modificada de DM1 unida a un nuevo enlazador escindible, denominado "M0026" (también conocido como "compuesto 7" en el documento WO2014/145090), para producir "H1H1863N2-M0026". Cuando se probó la citotoxicidad *in vitro* contra células MMT/EGFRvIII, H1H1863N2-MCC-DM1 exhibió una CI₅₀ de 12 nM mientras que H1H1863N2-7 exhibió una CI₅₀ de 0,8 nM basado en equivalentes de fármacos.

Para comparar la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-EGFRvIII conjugados con DM1 y M0026, se realizaron estudios en ratones inmunocomprometidos que portaban aloinjertos de cáncer de mama positivos para EGFRvIII.

55

En resumen, se establecieron aloinjertos tumorales mediante la implantación subcutánea de 0,5 x 10⁶ células MMT/EGFRvIII en el flanco izquierdo de ratones hembra SCID CB17 (Taconic, Hudson, NY). Una vez que los tumores alcanzaron un volumen promedio de 140 mm³ (-Día 8), los ratones se asignaron al azar en grupos de siete y se les administró ADC anti-EGFRvIII utilizando el formato de fármaco-enlazador MCC-DM1 o M0026. También se evaluaron los reactivos de control, incluidos los ADC no unidos que utilizan el formato de fármaco-enlazador MCC-DM1 o M0026, y el vehículo PBS. Los ADC se administraron a 1 y 5 mg/kg tres veces durante una semana y luego se controlaron hasta que se alcanzó un tamaño promedio de tumor de aproximadamente 2000 mm³ en el grupo administrado con vehículo solo. En este punto, la inhibición del crecimiento tumoral se calculó como se describe a continuación.

65 El tamaño promedio del tumor en relación con el grupo tratado con el vehículo se calculó de la siguiente manera: los tumores se midieron con calibradores dos veces por semana hasta que el tamaño promedio del grupo del vehículo

alcanzó 1000 mm³; el tamaño del tumor se calculó utilizando la fórmula $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$. La inhibición del crecimiento tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $(1 - ((T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}})/(C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}}))) * 100$, donde T (grupo tratado) y C (grupo de control) representan la masa tumoral media en el día en que el grupo vehículo alcanzó 1000 mm³. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

5

Tabla 15

Grupo de tratamiento	Tamaño final del tumor en el día 8 mm ³ (media ± DT)	Inhibición media del crecimiento tumoral (%)
Vehículo PBS	2253 ± 217	0
Control-MCC-DM1 1 mg/kg	2827 ± 278	-27
Control-MCC-DM1 5 mg/kg	2402 ± 256	-7
Control-M0026 1 mg/kg	2729 ± 470	-22
Control-M0026 5 mg/kg	2787 ± 503	-25
H1H1863N2-MCC-DM1 1 mg/kg	931 ± 292	62
H1H1863N2-MCC-DM1 5 mg/kg	471 ± 227	84
H1H1863N2-M0026 1 mg/kg	679 ± 265	74
H1H1863N2-M0026 5 mg/kg	96 ± 34	102

Como se resume en la tabla 15, la mayor inhibición tumoral se observó en ratones a los que se les administró 5 mg/kg de H1H1863N2-M0026, donde se observó la regresión del tumor inicial. La inhibición del crecimiento tumoral del 102 % resultante del tratamiento con 5 mg/kg H1H1863N2-M0026 fue significativamente mayor que la observada después del tratamiento del tumor con 5 mg/kg H1H1862N2-MCC-DM1 (83 %). La superioridad de la inhibición del crecimiento tumoral inducida por H1H1863N2-M0026 en comparación con H1H1863N2-mcc-DM1 también se mantuvo en la dosis de 1 mg/kg. No se observó ningún efecto antitumoral en los grupos tratados con ADC de Control utilizando MCC-DM1 o M0026.

10

15

Por lo tanto, este ejemplo muestra que los anticuerpos anti-EGFRvIII de la presente invención, cuando se administran en forma de conjugados de anticuerpo-fármaco, son altamente potentes para inhibir el crecimiento tumoral. El presente Ejemplo además apoya un papel para que los ADC de la invención promuevan realmente la regresión del tumor, especialmente en el contexto de los anticuerpos anti-EGFRvIII de la invención (por ejemplo, H1H1863N2) conjugados a la nueva molécula enlazador/fármaco M0026.

20

El alcance de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán obvias para los expertos en la técnica. Se pretende incluir dichas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25

Ejemplo 13: Los anticuerpos anti-EGFRvIII-DM1 muestran especificidad por las células que expresan EGFRvIII y demuestran una potente actividad de destrucción celular

30

En este ejemplo, se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-EGFRvIII humanas conjugados a la toxina de la maitansina DM1 para reducir la viabilidad celular utilizando ensayos basados en células *in vitro*.

Se introdujo de forma estable EGFRvIII humana de longitud completa (SEQ ID NO: 147) o EGFR humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 146) en líneas celulares HEK293 (293/hEGFRvIII, 293/hEGFRts), U251 (U251/hEGFRvIII) y MMT 060562 (MMT). Todas las células se generaron mediante metodologías basadas en lipofectamina 2000 y se cultivaron en medios de crecimiento completos en presencia de G418.

35

La expresión en la superficie celular de EGFR ts o EGFRvIII se midió mediante análisis FACS. En resumen, se incubaron 1×10^6 células con 10 µg/ml de anticuerpo H1H1863N2 anti-EGFRvIII, un AcM de control anti-EGFRts (Control IV) o un control de isotipo durante 30 min. en hielo en tampón de dilución de anticuerpos. Después de dos lavados con tampón de dilución de anticuerpos, las células se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo secundario antihumano conjugado con PE durante 30 minutos en hielo. Después de dos lavados adicionales, las muestras se ejecutaron en un citómetro Accuri C6 (BD) o Hypercyt (Intellicyt) y se analizaron los datos utilizando el programa informático FlowJo. Los resultados se resumen en la Tabla 16. n.d. = no determinado.

45

Tabla 16: Expresión de la superficie celular en líneas celulares modificadas por ingeniería genética EGFRts y EGFRvIII

Línea celular	Unión FACS (MFI Veces por encima del control de isotipo)				
	Sin teñir	H1H1863N2 (anti-EGFRvIII)	Control IV (Anti-EGFRts)	Solo secundario	Control de Isotipo
HEK293	1X	1X	49x	1X	1X
HEK293/hEGFRts	1X	n.d.	332x	1X	1X
HEK293/hEGFRvIII	1X	264X	n.d.	1X	1X
U251	1X	1X	n.d.	1X	1X
U251/hEGFRvIII	1X	13X	n.d.	1X	1X
MMT/	1X	1X	n.d.	1X	1X
MMT/hEGFRvIII	1X	280X	n.d.	1X	1X

Estos resultados muestran que la expresión superficial de EGFRvIII fue comparable en las líneas celulares HEK293/hEGFRvIII y MMT/EGFRvIII, mientras que los niveles de expresión de U251/EGFRvIII fueron aproximadamente 20 veces más bajos que en los sistemas celulares HEK293/hEGFRvIII y MMT/hEGFRvIII. La unión de EGFRvIII a través de H1H1863N2 no fue detectable en las líneas celulares parentales. Por el contrario, el anticuerpo de control anti-EGFRts (Control IV) se unió a las células parentales HEK293 en 49 veces por encima del control de isotipo. La incorporación estable de un vector de expresión EGFRts en células HEK293 aumentó la expresión a 332 veces por encima de lo ya registrado y fue comparable a la expresión de EGFRvIII en células HEK293/hEGFRvIII y MMT/hEGFRvIII.

La unión selectiva del anticuerpo H1H1863N2 anti-EGFRvIII a EGFRvIII se evaluó mediante FACS utilizando HEK293 parental, HEK293/hEGFRts, HEK293/hEGFRvIII, líneas de células A431. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Especificidad de unión del anticuerpo anti-EGFRvIII a las líneas celulares que expresan EGFRvIII

AcM	Unión FACS (MFI Veces por encima del control de isotipo)			
	HEK293	HEK293/EGFRts	HEK293/EGFRvIII	A431
Control IV (Anti-EGFRts)	83	251	855	621
H1H1863N2 (anti-EGFRvIII)	1	3	662	13
Control de Isotipo	1	1	1	1
Solo Ac secundario	1	1	1	1
Células sin teñir	1	1	1	1

Como se muestra en la Tabla 17, tanto H1H1863N2 como el anticuerpo de control anti-EGFRts (Control IV) mostraron una fuerte unión (> 650 veces por encima de lo ya registrado) a las células HEK293/EGFRvIII en relación con un control de isotipo. Por el contrario, H1H1863N2 se unió débilmente a la línea celular ts-EGFR HEK293 (3 veces por encima de lo ya registrado) y expresaba de manera endógena la línea celular A431 del EGFR (13 veces por encima del control). El anticuerpo de control anti-EGFR-ts se unió fuertemente a las células que expresan EGFR ts, confirmando la selectividad de H1H1863N2 para EGFRvIII sobre EGFR de tipo silvestre.

A continuación, se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-EGFRvIII humanas conjugados a la toxina de la maitansina DM1 para reducir la viabilidad celular utilizando ensayos basados en células *in vitro*. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con PDL a 250 - 2000 células por pocillo en medios de crecimiento completos y se dejaron crecer durante la noche. Para las curvas de viabilidad celular, se añadió ADC o fármaco libre (DM1-SMe) a las células en concentraciones finales que varían entre 500 nM y 5 pM y se incubaron durante 3 días. Las células se incubaron con CCK8 (Dojindo) durante las 1-3 h finales y se determinó la absorbancia a 450 nm (DO₄₅₀) en Flexstation3 (Molecular Devices). Los niveles de DO₄₅₀ antecedentes de las células tratadas con digitonina (40 nM) se restaron de todos los pocillos y la viabilidad se expresa como un porcentaje de los controles no tratados. Los valores de CI₅₀ se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos (GraphPad Prism). Los resultados se presentan en las Tablas 18A y 18B. Los valores de CI₅₀ están en nM y se normalizan para la proporción particular de fármaco/anticuerpo (DAR, de sus siglas en inglés).

Tabla 18A: Potencia de destrucción celular de los conjugados de fármaco-anticuerpo anti-EGFRvIII-DM1

Línea celular	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		HEK293/ hEGFRts		U251	
	Cl ₅₀ (nM)	% de destrucción						
ADC								
H1H1863N2-MCC-DM1	> 100	90	1	97	> 100	91	48	77
Anti-EGFRts-MCC-DM1	76	94	0,2	97	~ 1,0	94	ND	ND
DM1-SMe	0,31	97	0,6	99	0,57	95	1,8	81
Control de Isotip-MCC-DM1	> 100	92	> 100	96	> 100	91	40	77

Tabla 18B: Potencia de destrucción celular de los conjugados de fármaco-anticuerpo anti-EGFRvIII-DM1

Línea celular	U251/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
	Cl ₅₀ (nM)	% de destrucción	Cl ₅₀ (nM)	% de destrucción	Cl ₅₀ (nM)	% de destrucción
ADC						
H1H1863N2-MCC-DM1	4	78	> 150	40	3	100
Anti-EGFRts-MCC-DM1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DM1-SMe	1,2	83	0,6	96	0,7	100
Control de Isotip-MCC-DM1	35	76	> 150	66	NK	72

- 5 Como se muestra en las Tablas 18A y 18B, H1H1863N2-MCC-DM1 redujo la viabilidad de las líneas celulares HEK293/hEGFRvIII, U251/hEGFRvIII y MMT/hEGFRvIII con Cl₅₀ que varían de 1,0 a 4,0 nM. Por el contrario, un control de isotipo conjugado con DM1 redujo la viabilidad de las células 293/EGFRvIII y MMT/hEGFRvIII con Cl₅₀ mayores que 100 nM y células U251/hEGFRvIII con una Cl₅₀ de 35 nM. H1H1863N2-MCC-DM1 no tuvo impacto en las células HEK293 que expresan EGFR de tipo silvestre (293/hEGFRts) o en las líneas celulares parentales de control, lo que sugiere especificidad para las células que expresan EGFRvIII.

Por lo tanto, este Ejemplo demuestra que el anticuerpo H1H1863N2 de EGFRvIII tiene especificidad por las líneas celulares que expresan EGFRvIII y demuestra capacidad de destrucción celular específica cuando se conjuga con la toxina DM1.

Ejemplo 14: Se logra una potencia de destrucción de células mejorada cuando un conjugado de fármaco-anticuerpo de unión conformacional EGFRvIII se dosifica en combinación con un conjugado de fármaco-anticuerpo de unión a péptido de unión EGFRvIII

- 20 En este ejemplo, se determinó la capacidad para mejorar la destrucción celular mediante la administración conjunta de dos tipos diferentes de conjugados de fármaco-anticuerpo anti-EGFRvIII. Para este Ejemplo, las combinaciones probadas consistieron en dos anticuerpos anti-EGFRvIII diferentes: (1) un anticuerpo anti-EGFRvIII específico que no reconoce el ADC de péptido de unión EGFRvIII (denominado en el presente documento como "aglutinante conformacional"); y (2) un anticuerpo anti-EGFRvIII específico que reconoce el péptido de unión EGFRvIII (denominado en el presente documento como "aglutinante peptídico"). Como se ha demostrado en el Ejemplo 6, el anticuerpo H1H1863N2 anti-EGFRvIII no se une al péptido de unión EGFRvIII o a los restos 311-326 de EGFR humano y, por lo tanto, se considera un "aglutinante conformacional".

Competencia cruzada *in vitro*

- 30 En primer lugar, la capacidad de H1H1863N2 para competir de forma cruzada con un anticuerpo que se une al péptido de unión EGFRvIII se determinó a través de un ensayo de competencia de unión. El anticuerpo anti-EGFRvIII de unión al péptido de unión utilizado en este ejemplo fue el Control V.

- 35 La competencia cruzada se determinó utilizando un ensayo en tiempo real de interferometría de biomasa sin marcar (BLI) en un biosensor Octet HTX (ForteBio Corp., una división de Pall Life Sciences). Todo el experimento se realizó a 25 °C en un tampón compuesto por HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v, BSA 1,0 mg/ml (tampón Octet HBST) con agitación de la placa a una velocidad de 1000 rpm. Para evaluar si dos anticuerpos compitieron de manera cruzada por la unión en EGFRvIII humana recombinante (hEGFRvIII.mmh; SEQ ID: 152), aproximadamente ~ 0,35 nm de hEGFRvIII.mmh se capturaron en biosensores Octet recubiertos con antipenta-His. Los biosensores capturados con antígeno se saturaron luego con el primer anticuerpo monoclonal anti-EGFRvIII (posteriormente denominado AcM-1) mediante inmersión en pocillos que contienen una solución de AcM-1 de 50 µg/ml durante 5 minutos. Los biosensores se sumergieron posteriormente en pocillos que contenían una solución

de 50 µg/ml de un segundo anticuerpo monoclonal anti-EGFRvIII (posteriormente denominado AcM-2) durante 3 minutos. Todos los biosensores se lavaron en tampón Octet HBST entre cada paso del experimento. La respuesta de unión en tiempo real fue monitoreada durante el curso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada paso. Se comparó la respuesta de unión de AcM-2 a hEGFRvIII que formó un complejo previamente con AcM-1 y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-EGFRvIII.

Usando este formato experimental de competencia cruzada, H1H1863N2 no mostró competencia cruzada con el aglutinante peptídico de unión EGFRvIII probado, ni compitió de manera cruzada por la unión a EGFRvIII con Control II o Control IV. Los resultados de este ensayo de competencia cruzada indican, por lo tanto, que H1H1863N2 tiene un epítipo de unión distinto al del aglutinante peptídico de unión EGFRvIII, así como los Controles II y IV.

Actividad de destrucción celular de conjugados de fármaco-anticuerpo anti-EGFRvIII individuales

A continuación, se evaluó la capacidad de H1H1863N2-MCC-DM1 y un ADC de unión al péptido anti-EGFRvIII para reducir la viabilidad celular cuando se administra en combinación. La capacidad del Control V para inducir la destrucción celular cuando se conjugó con SMCC-DM1 (es decir, Control V-MCC-DM1) se determinó usando un ensayo basado en células *in vitro* como se describió en el Ejemplo 13. Los resultados se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19: Potencia de destrucción celular de los conjugados de fármaco-anticuerpo anti-EGFRvIII-DM1

Línea celular	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII (alto)		MMT		MMT/ hEGFRvIII (alto)	
	IC50	% de destrucción	IC50	% de destrucción	IC50	% de destrucción	IC50	% de destrucción
ADC								
DM1-SMe (libre de DM1)	0,19	98	0,25	99	0,15	100	0,18	99
Control de isotipo - MCC-DM1	200	91	150	92	110	68	250	72
H1H1863N2-MCC-DM1	80	97	0,37	99	200	95	3,25	97
Control V-MCC-DM1	90	95	0,25	100	200	89	0,35	97

Como se resume en la tabla 19, los ADC anti-EGFRvIII redujeron la viabilidad celular de varias líneas celulares que sobreexpresaban EGFRvIII con valores de CI₅₀ que varían de 0,25 nM a 3,25 nM.

Actividad de destrucción celular de combinaciones por pares de conjugados de fármaco-anticuerpo anti-EGFRvIII

A continuación, se probó la potencia de destrucción celular de H1H1863N2-MCC-DM1 emparejado con el ADC de unión al péptido anti-EGFRvIII en líneas celulares que sobreexpresan EGFRvIII en una relación 1:1. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Potencia de destrucción celular de combinaciones por pares de ADC anti-EGFRvIII-DM1

Línea celular:		HEK293		HEK293/hEGFRvIII		MMT		MMT/hEGFRvIII	
ADC 1	ADC 2	CI ₅₀ (nM)	% de destrucción						
H1H1863N2-MCC-DM1	Ninguno	250	87	1,52	95	250	59	11,1	98
Control V-MCC-DM1	Ninguno	100	85	0,14	98	100	67	0,7	95
H1H1863N2-MCC-DM1	Control V-MCC-DM1	100	91	0,19	99	200	98	0,58	100
DM1-SMe (libre de DM1)	Ninguno	0,21	96	0,28	97	0,19	100	0,19	100
Control de Isotipo-MCC-DM1	Ninguno	200	93	95	93	150	32	100	36

Como se resume en la tabla 20, la combinación de H1H1863N2-MCC-DM1 (un aglutinante de epítipo conformacional) y el Control V-MCC-DM1 (un aglutinante de péptidos de unión) dio como resultado una potencia de destrucción celular

que fue al menos equivalente a, o en ciertos casos, mejorada en comparación con los tratamientos de un solo ADC. La falta de interferencia entre los dos tipos de anticuerpos sugiere el uso eficaz de dos anticuerpos no competitivos con diferentes citotoxinas, o diferentes clases de citotoxinas que tienen distintos mecanismos de acción.

5 En resumen, este ejemplo demuestra que H1H1863N2 no compite de forma cruzada con el anticuerpo de unión al péptido EGFRvIII de control. Este epítipo único permite su combinación con los ADC de unión al péptido EGFRvIII para mejorar la potencia de destrucción celular. Esta nueva combinación de ADC EGFRvIII puede permitir una mejor eficacia terapéutica.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> ANTICUERPOS ANTI-EGFRvIII Y USOS DE LOS MISMOS

15

<130> A0020W001

<140> Por asignar

<141> Presentado en este documento

20

<150> 61/950.963

<151> 11/03/2014

<160> 165

25

<170> FastSEQ para la versión de Windows 4.0

<210> 1

<211> 354

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

35

<400> 1

```

caggtgcagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtaaaagtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120
actggacagg ggcttgagtg gatgggatgg attaacccta acagtgatta cacaggctat 180
gtacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cctccataag tacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gacatcacgg 300
tggctctgaac acttccacca ctggggccag ggcaccctgg tcaactgtctc ctca 354
    
```

40

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Sintético

<400> 2

ES 2 736 126 T3

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

5 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 3
 ggatacacct tcaccagtta tgat 24

15 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp
 1 5

25 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 5
 attaacccta acagtgatta caca 24

40 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 6

ES 2 736 126 T3

Ile Asn Pro Asn Ser Asp Tyr Thr
 1 5

5 <210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 7
 gcgacatcac ggtggtctga acactccac cac 33

15 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 8

Ala Thr Ser Arg Trp Ser Glu His Phe His His
 1 5 10

25 <210> 9
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 9

```

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtagcagc acaaaccagg acagcctcct aacctactca ttactgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttatagtact 300
ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaac ga 342
  
```

40 <210> 10
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 10

ES 2 736 126 T3

```

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

```

5 <210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 11
 cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac 36

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

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 12

```

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1           5           10

```

25 <210> 13
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 13
 tgggcatct 9

40 <210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 14

ES 2 736 126 T3

Trp Ala Ser
1

5 <210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 15
caccaatatt atagtactcc attcaact 27

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

20 <220>
<223> Sintético

<400> 16

His Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

25 <210> 17
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 17

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cgggagactc 60
tcctgtgtag tgtctggatt catcttcagt agctatggca tgcactgggt cggccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatattatg atggaagtaa tgaatactat 180
gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctccaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgagagggc 300
tacagtcagc ggtacaagta ttacttcggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372
    
```

40 <210> 18
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 18

ES 2 736 126 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Arg	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Gly	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Leu	Ile	Phe	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Val	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	Glu	Gly	Tyr	Ser	Gln	Arg	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Met	Asp
			100					105					110		
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

5 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 19
 ggattcatct tcagtagcta tggc 24

15 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 20

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

25 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 21
 atattttatg atggaagtaa tga 24

40 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 22

ES 2 736 126 T3

Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Glu
 1 5

5 <210> 23
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 23
 gcgcgagagg gctacagtca gcggtacaag tattactcg gtatggacgt c 51

15 <210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 24

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Gln Arg Tyr Lys Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

25 <210> 25
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 25

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctgggtag cctggtatca gcagcaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tcccgtcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

40 <210> 26
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 26

ES 2 736 126 T3

```

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

```

5 <210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 27
 cagggtatta gcagctgg 18

15 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 28

```

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1           5

```

25 <210> 29
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 29
 gctgcatcc 9

40 <210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 30

ES 2 736 126 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 31
caacagacta acagttccc gctcact 27

15 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 32

Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 33
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 33

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt agctacgaca tgcactgggt cgcgccaagct 120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg ctggtgccac atactatcca 180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag aggggattac 300
gtttggggga cttatcgtcc cctctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366
    
```

40 <210> 34
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 34

ES 2 736 126 T3

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

5 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 35
 ggattcccct tcagtagcta cgac 24

15 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 36

Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr Asp
 1 5

25 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 37
 attggtactg ctggtgccac a 21

40 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 38

ES 2 736 126 T3

Ile Gly Thr Ala Gly Ala Thr
 1 5

5 <210> 39
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 39
 gcaagagggg attacgttg ggggacttat cgtcccctct ttgactac 48

15 <210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 40

Ala Arg Gly Asp Tyr Val Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

25 <210> 41
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 41

```

gacatccagt tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggccagtca gggcattaac aattatttag cctggtatca acaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaaactgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcagcag cttaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
  
```

40 <210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 42

ES 2 736 126 T3

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

5 <210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 43
 cagggcatta acaattat 18

15 <210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 44

Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 1 5

25 <210> 45
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 45
 gctgcatcc 9

40 <210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 46

ES 2 736 126 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 47
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 47
cagcagctta atagttacc gctcact 27

15 <210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 48

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 49
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 49

```

caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agatatggca tacactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttggcatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtgat 240
ctgcaaataga ccagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgga 300
ctggagatac gagatcacta ctactacggt atggacgtct gggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372
    
```

40 <210> 50
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 50

ES 2 736 126 T3

```

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

```

5 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 51
 ggattcacct tcagtagata tggc 24

15 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 52

```

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly
 1          5

```

25 <210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 53
 atttggcatg atggaagtaa taaa 24

40 <210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 54

ES 2 736 126 T3

Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

5 <210> 55
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 55
 gcgagagatg gactggagat acgagatcac tactactacg gtatggacgt c 51

15 <210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 56

Ala Arg Asp Gly Leu Glu Ile Arg Asp His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

25 <210> 57
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 57

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat cggtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gactactagt agttggttg cctggatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctacgctcct gatctataag gcgctctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aaattcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacgtatta ctgccaacag tataacaggt attctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaattaa a 321

40 <210> 58
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<4> 58

ES 2 736 126 T3

```

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

```

5 <210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 59
 cagagtacta gtattgg 18

15 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 60

```

Gln Ser Thr Ser Ser Trp
 1           5

```

25 <210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 61
 aaggcgtct 9

40 <210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 62

ES 2 736 126 T3

Lys Ala Ser
1

5 <210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 63
caacagtata acaggtattc tcggacg 27

15 <210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 64

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Arg Thr
1 5

25 <210> 65
<211> 378
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 65

```

gaagtgcagt tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt cgggcaagtt 120
ccaggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggctat 180
gcgactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga atagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatatc 300
catgactacg gaaaagatta ctactactac tacgggatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctca 378
    
```

40 <210> 66
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 66

ES 2 736 126 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50				55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65				70				75						80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Lys	Asp	Ile	His	Asp	Tyr	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly
			100				105						110		
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120						125		

5 <210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 67
 ggattcacct ttgatgatta tgcc 24

15 <210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

25 <210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 69
 attagttgga atagtgtag cata 24

40 <210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 70

ES 2 736 126 T3

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
 1 5

5 <210> 71
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 71
 gcaaaagata tccatgacta cggaaaagat tactactact actacgggat ggacgtc 57

15 <210> 72
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 72

Ala Lys Asp Ile His Asp Tyr Gly Lys Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 1 5 10 15
 Met Asp Val

25 <210> 73
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 73

gaaattgcgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcacctatt tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata gttcaccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

40 <210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 74

ES 2 736 126 T3

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

5 <210> 75
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 75
 cagagtgtta gcagcaccta t 21

15 <210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 76

Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr
 1 5

25 <210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 77
 ggtgcatcc 9

40 <210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 78

ES 2 736 126 T3

Gly Ala Ser
1

5 <210> 79
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 79
cagcagtatg atagttcacc gatcacc 27

15 <210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 80

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Ile Thr
1 5

25 <210> 81
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 81

```

caggtgcagc tgggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt gcctatgcca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaaaattat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcta 300
atggtcggag ttactaacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc caca 354

```

40 <210> 82
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 82

ES 2 736 126 T3

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

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

<210> 83
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 83
 ggattcacct tcagtccta tgcc 24

<210> 84
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala
 1 5

<210> 85
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 85
 35 atatggtatg atggaagtaa taaa 24

<210> 86
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 736 126 T3

<400> 86

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

5 <210> 87
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 87
gcgagagatc taatggtcgg agttactaac tat 33

15 <210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

25 <400> 88

Ala Arg Asp Leu Met Val Gly Val Thr Asn Tyr
1 5 10

30 <210> 89
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 89

```
gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtcg cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacactgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
tttcaccaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac 180
tctgggggtcc cagacagatt caccggcagt gggtcaggca ctgatttcac actaaaaatc 240
agcaggggtgg aggctgagga tgttggggtc ttttactgca tgcaaggttc acactggcct 300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339
```

40 <210> 90
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 90

ES 2 736 126 T3

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

Ser His Trp Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

5 <210> 91
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 91
 caaagcctcg tatacactga tggaacacc tac 33

15 <210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 92

Gln Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

25 <210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 93
 aaggttct 9

40 <210> 94
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 94

ES 2 736 126 T3

Lys Val Ser
1

5 <210> 95
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 95
atgcaagggt cacactggcc tccgtacct 30

15 <210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 96

Met Gln Gly Ser His Trp Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

25 <210> 97
<211> 357
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 97

```

caggttcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc ctgcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg atccttcagt ggtaactact ggagctggat ccgccagtcc 120
ccagggaaagg ggttggagtg gattggggaa atcaatcadc gtggaaactc caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagg caccatatca ttagacacgt ccaagaacca gttatccctg 240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gccatgtatt attgtgtgag aggggggtggg 300
gactactact tcggcatgga cgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctcctca 357
    
```

40 <210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 98

ES 2 736 126 T3

```

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

```

5 <210> 99
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 99
 ggtggatcct tcagtgtaa ctac 24

15 <210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<4> 100

```

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asn Tyr
 1          5

```

25 <210> 101
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 101
 atcaatcatc gtggaactc c 21

40 <210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 102

ES 2 736 126 T3

Ile Asn His Arg Gly Asn Ser
 1 5

5 <210> 103
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 103
 gtgagagggg gtggggacta ctactcggc atggacgtc 39

15 <210> 104
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 104

Val Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val
 1 5 10

25 <210> 105
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 105

```

gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga aatgatttag gctggtatca gctgagacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct acatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt atccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa g 321
  
```

40 <210> 106
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 106

ES 2 736 126 T3

```

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

```

5 <210> 107
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 107
 cagggcattg gaaatgat 18

15 <210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 108

```

Gln Gly Ile Gly Asn Asp
 1           5

```

25 <210> 109
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 109
 gctacatcc 9

40 <210> 110
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 110

```

Ala Thr Ser
 1

```

ES 2 736 126 T3

5 <210> 111
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 111
 ctacaagatt acaattatcc gtggacg 27

15 <210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

20 <400> 112

Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
 1 5

25 <210> 113
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 113

```

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggagg gtccttcagt ggttactact ggagctggat cgcgccagtcc 120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagttgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtatatt tctgtgagag aggggggtggg 300
acctactact acggtatgga cgtttggggc caagggacca cggtcaccgt ctctctca 357
  
```

35
 40 <210> 114
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 114

ES 2 736 126 T3

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

5 <210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 115
 ggagggtcct tcagtggtta ctac 24

15 <210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 116

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

25 <210> 117
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 117
 atcaatcata gtggaagcac c 21

40 <210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 118

ES 2 736 126 T3

Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
 1 5

5 <210> 119
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 119
 gcgagagggg gtgggacctt ctactacggt atggacgtt 39

15 <210> 120
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 120

Ala Arg Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

25 <210> 121
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 121

```

gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga tatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatthtg caacttatta ctgtctacag gattacaatt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggatatcaa a 321
  
```

40 <210> 122
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 122

ES 2 736 126 T3

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

5 <210> 123
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 123
 cagggcattg gatatgat 18

15 <210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 124

Gln Gly Ile Gly Tyr Asp
 1 5

25 <210> 125
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 125
 gctgcatcc 9

40 <210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <4> 126

Ala Ala Ser
 1

ES 2 736 126 T3

5 <210> 127
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 127
 ctacaggatt acaattaccg gtggacg 27

15 <210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 128

Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
 1 5

25 <210> 129
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 129

35 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg atccttcagt ggtgactact ggagctggat tcgccagtcc 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aaactgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggaggcggg 300
 gactactact acggtatgga cgtctggggc ctagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

40 <210> 130
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 130

ES 2 736 126 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asp
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Leu Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 131
 ggtggatcct tcagtggtga ctac 24

15 <210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 132

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asp Tyr
 1 5

25 <210> 133
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 133
 atcaatcata gtggaagcac c 21

40 <210> 134
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 134

ES 2 736 126 T3

Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
 1 5

5 <210> 135
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 135
 gcgagaggag gcggggacta ctactacggt atggacgtc 39

15 <210> 136
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 136

Ala Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

25 <210> 137
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

35 <400> 137

```
gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct acatccagtt taaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa a 321
```

40 <210> 138
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 138

ES 2 736 126 T3

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

5 <210> 139
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 139
 cagggcattg gaaatgat 18

15 <210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 140

Gln Gly Ile Gly Asn Asp
 1 5

25 <210> 141
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 141
 gctacatcc 9

40 <210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 142

ES 2 736 126 T3

Ala Thr Ser
1

5 <210> 143
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 143
ctacaagatt acaattaccg gtggacg 27

15 <210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 144

Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

25 <210> 145
<211> 3633
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <400> 145

ES 2 736 126 T3

atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctctctggcg tgetggetgc gctctgcccg 60
 gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagt ttgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120
 ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg 180
 gtccttggga atttggaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag 240
 accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgccctca acacagtggg gcaattcct 300
 ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360
 gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccat gagaaattta 420
 caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480
 agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc 540
 cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600
 ggtgcaggag agggaaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgcca gcagtgtctc 660
 gggcgctgcc gtggcaagtc cccagtgac tgcctgcca accagtgtgc tgcaggctgc 720
 acaggcccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780
 aaggacacct gcccccaact catgctctac aaccccacca cgtaccagat ggatgtgaac 840
 cccgagggca aatacagctt tggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900
 gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960
 gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttggc gcaaagtgtg taacggaata 1020
 ggtattggtg aatttaaaga ctcaactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa 1080
 aactgcacct ccatcagtg cgtctccac atcctgcccg tggcatttag gggtgactcc 1140
 ttcacacata ctctcctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200
 atcacagggg ttttctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260
 gagaacctag aatcatacgc cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgagtc 1320
 gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380
 gtgataatth caggaacaa aaatthgtgc tatgcaata caataaactg gaaaaaactg 1440
 tttgggacct ccggtcagaa aacaaaatt tcccccagg gctgctgggg cccggagccc 1500
 gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560
 agggactgcg tctcttggcc gaatgtcagc cgaggcaggg aatgctgga caagtgaac 1620
 cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca 1680
 gagtgctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740
 cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg 1800
 ggagaaaaca acacctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860
 catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtcttg aaggctgtcc aacgaatggg 1920
 cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtgggggccc tcctcttget gctggtggtg 1980
 gccctgggga tggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgccc 2040
 aggtgctgc agggagggg gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100
 caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160
 ggtgcgttcg gcacggtgta taagggact tggatcccag aaggtagaaa agttaaatt 2220
 cccgtcgcta tcaagggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
 gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccag tgtgccgct gctgggcatc 2340
 tgctcacct ccaccgtgca gctcatcagc cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400
 tatgtccggg aacacaaaaga caatattggc tcccagtagc tgcactactg gtgtgtgcag 2460
 atcgcaaagg gcatgaaacta cttggaggac cgtcgttgg tgcaccgca cctggcagcc 2520
 aggaacgtac tgggaaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa 2580
 ctgctgggtg cggaaagagaa agaatacct gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640
 atggcattgg aatcaattht acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
 ggggtgactg tttgggagtt gatgacctt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760
 agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctgagccacc catatgtacc 2820
 atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tgcccaaag 2880
 ttcggtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccag acccccagc ctacctgtc 2940
 attcaggggg atgaaagaat gcatttggca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
 ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccc acgagtacct catcccacag 3060

ES 2 736 126 T3

```
cagggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtgca 3120
accagcaaca attccaccgt ggcttgcatt gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc 3180
aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac 3240
agcatagacg acaccttcct cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg 3300
cccgtggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaacct cgcgccagc 3360
agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccgga gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggtcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600
gcccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633
```

<210> 146
<211> 1210
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146

5

ES 2 736 126 T3

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20 25 30
 Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35 40 45
 Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 55 60
 Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85 90 95
 Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100 105 110
 Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125
 Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140
 His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160
 Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175
 Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190
 Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205
 Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
 210 215 220
 Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255
 Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335
 Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350
 Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365

ES 2 736 126 T3

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
 370 375 380
 Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
 385 390 395 400
 Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
 405 410 415
 Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540
 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560
 Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575
 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605
 Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620
 Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640
 Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655
 Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
 660 665 670
 Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
 675 680 685
 Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
 690 695 700
 Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735
 Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750
 Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765
 Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780
 Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800
 Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
 805 810 815
 Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
 820 825 830
 Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
 835 840 845
 Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
 850 855 860
 Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp

ES 2 736 126 T3

865					870					875				880	
Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	His	Arg	Ile	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp
				885					890					895	
Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ser
			900					905					910		
Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Glu	Ile	Ser	Ser	Ile	Leu	Glu
		915					920					925			
Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr
	930					935					940				
Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	Ala	Asp	Ser	Arg	Pro	Lys
945					950					955				960	
Phe	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln
				965					970					975	
Arg	Tyr	Leu	Val	Ile	Gln	Gly	Asp	Glu	Arg	Met	His	Leu	Pro	Ser	Pro
			980					985					990		
Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Met	Asp
		995					1000					1005			
Asp	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe
	1010					1015					1020				
Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala
1025					1030					1035				1040	
Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Ile	Asp	Arg	Asn	Gly	Leu	Gln
				1045					1050					1055	
Ser	Cys	Pro	Ile	Lys	Glu	Asp	Ser	Phe	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asp
			1060					1065					1070		
Pro	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Ser	Ile	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	Pro
		1075					1080					1085			
Val	Pro	Glu	Tyr	Ile	Asn	Gln	Ser	Val	Pro	Lys	Arg	Pro	Ala	Gly	Ser
	1090					1095					1100				
Val	Gln	Asn	Pro	Val	Tyr	His	Asn	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Ser
1105					1110					1115				1120	
Arg	Asp	Pro	His	Tyr	Gln	Asp	Pro	His	Ser	Thr	Ala	Val	Gly	Asn	Pro
				1125					1130					1135	
Glu	Tyr	Leu	Asn	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Phe	Asp
			1140					1145					1150		
Ser	Pro	Ala	His	Trp	Ala	Gln	Lys	Gly	Ser	His	Gln	Ile	Ser	Leu	Asp
		1155					1160					1165			
Asn	Pro	Asp	Tyr	Gln	Gln	Asp	Phe	Phe	Pro	Lys	Glu	Ala	Lys	Pro	Asn
	1170					1175					1180				
Gly	Ile	Phe	Lys	Gly	Ser	Thr	Ala	Glu	Asn	Ala	Glu	Tyr	Leu	Arg	Val
1185					1190					1195				1200	
Ala	Pro	Gln	Ser	Ser	Glu	Phe	Ile	Gly	Ala						
				1205					1210						

<210> 147
 <211> 943
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 147

ES 2 736 126 T3

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

ES 2 736 126 T3

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
100 105 110
Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
115 120 125
Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
130 135 140
Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
145 150 155 160
Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
165 170 175
Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
180 185 190
Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
195 200 205
Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
210 215 220
Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
225 230 235 240
Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys
245 250 255
Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys
260 265 270
Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys
275 280 285
Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
290 295 300
Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
305 310 315 320
Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
325 330 335
Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
340 345 350
Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
355 360 365
Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val
370 375 380
Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe
385 390 395 400
Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu
405 410 415
Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro
420 425 430
Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile
435 440 445
Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp
450 455 460
Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu
465 470 475 480
Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala
485 490 495
Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly
500 505 510
Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe
515 520 525
Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser
530 535 540
Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr
545 550 555 560
Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
565 570 575
Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala
580 585 590
Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys

ES 2 736 126 T3

		595					600					605			
Val	Pro	Ile	Lys	Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	His	Arg	Ile	Tyr
	610					615					620				
Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu
625					630					635				640	
Met	Thr	Phe	Gly	Ser	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Glu	Ile
				645					650					655	
Ser	Ser	Ile	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ile	Cys
			660					665					670		
Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	Ala
		675					680					685			
Asp	Ser	Arg	Pro	Lys	Phe	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Met
690					695						700				
Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Tyr	Leu	Val	Ile	Gln	Gly	Asp	Glu	Arg	Met
705					710					715					720
His	Leu	Pro	Ser	Pro	Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Met	Asp
				725					730					735	
Glu	Glu	Asp	Met	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro
			740					745					750		
Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu
		755					760					765			
Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Ile	Asp
		770				775					780				
Arg	Asn	Gly	Leu	Gln	Ser	Cys	Pro	Ile	Lys	Glu	Asp	Ser	Phe	Leu	Gln
785				790						795					800
Arg	Tyr	Ser	Ser	Asp	Pro	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Ser	Ile	Asp
				805					810					815	
Asp	Thr	Phe	Leu	Pro	Val	Pro	Glu	Tyr	Ile	Asn	Gln	Ser	Val	Pro	Lys
			820					825					830		
Arg	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Gln	Asn	Pro	Val	Tyr	His	Asn	Gln	Pro	Leu
		835					840					845			
Asn	Pro	Ala	Pro	Ser	Arg	Asp	Pro	His	Tyr	Gln	Asp	Pro	His	Ser	Thr
		850				855					860				
Ala	Val	Gly	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Asn	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Cys	Val
865					870					875					880
Asn	Ser	Thr	Phe	Asp	Ser	Pro	Ala	His	Trp	Ala	Gln	Lys	Gly	Ser	His
				885					890					895	
Gln	Ile	Ser	Leu	Asp	Asn	Pro	Asp	Tyr	Gln	Gln	Asp	Phe	Phe	Pro	Lys
			900					905					910		
Glu	Ala	Lys	Pro	Asn	Gly	Ile	Phe	Lys	Gly	Ser	Thr	Ala	Glu	Asn	Ala
		915					920					925			
Glu	Tyr	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Gln	Ser	Ser	Glu	Phe	Ile	Gly	Ala	
	930					935						940			

<210> 148
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 148

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 1 5 10

15 <210> 149
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 736 126 T3

<220>
<223> Sintético

5 <400> 149

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Lys

10 <210> 150
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 150

Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr
 1 5 10 15
 Asp His

20 <210> 151
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintético

<400> 151

30 Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Ser Lys
 20

35 <210> 152
<211> 408
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintético

<400> 152

ES 2 736 126 T3

Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Gly	Asn	Tyr
			20					25					30		
Val	Val	Thr	Asp	His	Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser
		35					40					45			
Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly
	50					55					60				
Pro	Cys	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp
65					70					75					80
Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr
			85						90					95	
Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp
			100					105					110		
Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu
		115					120					125			
Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro
	130					135					140				
Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg
145					150					155					160
Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu
			165					170						175	
Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly
			180					185					190		
Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile
	195					200						205			
Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile
	210					215					220				
Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His
225					230					235					240
Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys
			245						250					255	
Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys
			260					265					270		
Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys
		275					280					285			
Ile	Gln	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys
	290					295					300				
Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp
305					310					315					320
Gly	Pro	His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn
			325						330					335	
Asn	Thr	Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu
			340					345					350		
Cys	His	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly
		355					360					365			
Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu
	370					375					380				
Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu
385					390					395					400
Asp	Leu	His	His	His	His	His	His								
				405											

<210> 153
 <211> 613
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

ES 2 736 126 T3

<400> 153

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

5

ES 2 736 126 T3

Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
115 120 125
Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
130 135 140
Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
145 150 155 160
Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
165 170 175
Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
180 185 190
Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
195 200 205
Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
210 215 220
Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
225 230 235 240
Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys
245 250 255
Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys
260 265 270
Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys
275 280 285
Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
290 295 300
Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
305 310 315 320
Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
325 330 335
Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
340 345 350
Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
355 360 365
Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Glu Pro Arg Gly
370 375 380
Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
385 390 395 400
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val
405 410 415
Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
420 425 430
Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
435 440 445
Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
450 455 460
Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
465 470 475 480
Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala
485 490 495
Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro
500 505 510
Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln
515 520 525
Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr
530 535 540
Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
545 550 555 560
Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
565 570 575
Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser
580 585 590
Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser
595 600 605
Arg Thr Pro Gly Lys

610

- 5 <210> 154
- <211> 684
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Sintético

- <400> 154

ES 2 736 126 T3

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
65 70 75 80
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp

ES 2 736 126 T3

				405					410				415		
Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln
			420					425					430		
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu
		435					440					445			
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser
	450					455					460				
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu
465					470					475					480
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu
			485						490					495	
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro
			500					505					510		
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn
		515					520					525			
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly
	530					535					540				
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro
545					550					555					560
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro
				565					570					575	
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val
			580					585					590		
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp
		595					600					605			
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys
	610					615					620				
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly
625					630					635					640
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Cys	Pro	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile
				645					650					655	
Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp
			660				665						670		
Leu	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly				
		675					680								

<210> 155
 <211> 880
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 155

ES 2 736 126 T3

Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Cys	Gln
			20					25					30		
Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	His	Phe
		35					40					45			
Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn	Asn	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Gly	Asn
	50					55					60				
Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys
65					70					75					80
Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Val
				85					90					95	
Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Ile	Ile	Arg	Gly	Asn	Met	Tyr
			100					105					110		
Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn
		115					120					125			
Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Leu

ES 2 736 126 T3

130					135					140				
His Gly Ala Val Arg	Phe Ser Asn Asn Pro	Ala Leu Cys Asn Val Glu												
145				150					155					160
Ser Ile Gln Trp Arg	Asp Ile Val Ser Ser	Asp Phe Leu Ser Asn Met												
			165					170						175
Ser Met Asp Phe Gln	Asn His Leu Gly Ser	Cys Gln Lys Cys Asp Pro												
			180					185						190
Ser Cys Pro Asn Gly	Ser Cys Trp Gly Ala	Gly Glu Glu Asn Cys Gln												
			195					200						205
Lys Leu Thr Lys Ile	Ile Cys Ala Gln Gln	Cys Ser Gly Arg Cys Arg												
			210					215						220
Gly Lys Ser Pro Ser	Asp Cys Cys His Asn	Gln Cys Ala Ala Gly Cys												
225				230										240
Thr Gly Pro Arg Glu	Ser Asp Cys Leu Val	Cys Arg Lys Phe Arg Asp												
			245					250						255
Glu Ala Thr Cys Lys	Asp Thr Cys Pro Pro	Leu Met Leu Tyr Asn Pro												
			260					265						270
Thr Thr Tyr Gln Met	Asp Val Asn Pro Glu	Gly Lys Tyr Ser Phe Gly												
			275					280						285
Ala Thr Cys Val Lys	Lys Cys Pro Arg Asn	Tyr Val Val Thr Asp His												
			290					295						300
Gly Ser Cys Val Arg	Ala Cys Gly Ala Asp	Ser Tyr Glu Met Glu Glu												
305				310										320
Asp Gly Val Arg Lys	Cys Lys Lys Cys Glu	Gly Pro Cys Arg Lys Val												
			325					330						335
Cys Asn Gly Ile Gly	Ile Gly Glu Phe Lys	Asp Ser Leu Ser Ile Asn												
			340					345						350
Ala Thr Asn Ile Lys	His Phe Lys Asn Cys	Thr Ser Ile Ser Gly Asp												
			355					360						365
Leu His Ile Leu Pro	Val Ala Phe Arg Gly	Asp Ser Phe Thr His Thr												
			370					375						380
Pro Pro Leu Asp Pro	Gln Glu Leu Asp Ile	Leu Lys Thr Val Lys Glu												
385				390										400
Ile Thr Gly Phe Leu	Leu Ile Gln Ala Trp	Pro Glu Asn Arg Thr Asp												
			405					410						415
Leu His Ala Phe Glu	Asn Leu Glu Ile Ile	Arg Gly Arg Thr Lys Gln												
			420					425						430
His Gly Gln Phe Ser	Leu Ala Val Ser Leu	Asn Ile Thr Ser Leu												
			435					440						445
Gly Leu Arg Ser Leu	Lys Glu Ile Ser Asp	Gly Asp Val Ile Ile Ser												
			450					455						460
Gly Asn Lys Asn Leu	Cys Tyr Ala Asn Thr	Ile Asn Trp Lys Lys Leu												
465				470										480
Phe Gly Thr Ser Gly	Gln Lys Thr Lys Ile	Ile Ser Asn Arg Gly Glu												
			485					490						495
Asn Ser Cys Lys Ala	Thr Gly Gln Val Cys	His Ala Leu Cys Ser Pro												
			500					505						510
Glu Gly Cys Trp Gly	Pro Glu Pro Arg Asp	Cys Val Ser Cys Arg Asn												
			515					520						525
Val Ser Arg Gly Arg	Glu Cys Val Asp Lys	Cys Asn Leu Leu Glu Gly												
			530					535						540
Glu Pro Arg Glu Phe	Val Glu Asn Ser Glu	Cys Ile Gln Cys His Pro												
545				550										560
Glu Cys Leu Pro Gln	Ala Met Asn Ile Thr	Cys Thr Gly Arg Gly Pro												
			565					570						575
Asp Asn Cys Ile Gln	Cys Ala His Tyr Ile	Asp Gly Pro His Cys Val												
			580					585						590
Lys Thr Cys Pro Ala	Gly Val Met Gly Glu	Asn Asn Thr Leu Val Trp												
			595					600						605
Lys Tyr Ala Asp Ala	Gly His Val Cys His	Leu Cys His Pro Asn Cys												
			610					615						620
Thr Tyr Gly Cys Thr	Gly Pro Gly Leu Glu	Gly Cys Pro Thr Asn Gly												
625				630										640

ES 2 736 126 T3

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 645 650 655
 Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 660 665 670
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 675 680 685
 Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 690 695 700
 Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 705 710 715 720
 Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 725 730 735
 Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 740 745 750
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 755 760 765
 Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 770 775 780
 Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
 785 790 795 800
 Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
 805 810 815
 Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
 820 825 830
 Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
 835 840 845
 Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
 850 855 860
 Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 865 870 875 880

<210> 156
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 156

ES 2 736 126 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	

Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

<210> 157
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 157

ES 2 736 126 T3

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

<210> 158
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 158

ES 2 736 126 T3

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

- <210> 159
- <211> 19
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Sintético
- 10 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa = Ala
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa = Arg o Lys
- 20 <220>

- <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Gly o Asp
- 5
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Asp, Gly, Ile o ausente
- 10
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Tyr, Leu, His o ausente
- 15
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = Val, Glu, Asp, Met o ausente
- 20
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Trp, Ile, Tyr, Val o ausente
- 25
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = Gly o Arg
- 30
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa = Thr, Asp, Lys, Gly o Val
- 35
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa = His, Asp, Thr o ausente
- 40
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Tyr o ausente
- 45
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa = Tyr o ausente
- 50
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = Tyr o Asn
- 55
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = Arg o Tyr
- 60
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa = Pro, Tyr o ausente
- 65
- <220>
 <221> VARIANTE

ES 2 736 126 T3

<222> (16)..(16)
 <223> Xaa = Leu, Gly o ausente

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa = Phe, Met o ausente

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa = Asp o ausente

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = Tyr, Val o ausente

20 <400> 159

Xaa															
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa													

25 <210> 160
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = Gln, Leu o Met

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Gln

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Leu, Tyr, Asp o Gly

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Asn, Asp, Tyr o Ser

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Ser, Arg, Asn o His

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = Tyr, Ser o Trp

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)

ES 2 736 126 T3

<223> Xaa = Pro o Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = Pro o ausente

<220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa = Leu, Arg, Ile, Trp o Tyr

<220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa = Thr

<400> 160

	Xaa									
20	1				5					10

<210> 161
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = Gly

<220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Phe o Gly

<220>
 <221> VARIANTE
 40 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Pro, Thr o Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Phe

<220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Ser o Asp

<220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = Ser, Arg, Asp, Gly o Ala

<220>
 <221> VARIANTE
 60 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Tyr o Asp

ES 2 736 126 T3

5
<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Asp, Gly, Ala o Tyr

<400> 161

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10
<210> 162
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Sintético

20
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Ile

25
<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Gly, Trp, Ser o Asn

30
<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = His, Trp, Tyr o ausente

35
<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Thr, Asp, Asn o His

40
<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Ala, Gly o Ser

45
<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Gly o Ser

50
<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Ala, Asn o Ser

55
<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Thr, Lys o Ile

<400> 162

ES 2 736 126 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

- 5 <210> 163
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Sintético

- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa = Gln

- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa = Gly o Ser

- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa = Ile, Thr, Val o Leu

- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)..(4)
- <223> Xaa = Asn, Ser, Gly o Val

- 35 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa = Asn, Ser o Tyr

- 40 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (6)..(6)
- <223> Xaa = Thr o ausente

- 45 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (7)..(7)
- <223> Xaa = Asp o ausente

- 50 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (8)..(8)
- <223> Xaa = Gly o ausente

- 55 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (9)..(9)
- <223> Xaa = Asn o ausente

- 60 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (10)..(10)
- <223> Xaa = Thr o ausente

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (11)..(11)
- <223> Xaa = Tyr, Trp o Asp

ES 2 736 126 T3

<400> 163

Xaa
1 5 10

5

<210> 164
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintético

15

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Ala, Lys o Gly

20

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Ala, Thr o Val

25

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Ser

30

<400> 164

Xaa Xaa Xaa
1

35

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

40

<220>
<223> Sintético

<400> 165

Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
1 5 10 15

45

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado y fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a EGFRvIII humana, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una combinación de secuencias de aminoácidos de HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo muestra una constante de disociación de equilibrio (K_D) para un dímero de EGFRvIII humana de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5,0 nM o menos, aproximadamente 1,0 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, medida mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con una citotoxina, opcionalmente en donde la citotoxina se selecciona del grupo que consiste en (i) biotoxinas, agentes quimioterapéuticos y radioisótopos o (ii) maitansinoides, auristatinas, tomamincinas, duocarmicinas, ^{225}Ac , ^{227}Th y derivados de los mismos.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo exhibe una K_D para un dímero de EGFR humano superior a la del dímero de EGFRvIII en al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces, al menos aproximadamente 1000 veces, al menos aproximadamente 2000 veces o al menos aproximadamente 3000 veces, medida mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial, opcionalmente en donde el anticuerpo o fragmento del mismo no se une a un dímero de EGFR a un nivel detectable mediante un ensayo de resonancia de plasmón de superficie.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde:
- (a) la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; o
(b) la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno comprende un par de secuencias de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 34/42.
7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, agentes antiinflamatorios y analgésicos.
8. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 7 para su uso en un método para tratar un cáncer o tumor que expresa EGFRvIII, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 7.
9. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 8, en donde el cáncer o tumor se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, carcinoma ductal o intraductal de mama, carcinoma pulmonar no microcítico, carcinomas de ovario, cáncer de próstata y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
10. Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) para su uso en un método para tratar un cáncer, reducir el crecimiento del tumor y/o causar la regresión del tumor en un paciente, comprendiendo el ADC un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y una citotoxina, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del ADC se une específicamente a EGFRvIII pero no se une al péptido de unión de la SEQ ID NO: 148 o al péptido de la SEQ ID NO: 165, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una combinación de secuencias de aminoácidos de HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de las SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48, y comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesite el ADC.
11. El ADC para su uso de la reivindicación 10, en donde el método comprende además administrar al paciente un ADC adicional que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y una citotoxina, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC adicional se une específicamente a EGFRvIII y también se une al péptido de unión de la SEQ ID NO: 148 y/o al péptido de la SEQ ID NO: 165.
12. El ADC para su uso de la reivindicación 10, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 34 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 42.
13. Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) para su uso en un método para tratar un cáncer, reducir el crecimiento del tumor y/o causar la regresión del tumor en un paciente, comprendiendo el ADC un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y una citotoxina, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del primer ADC se une específicamente a EGFRvIII y también se une al péptido de unión de la SEQ ID NO: 148 y/o al péptido de la SEQ ID

NO: 165, y comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesite el ADC y un ADC adicional que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y una citotoxina, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del adicional ADC se une específicamente a EGFRvIII pero no se une al péptido de unión de la SEQ ID NO: 148 o al péptido de la SEQ ID NO: 165, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo del ADC adicional comprende una combinación de secuencias de aminoácidos de HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de las SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48.

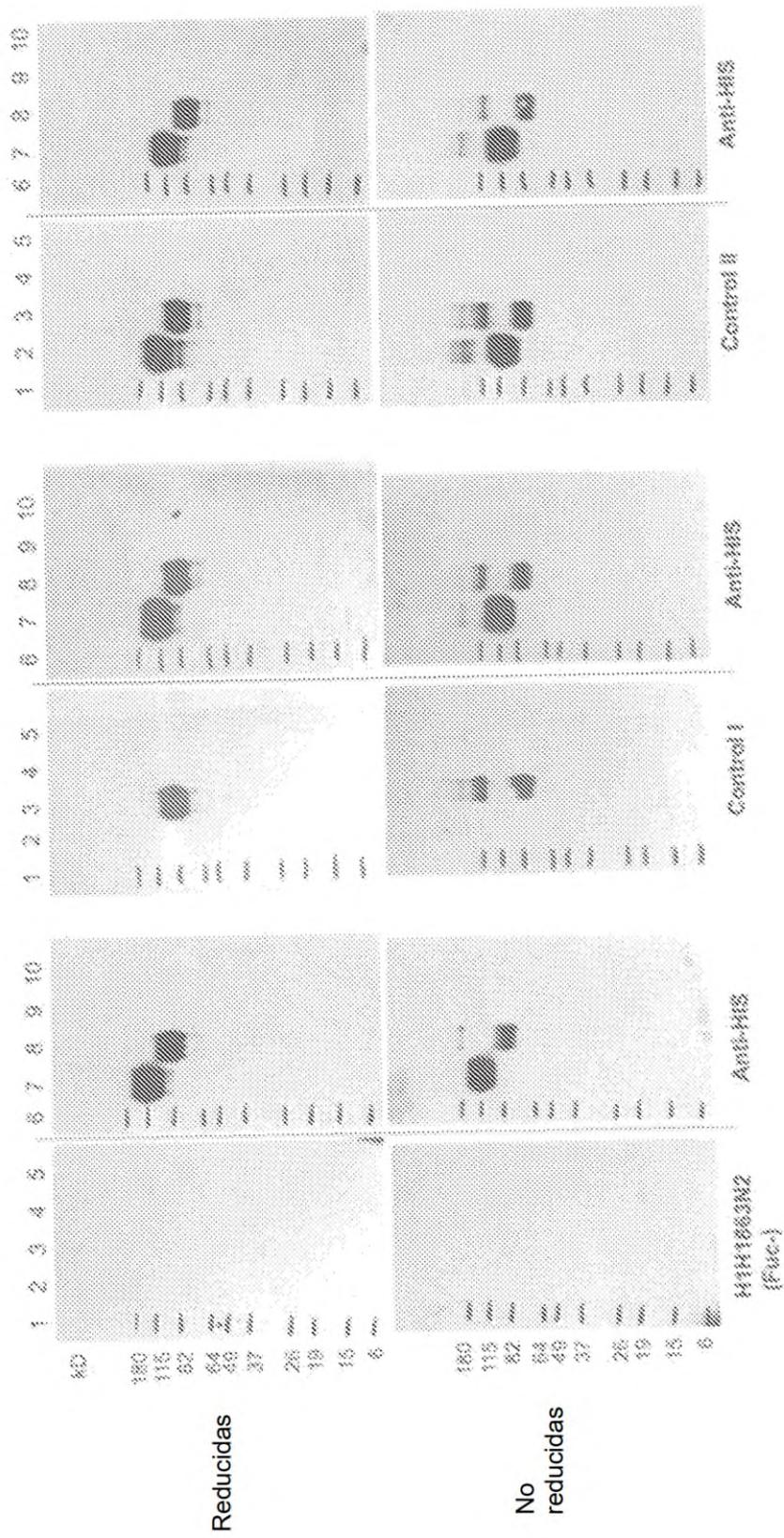


Fig. 1a

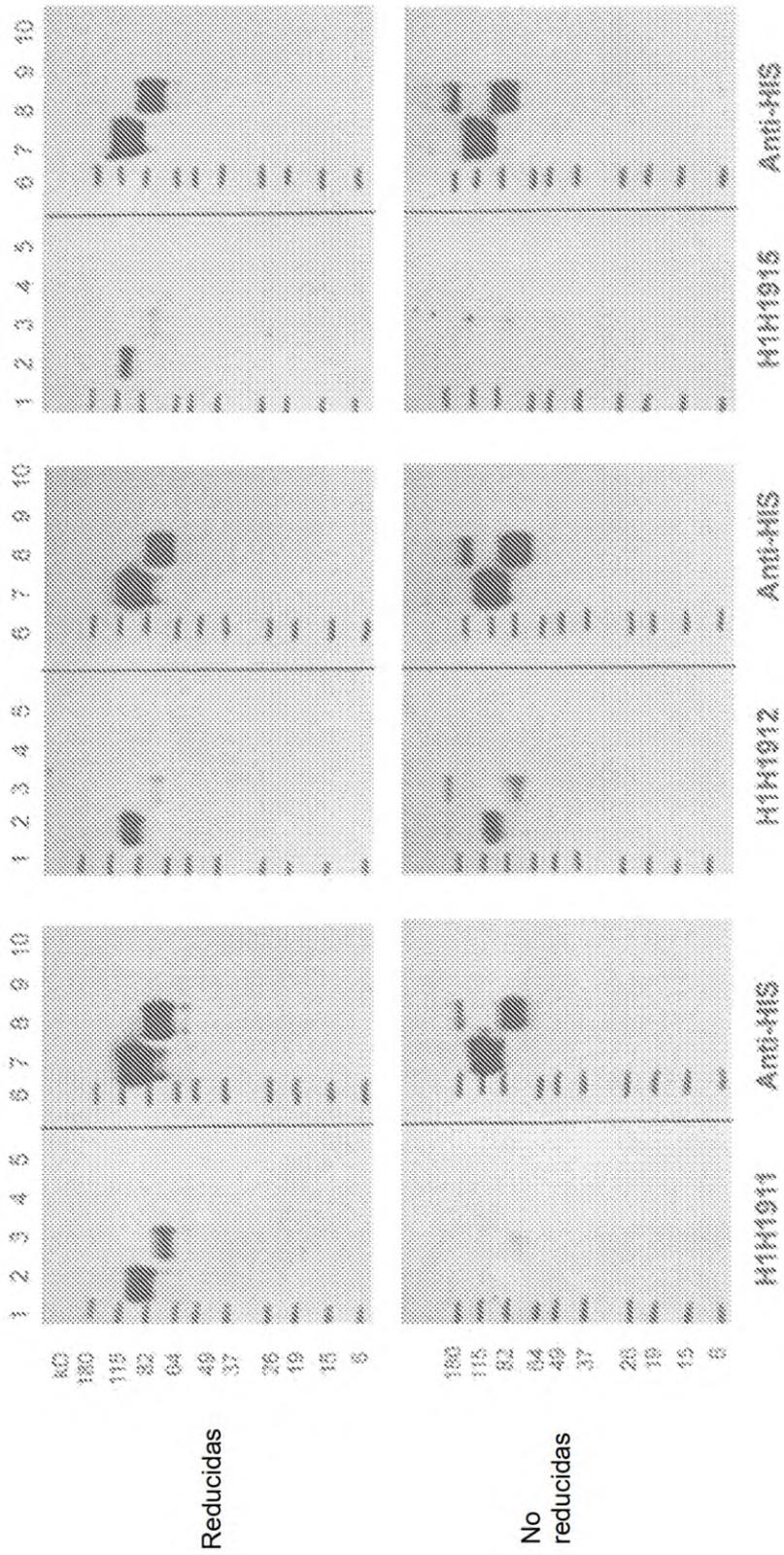


Fig. 1b

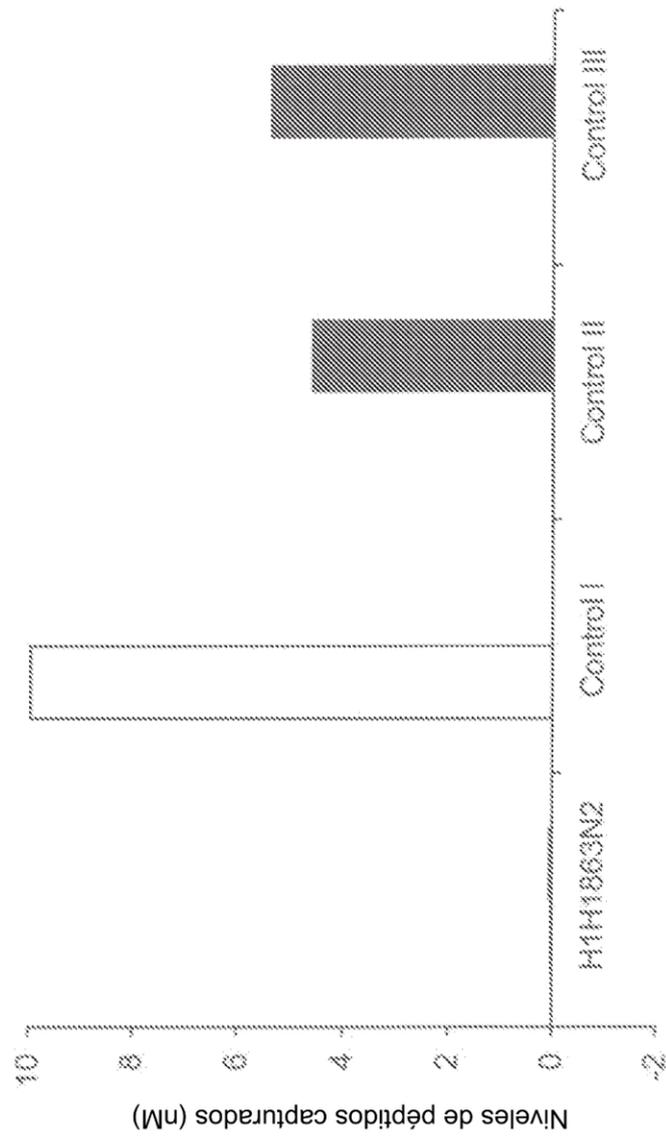


Fig. 2

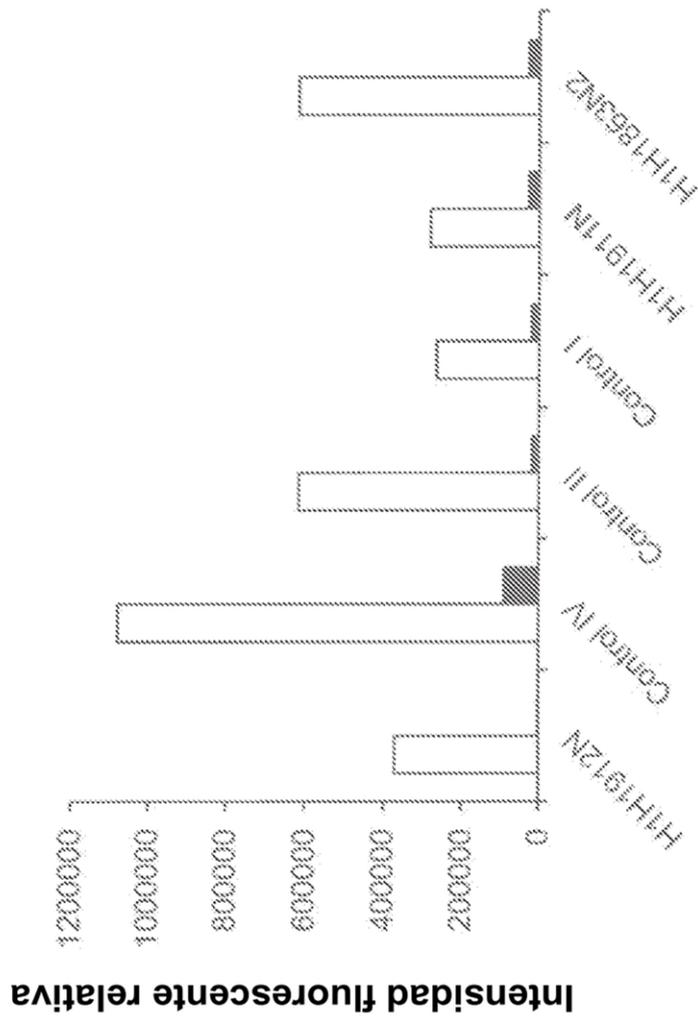


Fig. 3

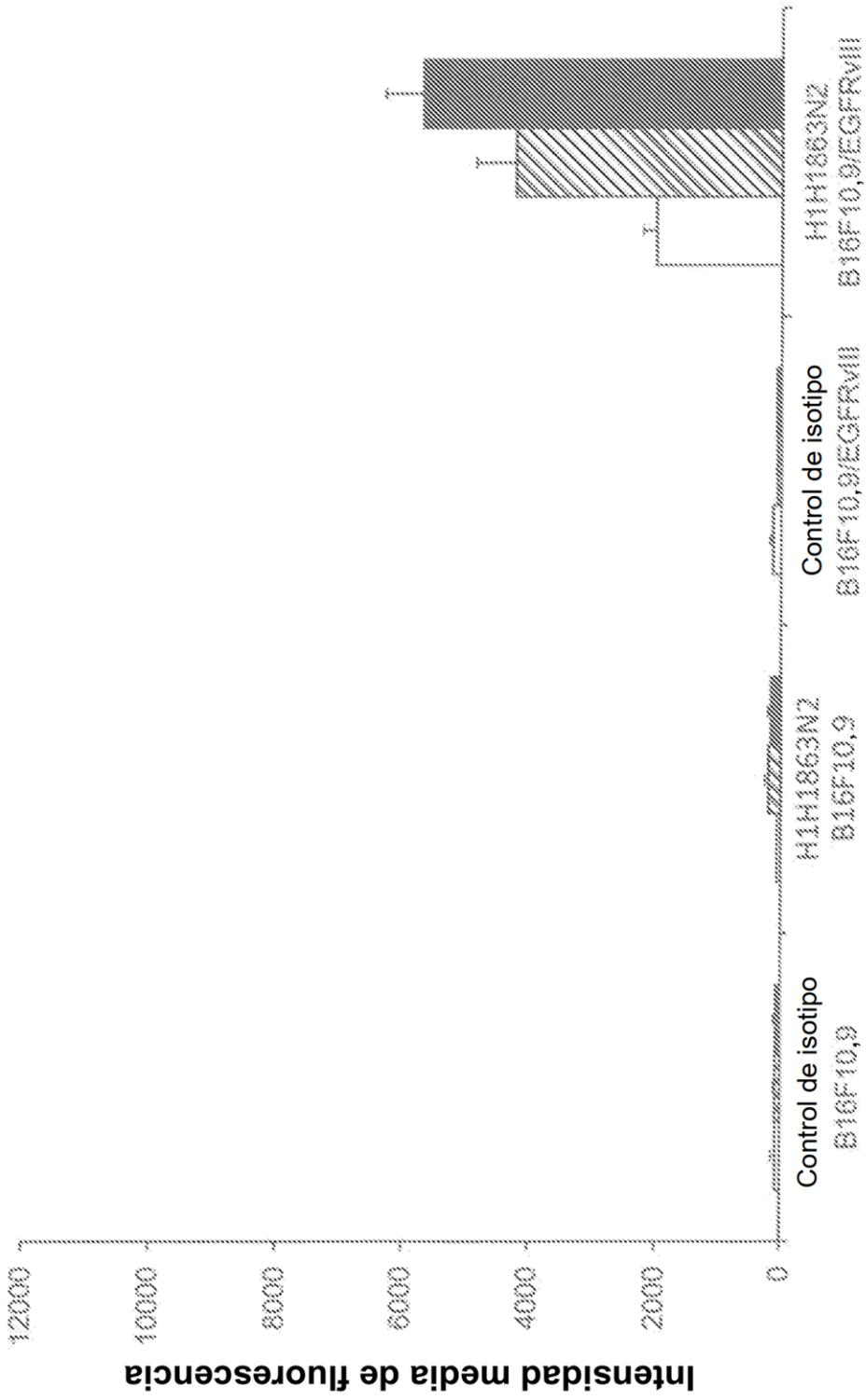


Fig. 4a

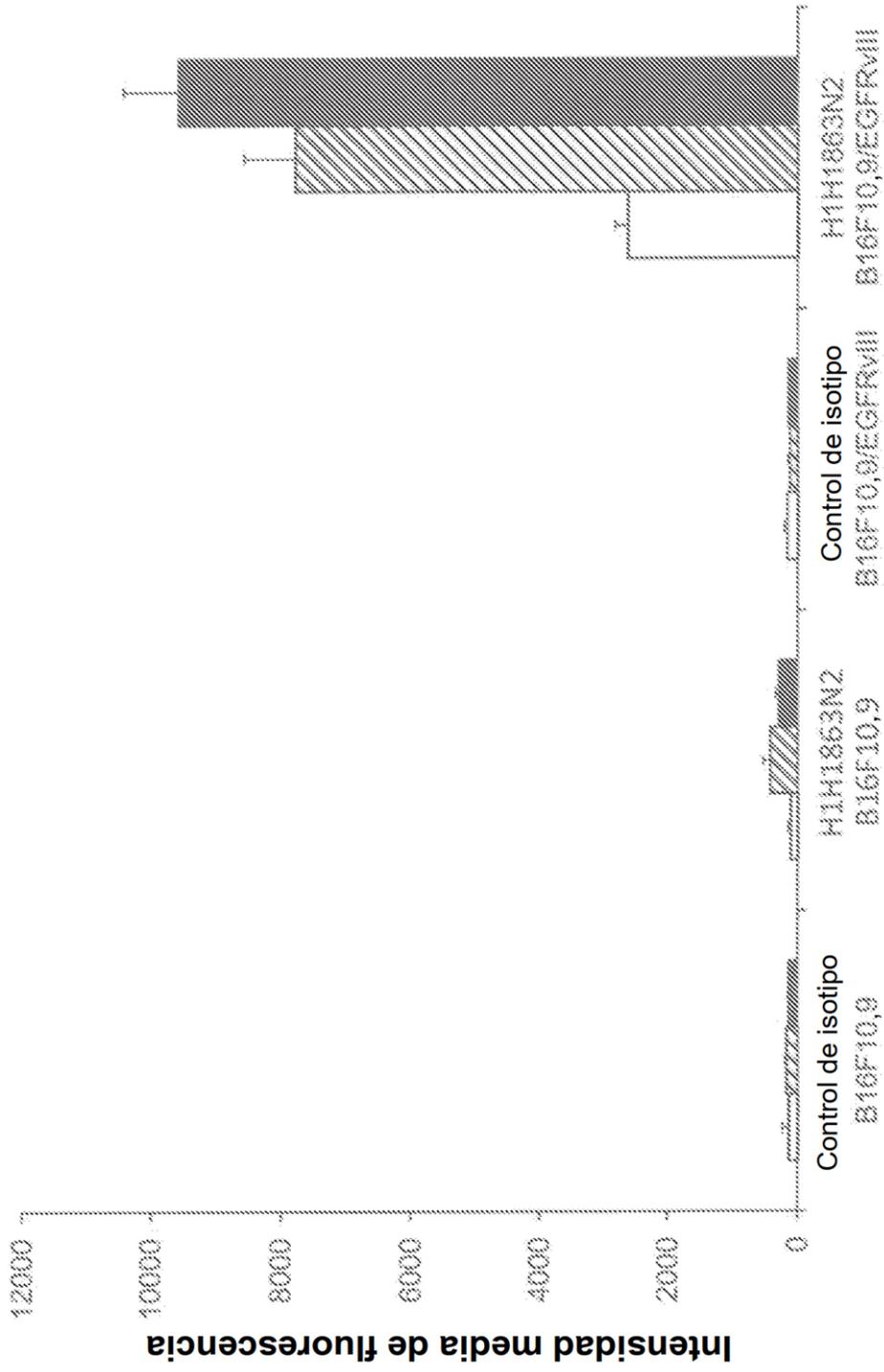


Fig. 4b

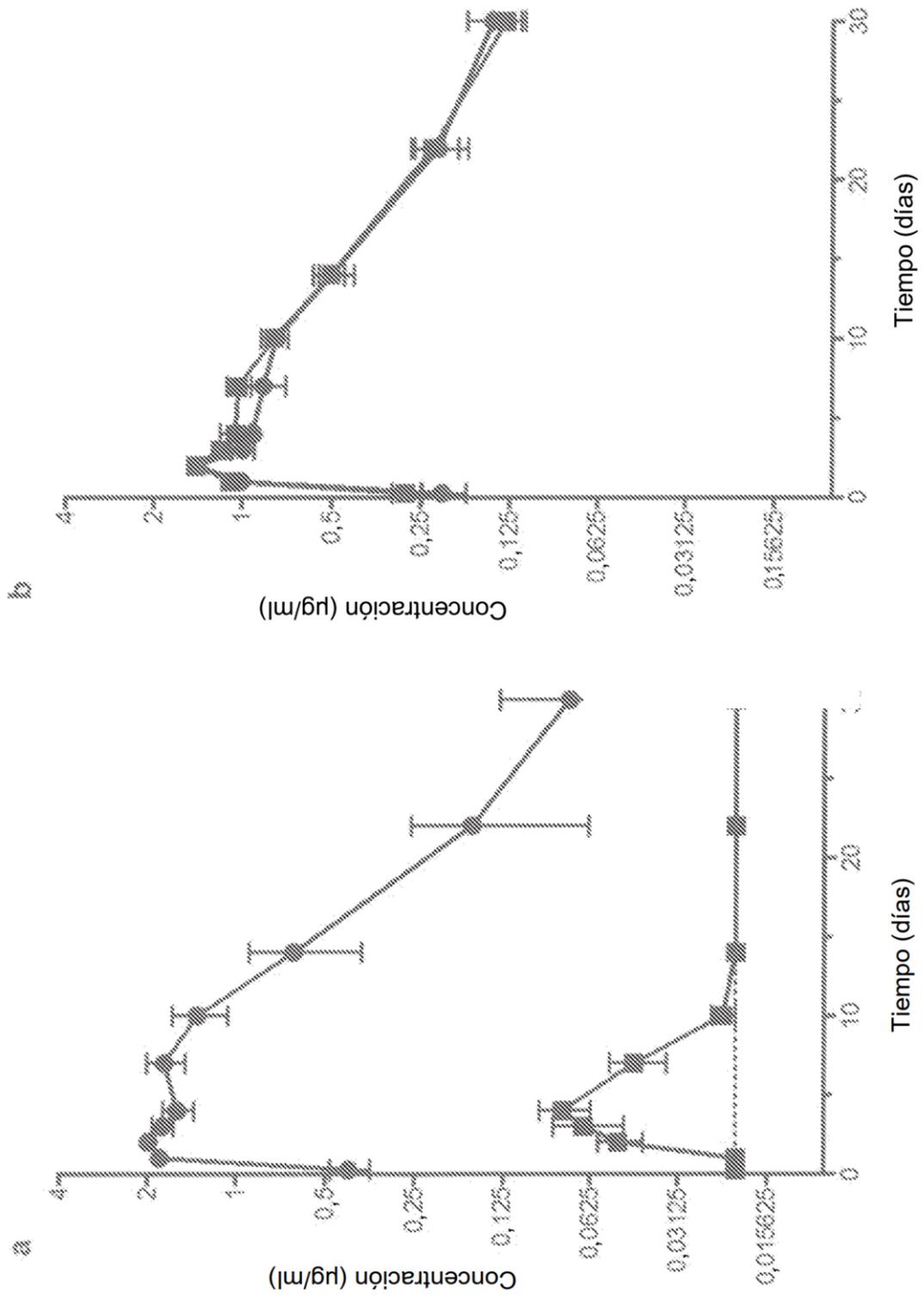


Fig. 5a-b

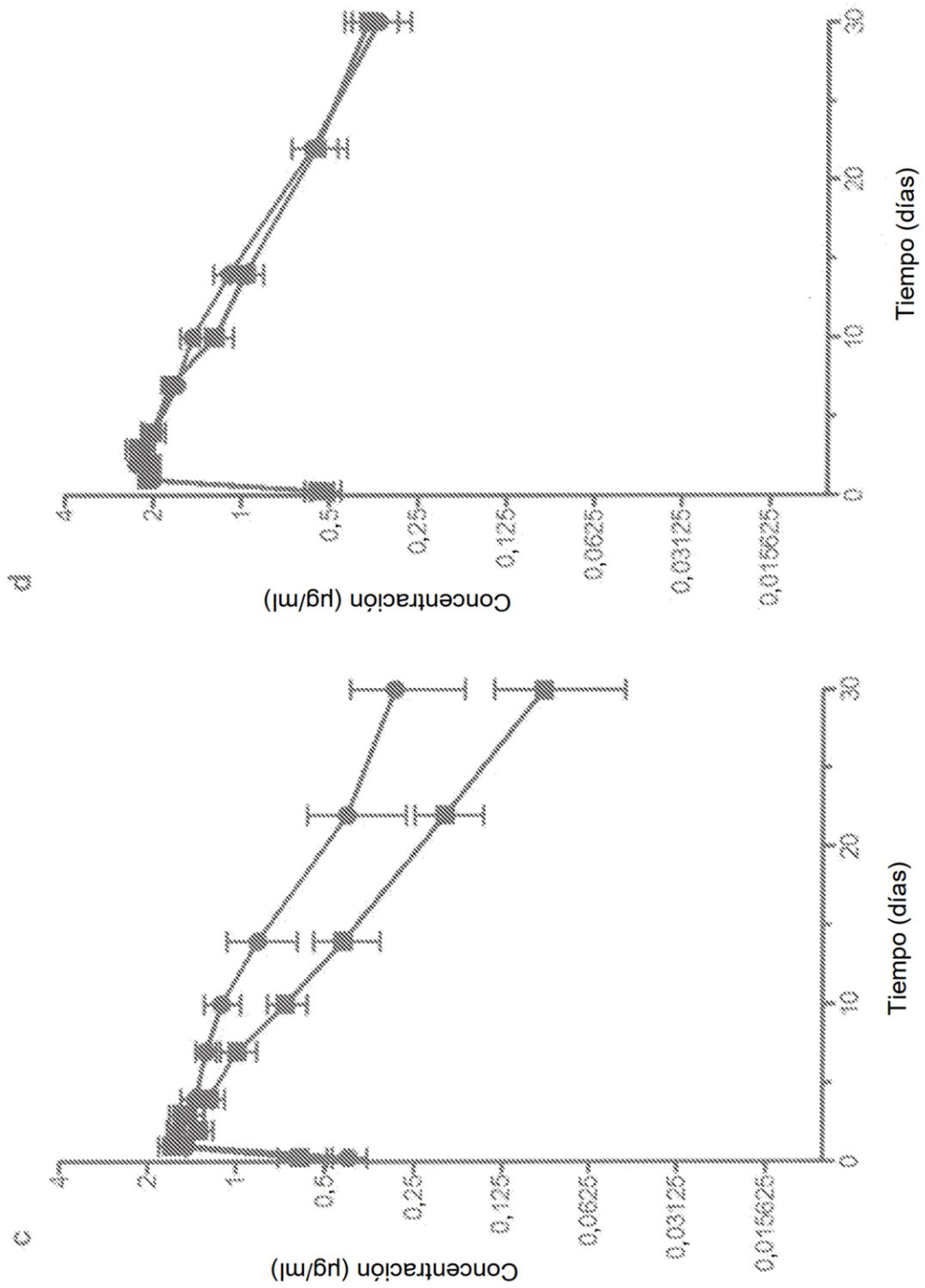


Fig. 50-d