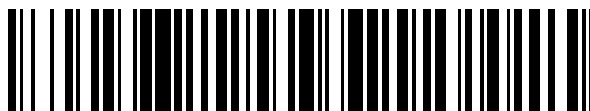


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 976**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2006 PCT/IB2006/000238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2006 WO06082515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2006 E 06710336 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 1871805**

54 Título: **Moléculas de unión a antígeno que se unen a EGFR, vectores que las codifican y usos de las mismas**

30 Prioridad:

07.02.2005 US 650115 P

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

24.04.2020

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 10
8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**UMANA, PABLO y
MOESSNER, EKKEHARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 755 976 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

Moléculas de unión a antígeno que se unen a EGFR, vectores que las codifican y usos de las mismas

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-EGFR humanizado que se une específicamente con EGFR humano, en donde dicho anticuerpo comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 15; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 45; y en donde dicho anticuerpo comprende una región Fc humana, modificada por glucoingeniería, que tiene un número reducido de restos de fucosa en comparación con la forma no modificada por glucoingeniería del anticuerpo. La presente divulgación se refiere en general a moléculas de unión a antígeno (ABM). En realizaciones particulares, la presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados específicos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR). Además, la presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican dichas ABM y vectores y células hospedadoras que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico. La divulgación se refiere además a métodos para producir las ABM descritas en el presente documento y a métodos para usar estas ABM en el tratamiento de enfermedad. Además, la presente descripción se refiere a ABM con glucosilación modificada que tienen propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con mayor unión a receptor de Fc y mayor función efectora.

Antecedentes de la técnica

25 EGFR y anticuerpos anti-EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1 y denominado en el presente documento "EGFR") es un receptor transmembrana de 170 kDa codificado por el protooncogén *c-erbB* y presenta actividad tirosina cinasa intrínseca (Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 73: 228-235 (1996); Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). La entrada de la base de datos SwissProt P00533 proporciona la secuencia de EGFR. También hay isoformas y variantes de EGFR (p. ej., transcritos de ARN alternativos, versiones truncadas, polimorfismos, etc.) incluyendo, pero sin limitación, las identificadas por los números de entrada de la base de datos Swissprot P00533-1, P00533-2, P00533-3 y P00533-4. Se sabe que EGFR se une a ligandos que incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), anfirregulina, EGF de unión a heparina (hb-EGF), betacelulina y epiregulina (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002); Mendelsohn y Baselga, Oncogene 19:6550-6565 (2000)). EGFR regula numerosos procesos celulares a través de rutas de transducción de señales mediadas por tirosina-cinasa, incluyendo, pero sin limitación, activación de rutas de transducción de señales que controlan la proliferación celular, diferenciación, supervivencia celular, apoptosis, angiogénesis, mitogénesis y metástasis (Atalay *et al.*, Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Tsao y Herbst, Signal 4:4-9 (2003); Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).

Se ha señalado la sobreexpresión de EGFR en numerosas afecciones malignas humanas, incluyendo cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata y riñón. (Atalay *et al.*, Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002) Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). En muchas de estas afecciones, la sobreexpresión de EGFR se correlaciona o se asocia con un mal pronóstico de los pacientes. (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002) Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). EGFR también se expresa en las células de tejidos normales, en particular los tejidos epiteliales de la piel, hígado y tracto gastrointestinal, aunque a niveles en general más bajos que en células malignas (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)).

Los anticuerpos monoclonales no conjugados (mAb) pueden ser medicinas útiles para el tratamiento del cáncer, como lo demuestra la aprobación por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos de Trastuzumab (Herceptin™; Genentech Inc.) para el tratamiento del cáncer de mama avanzado (Grillo-Lopez, A.-J., *et al.*, Semin. Oncol. 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21:309-18 (1999)), Rituximab (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA y Genentech Inc., San Francisco, CA), para el tratamiento de linfocitos B CD20 positivos, linfoma no Hodgkin de grado bajo o folicular, Gemtuzumab (Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst) para el tratamiento de leucemia mieloide aguda recidivante y Alemtuzumab (CAM-PATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de células B. El éxito de estos productos se basa no solo en su eficacia sino también en sus excelentes perfiles de seguridad (Grillo-Lopez, A.J., *et al.*, Semin. Oncol. 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21:309-18 (1999)). A pesar de los logros de estos fármacos, actualmente existe un gran interés en obtener mayor actividad de anticuerpos específica que la que normalmente proporciona la terapia con mAb no conjugado.

Los resultados de varios estudios sugieren que los mecanismos dependientes del receptor de Fc contribuyen sustancialmente a la acción de los anticuerpos citotóxicos contra tumores e indican que un anticuerpo óptimo contra tumores se uniría preferentemente con receptores de Fc de activación y mínimamente con el compañero inhibidor

FcγRIIB. (Clynes, R. A., *et al.*, *Nature Medicine* 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A.M. y Ravetch, J. V., *J. Exp. Med.* 195(12):1653-1659 (junio de 2002). Por ejemplo, los resultados de al menos un estudio sugieren que el polimorfismo en el receptor FcγRIIIa, en particular, está fuertemente asociado con la eficacia de la terapia de anticuerpos. (Cartron, G., *et al.*, *Blood* 99(3):754-757 (febrero de 2002)). Ese estudio mostró que los pacientes homocigotos para FcγRIIIa tienen una mejor respuesta al Rituximab que los pacientes heterocigotos. Los autores concluyeron que la respuesta superior se debió a una mejor unión *in vivo* del anticuerpo con FcγRIIIa, lo que dio como resultado mejor actividad de ADCC contra células de linfoma. (Cartron, G., *et al.*, *Blood* 99(3):754-757 (febrero de 2002)).

Se han señalado diversas estrategias para dirigirse a EGFR y bloquear las rutas de señalización de EGFR. Los inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña como gefitinib, erlotinib y CI-1033 bloquean la autofosforilación de EGFR en la región intracelular de tirosina cinasa, inhibiendo de este modo los acontecimientos de señalización corriente abajo (Tsao y Herbst, *Signal* 4: 4-9 (2003)). Los anticuerpos monoclonales, por otro lado, se dirigen a la parte extracelular de EGFR, lo que da como resultado el bloqueo de la unión a ligando y por lo tanto inhibe acontecimientos corriente abajo tales como proliferación celular (Tsao y Herbst, *Signal* 4: 4-9 (2003)).

Se han generado varios anticuerpos monoclonales murinos que logran dicho bloqueo *in vitro* y se han evaluado por su capacidad para afectar al crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de ratón (Masui, *et al.*, *Cancer Res.* 46:5592-5598 (1986); Masui, *et al.*, *Cancer Res.* 44:1002-1007 (1984); Goldstein, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 1: 1311-1318 (1995)). Por ejemplo, EMD 55900 (EMD Pharmaceuticals) es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR murino que se indujo contra la línea celular de carcinoma epidermoide humano A431 y se ensayó en estudios clínicos de pacientes con carcinoma de células escamosas avanzado de la laringe o hipofaringe (Bier *et al.*, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 252:433-9 (1995)). Además, se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales de rata ICR16, ICR62 e ICR80, que se unen al dominio extracelular de EGFR, son eficaces para inhibir la unión de EGF y TGF-α al receptor. (Modjtahedi *et al.*, *Int. J. Cancer* 75:310-316 (1998)). El anticuerpo monoclonal murino 425 es otro MAb que se indujo contra la línea celular de carcinoma A431 humano y se descubrió que se unía a un epítipo polipeptídico en el dominio externo del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. (Murthy *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 252(2):549-560 (1987). Un problema potencial con el uso de anticuerpos murinos en tratamientos terapéuticos es que los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el hospedador humano como una proteína extraña; por lo tanto, las inyecciones repetidas de dichos anticuerpos extraños pueden conducir a la inducción de respuestas inmunitarias que conducen a reacciones de hipersensibilidad perjudiciales. Para anticuerpos monoclonales de base murina, esto se denomina con frecuencia respuesta de anticuerpos humanos contra ratones, o respuesta "HAMA", o una respuesta de anticuerpos humanos contra ratas, o "HARA". Adicionalmente, estos anticuerpos "extraños" pueden ser atacados por el sistema inmunitario del hospedador de tal manera que son, en efecto, neutralizados antes de llegar a su sitio diana. Asimismo, los anticuerpos monoclonales no humanos (p. ej., anticuerpos monoclonales murinos) normalmente carecen de funcionalidad efectora humana, es decir, son incapaces de, entre otras cosas, mediar en la lisis dependiente del complemento o lisar células diana humanas a través de toxicidad celular dependiente de anticuerpos o fagocitosis mediada por el receptor de Fc.

Se han desarrollado anticuerpos quiméricos que comprenden partes de anticuerpos de dos o más especies diferentes (p. ej., ratón y ser humano) como una alternativa a los anticuerpos "conjugados". Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.891.996 (Mateo de Acosta del Río *et al.*) analiza un anticuerpo quimérico de ratón/humano, R3, dirigido contra EGFR y la patente de los Estados Unidos n.º 5.558.864 analiza la generación de formas quiméricas y humanizadas del MAb 425 murino anti-EGFR. Además, IMC-C225 (Erbix®; ImClone) es un anticuerpo monoclonal quimérico humano/de ratón anti-EGFR (basado en el anticuerpo monoclonal M225 de ratón, que dio como resultado respuestas HAMA en ensayos clínicos humanos) que se ha señalado que demuestra eficacia antitumoral en diversos modelos de xenoinjerto humano. (Herbst y Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)). La eficacia de IMC-C225 se ha atribuido a varios mecanismos, incluyendo la inhibición de acontecimientos celulares regulados por rutas de señalización de EGFR, y posiblemente por mayor actividad de toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Herbst y Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)). También se usó IMC-C225 en ensayos clínicos, incluso en combinación con radioterapia y quimioterapia (Herbst y Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)). Recientemente, Abgenix, Inc. (Fremont, CA) desarrolló ABX-EGF para terapia contra el cáncer. ABX-EGF es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR completamente humano. (Yang *et al.*, *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 38: 17-23 (2001)).

El documento WO2004/065540 desvela anticuerpos anti-EGFR modificados por ingeniería genética para aumentar el potencial terapéutico. El documento WO95/20045 desvela el anticuerpo ICR62 de rata anti-EGFR y su uso en un ensayo de fase I en seres humanos.

Glucosilación de anticuerpos

El componente oligosacárido puede afectar significativamente a propiedades relevantes para la eficacia de una glucoproteína terapéutica, incluyendo estabilidad física, resistencia al ataque por proteasa, interacciones con el sistema inmunitario, farmacocinética y actividad biológica específica. Dichas propiedades pueden depender no solo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas, de oligosacáridos. Se pueden hacer algunas generalizaciones entre la estructura de oligosacárido y la función de glucoproteína. Por ejemplo, determinadas estructuras de oligosacáridos median en la eliminación rápida de la glucoproteína del torrente sanguíneo mediante interacciones con proteínas de unión a carbohidratos específicos, mientras que otros pueden unirse con anticuerpos

y desencadenar reacciones inmunitarias no deseadas. (Jenkins *et al.*, Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)).

Las células de mamíferos son los hospedadores preferidos para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glucosilar proteínas de la forma más compatible para aplicación en seres humanos. (Cumming *et al.*, Glycobiology 1:115-30 (1991); Jenkins *et al.*, Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)). Las bacterias con poca frecuencia glucosilan proteínas y, como otros tipos de hospedadores habituales, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insectos y plantas, producen patrones de glucosilación asociados con eliminación rápida del torrente sanguíneo, interacciones inmunitarias indeseables y, en algunos casos específicos, actividad biológica reducida. Entre las células de mamíferos, se han usado células de ovario de hámster chino (CHO) más habitualmente durante las últimas dos décadas. Además de proporcionar patrones de glucosilación adecuados, estas células permiten la generación constante de líneas celulares clonales genéticamente estables, altamente productivas. Se pueden cultivar a altas densidades en biorreactores sencillos usando medios sin suero y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales usadas habitualmente incluyen células de riñón de cría de hámster (BHK), células de mieloma de ratón NS0 y SP2/0. Más recientemente, también se ha probado la producción de animales transgénicos. (Jenkins *et al.*, Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de cadena pesada, poseyendo cada isotipo un conjunto distinto de estructuras de carbohidratos ligados a N, que afectan de manera variable el ensamblaje, la secreción o la actividad funcional de proteínas. (Wright, A. y Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)). La estructura del carbohidrato ligado a N unido varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos complejos de alta manosa, con ramificación múltiple y biantenarios. (Wright, A. y Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)). Normalmente, existe un procesamiento heterogéneo de las estructuras centrales de oligosacáridos unidas en un sitio de glucosilación particular de tal manera que incluso los anticuerpos monoclonales existen como múltiples glucoformas. De manera análoga, se ha mostrado que se producen diferencias importantes en la glucosilación de anticuerpos entre líneas celulares e incluso se observan diferencias menores para una línea celular dada cultivada en condiciones de cultivo diferentes. (Lifely, M. R. *et al.*, Glycobiology 5(8):813-22 (1995)).

Una manera de obtener grandes aumentos de potencia, manteniendo al mismo tiempo un proceso de producción sencillo y evitando potencialmente efectos secundarios indeseables significativos, es potenciar las funciones efectoras mediadas por células, naturales, de anticuerpos monoclonales modificando por ingeniería genética su componente oligosacárido como se describe en Umana, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) y patente de los Estados Unidos n.º 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG 1, los anticuerpos más habitualmente usados en inmunoterapia contra el cáncer, son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación ligado a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 están internados entre los dominios CH2, formando contactos amplios con la cadena principal polipeptídica, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M. R., *et al.*, Glycobiology 5:813-822 (1995); Jefferis, R., *et al.*, Immunol Rev. 163:59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15:26-32 (1997)).

Umana *et al.* mostró previamente que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, aumenta significativamente la actividad de ADCC *in vitro* de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-neuroblastoma (chCE7) producido por las células CHO modificadas por ingeniería genética. (Véase Umana, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999); y publicación internacional n.º WO 99/54342). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de mAb sin conjugar que tienen alta afinidad y especificidad tumoral, pero tienen muy poca potencia para ser clínicamente útiles cuando se producen en líneas celulares industriales convencionales que carecen de la enzima GnTIII (Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)). Ese estudio fue el primero en mostrar que se podrían obtener grandes aumentos de actividad de ADCC mediante modificación por ingeniería genética de las células productoras de anticuerpos para que expresen GnTIII, que también condujo a un aumento de la proporción de oligosacáridos bisecados, asociados a región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos bisecados, no fucosilados, por encima de los niveles hallados en anticuerpos de origen natural.

Sigue existiendo la necesidad de enfoques terapéuticos potenciados dirigidos a EGFR para el tratamiento de trastornos de la proliferación celular en primates, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, en donde dichos trastornos se caracterizan por la expresión de EGFR, en particular expresión anómala (p. ej., sobreexpresión) incluyendo, pero sin limitación, cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata y riñón.

Breve resumen de la invención

Reconociendo el tremendo potencial terapéutico de las moléculas de unión a antígeno (ABM) que tienen la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata (p. ej., se unen al mismo epítipo) y que se han modificado por glucoingeniería para potenciar la afinidad de unión al receptor de Fc y la función efectora, los presentes inventores desarrollaron un método para producir dichas ABM. Entre otros, este método implica producir anticuerpos quiméricos recombinantes o fragmentos quiméricos de los mismos. La eficacia de estos ABM se potencia adicionalmente

modificando por ingeniería genética el perfil de glucosilación de la región Fc del anticuerpo.

En consecuencia, en un aspecto, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 124; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 126; y (c) SEQ ID NO: 108. En otro aspecto, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 114; (b) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 118; y (c) SEQ ID NO: 119. En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión.

En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 120. En otro aspecto, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 50; y SEQ ID NO: 52. En una realización, dichos polinucleótidos codifican polipéptidos de fusión.

La divulgación se dirige además a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 120, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 50; y SEQ ID NO: 52, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

La divulgación también se dirige a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie distinta de rata. La divulgación también se dirige a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; y SEQ ID NO: 121. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; y SEQ ID NO: 121; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie distinta de rata.

En otro aspecto más, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 43. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 43; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie distinta de rata. En otro aspecto más, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 49; y SEQ ID NO: 51. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 49; y SEQ ID NO: 51, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie distinta de rata.

La divulgación también se dirige a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región VH del anticuerpo ICR62, o variantes funcionales del mismo, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie distinta de rata. En otro aspecto, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región VL del anticuerpo ICR62, o variantes funcionales del mismo, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región CL de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie distinta de rata.

La divulgación se dirige además a un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados

descritos anteriormente y a una célula hospedadora que comprende dicho vector de expresión. En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a una célula hospedadora que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriormente.

En un aspecto, la divulgación se dirige a un polipéptido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 123 y SEQ ID NO: 125; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 127; y (c) SEQ ID NO: 107, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la divulgación se dirige a un polipéptido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 113; (b) SEQ ID NO: 115; y (c) SEQ ID NO: 117, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.

La divulgación también se dirige a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma. La divulgación se dirige además a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 43 o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de estos polipéptidos comprende además una región Fc humana y/o una región CL humana. la divulgación se dirige a un polipéptido quimérico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; y SEQ ID NO: 121, o una variante de la misma. La divulgación se dirige además a un polipéptido quimérico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 49; y SEQ ID NO: 51, o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de estos polipéptidos comprende además una región Fc humana y/o una región CL humana. En una realización, la región Fc humana comprende IgG1.

En otro aspecto, la divulgación se dirige a un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo ICR62 y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo y a una molécula de unión a antígeno que comprende dicho polipéptido. En una realización, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo es quimérico. En otra realización preferida, el anticuerpo es humanizado o primatizado.

En otro aspecto, la divulgación se dirige a una ABM, que es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para unirse a EGFR y que es quimérica. En una realización, la ABM es un anticuerpo IgG o un fragmento del mismo. En una realización adicional, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; y SEQ ID NO: 121. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 49; y SEQ ID NO: 51. En una realización adicional, la ABM es un anticuerpo recombinante que está primatizado. En otra realización más, la ABM es un anticuerpo recombinante que está humanizado. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región Fc humana. En una realización adicional, cualquiera de las ABM analizadas anteriormente puede conjugarse con un resto tal como una toxina o un radiomarcador.

La divulgación se refiere además a una ABM de la presente divulgación, dicha ABM tiene oligosacáridos modificados. En una realización, los oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida en comparación con oligosacáridos sin modificar. En otras realizaciones, los oligosacáridos modificados son híbridos o complejos. En una realización adicional, la ABM tiene una mayor proporción de oligosacáridos no fucosilados u oligosacáridos no fucosilados, bisecados, en la región Fc de dicha molécula. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados, bisecados, son híbridos. En una realización adicional, los oligosacáridos no fucosilados, bisecados, son complejos. En una realización, al menos 20 % de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados o bisecados, no fucosilados. En realizaciones más preferidas, al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 % o más de los oligosacáridos son no fucosilados o bisecados, no fucosilados.

La divulgación se refiere además a un polinucleótido que codifica cualquiera de las ABM analizadas anteriormente y a vectores de expresión y células que comprenden dicho polinucleótido.

La divulgación se refiere además a un método para producir una ABM, que es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para unirse a EGFR y en donde dicha ABM es quimérica; comprendiendo dicho método: (a) cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica una ABM de la presente divulgación en un medio en condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha ABM; y (b) recuperar dicha ABM del cultivo resultante.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende la ABM de la divulgación.

Se contempla que la composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un adyuvante o una combinación de los mismos.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad caracterizada por la expresión de EGFR (p. ej., expresión anómala o sobreexpresión de EGFR). El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la ABM de la presente divulgación a un sujeto, preferentemente un sujeto mamífero y más preferentemente un ser humano que lo necesite. En una realización preferida, la enfermedad se trata administrando un ABM que es un anticuerpo quimérico (p. ej., humanizado) o un fragmento quimérico de un anticuerpo. En una realización, la ABM se administra en una cantidad de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15,0 mg/kg. En otra realización, la ABM se administra en una cantidad de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 12,0 mg/kg. En una realización adicional, la ABM se administra en una cantidad de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg. En una realización adicional, la ABM se administra en una cantidad de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 12,0 mg/kg. En una realización adicional, la ABM se administra en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 1,5, aproximadamente 4,5 y aproximadamente 12,0 mg/kg.

En otro aspecto más, la divulgación está relacionada con una célula hospedadora modificada por ingeniería genética para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de la ABM producida por la célula hospedadora, en donde la ABM es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para unirse a EGFR y en donde la ABM es quimérica. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión. En otra realización, la ABM producida por la célula hospedadora es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está humanizado. En una realización adicional, la ABM comprende una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

La divulgación también se dirige a un polinucleótido aislado que comprende al menos una (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) región determinante de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los restos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferentemente, dichos polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula de unión a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o variantes o formas truncadas del mismo que contienen al menos los restos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable completa de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo quimérico (p. ej., humanizado). La divulgación se dirige además a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

En otra realización, la divulgación se dirige a una molécula de unión a antígeno que comprende al menos una (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los restos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o variantes o formas truncadas del mismo que contienen al menos los restos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno comprende la región variable de un anticuerpo de cadena ligera o pesada. En una realización particularmente útil, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, p. ej., humanizado. La divulgación también se dirige a métodos para preparar dichas moléculas de unión a antígeno y a su uso en el tratamiento de enfermedades, incluyendo tumores malignos tales como cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón.

La célula hospedadora de la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que incluye, pero sin limitación, una célula HEK293-EBNA, una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula YO de mieloma, una célula P3X63 de mieloma de ratón, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma. En una realización, la célula hospedadora de la divulgación comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VL del anticuerpo ICR62 de rata o variantes del mismo y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana. En otra realización, la célula hospedadora de la divulgación comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VH del anticuerpo ICR62 de rata o variantes del mismo y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a una célula hospedadora que produce una ABM que presenta mayor afinidad de unión al receptor de Fc y/o mayor función efectora como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, la mayor afinidad de unión es para un receptor de Fc, en particular, el receptor FcγRIIIA. La función efectora contemplada en el presente documento puede seleccionarse del grupo que incluye, pero sin limitación, mayor citotoxicidad celular mediada por Fc; mayor unión a linfocitos NK; mayor unión a macrófagos; mayor unión a células polimorfonucleares; mayor unión a monocitos; mayor señalización directa inductora de apoptosis; mayor maduración de células dendríticas; y mayor sensibilización de linfocitos T.

En una realización adicional, la célula hospedadora de la presente divulgación comprende al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII que está unido operativamente con un elemento promotor constitutivo.

En otro aspecto, la divulgación se dirige a un método para producir una ABM en una célula hospedadora, que comprende: (a) cultivar una célula hospedadora modificada por ingeniería genética para expresar al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII en condiciones que permiten la producción de dicha ABM y que permiten la modificación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicha ABM; y (b) aislar dicha ABM; en donde dicha ABM es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para unirse a EGFR y en donde dicha ABM es quimérica (p. ej., humanizada). En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión, preferentemente que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi seleccionado del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI"), el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII") y el dominio de localización de $\alpha 1$ -6 núcleo fucosiltransferasa. Preferentemente, el dominio de localización en el Golgi es de manosidasa II o GnTI.

En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a un método para modificar el perfil de glucosilación de una ABM anti-EGFR producida por una célula hospedadora que comprende introducir en la célula hospedadora al menos un ácido nucleico o vector de expresión de la divulgación. En una realización, la ABM es un anticuerpo o un fragmento del mismo; preferentemente que comprende la región Fc de una IgG. Como alternativa, el polipéptido es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo quimérico, recombinante, o un fragmento del mismo, capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para unirse a EGFR y tener fucosilación reducida.

En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método para modificar la glucosilación del anticuerpo recombinante o un fragmento del mismo de la divulgación usando un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi. En una realización, los polipéptidos de fusión de la divulgación comprenden el dominio catalítico de GnTIII. En otra realización, el dominio de localización en el Golgi se selecciona del grupo que consiste en: el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de GnTI, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de $\alpha 1$ -6 núcleo fucosiltransferasa. Preferentemente, el dominio de localización en el Golgi es de manosidasa II o GnTI.

En una realización, el método de la divulgación está dirigido a producir un anticuerpo quimérico, recombinante, o un fragmento del mismo, con oligosacáridos modificados en donde dichos oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida en comparación con oligosacáridos sin modificar. Según la presente divulgación, estos oligosacáridos modificados pueden ser híbridos o complejos. En otra realización, el método de la divulgación está dirigido a producir un anticuerpo quimérico, recombinante, (p. ej., humanizado) o un fragmento del mismo que tiene una mayor proporción de oligosacáridos no fucosilados, bisecados, en la región Fc de dicho polipéptido. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados, bisecados, son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos no fucosilados, bisecados, son complejos. En una realización adicional, el método de la divulgación está dirigido a producir un anticuerpo quimérico, recombinante, o un fragmento del mismo que tiene al menos 20 % de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido que son bisecados, no fucosilados. En una realización preferida, al menos 30 % de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados. En otra realización preferida, en donde al menos 35 % de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a un anticuerpo quimérico, recombinante, o un fragmento del mismo, que presenta mayor afinidad de unión al receptor de Fc y/o mayor función efectora como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, la mayor afinidad de unión es para un receptor activador de Fc. En una realización adicional, el receptor de Fc es receptor activador Fc γ , en particular, el receptor Fc γ RIIIA. La función efectora contemplada en el presente documento puede seleccionarse del grupo que incluye, pero sin limitación, mayor citotoxicidad celular mediada por Fc; mayor unión a linfocitos NK; mayor unión a macrófagos; mayor unión a células polimorfonucleares; mayor unión a monocitos; mayor señalización directa inductora de apoptosis; mayor maduración de células dendríticas; y mayor sensibilización de linfocitos T.

En otro aspecto, la divulgación se dirige a un fragmento de anticuerpo quimérico, recombinante (p. ej., humanizado), que tiene la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata y que contiene la región Fc, que se modifica por ingeniería genética para tener mayor función efectora producida por cualquiera de los métodos de la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21;

SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; y SEQ ID NO: 121, y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y modificada por ingeniería genética para tener mayor función efectora producida por cualquiera de los métodos de la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 49; y SEQ ID NO: 51 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y modificada por ingeniería genética para tener mayor función efectora producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo quimérico, recombinante (por ejemplo, humanizado), producido por cualquiera de los métodos de la presente divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo quimérico, recombinante (por ejemplo, humanizado), producido por cualquiera de los métodos de la presente divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión producida por cualquiera de los métodos de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a un método para marcar como diana *in vivo* o *in vitro* células que expresan EGFR. Se desvela un método para marcar como diana células que expresan EGFR en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una ABM de la divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación se dirige a un método para detectar *in vivo* o *in vitro* la presencia de EGFR en una muestra, p. ej., para diagnosticar un trastorno relacionado con la expresión de EGFR. En una realización, la detección se realiza poniendo en contacto una muestra para analizar, opcionalmente con una muestra de control, con una ABM de la presente divulgación en condiciones que permitan la formación de un complejo entre la ABM y el EGFR. Después se detecta la formación de complejo (por ejemplo, mediante ELISA u otros métodos conocidos en la técnica). Cuando se usa una muestra de control con la muestra de ensayo, cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos ABM-EGFR al comparar las muestras de ensayo y de control es indicativa de la presencia de EGFR en la muestra de ensayo.

La divulgación se dirige además a un método para tratar un trastorno relacionado con la expresión de EGFR, en particular, un trastorno de proliferación celular en donde se expresa EGFR y, más particularmente, en donde EGFR se expresa de manera anómala (por ejemplo, se sobreexpresa), incluyendo cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo quimérico, recombinante (por ejemplo, humanizado), o fragmento del mismo, producido por cualquiera de los métodos de la presente divulgación, a un sujeto humano que lo necesite.

Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra la actividad funcional de cadenas polipeptídicas de ICR62 individuales pesadas y ligeras quiméricas de rata-ser humano cuando se combinan con las construcciones de ICR62 humanizadas I-HHC (cadena pesada) e I-KB (cadena ligera). rVL representa la cadena ligera quimérica y rVH representa la cadena pesada quimérica. La designación "r" indica que los dominios variables son del anticuerpo de rata original.

La FIGURA 2 muestra actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada I-HHC, I-HHA e I-HLA y construcciones de región variable de cadena ligera humanizada I-KA e I-KB emparejadas en diversas configuraciones.

La FIGURA 3 muestra actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada I-HLB, I-HLC e I-HLA y construcciones de región variable de cadena ligera humanizada I-KA e I-KC emparejadas en varias configuraciones.

La FIGURA 4 muestra actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada I-HLA2, I-HLA3 e I-HLA4 y construcción de región variable de cadena ligera humanizada I-KC en comparación con el anticuerpo ICR62 quimérico de rata-ser humano.

La FIGURA 5 muestra actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada I-HLA1, I-HLA3, I-HLA5 e I-HLA6 y construcción de región variable de cadena ligera humanizada I-KC en comparación con el anticuerpo ICR62 quimérico de rata-ser humano.

La FIGURA 6 muestra actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada I-HLA7, I-HLA6 e I-HHB y construcción de región variable de cadena ligera humanizada I-KC en comparación con el anticuerpo ICR62 quimérico de rata-ser humano.

La FIGURA 7 muestra actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada I-HHF, I-HLA9 e I-HLA8 y construcción de región variable de cadena ligera humanizada I-KC en comparación con el anticuerpo ICR62 quimérico de rata-ser humano.

La FIGURA 8 muestra actividad de unión de anticuerpos humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada I-HHB, I-HHD, I-HHG, I-HHF, I-HLA7 e I-HLA9 y construcción de región variable de cadena ligera humanizada I-KC.

La FIGURA 9 muestra una comparación de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) para diversas glucoformas del anticuerpo quimérico ICR62, así como para la variante humanizada I-HLA4. "G1" se refiere a glucoingeniería del anticuerpo por coexpresión con GnTIII. "G2" se refiere a glucoingeniería del anticuerpo por coexpresión con GnTIII y ManII. "TS" se refiere a anticuerpos que no fueron modificados por glucoingeniería. Las

construcciones de cadena pesada humanizadas se emparejaron con la construcción de cadena ligera I-KC. La FIGURA 10 muestra una comparación de ADCC para la forma no modificada por glucoingeniería (TS) y la glucoforma G2 (es decir, modificada por glucoingeniería por coexpresión con GnTIII y ManII) de las construcciones del anticuerpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7. Los mismos anticuerpos se aplicaron a dos líneas celulares diana diferentes: en el panel A, se usó la línea celular diana LN229; en el panel B, se usó la línea celular A431.

Las construcciones de cadena pesada humanizadas se emparejaron con la construcción de cadena ligera I-KC. Las FIGURAS 11A y 11B muestran una comparación de ADCC para formas no modificadas por glucoingeniería (TS) y glucoformas G2 de ICR62 quimérico y las construcciones de anticuerpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7. Se usó la línea celular diana A431. Las construcciones de cadena pesada humanizadas se emparejaron con la construcción de cadena ligera I-KC.

La FIGURA 12 muestra una comparación de ADCC de 72 h para glucoformas G2 de ICR62 quimérico y las construcciones de anticuerpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7. Las construcciones de cadena pesada humanizadas se emparejaron con la construcción de cadena ligera I-KC.

La FIGURA 13 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de construcciones de región variable de cadena pesada de ICR62 humanizada en comparación con las secuencias de ICR62 de rata. Los puntos representan la identidad de los restos de aminoácidos en una posición dada dentro de una construcción dada.

La FIGURA 14 muestra un ensayo de unión de FcγRIIIa-Fc usando células CHO que presentan FcγRIIIa humano recombinante. Se comparó un anticuerpo IgG1 anti-EGFR humanizado I-HHB/KC modificado por glucoingeniería con un anticuerpo no modificado por glucoingeniería (TS).

La FIGURA 15 muestra un perfil de oligosacáridos MALD/TOF-MS para el anticuerpo IgG 1 anti-EGFR humanizado modificado por glucoingeniería, I-HHB/KC. La glucoingeniería se realiza mediante sobreexpresión en las células productoras de anticuerpos de genes que codifican enzimas con actividades GnTIII y Manosidasa II de Golgi, que produce más de 70 % de oligosacáridos ligados a Fc-Asn297 no fucosilados.

La Figura 16 muestra un perfil de precisión anti-EGFR (n=6 repeticiones a lo largo del intervalo de calibración) para la determinación de anti-EGFR en matriz de suero de mono al 1 % (grupo de suero de mono CMS25/31/33, proporcionado por HLS).

La FIGURA 17 muestra una curva de calibración anti-EGFR representativa para la determinación de anti-EGFR en matriz de suero de mono al 1 %.

La FIGURA 18 muestra concentraciones en suero de anti-EGFR el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a monos cynomolgus machos.

La FIGURA 19 muestra concentraciones en suero de anti-EGFR el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a monos cynomolgus hembras.

La FIGURA 20 muestra la relación entre áreas bajo las curvas de concentración-tiempo en suero anti-EGFR (AB₁₆₈) y el nivel de dosis el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a monos cynomolgus.

La FIGURA 21 muestra concentraciones en suero de anti-EGFR durante la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a monos cynomolgus machos.

La FIGURA 22 muestra concentraciones en suero de anti-EGFR durante la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a monos cynomolgus hembras.

La FIGURA 23 muestra el perfil MALDI/TOF-MS de oligosacáridos del anticuerpo anti-EGFR modificado por ingeniería de Fc (glucoingeniería) usado para los estudios en monos *in vivo* descritos en los ejemplos a continuación en el presente documento.

La FIGURA 24 muestra la unión a EGFR expresada en la superficie de células de carcinoma epidermoide A431 humano. El anticuerpo usado para el estudio de unión fue el anticuerpo anti-EGFR modificado por ingeniería de Fc (construcción I-HHB) usado para los estudios en mono *in vivo* descritos en los ejemplos a continuación en el presente documento.

La FIGURA 25 muestra la unión a EGFR expresado en la superficie de células de riñón de mono COS-7. El anticuerpo usado fue el anticuerpo anti-EGFR (cadena pesada de I-HHB; cadena ligera I-KC). Para referencia, se muestra la unión a células con baja expresión de EGFR humano, células de cáncer de mama MCF-7.

La FIGURA 26 muestra la unión de Fc-FcγRIIIa usando una célula completa (células CHO modificadas por ingeniería genética para expresar FcγRIIIa humano en su superficie). El anticuerpo usado fue el anticuerpo anti-EGFR modificado por ingeniería de Fc (glucoingeniería) usado para los estudios de mono *in vivo* descritos en los ejemplos a continuación en el presente documento. Se muestra unión para un anticuerpo IgG1 de control no modificado por ingeniería de Fc (sin modificar) para comparación.

La FIGURA 27 muestra ADCC mediada por anticuerpo anti-EGFR modificado por ingeniería de Fc (glucoingeniería). Las células diana son células de carcinoma de pulmón humano A549. Se muestra actividad de ADCC para la forma no modificada por ingeniería de Fc (sin modificar) del anticuerpo para comparación.

La FIGURA 28 muestra ADCC mediada por anticuerpo anti-EGFR modificado por ingeniería de Fc (glucoingeniería). Las células diana son la línea celular de queratinocitos de mono cynomolgus CYNOM-K1. Se muestra actividad de ADCC para la forma no modificada por ingeniería de Fc (sin modificar) del anticuerpo para comparación.

La FIGURA 29 muestra unión a diana de EGFR de diversas variantes de construcción de cadena ligera basadas en la construcción I-KC emparejada con la construcción I-HHB de cadena pesada.

Descripción detallada de la invención

Los términos se usan en el presente documento como se usan en general en la técnica, a menos que se defina otra cosa de la siguiente manera.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término *anticuerpo* incluye moléculas de anticuerpo completas, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (p. ej., biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpos que tienen la región Fc y conservan la especificidad de unión, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y que conservan la especificidad de unión. También se incluyen fragmentos de anticuerpos que conservan la especificidad de unión, incluyendo, pero sin limitación, fragmentos de VH, fragmentos de VL, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos Fv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos (véase, p. ej., Hudson y Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003)). También se incluyen anticuerpos humanizados, primatizados y quiméricos.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión *región Fc* se refiere a una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG podrían variar ligeramente, se define habitualmente que la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde el resto de aminoácido en la posición Cys226 hasta el extremo carboxilo.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión *región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina* incluye variantes alélicas de origen natural de la región Fc de una inmunoglobulina así como variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresiones pero que no reducen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar en funciones efectoras (tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, pueden suprimirse uno o más aminoácidos del extremo N o C de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse según normas generales conocidas en la técnica para que tengan efecto mínimo en la actividad. (Véase, p. ej., Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-1310 (1990).

Como se usa en el presente documento, el término *EGFR* se refiere al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1) (Ulrich, A. et al., Nature 309:418-425 (1984); n.º de referencia de SwissProt P00533; números de referencia secundarios: O00688, O00732, P06268, Q14225, Q92795, Q9BZS2, Q9GZX1, Q9H2C9, Q9H3C9, Q9UMD7, Q9UMD8, Q9UMG5), así como isoformas de origen natural y variantes de las mismas. Dichas isoformas y variantes incluyen, pero sin limitación, la variante EGFRvIII, productos de corte y empalme alternativos (p. ej., identificados por los números de referencia de SwissProt P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4), variantes GLN-98, ARG-266, Lys-521, ILE-674, GLY-962 y PRO-988 (Livingston, R.J. et al., NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478, Department of Genome Sciences, Seattle, WA (2004)) y otros identificados por los siguientes números de referencia: NM_005228.3, NM_201282.1, NM_201283.1, NM_201284.1 (ARNm de REFSEQ); AF125253.1, AF277897.1, AF288738.1, AI217671.1, AK127817.1, AL598260.1, AU137334.1, AW163038.1, AW295229.1, BC057802.1, CB160831.1, K03193.1, U48722.1, U95089.1, X00588.1, X00663.1; H54484S1, H54484S3, H54484S2 (conjunto MIPS); DT.453606, DT.868556S1, DT.95165593, DT.97822681, DT.95165600, DT.100752430, DT.91654361, DT.92034460, DT.92446349, DT.97784849, DT.101978019, DT.418647, DT.86842167, DT.91803457, DT.92446350, DT.95153003, DT.95254161, DT.97816654, DT.87014330, DT.87079224 (montaje DOTS).

Como se usa en el presente documento, la expresión *ligando de EGFR* se refiere a un polipéptido que se une con y/o activa EGFR. La expresión incluye formas precursoras unidas a membrana del ligando de EGFR, así como formas solubles procesadas proteolíticamente del ligando de EGFR.

Como se usa en el presente documento, la expresión *activación del ligando de EGFR* se refiere a transducción de señales (por ejemplo, la provocada por un dominio de cinasa intracelular de restos de tirosina fosforilantes del receptor EGFR en el EGFR o un polipéptido sustrato) mediada por unión del ligando de EGFR.

Como se usa en el presente documento, la expresión *enfermedad o trastorno caracterizado por activación o producción anómala de EGFR o un ligando de EGFR o trastorno relacionado con la expresión de EGFR*, se refiere a una afección, que implicar o no tumor maligno o cáncer, donde se produce activación y/o producción anómala de EGFR y/o un ligando de EGFR en células o tejidos de un sujeto que tiene, o tiene predisposición a, la enfermedad o el trastorno.

Como se usa en el presente documento, los términos *sobreexpresar*, *sobreexpresado* y *sobreexpresando*, como se usan en relación con células que expresan EGFR, se refieren a células que tienen niveles mediblemente más altos de EGFR en su superficie en comparación con una célula normal del mismo tipo tisular. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por la amplificación génica o por aumento de la transcripción o traducción. La expresión de EGFR (y, por lo tanto, la sobreexpresión) puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles de EGFR presentes en la superficie de una célula o en un lisado celular mediante técnicas conocidas en este campo: p. ej., a través de un ensayo de inmunohistoquímica, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, transferencia de Western, unión a ligandos, actividad cinasa, etc.

(Véase, en general, CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK, Celis, J., ed., Academic Press (2ª ed., 1998); CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Coligan, J.E. *et al.*, eds., John Wiley & Sons (1995-2003); véase también, Sumitomo *et al.*, Clin. Cancer Res. 10: 794-801 (2004) (que describe la transferencia de Western, citometría de flujo e inmunohistoquímica))). Como alternativa, o además, se pueden medir los niveles de moléculas de ácido nucleico que codifican HER en la célula, p. ej., mediante hibridación fluorescente in situ, transferencia de Southern o técnicas de PCR. Los niveles de EGFR en células normales se comparan con los niveles de células aquejadas de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) para determinar si el EGFR se sobreexpresa.

Como se usa en el presente documento, la expresión *molécula de unión a antígeno* se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. De manera más específica, una *molécula de unión a antígeno que se une a EGFR* es una molécula que se une específicamente con un receptor transmembrana de 170 kDa, normalmente designado como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), pero también conocido como HER-1 o ErbB1. Por "se une de manera específica" se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y puede distinguirse de interacciones no deseadas o inespecíficas.

Como se usa en el presente documento, los términos *fusión* y *quimérico*, cuando se usan en referencia a polipéptidos tales como ABM se refieren a polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos procedentes de dos o más polipéptidos heterólogos, tales como partes de anticuerpos de diferentes especies. Para ABM quiméricas, por ejemplo, los componentes que no se unen al antígeno pueden proceder de una amplia diversidad de especies, incluyendo primates tales como chimpancés y seres humanos. La región constante de la ABM quimérica es más preferentemente sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico es más preferentemente sustancialmente idéntica a la de un anticuerpo anti-EGFR recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable murina. Los anticuerpos humanizados son una forma particularmente preferida de anticuerpo de fusión o quimérico.

Como se usa en el presente documento, *un polipéptido que tiene actividad GnTIII* se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un resto de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en el enlace β -1-4 al manósido ligado a β del núcleo de trimanosilo de oligosacáridos ligados a N. Esto incluye polipéptidos de fusión que presentan actividad enzimática similar a, pero no necesariamente idéntica a, una actividad de β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosil-glucoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminil-transferasa (EC 2.4.1.144), según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), como se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso de que exista dependencia de la dosis, no es necesario que sea idéntica a la de GnTIII, sino más bien sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con el GnTIII (es decir, el polipéptido candidato presentará mayor actividad, o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, no más de aproximadamente diez veces menos actividad y, lo más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad en relación con el GnTIII).

Como se usa en el presente documento, el término *variante* (o *análogo*) se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido enumerado específicamente de la divulgación por inserciones, supresiones y sustituciones de aminoácidos, creado usando, p. ej., técnicas de ADN recombinante. Las variantes de las ABM de la presente divulgación incluyen moléculas de unión a antígeno quiméricas, primatizadas o humanizadas en donde uno o varios de los restos de aminoácidos se modifican por sustitución, adición y/o supresión de tal manera que no afecte sustancialmente a la afinidad de unión a antígeno (por ejemplo, EGFR). Se puede encontrar orientación para determinar qué resto de aminoácido se puede reemplazar, añadir o suprimir sin anular actividades de interés, comparando la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología (regiones conservadas) o reemplazando aminoácidos con secuencia consenso.

Como alternativa, pueden sintetizarse o seleccionarse variantes recombinantes que codifican estos polipéptidos iguales o similares haciendo uso de la "redundancia" en el código genético. Pueden introducirse diversas sustituciones de codones, tales como los cambios silenciosos que producen diversos sitios de restricción, para optimizar la clonación en un plásmido o vector viral o expresión en un sistema procariota o eucariota particular. Las mutaciones en la secuencia polinucleotídica pueden reflejarse en el polipéptido o dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar características tales como afinidades de unión a ligando, afinidades intercatenarias o tasa de degradación/renovación.

Preferentemente, las "sustituciones" de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, reemplazos conservativos de aminoácidos. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos "conservativas" basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las "inserciones" o "supresiones" están preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 10 aminoácidos. La variación

permitida puede determinarse experimentalmente realizando de manera sistemática inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en una molécula polipeptídica usando técnicas de ADN recombinante y ensayando las variantes recombinantes resultantes para determinar la actividad.

Como se usa en el presente documento, el término *humanizado* se usa para hacer referencia a una molécula de unión a antígeno procedente de una molécula de unión a antígeno no humana, por ejemplo, un anticuerpo murino, que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión a antígeno de la molécula parental pero que es menos inmunogénica en seres humanos. Esto puede lograrse mediante diversos métodos, incluyendo (a) injertar los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertar solo las CDR no humanas en el marco conservado humano y regiones constantes con o sin conservación de restos de marco conservado críticos (por ejemplo, los que son importantes para conservar buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpos) o (c) trasplantar todo los dominios variables no humanos, pero "ocultándolos" con una sección de tipo humano mediante el reemplazo de restos superficiales. Dichos métodos se desvelan en Jones *et al.*, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3): 169-217 (1994). En general hay 3 regiones determinantes de complementariedad, o CDR, (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, que están flanqueadas por cuatro subregiones marco conservadas (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Se puede encontrar un análisis de anticuerpos humanizados, entre otros, en la patente de los Estados Unidos n.º 6.632.927 y en la solicitud de los Estados Unidos publicada n.º 2003/0175269.

De manera similar, como se usa en el presente documento, el término *primitizado* se usa para hacer referencia a una molécula de unión a antígeno procedente de una molécula de unión a antígeno de un animal distinto de primate, por ejemplo, un anticuerpo murino, que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión a antígeno de la molécula parental pero que es menos inmunogénica en primates.

En el caso de que haya dos o más definiciones de un término que se usa y/o acepta en la técnica, se entiende que la definición del término como se usa en el presente documento incluya todos esos significados a menos que se indique de manera explícita lo contrario. Un ejemplo específico es el uso de la expresión "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) donde las definiciones incluyen restos de aminoácidos solapantes o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, se entiende que la aplicación de cualquier definición para hacer referencia a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo se encuentra dentro del alcance del término como se define y usa en el presente documento. Los restos de aminoácidos adecuados que abarcan las CDR como se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen posteriormente en la Tabla A como comparación. Los números exactos de restos que abarcan una CDR particular variará dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de manera rutinaria qué restos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

	Kabat	Chothia	AbM ²
CDR1 de V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 de V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 de V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 de V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 de V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 de V _L	89-97	91-96	89-97

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 es según las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.* (véase más adelante).

² "AbM" se refiere a las CDR definidas por el software de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto habitual en la materia puede asignar de manera inequívoca este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin basarse en ningún dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Como se usa en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones de restos de aminoácidos específicas en una ABM son según el sistema de numeración de Kabat. Las secuencias del listado de secuencias (es decir, de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 127) no están numeradas según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, está dentro de la experiencia habitual de un experto en la materia determinar el esquema de numeración de Kabat de cualquier secuencia de región variable en el Listado de Secuencias basado en la numeración de las secuencias presentadas en el mismo.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente divulgación, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia salvo por que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, puede suprimirse o sustituirse hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia con otro nucleótido o pueden insertarse en la secuencia de referencia varios nucleótidos de hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia.

En la práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos o secuencia polipeptídica de la presente divulgación puede determinarse de manera convencional usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia general entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente divulgación) y una secuencia objeto, también denominado alineación de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias de ADN. Se puede comparar una secuencia de ARN convirtiendo U en T. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuple=4, Penalización por desapareamiento=1, Penalización por unión=30, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Penalización por huecos=5, Penalización por tamaño de huecos 0,05, Tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a supresiones 5' o 3', no debido a supresiones internas, se debe realizar una corrección manual a los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta truncamientos en 5' y 3' de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', en relación con la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia de consulta que están 5' y 3' de la secuencia objeto, que no coinciden/se alinean, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Si un nucleótido coincide/se alinea se determina mediante resultados de la alineación de secuencias FASTDB. Este porcentaje se resta después del porcentaje de identidad, se calcula mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es lo que se usa para los fines de la presente divulgación. Solo se calculan bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia objeto, como se presenta en la alineación FASTDB, que no coinciden/se alinean con la secuencia de consulta, con el fin de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea con una secuencia de consulta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las supresiones se producen en el extremo 5' de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra una coincidencia/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no emparejadas representan 10 % de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no coincidentes/número total de bases en la secuencia de consulta), por lo que se resta 10 % de la puntuación de porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes coincidieran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería del 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia de consulta de 100 bases. Esta vez, las supresiones son supresiones internas, de modo que no hay bases en los 5' o 3' de la secuencia objeto que no coinciden/se alinean con la consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las bases 5' y 3' de la secuencia objeto que no coinciden/se alinean con la secuencia de consulta se corrigen manualmente. No se realizarán otras correcciones manuales para los fines de la presente divulgación.

Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de consulta de la presente divulgación, se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto es idéntica a la secuencia de consulta excepto que la secuencia del polipéptido objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de consulta, hasta 5 % de los restos de aminoácidos en la secuencia objeto se pueden insertar, eliminar o sustituir con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la práctica, si cualquier polipéptido particular es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a un polipéptido de referencia puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia general entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente divulgación) y una secuencia objeto, también denominado alineación de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias

de nucleótidos o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación de aminoácidos FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuple=2, Penalización por desapareamiento=1, Penalización por unión=20, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Tamaño de ventana=longitud de secuencia, Penalización por huecos=5, Penalización por tamaño de huecos=0,05, Tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a supresiones N o C terminales, no debido a supresiones internas, se debe realizar una corrección manual a los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta truncamientos N y C terminales de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, en relación con la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de restos de la secuencia de consulta que en sentido N y C terminal de la secuencia objeto, que no coinciden/se alinean con un resto objeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Si un resto coincide/se alinea se determina mediante resultados de la alineación de secuencias FASTDB. Este porcentaje se resta después del porcentaje de identidad, se calcula mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es lo que se usa para los fines de la presente divulgación. Solo los restos en los extremos N y C de la secuencia objeto, que no coinciden/se alinean con la secuencia de consulta, se tienen en cuenta con el fin de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad. Es decir, solo se consultan posiciones de restos fuera de los restos N y C terminales más lejanos de la secuencia objeto.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 restos de aminoácidos se alinea con una secuencia de consulta de 100 restos para determinar el porcentaje de identidad. La supresión se produce en el extremo N de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra una coincidencia/alineación de los primeros 10 restos en el extremo N. Los 10 restos no emparejados representan 10 % de la secuencia (número de restos en los extremos N y C no coincidentes/número total de restos en la secuencia de consulta), por lo que se resta 10 % de la puntuación de porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. Si los 90 restos restantes coincidieran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería del 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 restos con una secuencia de consulta de 100 restos. Esta vez, las supresiones son supresiones internas, de modo que no hay restos en los extremos N o C de la secuencia objeto que no coinciden/se alinean con la consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las posiciones de restos fuera de los extremos N y C terminales de la secuencia objeto, como se presenta en la alineación FASTDB, que no coinciden/se alinean con la secuencia de consulta se corrigen manualmente. No se realizarán otras correcciones manuales para los fines de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico que "*hibrida en condiciones rigurosas*" con una secuencia de ácido nucleico de la divulgación, se refiere a un polinucleótido que hibrida en una incubación durante una noche a 42 °C en una solución que contiene formamida al 50 %, SSC 5x (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10 % y ADN de esperma de salmón cortado, desnaturalizado, 20 µg/ml, seguido de lavado de los filtros en SSC 0,1x a aproximadamente 65 °C.

Como se usa en el presente documento, la expresión *dominio de localización en el Golgi* se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido residente en el Golgi que es responsable de anclar el polipéptido en su ubicación dentro del complejo de Golgi. En general, los dominios de localización comprenden "colas" amino terminales de una enzima.

Como se usa en el presente documento, la expresión *función efectora* se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, afinidad de unión al receptor de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígeno mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, regulación negativa de receptores de superficie celular, etc.

Como se usa en el presente documento, se considera que las expresiones *modificar por ingeniería genética*, *modificado por ingeniería genética*, *ingeniería genética* e *ingeniería de glucosilación* incluyen cualquier manipulación del patrón de glucosilación de un polipéptido de origen natural o recombinante o fragmento del mismo. La ingeniería de glucosilación incluye la ingeniería metabólica de la maquinaria de glucosilación de una célula, incluyendo manipulaciones genéticas de las rutas de síntesis de oligosacáridos para lograr glucosilación alterada de glucoproteínas expresadas en células. Asimismo, la ingeniería de glucosilación incluye los efectos de las mutaciones y el ambiente celular en la glucosilación. En una realización, la ingeniería de glucosilación es una alteración de la actividad glucosiltransferasa. En una realización particular, la modificación ingeniería da como resultado alteración de la actividad glucosaminiltransferasa y/o actividad fucosiltransferasa.

Como se usa en el presente documento, la expresión *célula hospedadora* abarca cualquier tipo de sistema celular que pueda modificarse por ingeniería genética para generar los polipéptidos y las moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación. En una realización, la célula hospedadora se modifica por ingeniería genética para permitir la

producción de una molécula de unión a antígeno con glucoformas modificadas. En una realización preferida, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión. En determinadas realizaciones, las células hospedadoras se han manipulado adicionalmente para expresar mayores niveles de uno o más polipéptidos que tienen actividad GnTIII. Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, p. ej., células de mamífero cultivadas, tales como células CHO, células HEK293-EBNA, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal.

Como se usa en el presente documento, la expresión *Citotoxicidad celular mediada por Fc* incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión de Fc soluble que contiene una región Fc humana. Es un mecanismo inmunitario que conduce a la lisis de "células diana de anticuerpos" por "células efectoras inmunitarias humanas", en donde:

Las *células efectoras inmunitarias humanas* son una población de leucocitos que presentan receptores de Fc en su superficie a través de los cuales se unen a la región Fc de anticuerpos o de proteínas de fusión de Fc y realizan funciones efectoras. Dicha población puede incluir, pero sin limitación, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o linfocitos citolíticos naturales (NK).

Las *células dianas de anticuerpos* son células a las que se unen los anticuerpos o las proteínas de fusión de Fc. Los anticuerpos o las proteínas de fusión de Fc se unen con células diana a través de la parte de proteína N-terminal de la región Fc.

Como se usa en el presente documento, la expresión *aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc* se define como un aumento del número de "células diana de anticuerpos" que se lisan en un momento dado, a una concentración dada de anticuerpo, o de proteína de fusión de Fc, en el medio que rodea las células diana, por el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc definido anteriormente y/o una reducción de la concentración de anticuerpo, o de proteína de fusión de Fc, en el medio que rodea las células diana, necesario para lograr la lisis de un número dado de "células diana de anticuerpos", en un momento dado, por el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc. El aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc es relativo a la citotoxicidad celular mediada por el mismo anticuerpo, o proteína de fusión de Fc, producido por el mismo tipo de células hospedadoras, usando los mismos métodos convencionales de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que son bien conocidos por los expertos en la materia, pero que no ha sido producido por células hospedadoras modificadas por ingeniería genética para expresar la glucosiltransferasa GnTIII por los métodos descritos en el presente documento.

Por *anticuerpo que tiene mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)* se entiende un anticuerpo, como se define ese término en el presente documento, que tiene mayor ADCC según lo determinado por cualquier método adecuado conocido por los expertos habituales en la materia. Un ensayo ADCC *in vitro* aceptado es el siguiente:

- 1) el ensayo usa células diana que se sabe que expresan el antígeno diana reconocido por la región de unión a antígeno del anticuerpo;
- 2) el ensayo usa células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), aisladas de la sangre de un donante sano elegido al azar, como células efectoras;
- 3) el ensayo se lleva a cabo según el siguiente protocolo:

- i) las PBMC se aíslan usando procedimientos convencionales de centrifugación de densidad y se suspenden a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular RPMI;
- ii) las células diana se cultivan mediante métodos convencionales de cultivo tisular, se recogen de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad mayor de 90 %, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 micro-Curies de ^{51}Cr , se la van dos veces con medio de cultivo celular y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de 105 células/ml;
- iii) se transfieren 100 microlitros de la suspensión de células diana final anterior a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos;
- iv) el anticuerpo se diluye en serie de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpos resultantes a las células diana en la placa de microtitulación de 96 pocillos, ensayando por triplicado diversas concentraciones de anticuerpos que abarcan todo el intervalo de concentraciones anterior;
- v) para los controles de liberación máxima (LM), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas, reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2 % (V/V) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpos (punto iv anterior);
- vi) para los controles de liberación espontánea (LE), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas, reciben 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpos (punto iv anterior);
- vii) la placa de microtitulación de 96 pocillos se centrifuga después a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incuba durante 1 hora a 4°C ;

viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) a cada pocillo para producir una relación de efector:célula diana de 25:1 y las placas se colocan en una incubadora con atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C durante 4 horas;

ix) se recoge el sobrenadante sin células de cada pocillo y se cuantifica la radioactividad liberada experimentalmente (RLE) usando un contador gamma;

x) el porcentaje de lisis específica se calcula para cada concentración de anticuerpo según la fórmula $(RLE - LM)/(LM - LE) \times 100$, donde RLE es la radioactividad promedio cuantificada (véase punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpos, LM es la radioactividad promedio cuantificada (véase punto ix anterior) para los controles de LM (véase punto v anterior) y LE es la radioactividad promedio cuantificada (véase punto ix anterior) para los controles de LE (véase punto vi anterior);

4) "aumento de ADCC" se define como un aumento del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentración de anticuerpos ensayado anteriormente y/o una reducción en la concentración de anticuerpo necesaria para lograr la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observado dentro del intervalo de concentración de anticuerpos ensayado anteriormente. El aumento de ADCC es relativo al ADCC, medido con el ensayo anterior, mediado por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células hospedadoras, usando los mismos métodos convencionales de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que son bien conocidos por los expertos en la materia, pero que no ha sido producido por células hospedadoras modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar GnTIII.

En un aspecto, la presente divulgación está relacionada con moléculas de unión a antígeno que tienen la especificidad de unión del ICR62 de rata (es decir, se une sustancialmente al mismo epítipo) y con el descubrimiento de que sus funciones efectoras pueden potenciarse mediante glucosilación alterada. En una realización, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico. En una realización preferida, la divulgación se dirige a un anticuerpo quimérico, o un fragmento del mismo, que comprende una o más (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDR de cualquiera de las SEQ ID NO: 53-108 y/o SEQ ID NO: 122-127. De manera específica, en una realización preferida, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 124; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 126; y (c) SEQ ID NO: 108. En otra realización preferida, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 114; (b) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 118; y (c) SEQ ID NO: 119. En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión.

En otra realización, la molécula de unión a antígeno comprende el dominio V_H del anticuerpo ICR62 de rata codificado por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una variante del mismo; y un polipéptido no murino. En otra realización preferida, la divulgación se dirige a una molécula de unión a antígeno que comprende el dominio V_L del anticuerpo de rata codificado por SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44, o una variante del mismo; y un polipéptido no murino.

En otro aspecto, la divulgación se dirige a moléculas de unión a antígeno que comprenden una o más (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR truncadas de ICR62. Dichas CDR truncadas contendrán, como mínimo, los restos de aminoácidos determinantes de especificidad para la CDR dada. Por "resto determinante de especificidad" se entiende los restos que están directamente implicados en la interacción con el antígeno. En general, solo aproximadamente un quinto a un tercio de los restos en una CDR dada participan en la unión al antígeno. Los restos determinantes de especificidad en una CDR particular pueden identificarse mediante, por ejemplo, cálculo de contactos interatómicos a partir de modelado tridimensional y determinación de la variabilidad de secuencia en una posición de resto dada de acuerdo con los métodos descritos en Padlan *et al.*, FASEB J. 9(1):133-139 (1995).

En consecuencia, la divulgación también se dirige a un polinucleótido aislado que comprende al menos una (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) región determinante de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los restos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferentemente, dichos polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula de unión a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o variantes o formas truncadas del mismo que contienen al menos los restos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En una realización, el polinucleótido comprende al menos una de las CDR expuestas en las tablas 2-5, posteriormente. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable completa de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo quimérico (p. ej., humanizado). La divulgación se dirige además a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

En otra realización, la divulgación se dirige a una molécula de unión a antígeno que comprende al menos una (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los restos determinantes de especificidad para dicha

región determinante de complementariedad y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o variantes o formas truncadas del mismo que contienen al menos los restos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende al menos una de las CDR expuestas en las tablas 2-5, posteriormente. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno comprende la región variable de un anticuerpo de cadena ligera o pesada. En una realización particularmente útil, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, p. ej., humanizado. La divulgación también se dirige a métodos para preparar dichas moléculas de unión a antígeno y a su uso en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de proliferación celular en donde se expresa EGFR, en particular, en donde EGFR se expresa de manera anómala (por ejemplo, se sobreexpresa) en comparación con tejido normal del mismo tipo celular. Dichos trastornos incluyen, pero sin limitación, a cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón. Los niveles de expresión de EGFR pueden determinarse mediante métodos conocidos en la técnica y los descritos en el presente documento (por ejemplo, mediante ensayo de inmunohistoquímica, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, transferencia de Western, unión a ligandos, actividad cinasa, etc.).

La divulgación también se dirige a un método para marcar como diana *in vivo* o *in vitro* células que expresan EGFR. Las células que expresan EGFR pueden marcarse como diana con fines terapéuticos (p. ej., para tratar un trastorno que es tratable mediante la alteración de la señalización mediada por EGFR, por ejemplo, bloqueando la unión del ligando o dirigiéndose a las células que expresan EGFR para su destrucción por el sistema inmunitario). En una realización, la presente divulgación se dirige a un método para marcar como diana células que expresan EGFR en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una ABM de la divulgación. Las células que expresan EGFR también pueden marcarse como diana con fines de diagnóstico (p. ej., para determinar si expresan EGFR, bien de manera normal o anómala). Por tanto, la divulgación también se dirige a métodos para detectar la presencia de EGFR o una célula que expresa EGFR, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Un método para detectar la expresión de EGFR según la presente divulgación comprende poner en contacto una muestra para analizar, opcionalmente con una muestra de control, con una ABM de la presente divulgación, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre la ABM y EGFR. Después se detecta la formación de complejo (por ejemplo, mediante ELISA u otros métodos conocidos en la técnica). Cuando se usa una muestra de control con la muestra de ensayo, cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos ABM-EGFR al comparar las muestras de ensayo y control es indicativa de la presencia de EGFR en la muestra de ensayo.

TABLA 2

CDR		Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
CDR1 de cadena pesada	Kabat	GACTACAAGATACAC	54
		GACTACGCCATCAGC	56
		GACTACTATATGCAC	58
		GACTACAAGATATCC	122
	Chothia	GGTTTTACATTCAGTACTGACTAC	60
		GGTTACACATTCAGTACTGACTAC	62
		GGTTATTCATTCAGTACTGACTAC	64
	AbM	GGTTTTACATTCAGTACTGACTACAAGATACAC	66
		GGTTTTACATTCAGTACTGACTACGCCATCAGC	68
		GGTTTTACATTCAGTACTGACTACTATATGCAC	70
		GGTTACACATTCAGTACTGACTACTATATGCAC	72
		GGTTATTCATTCAGTACTGACTACAAGATACAC	74
		GGTTTCACATTCAGTACTGACTACAAGATATCC	124

(continuación)

CDR		Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
CDR2 de cadena pesada	Kabat	TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CAATGAAAAGTTCAAGAGC	76
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CGCACAGAAGTTCCAGGGC	78
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTA CGCACAGAAGTTCCAGGGC	80
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CGCACAGAAGTTTCAGGGC	82
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CAGCCCAAGCTTCCAAGGC	84
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CAACGAGAAGTTCCAAGGC	86
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAACTA CGCACAGAAGTTCCAGGGC	88
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACGTA CGCACAGAAGTTCCAGGGC	90
		TACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA	126
		CAGCCCAAGCTTCCAAGGC	
	Chothia	AATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	92
		AACCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	94
		AACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	96
	AbM	TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	98
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	100
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	102
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	104
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	106
CDR3 de cadena pesada	Kabat Chothia AbM	CTATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGC C	108

TABLA 3

CDR		Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR1 de cadena pesada	Kabat	DYKIH	53
		DY AIS	55
		DYYMH	57
		DYKIS	123
	Chothia	GFTFTDY	59
		GYTFTDY	61
		GYSFTDY	63
	AbM	GFTFTDYKIH	65
		GFTFTDY AIS	67
		GFTFTDY YMH	69
		GYTFTDY YMH	71
		GYSFTDYKIH	73
		GFTFTDYKIS	125

(continuación)

CDR		Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR2 de cadena pesada	Kabat	YFNPNSGYSTYNEKFKS	75
		GINPNSGYSTYAQKFQG	77
		YFNPNSGYSTYAQKFQG	79
		WINPNSGYSTYAQKFQG	81
		WINPNSGYSTYSPSFQG	83
		WINPNSGYSTYNEKFQG	85
		YFNPNSGYSNYAQKFQG	87
		YFNPNSGYATYAQKFQG	89
		YFNPNSGYSTYSPSFQG	127
	Chothia	NPNSGYST	91
		NPNSGYSN	93
		NPNSGYAT	95
	AbM	YFNPNSGYST	97
		GINPNSGYST	99
		WINPNSGYST	101
		YFNPNSGYSN	103
		YFNPNSGYAT	105
CDR3 de cadena pesada	Kabat Chothia AbM	LSPGGYYVMDA	107

TABLA 4

CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR1 de cadena ligera de Kabat	KASQNINNYLN	111
	RASQGINNYLN	113
CDR2 de cadena ligera de Kabat	NTNNLQT	115
CDR3 de cadena ligera de Kabat	LQHNSFPT	117

TABLA 5

CDR	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
CDR1 de cadena ligera de Kabat	AAAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAAC	112
	CGGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAAT	114
CDR2 de cadena ligera de Kabat	AATACAAACAATTTGCAAACA	116
	AATACCAACAACCTTGCAGACA	118
CDR3 de cadena ligera de Kabat	TTGCAGCATAATAGTTTTCCACG	119

Se sabe que varios mecanismos están implicados en la eficacia terapéutica de anticuerpos anti-EGFR, incluyendo bloqueo de la unión del ligando (p. ej., EGF, TGF- α , etc.) con EGFR y la posterior activación de rutas de señalización, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) e inducción de detención del crecimiento o diferenciación terminal.

El anticuerpo monoclonal de rata ICR62 (IgG2b) se ha analizado en la publicación PCT n.º WO 95/20045. Se dirigió al epítipo C de EGFR y se mostró que inhibe la unión del ligando, inhibe el crecimiento *in vitro* de carcinomas de células escamosas que expresan EGFR e induce la regresión de xenoinjertos de tumores en ratones atímicos (documento WO 95/20045; Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). Como un anticuerpo completamente de roedor, la administración del anticuerpo monoclonal de rata ICR62 a seres humanos dio como resultado una respuesta HARA en algunos pacientes incluso después de una sola dosis. (documento WO 95/20045; Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).

Se han descrito anticuerpos quiméricos de ratón/ser humano. Véase, por ejemplo, Morrison, S. L. *et al.*, PNAS 11: 6851-6854 (noviembre de 1984); publicación de patente europea n.º 173494; Boulianna, G. L. *et al.*, Nature 312: 642 (diciembre de 1984); Neubeiger, M. S. *et al.*, Nature 314: 268 (marzo de 1985); publicación de patente europea n.º 125023; Tan *et al.*, J. Immunol. 135: 8564 (noviembre de 1985); Sun, L. K *et al.*, Hybridoma 5(1): 517 (1986); Sahagan *et al.*, J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986). Véase, en general, Muron, Nature 312: 597 (diciembre de 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5(3) (marzo de 1985); Marx, Science 229: 455 (agosto de 1985); y Morrison, Science 229: 1202-1207 (septiembre de 1985). IMC-C225 (Erbix®, Imclone) es un anticuerpo monoclonal quimérico

dirigido contra EGFR y que tiene una región variable de ratón y una región constante humana (véase Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). La parte murina de IMC-225 procede de M225, que se descubrió que se une a EGFR e inhibe la fosforilación dependiente de tirosina cinasa inducida por EGF, así como induce apoptosis en líneas celulares tumorales que sobreexpresan EGFR (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). Sin embargo, M225 indujo una reacción HAMA en pacientes tratados con el anticuerpo en ensayos clínicos de fase I (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). IMC-225 se ha ensayado *in vivo* e *in vitro* y se ha usado en combinación con radioterapia y quimioterapia en varios tipos de tumores, incluyendo los asociados con mal pronóstico (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). Sin embargo, IMC-225 se ha asociado con toxicidades tales como reacciones alérgicas y cutáneas en pacientes a los que se administró el anticuerpo IMC-225 en ensayos clínicos (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)).

En una realización particularmente preferida, la ABM quimérico de la presente divulgación es un anticuerpo humanizado. Se conocen en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, se pueden preparar ABM humanizadas de la presente divulgación según los métodos de la patente de los Estados Unidos n.º 5.225.539 de Winter, la patente de los Estados Unidos n.º 6.180.370 de Queen *et al.*, la patente de los Estados Unidos n.º 6.632.927 de Adair *et al.*, o la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2003/0039649 de Foote. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". Puede realizarse humanización esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo con secuencias de región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567) en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Los anticuerpos anti-EGFR humanizados objeto comprenderán regiones constantes de inmunoglobulina humana.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región marco conservada humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro método para seleccionar la secuencia de marco conservado humano es comparar la secuencia de cada subregión individual del marco conservado completo de roedores (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) o alguna combinación de las subregiones individuales (p. ej., FR1 y FR2) frente a una biblioteca de secuencias de regiones variables humanas conocidas que corresponden a esa subregión marco conservada (por ejemplo, como se determina por la numeración de Kabat) y elegir la secuencia humana para cada subregión o combinación que sea más cercana a la del roedor (Leung, publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2003/0040606A1, publicada el 27 de febrero de 2003). Otro método usa una región marco conservada particular procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Se pueden generar modelos tridimensionales de inmunoglobulina usando programas informáticos con los que están familiarizados los expertos en la materia (p. ej., Insight I, Accelrys, Inc. (anteriormente MSI) o en <http://swissmodel.expasy.org>). Estos programas informáticos pueden ilustrar y presentar estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de modo que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como mayor afinidad por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de región hipervariable están implicados directa y más sustancialmente en la influencia sobre la unión a antígeno.

En una realización, los anticuerpos de la presente divulgación comprenden una región Fc humana. En una realización específica, la región constante humana es IgG1, como se expone en las SEQ ID NO: 109 y 110 y se expone a continuación:

Secuencia de nucleótidos de IgG1 (SEQ ID NO: 110)

ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
 GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
 ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCG
 CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATC
 ACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
 CTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
 GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTCTGCACC
 AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
 CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG
 TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAAGACCACGCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC

AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
 ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

Secuencias de aminoácidos de IgG1 (SEQ ID NO: 109)

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

Sin embargo, la presente divulgación también abarca variantes e isoformas de la región Fc humana. Por ejemplo, se pueden producir regiones Fc variantes adecuadas para su uso en la presente divulgación según los métodos enseñados en la patente de los Estados Unidos n.º 6.737.056 de Presta (variantes de región Fc con función efectora alterada debido a una o más modificaciones de aminoácidos); o en las solicitudes de patente de los Estados Unidos n.º 60/439.498; 60/456.041; 60/514.549; o documento WO 2004/063351 (regiones Fc variantes con mayor afinidad de unión debido a la modificación de aminoácidos); o en la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 10/672.280 o documento WO 2004/099249 (variantes de Fc con unión alterada a FcγR debido a la modificación de aminoácidos).

10

15 En otra realización, las moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética para tener afinidad de unión mejorada según, por ejemplo, los métodos desvelados en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2004/0132066 de Balint *et al.*

20 En una realización, la molécula de unión a antígeno de la presente divulgación se conjuga con un resto adicional, tal como un radiomarcador o una toxina. Dichas ABM conjugadas pueden producirse mediante numerosos métodos que son bien conocidos en la técnica.

Una diversidad de radionúclidos son aplicables a la presente divulgación y a los expertos en la materia se les atribuye la capacidad de determinar fácilmente qué radionúclido es el más apropiado en diversas circunstancias. Por ejemplo, El yodo-131 es un radionúclido bien conocido usado para inmunoterapia dirigida. Sin embargo, la utilidad clínica del yodo-131 puede estar limitada por varios factores incluyendo: semivida física a los ocho días; deshalogenación de anticuerpos yodados tanto en la sangre como en sitios tumorales; y características de emisión (p. ej., componente gamma grande) que pueden ser subóptimas para el depósito de dosis localizadas en el tumor. Con la llegada de agentes quelantes superiores, la oportunidad de unir grupos quelantes metálicos a proteínas ha aumentado las oportunidades de utilizar otros radionúclidos tales como indio-111 y itrio-90. El itrio-90 proporciona varios beneficios para la utilización en aplicaciones radioinmunoterapéuticas: la semivida de 64 horas de itrio-90 es lo suficientemente larga para permitir la acumulación de anticuerpo en el tumor y, a diferencia de, p. ej., yodo-131, el itrio-90 es un emisor

25

30

beta puro de alta energía sin irradiación gamma acompañante en su desintegración, con un intervalo en tejido de 100 a 1000 diámetros celulares. Asimismo, la cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración ambulatoria de anticuerpos marcados con itrio-90. Adicionalmente, la internalización de anticuerpo marcado no es necesaria para la destrucción celular y la emisión local de radiación ionizante debería ser letal para células tumorales adyacentes que carecen del antígeno diana.

Las dosificaciones eficaces de tratamiento individual (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos anti-EGFR marcados con itrio-90 varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosificaciones eficaces no ablativas para médula ósea de tratamiento único de anticuerpos anti-EGFR marcados con yodo-131 varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosificaciones eficaces ablativas de tratamiento único (es decir, pueden necesitar un trasplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos anti-EGFR marcados con yodo-131 varían entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferentemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Junto con un anticuerpo quimérico anti-EGFR, debido a la semivida en circulación más larga frente a anticuerpos murinos, una dosificación eficaz no ablativa para médula ósea de tratamiento único de anticuerpos quiméricos anti-EGFR marcados con yodo-131 varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, más preferentemente menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de captura de imágenes para, p. ej., el marcador de indio-111, son normalmente menores de aproximadamente 5 mCi.

Con respecto a anticuerpos anti-EGFR radiomarcados, también se puede realizar terapia con los mismos usando un único tratamiento de terapia o usando múltiples tratamientos. Debido al componente de radionúclido, se prefiere que, antes del tratamiento, se "recojan" células madre periféricas ("CMP") o médula ósea ("MO") para pacientes que experimenten toxicidad potencialmente mortal de la médula ósea resultante de radiación. MO y/o CMP se recogen usando técnicas convencionales y después se purgan y congelan para posible reinfusión. Adicionalmente, lo más preferido es que antes del tratamiento se realice un estudio de dosimetría diagnóstica usando un anticuerpo marcado para diagnóstico (p. ej., usando indio-111) en el paciente, uno de cuyos fines es garantizar que el anticuerpo marcado terapéuticamente (por ejemplo, usando itrio-90) no se "concentre" innecesariamente en ningún órgano o tejido normal.

En una realización preferida, la presente divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la tabla 7 a continuación. En una realización preferida, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia mostrada en la tabla 6 a continuación. La divulgación se dirige además a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en la tabla 6 a continuación. En otra realización, la divulgación se dirige a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos en la tabla 7. La divulgación también abarca un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las construcciones en la tabla 7 con sustituciones de aminoácidos conservadoras.

TABLA 6

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEQ ID NO
VH de ICR62	CAGGTCAACCTACTGCAGTCTGGGGCTGCACTGGT GAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGTTGTCTTGCAAAG GTTCTGGTTTTACATTCAGTACTACAAGATACAC TGGGTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAGCCTTGAGT GGATTGGGTATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGT ACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAT TGACTGCAGACAAATCCACCGATACAGCCTATATG GAGCTTACCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAAC CTATTACTGTACAAGACTATCCCCAGGGGGTTACT ATGTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAGCTTCAGTC ACTGTCTCCTC	2

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEQ ID NO
I-HHA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCTTCTGGATTTACATTCACTGACTACGCCATCAG CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	4
I-HHB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	6
I-HHC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	8
I-HLA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCA TGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	10

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEQ ID NO
I-HLB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATACTTCAACCCTAACAGCGGTTATA GTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCAC CATGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	12
I-HLC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATACTTCAACCCTAACAGCGGTTACA GTACTTACAACGAGAAGTTCAAGAGCCGGGTCAC CATGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	14
I-HHD	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCCTCTGGTTTCACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	16
I-HHE	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTCACATTCACTGACTACAAGATATC CTGGGTGCGACAGGCTCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	18

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEQ ID NO
I-HHF	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTC GAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	20
I-HHG	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGC CACGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	22
I-HLA1	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	24
I-HLA2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	26

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEQ ID NO
I-HLA3	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTACACATTCAGTACTACTATATGC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	28
I-HLA4	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTACACATTCAGTACTACTATATGC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCAC CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGC CATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	30
I-HLA5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCAGTACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	32
I-HLA6	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCAGTACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	34

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEQ ID NO
I-HLA7	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCGCGGACAACGGCTCGA GTGGATCGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCAC CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGC CATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	36
I-HLA8	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATA GTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCAC CATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGT TACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCAC CGTGACCGTCTCCTCA	38
I-HLA9	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGCGAGTCGTTGAAGATCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTATTCATTCACTGACTACAAGATCCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	40
I-HLA10	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGCGAGTCGTTGAAGATCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTATTCATTCACTGACTACAAGATCCA CTGGGTGCGACAGATGCCTGGAAAGGGCCTCGAG TGGATGGGCTACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCAG	120
Secuencia señal de VH	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGC AGCAGCCACAGGAGCCCACTCC	42

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEQ ID NO
VL de ICR62	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCATTCCTGTCT GCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTATCAACTGCAA AGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAACTGGT ATCAGCAAAAGCTTGGAGAAGCTCCCCAACGCCT GATATATAATACAAACAATTTGCAAACAGGCATCC CATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGAT TACACACTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGA TTTTGCCACATATTTCTGCTTGCAGCATAATAGTTT TCCCACGTTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGA AACGTACG	44
I-KC	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTCTGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCC GGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGCAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG AATCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACG	46
Secuencia señal de VL	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCT CCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGT	48
I-KA	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTCTGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCC GGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGCAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG AATACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGTG	50
I-KB	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTCTGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCA AAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAACTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGCAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG AATACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGTG	52

TABLA 7

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
VH de ICR62	QVNLLQSGAALVKPGASVKLSCKGSGFTFTDYKIHVVK QSHGKSLEWIGYFNPNSGYSTYNEKFKSKATLTADKSTD TAYMELTSLSSEDSATYYCTRLSPGGYYVMDAWGQGA SVTVSS	1

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
I-HHA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYAISWVR QAPGQGLEWMGGINPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	3
I-HHB	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	5
I-HHC	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	7
I-HLA	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYAQKFQGRVTMTADT</u> <u>SISTAYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	9
I-HLB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGFTFTDYKIHWR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTMTADTSI STAYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	11
I-HLC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGFTFTDYKIHWR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRVTMTADTSI STAYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	13
I-HHD	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	15
I-HHE	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKISWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	17
I-HHF	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	19
I-HHG	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYATYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	21
I-HLA1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPFQGVITISADKSI</u> <u>STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	23

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
I-HLA2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYYMHWV RQAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ GTTVTVSS	25
I-HLA3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWV RQAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ GTTVTVSS	27
I-HLA4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWV RQAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ GTTVTVSS	29
I-HLA5	<u>QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYYMHWV</u> <u>RQAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSI</u> <u>STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	31
I-HLA6	<u>QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYYMHWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKS</u> <u>ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	33
I-HLA7	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR QARGQRLEWIGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	35
I-HLA8	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	37
I-HLA9	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWRQ</u> <u>APGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGT</u> <u>TVTVSS</u>	39
I-HLA10	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWRQ</u> <u>MPGKGLEWMGYFNPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSIST</u> <u>AYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGT</u> <u>TVTVSS</u>	121
Secuencia señal de VH	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	41
VL de ICR62	<u>DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQINNYLNWYQQK</u> <u>LGEAPKRLIYNTNNLQTGIPSRFSGSGSDTYTLTISSLQP</u> <u>EDFATYFCLQHNSFPTFGAGTKLEIKRT</u>	43
I-KC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	45
Secuencia señal de VL	MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARC	47

(continuación)

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEQ ID NO
I-KA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQGTGVPSTRFSGSGSGTEYTLTISSLQ PEDFATYYCLQHNSFPTFGQGQGTKLEIKRTV	49
I-KB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQNINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQGTGVPSTRFSGSGSGTEYTLTISSLQ PEDFATYYCLQHNSFPTFGQGQGTKLEIKRTV	51

En otra realización, la presente divulgación se dirige a un vector de expresión y/o una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos aislados de la presente divulgación.

En general, se puede usar cualquier tipo de línea celular cultivada para expresar la ABM de la presente divulgación. En una realización preferida, células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales se usan como la línea celular de fondo para generar las células hospedadoras modificadas por ingeniería genética de la divulgación.

La eficacia terapéutica de las ABM de la presente divulgación se puede potenciar produciéndolas en una célula hospedadora que expresa además un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido residente en el Golgi. En otra realización preferida, la expresión de las ABM de la presente divulgación en una célula hospedadora que expresa un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII da como resultado ABM con mayor afinidad de unión al receptor de Fc y mayor función efectora. En consecuencia, en una realización, la presente divulgación se dirige a una célula hospedadora que comprende (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII; y (b) un polinucleótido aislado que codifica una ABM de la presente divulgación, tal como un anticuerpo quimérico, primatizado o humanizado que se une a EGFR humano. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en el Golgi es el dominio de localización de manosidasa II. Se desvelan métodos para generar dichos polipéptidos de fusión y usarlos para producir anticuerpos con mayores funciones efectoras en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos n.º 60/495.142 y la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2004/0241817 A1. En otra realización preferida, la ABM quimérica es un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, que tiene la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo quimérico comprende un Fc humano. En otra realización preferida, el anticuerpo es primatizado o humanizado.

En una realización, uno o varios polinucleótidos que codifican una ABM de la presente divulgación pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, como alternativa, un sistema de expresión regulado. Los sistemas de expresión regulados adecuados incluyen, pero sin limitación, un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión de interruptor lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoides, un sistema promotor inducible por temperatura y un sistema de expresión de metalotioneína inducible por metal. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican una ABM de la presente divulgación están comprendidos dentro del sistema de la célula hospedadora, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Se considera que el nivel de expresión máximo es el mayor nivel posible de expresión de polipéptidos estables que no tiene un efecto adverso significativo sobre la tasa de crecimiento celular y se determinará mediante experimentación rutinaria. Los niveles de expresión se determinan mediante métodos conocidos en general en la técnica, incluyendo análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo específico para la ABM o un anticuerpo específico para un marcador peptídico fusionado con la ABM; y análisis de transferencia de Northern. En una alternativa adicional, el polinucleótido puede estar unido operativamente con un gen indicador; los niveles de expresión de una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata se determinan midiendo una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen indicador. El gen indicador puede transcribirse junto con el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido de fusión como una única molécula de ARNm; sus respectivas secuencias codificantes pueden estar unidas por un sitio de entrada de ribosomas interno (IRES) o por un potenciador de la traducción independiente de caperuza (CITE). El gen indicador puede traducirse junto con al menos un ácido nucleico que codifica una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata de modo que se forme una única cadena polipeptídica. Los ácidos nucleicos que codifican las ABM de la presente divulgación pueden estar unidos operativamente al gen indicador bajo el control de un único promotor, de modo que el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión y el gen indicador se transcriben en una molécula de ARN que se corta y empalma como

alternativa en dos moléculas de ARN mensajero (ARNm) separadas; uno de los ARNm resultantes se traduce a dicha proteína indicadora y el otro se traduce a dicho polipéptido de fusión.

Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una ABM que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata junto con señales de control transcripcional/traduccionales adecuadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Se pueden utilizar diversos sistemas de hospedador-vectores de expresión para expresar la secuencia codificante de las ABM de la presente divulgación. Preferentemente, las células de mamífero se usan como sistemas de células hospedadoras transfectadas con vectores de expresión de ADN de plásmido o ADN de cósmido recombinantes que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante del polipéptido de fusión. Lo más preferentemente, células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales se usan como sistema de células hospedadoras. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y métodos de selección se describen en las siguientes referencias y las referencias en las mismas: Borth *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 71(4):266-73 (2000-2001), en Werner *et al.*, Arzneimittelforschung/Drug Res. 48(8):870-80 (1998), en Andersen y Krummen, Curr. Op. Biotechnol. 13:117-123 (2002), en Chadd y Chamow, Curr. Op. Biotechnol. 12:188-194 (2001), y en Giddings, Curr. Op. Biotechnol. 12: 450-454 (2001). En realizaciones alternativas, pueden usarse otros sistemas de células hospedadoras eucariotas, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de una ABM de la presente divulgación, tales como los sistemas de expresión enseñados en la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 60/344.169 y documento WO 03/056914 (métodos para producir glucoproteína de tipo humano en una célula hospedadora eucariota no humana); sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen la secuencia codificante de una ABM química que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen la secuencia codificante de una ABM de la divulgación, incluyendo, pero sin limitación, los sistemas de expresión enseñados en la patente de los Estados Unidos n.º 6.815.184 (métodos para la expresión y secreción de polipéptidos biológicamente activos de lenteja de agua modificada por ingeniería genética); documento WO 2004/057002 (producción de proteínas glucosiladas en células de plantas briófitas mediante la introducción de un gen de glucosiltransferasa) y documento WO 2004/024927 (métodos para generar proteína extracelular heteróloga no vegetal en protoplastos de musgo); y la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 60/365.769, 60/368.047 y WO 2003/078614 (procesamiento de glucoproteínas en plantas transgénicas que comprenden una enzima funcional GnTIII de mamífero); o sistemas de células animales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., adenovirus, virus vaccinia) incluyendo líneas celulares modificadas por ingeniería genética para contener múltiples copias del ADN que codifica una ABM química que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata, bien amplificado de manera estable (CHO/dhfr) o amplificado de manera inestable en cromosomas de minúsculo doble (por ejemplo, líneas celulares murinas). En una realización, el vector que comprende el polinucleótido o los polinucleótidos que codifican la ABM de la divulgación es policistónico. Además, en una realización, la ABM analizada anteriormente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

Para los métodos de la presente divulgación, en general se prefiere expresión estable a expresión transitoria porque normalmente logra resultados más reproducibles y también es más susceptible de producción a gran escala. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación víricos, pueden transformarse células hospedadoras con los ácidos nucleicos codificantes respectivos controlados por elementos de control de la expresión adecuados (p. ej., secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Después de la introducción de ADN exógeno, pueden dejarse crecer células modificadas por ingeniería genética durante 1-2 días en un medio enriquecido y después cambiarse a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite la selección de células que han integrado el plásmido de manera estable en sus cromosomas y crecen hasta formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares.

Se pueden usar varios sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, los genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, Cell 11: 223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalski y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026 (1962)) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22: 817 (1980)), que se pueden emplear en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia antimetabolitos como base de la selección de genes de dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567 (1989); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981)); e hgro, que confiere resistencia a la

higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30: 147 (1984)). Recientemente, se han descrito genes seleccionables adicionales, concretamente *trpB*, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; *hisD*, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047 (1988)); el sistema de glutamina sintasa; y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

La presente divulgación se dirige además a un método para modificar el perfil de glucosilación de las ABM de la presente divulgación que son producidas por una célula hospedadora, que comprende expresar en dicha célula hospedadora un ácido nucleico que codifica una ABM y un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII o un vector que comprende dichos ácidos nucleicos. Preferentemente, el polipéptido modificado es IgG o un fragmento del mismo que comprende la región Fc. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

Las ABM modificadas producidas por las células hospedadoras de la divulgación presentan mayor afinidad de unión al receptor de Fc y/o mayor función efectora como resultado de la modificación. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que contiene la región Fc. Preferentemente, la mayor afinidad de unión al receptor de Fc es mayor unión a un receptor activador de Fc γ , tal como el receptor Fc γ RIIIa. La mayor función efectora es preferentemente un aumento en una o más de las siguientes: mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mayor fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), mayor secreción de citocinas, mayor captación de antígeno mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, mayor citotoxicidad celular mediada por Fc, mayor unión a linfocitos NK, mayor unión a macrófagos, mayor unión a células polimorfonucleares (PMN), mayor unión a monocitos, mayor reticulación de anticuerpos unidos a diana, mayor señalización directa inductora de apoptosis, mayor maduración de células dendríticas y mayor sensibilización de linfocitos T.

La presente divulgación también se dirige a un método para producir una ABM de la presente divulgación, que tiene oligosacáridos modificados en una célula hospedadora que comprende (a) cultivar una célula hospedadora modificada por ingeniería genética para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII en condiciones que permiten la producción de una ABM según la presente divulgación, en donde dicho polipéptido que tiene actividad GnTIII se expresa en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de dicha ABM producida por dicha célula hospedadora; y (b) aislar dicha ABM. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII. En una realización particularmente preferida, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido residente en el Golgi.

Preferentemente, el dominio de localización en el Golgi es el dominio de localización de manosidasa II o GnTI. Como alternativa, el dominio de localización en el Golgi se selecciona del grupo que consiste en: el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de α 1-6 núcleo fucosiltransferasa. Las ABM producidas por los métodos de la presente divulgación tienen mayor afinidad de unión al receptor de Fc y/o mayor función efectora. Preferentemente, la mayor función efectora es una o más de las siguientes: mayor citotoxicidad celular mediada por Fc (incluyendo mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), mayor fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), mayor secreción de citocinas, mayor captación de antígeno mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, mayor unión a linfocitos NK, mayor unión a macrófagos, mayor unión a monocitos, mayor unión a células polimorfonucleares, mayor señalización directa inductora de apoptosis, mayor reticulación de anticuerpos unidos a diana, mayor maduración de células dendríticas o mayor sensibilización de linfocitos T. La mayor afinidad de unión al receptor de Fc es preferentemente mayor unión a receptores activadores de Fc tales como Fc γ RIIIa. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

En otra realización, la presente divulgación se dirige a una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata producido por los métodos de la divulgación que tiene una mayor proporción de oligosacáridos bisecados en la región Fc de dicho polipéptido. Se contempla que dicha ABM abarca anticuerpos y fragmentos de los mismos que comprenden la región Fc. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos bisecados en la región Fc de la ABM es al menos 50 %, más preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % y lo más preferentemente al menos 90-95 % de los oligosacáridos totales. En otra realización más, la ABM producida por los métodos de la divulgación tiene una mayor proporción de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos por los métodos de la presente divulgación. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 % a 70 %, lo más preferentemente al menos 75 %. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser del tipo híbrido o complejo. En una realización particularmente preferida, la ABM producida por las células hospedadoras y los métodos de la divulgación tiene una mayor proporción de oligosacáridos no fucosilados, bisecados, en la región Fc. Los oligosacáridos no fucosilados, bisecados, pueden ser híbridos o complejos. De manera específica, los métodos de la presente divulgación pueden usarse para producir ABM en las que al menos el 15 %, más preferentemente al menos el 20 %, más preferentemente al menos el 25 %, más preferentemente al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 35 % de los

oligosacáridos en la región Fc de la ABM son bisecados, no fucosilados. Los métodos de la presente divulgación también pueden usarse para producir polipéptidos en los que al menos el 15 %, más preferentemente al menos el 20 %, más preferentemente al menos el 25 %, más preferentemente al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 35 % de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son híbridos bisecados no fucosilados.

En otra realización, la presente divulgación se dirige a una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata modificado por ingeniería genética para tener mayor función efectora y/o mayor afinidad de unión al receptor de Fc, producido por los métodos de la divulgación. Preferentemente, la mayor función efectora es una o más de las siguientes: mayor citotoxicidad celular mediada por Fc (incluyendo mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), mayor fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), mayor secreción de citocinas, mayor captación de antígeno mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, mayor unión a linfocitos NK, mayor unión a macrófagos, mayor unión a monocitos, mayor unión a células polimorfonucleares, mayor señalización directa inductora de apoptosis, mayor reticulación de anticuerpos unidos a diana, mayor maduración de células dendríticas o mayor sensibilización de linfocitos T. En una realización preferida, la mayor afinidad de unión al receptor de Fc es mayor unión a un receptor activador de Fc, más preferentemente FcγRIIIa. En una realización, la ABM es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

La presente divulgación se dirige además a composiciones farmacéuticas que comprenden las ABM de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación se dirige además al uso de dichas composiciones farmacéuticas en el método de tratamiento del cáncer. De manera específica, la presente divulgación se dirige a un método para el tratamiento del cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la divulgación.

La presente divulgación describe además métodos para la generación y uso de sistemas de células hospedadoras para la producción de glucoformas de las ABM de la presente divulgación, que tiene mayor afinidad de unión al receptor de Fc, preferentemente mayor unión a receptores activadores de Fc, y/o que tiene mayores funciones efectoras, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La metodología de glucoingeniería que se puede usar con las ABM de la presente divulgación se ha descrito con mayor detalle en la patente de los Estados Unidos n.º 6.602.684, publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2004/0241817 A1, publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2003/0175884 A1, solicitud de patente provisional de los Estados Unidos n.º 60/441.307 y documento WO 2004/065540. Las ABM de la presente divulgación pueden como alternativa modificarse por glucoingeniería para tener restos de fucosa reducidos en la región Fc según las técnicas desveladas en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2003/0157108 (Genentech) o en los documentos EP 1 176 195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 y publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140 (Kyowa). También pueden producirse ABM modificadas por glucoingeniería de la divulgación en sistemas de expresión que producen glucoproteínas modificadas, tales como las que se enseñan en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 60/344.169 y documento WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) o en los documentos WO 2004/057002 y WO 2004/024927 (Greenovation).

Generación de líneas celulares para la producción de proteínas con patrón de glucosilación alterado

La presente divulgación describe sistemas de expresión de células hospedadoras para la generación de las ABM de la presente divulgación que tienen patrones de glucosilación modificados. En particular, la presente divulgación describe sistemas de células hospedadoras para la generación de glucoformas de las ABM de la presente divulgación que tienen un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la divulgación describe sistemas de expresión de células hospedadoras seleccionados o modificados por ingeniería genética para expresar un polipéptido que tiene actividad GnTIII. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido residente en el Golgi heterólogo. De manera específica, dichos sistemas de expresión de células hospedadoras pueden modificarse por ingeniería genética para comprender una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene GnTIII, unido operativamente a un sistema promotor constitutivo o regulado.

En una realización específica, la presente divulgación describe una célula hospedadora que se ha modificado por ingeniería genética para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi. En un aspecto, la célula hospedadora se modifica por ingeniería genética con una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un gen que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi.

En general, puede usarse cualquier tipo de línea celular cultivada, incluyendo las líneas celulares analizadas anteriormente, como fondo para obtener por ingeniería genética las líneas celulares hospedadoras de la presente divulgación. En una realización preferida, células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de

hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales se usan como la línea celular de fondo para generar las células hospedadoras modificadas por ingeniería genética de la divulgación.

Se contempla que la divulgación abarque cualquier célula hospedadora modificada por ingeniería genética que exprese un polipéptido que tenga actividad GnTIII, incluyendo un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi como se define en el presente documento.

Uno o varios ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene actividad GnTIII pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, como alternativa, un sistema de expresión regulado. Dichos sistemas son bien conocidos en la técnica e incluyen los sistemas analizados anteriormente. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican polipéptidos de fusión que tienen actividad GnTIII y que comprenden el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido residente en el Golgi heterólogo están comprendidos dentro del sistema de células hospedadoras, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión de los polipéptidos de fusión que tienen actividad GnTIII se determinan mediante métodos conocidos en general en la técnica, incluyendo análisis de transferencia de Western, análisis de transferencia de Northern, análisis de la expresión de genes indicadores o medición de la actividad GnTIII. Como alternativa, se puede emplear una lectina que se une a productos biosintéticos del GnTIII, por ejemplo, lectina E₄-PHA. Como alternativa, se puede usar un ensayo funcional que mide el aumento de la unión al receptor de Fc o aumento de la función efectora mediada por anticuerpos producidos por las células modificadas por ingeniería genética con el ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII.

Identificación de transfectantes o transformantes que expresan la proteína que tiene un patrón de glucosilación modificado

Las células hospedadoras que contienen la secuencia codificante de una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata y que expresan los productos génicos biológicamente activos pueden identificarse mediante al menos cuatro enfoques generales; (a) hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN; (b) la presencia o ausencia de funciones de genes "marcadores"; (c) evaluar el nivel de transcripción medido por la expresión de los respectivos transcritos de ARNm en la célula hospedadora; y (d) detección del producto génico medido por inmunoensayo o por su actividad biológica.

En el primer enfoque, la presencia de la secuencia codificante de una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata y la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad GnTIII puede detectarse mediante hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN usando sondas que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas de las secuencias codificantes respectivas, respectivamente, o partes o derivados de las mismas.

En el segundo enfoque, el sistema de vector de expresión recombinante/hospedador puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de determinadas funciones de genes "marcadores" (p. ej., actividad timidina cinasa, resistencia a antibióticos, resistencia al metotrexato, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia codificante de la ABM de la divulgación, o un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad GnTIII se insertan dentro de una secuencia del gen marcador del vector, los recombinantes que contienen las secuencias codificantes respectivas pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, se puede colocar un gen marcador en tándem con las secuencias codificantes bajo el control del mismo o diferente promotor utilizado para controlar la expresión de las secuencias codificantes. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia codificante de la ABM de la divulgación y la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad GnTIII.

En el tercer enfoque, La actividad transcripcional para la región codificante de la ABM de la divulgación, o un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad GnTIII puede evaluarse mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, el ARN puede aislarse y analizarse mediante transferencia de Northern usando una sonda homóloga de las secuencias codificantes de la ABM de la divulgación, o un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad GnTIII o porciones particulares de la misma. Como alternativa, los ácidos nucleicos totales de la célula hospedadora pueden extraerse y ensayarse para determinar la hibridación con dichas sondas.

En el cuarto enfoque, la expresión de los productos proteicos se puede evaluar inmunológicamente, por ejemplo, mediante transferencias de Western, inmunoensayos tales como radioinmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a enzimas y similares. La prueba definitiva del éxito del sistema de expresión, sin embargo, implica la detección de los productos genéticos biológicamente activos.

Generación y uso de ABM que tienen una mayor función efectora incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

En realizaciones preferidas, la presente divulgación describe glucoformas de ABM quiméricas (por ejemplo,

humanizadas) que tienen sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata y que tienen mayor función efectora incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Se ha descrito previamente la ingeniería de glucosilación de anticuerpos. Véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos n.º 6.602.684.

Los ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales (mAb) no conjugados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer han arrojado recientemente resultados alentadores. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997); Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Se ha aprobado un IgG1 quimérico no conjugado para linfoma no Hodgkin de linfocitos B foliculares de grado bajo. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12: 223-25 (1997), mientras que otro mAb no conjugado, un IgG 1 humanizado dirigido a tumores de mama sólidos, también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase III. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Los antígenos de estos mAb están muy expresados en sus respectivas células tumorales y los anticuerpos median en la potente destrucción tumoral por células efectoras *in vitro* e *in vivo*. Por el contrario, muchos otros mAb no conjugados con especificidades tumorales finas no pueden desencadenar funciones efectoras de potencia suficiente para ser clínicamente útiles. Frost *et al.*, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus *et al.*, *J. Immunother.* 19: 184-91 (1996). Para algunos de estos mAb más débiles, actualmente se está ensayando la terapia adyuvante de citocinas. La adición de citocinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) al aumentar la actividad y el número de linfocitos en circulación. Frost *et al.*, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus *et al.*, *J. Immunother.* 19: 184-91 (1996). ADCC, un ataque lítico en células diana de anticuerpos, se desencadena al unirse los receptores de leucocitos con la región constante (Fc) de los anticuerpos. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997).

Un enfoque diferente, pero complementario, para aumentar la actividad de ADCC de IgG1 no conjugados es modificar por ingeniería genética la región Fc del anticuerpo. Los estudios de ingeniería de proteínas han mostrado que los FcγR interactúan con la región bisagra inferior del dominio CH2 de IgG. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996). Sin embargo, la unión de FcγR también requiere la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente en la Asn 297 conservada en la región CH2. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996); Wright y Morrison, *Trends Biotech.* 15: 26-31 (1997), lo que sugiere que el oligosacárido y el polipéptido contribuyen ambos directamente al sitio de interacción o que el oligosacárido es necesario para mantener una conformación activa del polipéptido CH2. Por lo tanto, la modificación de la estructura de oligosacáridos puede explorarse como un medio para aumentar la afinidad de la interacción.

Una molécula de IgG transporta dos oligosacáridos ligados a N en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Como cualquier glucoproteína, se produce un anticuerpo como una población de glucoformas que comparten la misma cadena principal polipeptídica pero tienen diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glucosilación. Los oligosacáridos que se encuentran normalmente en la región Fc de IgG en suero son de tipo bi-antenario complejo (Wormald *et al.*, *Biochemistry* 36: 130-38 (1997), con un nivel bajo de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina bisectora (GlcNAc), y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación central. Algunos estudios sugieren que la estructura mínima de carbohidratos necesaria para la unión con FcγR se encuentra dentro del núcleo del oligosacárido. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996).

Las líneas celulares derivadas de ratón o hámster usadas en la industria y el mundo académico para la producción de mAb terapéuticos no conjugados normalmente unen los determinantes de oligosacáridos necesarios a sitios Fc. Los IgG expresados en estas líneas celulares carecen, sin embargo, del GlcNAc bisector hallado en bajas cantidades en IgG en suero. Lively *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). Por el contrario, se ha observado recientemente que un IgG1 humanizado producido por mieloma de rata (CAMPATH-1H) portaba un GlcNAc bisector en algunas de sus glucoformas. Lively *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). El anticuerpo derivado de células de rata alcanzó una actividad de ADCC máxima *in vitro* similar a anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas celulares convencionales, pero a concentraciones de anticuerpos significativamente menores.

El antígeno CAMPATH normalmente está presente en niveles altos en células de linfoma y este mAb quimérico tiene alta actividad de ADCC en ausencia de un GlcNAc bisector. Lively *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). En la ruta de glucosilación ligada a N, GnTIII añade un GlcNAc bisector. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64: 163-81 (1986).

Estudios anteriores usaron una sola línea celular CHO productora de anticuerpos, que previamente se modificó por ingeniería genética para expresar, de una manera regulada externamente, diferentes niveles de una enzima génica clonada GnT III (Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Este enfoque estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de GnTIII y la actividad de ADCC del anticuerpo modificado. Por tanto, la divulgación contempla un anticuerpo recombinante, quimérico o un fragmento del mismo con la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata, que tiene glucosilación alterada resultante del aumento de la actividad de GnTIII. El aumento de la actividad de GnTIII da como resultado un aumento del porcentaje de oligosacáridos bisecados, así como una disminución del porcentaje de restos de fucosa, en la región Fc de la ABM. Este anticuerpo, o fragmento del mismo, tiene mayor afinidad de unión al receptor de Fc y mayor función efectora. Además, la divulgación se dirige a fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión que comprenden una región que es equivalente a la región Fc de las inmunoglobulinas. En una realización preferida, el anticuerpo está humanizado.

Aplicaciones terapéuticas de ABM producidas según los métodos de la invención.

En el sentido más amplio, las ABM de la presente divulgación pueden usarse para dirigirse a células *in vivo* o *in vitro* que expresan EGFR. Las células que expresan EGFR pueden marcarse como diana con fines de diagnóstico o terapéuticos. En un aspecto, las ABM de la presente divulgación pueden usarse para detectar la presencia de EGFR en una muestra. En otro aspecto, las ABM de la presente divulgación pueden usarse para inhibir o reducir la transducción de señal mediada por EGFR en células que expresan EGFR en la superficie. El EGFR se expresa de manera anómala (p. ej., se sobreexpresa) en muchos tumores humanos en comparación con tejido no tumoral del mismo tipo celular. Por tanto, las ABM de la divulgación son particularmente útiles en la prevención de la formación de tumores, erradicación de tumores e inhibición del crecimiento tumoral. Al bloquear la unión de ligandos de EGFR a EGFR, las ABM de la divulgación inhiben la activación de células tumorales dependiente de EGF, incluyendo la fosforilación de tirosina de EGFR, mayor tasa de acidificación extracelular y proliferación celular. Las ABM de la divulgación también actúan para detener el ciclo celular, provocar apoptosis de las células diana (p. ej., células tumorales) e inhibir la angiogénesis y/o la diferenciación de células diana. Las ABM de la divulgación se pueden usar para tratar cualquier tumor que exprese EGFR. Los tumores malignos particulares que pueden tratarse con las ABM de la divulgación incluyen, pero sin limitación, carcinomas epidérmicos y de células escamosas, carcinomas pulmonares no microcíticos, gliomas, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello y carcinomas de células renales.

Las ABM de la presente divulgación pueden usarse solas para dirigirse a y destruir células tumorales *in vivo*. Las ABM también se pueden usar junto con un agente terapéutico adecuado para tratar carcinoma humano. Por ejemplo, las ABM se pueden usar en combinación con métodos de tratamiento habituales o convencionales tales como quimioterapia, radioterapia o se pueden conjugar o unir a un fármaco terapéutico o toxina, así como a una linfocina o un factor de crecimiento inhibidor de tumores, para el suministro del agente terapéutico al sitio del carcinoma. Los conjugados de las ABM de la presente divulgación que son de importancia primordial son (1) inmunotoxinas (conjugados de la ABM y un resto citotóxico) y (2) ABM marcadas (p. ej., radiomarcadas, marcadas con enzimas o marcadas con fluorocromos) en las que el marcador proporciona un medio para identificar complejos inmunitarios que incluyen la ABM marcada. Las ABM también se pueden usar para inducir la lisis a través del proceso del complemento natural y para interactuar con células citotóxicas dependientes de anticuerpos normalmente presentes.

El resto citotóxico de la inmunotoxina puede ser un fármaco citotóxico o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano o vegetal o un fragmento enzimáticamente activo ("cadena A") de dicha toxina. Son toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas usados la cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina. En otra realización, las ABM se conjugan con fármacos antineoplásicos de molécula pequeña. Se preparan conjugados de la ABM y dichos restos citotóxicos usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales. Son ejemplos de dichos reactivos SPDP, IT, derivados bifuncionales de imidioésteres tales como dimetil adipimidato HCl, ésteres activos tales como disuccinimidil suberato, aldehídos tales como glutaraldehído, compuestos de bis-azido tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina, derivados de bis-diazonio tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina, diisocianatos tales como tolileno 2,6-diisocianato y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno). La parte de lisis de una toxina puede unirse con el fragmento Fab de las ABM. Se conocen en la técnica toxinas adecuadas adicionales, como se demuestra en, p. ej., la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada n.º 2002/0128448.

En una realización, una ABM química (por ejemplo, humanizada), modificada por glucoingeniería que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata, se conjuga con la cadena A de ricina. Más provechosamente, la cadena A de ricina se desglucosila y se produce mediante medios recombinantes. Un método ventajoso para preparar la inmunotoxina de ricina se describe en Vitetta *et al.*, Science 238, 1098 (1987).

Cuando se usan para destruir células cancerosas humanas *in vitro* para fines de diagnóstico, los conjugados se añadirán normalmente al medio de cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 10 nM. La formulación y el modo de administración para uso *in vitro* no son críticos. Normalmente se usarán formulaciones acuosas que sean compatibles con el medio de cultivo o perfusión. La citotoxicidad puede leerse mediante técnicas convencionales para determinar la presencia o el grado de cáncer.

Como se ha analizado anteriormente, se puede preparar un radiofármaco citotóxico para el tratamiento del cáncer conjugando un isótopo radiactivo (p. ej., I, Y, Pr) con una ABM química, modificada por glucoingeniería que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata. Se entiende que la expresión "resto citotóxico" como se usa en el presente documento incluye dichos isótopos.

En otra realización, los liposomas se cargan con un fármaco citotóxico y los liposomas se recubren con las ABM de la presente divulgación. Debido a que hay muchas moléculas de EGFR en la superficie de la célula maligna que expresa EGFR, este método permite suministrar grandes cantidades de fármaco al tipo celular correcto.

Las técnicas para conjugar dichos agentes terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas (véase, p. ej., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer

Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2.^a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)).

Otras aplicaciones terapéuticas adicionales para las ABM de la divulgación incluyen conjugación o enlace, p. ej., mediante técnicas de ADN recombinante, con una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico y el uso de ese conjugado de anticuerpo-enzima en combinación con el profármaco para convertir el profármaco en un agente citotóxico en el sitio del tumor (véase, p. ej., Senter *et al.*, "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the *in vitro* and *in vivo* Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49:5789-5792 (1989); y Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy", *FASEB J.* 4:188-193 (1990)).

Otro uso terapéutico más para las ABM de la divulgación implica el uso, ya sea sin conjugar, en presencia de complemento o como parte de un conjugado de anticuerpo-fármaco o anticuerpo-toxina, para eliminar células tumorales de la médula ósea de pacientes con cáncer. Según este enfoque, la médula ósea autóloga puede purgarse *ex vivo* mediante tratamiento con el anticuerpo y la médula ósea se infunde de nuevo en el paciente [véase, p. ej., Ramsay *et al.*, "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8(2):81-88 (1988)].

Asimismo, se contempla que la divulgación comprende una inmunotoxina de cadena sencilla que comprende dominios de unión a antígeno que permiten sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo ICR62 de rata (p. ej., polipéptidos que comprenden las CDR del anticuerpo ICR62 de rata) y que además comprende un polipéptido de toxina. Las inmunotoxinas de cadena sencilla de la divulgación pueden usarse para tratar el carcinoma humano *in vivo*.

De manera similar, una proteína de fusión que comprende al menos la región de unión a antígeno de una ABM de la divulgación unida a al menos una porción funcionalmente activa de una segunda proteína que tiene actividad antitumoral, p. ej., una lincocina u oncostatina, puede usarse para tratar el carcinoma humano *in vivo*.

La presente divulgación describe un método para destruir selectivamente células tumorales que expresan EGFR. Este método comprende hacer reaccionar el inmunoconjugado (p. ej., la inmunotoxina) de la divulgación con dichas células tumorales. Estas células tumorales pueden ser de un carcinoma humano.

Adicionalmente, la presente divulgación describe un método para tratar carcinomas (por ejemplo, carcinomas humanos) *in vivo*. Este método comprende administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que contiene al menos uno de los inmunoconjugados (por ejemplo, la inmunotoxina) de la divulgación.

En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a un método mejorado para tratar trastornos de proliferación celular en donde se expresa EGFR, en particular en donde EGFR se expresa de manera anómala (p. ej., se sobreexpresa), incluyendo cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una ABM de la presente divulgación a un sujeto humano que lo necesite. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo anti-EGFR modificado por glucoingeniería con una especificidad de unión sustancialmente igual que la del anticuerpo ICR62 de rata. En otra realización preferida, el anticuerpo está humanizado. Los ejemplos de trastornos de proliferación celular que pueden tratarse mediante una ABM de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, neoplasias localizadas en: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenal, paratiroides, hipófisis, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica y sistema urogenital.

De manera similar, otros trastornos de proliferación celular también se pueden tratar mediante las ABM de la presente divulgación. Los ejemplos de dichos trastornos de proliferación celular incluyen, pero sin limitación: hipergammaglobulinemia, trastornos linfoproliferativos, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, síndrome de Sezary, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de Gaucher, histiocitosis y cualquier otra enfermedad de la proliferación celular, además de neoplasia, localizada en un sistema de órganos enumerado anteriormente.

De acuerdo con la práctica de la presente divulgación, el sujeto puede ser un sujeto humano, equino, porcino, bovino, murino, canino, felino y aviar. Otros animales de sangre caliente también se incluyen en la presente divulgación.

La divulgación objeto describe además métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales humanas, tratar un tumor en un sujeto y tratar una enfermedad de tipo proliferativo en un sujeto. Estos métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición de la divulgación.

La divulgación se dirige además a métodos para tratar enfermedades o trastornos no malignos en un mamífero caracterizados por la activación o producción anómala de EGFR o uno o más ligandos de EGFR, que comprenden

administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de las ABM de la divulgación. El sujeto tendrá en general células que expresan EGFR, por ejemplo, en tejido enfermo del mismo, de modo que las ABM de la divulgación puedan unirse a las células dentro del sujeto.

La activación o expresión anómala de EGFR o un ligando de EGFR puede producirse en células del sujeto, por ejemplo, en tejido enfermo del sujeto. La activación anómala de EGFR puede atribuirse a la amplificación, sobreexpresión o producción aberrante del EGFR y/o ligando de EGFR. En una realización de la divulgación, se realizará un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si se produce producción o activación anómala de EGFR (o ligando de EGFR) en el sujeto. Por ejemplo, Se puede determinar la amplificación génica y/o sobreexpresión de EGFR y/o ligando. Están disponibles en la técnica diversos ensayos para determinar dicha amplificación/sobreexpresión e incluyen los ensayos de IHC, FISH y desprendimiento de antígenos descritos anteriormente. Como alternativa, o además, los niveles de un ligando de EGFR, tal como TGF- α en o asociado con la muestra pueden determinarse según procedimientos conocidos. Dichos ensayos pueden detectar proteína y/o ácido nucleico que lo codifica en la muestra para analizar. En una realización, los niveles de ligando de EGFR en una muestra pueden determinarse usando inmunohistoquímica (IHC); véase, por ejemplo, Scher *et al.* Clin. Cancer Research 1:545-550 (1995). Como alternativa, o además, se pueden evaluar los niveles de ácido nucleico que codifica EGFR en la muestra para analizar; p. ej., a través de FISH, transferencia de Southern o técnicas de PCR.

Por otra parte, la sobreexpresión o amplificación de EGFR o ligando de EGFR también se pueden evaluar usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une a la molécula que se va a detectar y se marca con un marcador detectable (p. ej., un isótopo radioactivo) y explorando externamente al paciente para localizar el marcador.

Como alternativa, se pueden detectar heterodímeros de EGFR, especialmente heterodímeros EGFR-ErbB2, EGFR-ErbB3 o EGFR-ErbB4, en el paciente, p. ej., en tejido enfermo del mismo, antes de la terapia. Se encuentran disponibles diversos métodos para detectar interacciones proteína-proteína no covalentes o indicar de otro modo la proximidad entre proteínas de interés. Los métodos ilustrativos para detectar heterodímeros de EGFR incluyen, sin limitación, métodos basados en inmunofluorescencia, tales como inmunoprecipitación; transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF) (Selvin, Nat. Struct. Biol. 7:730-34 (2000); Gadella y Jovin, J. Cell Biol. 129:1543-58 (1995); y Nagy *et al.*, Cytometry 32:120-131 (1998)); colocalización de EGFR con ErbB2 o ErbB3 utilizando técnicas convencionales de inmunofluorescencia directa o indirecta y microscopía de exploración láser confocal; captura de imágenes por exploración láser (LSI) para detectar la unión del anticuerpo y la colocalización de EGFR con ErbB2 o ErbB3 en un formato de alto rendimiento, tal como una placa de micropocillos (Zuck *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11122-11127 (1999)); o sistema de ensayo eTag/m (Aclara Bio Sciences, Mountain View, Calif.; y solicitud de patente de los Estados Unidos 2001/0049105, publicada el 6 de diciembre de 2001).

Resulta evidente, por lo tanto, que la presente divulgación abarca composiciones farmacéuticas, combinaciones y métodos para tratar tumores malignos humanos, tales como cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón. Por ejemplo, la divulgación incluye composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de tumores malignos humanos que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de ABM de la divulgación pueden administrarse usando modos de administración convencionales incluyendo, pero sin limitación, intravenosa, intraperitoneal, oral, intralifática o administración directamente en el tumor. Se prefiere la administración intravenosa.

En un aspecto de la divulgación, se preparan formulaciones terapéuticas que contienen las ABM de la divulgación para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales, (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN[™], PLURONICS[™] o polietilenglicol (PEG).

Las ABM de la presente divulgación pueden administrarse a un sujeto para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por actividad anómala de EGFR o ligando de EGFR, tal como un tumor, ya sea solas o en terapia combinada con, por ejemplo, un agente quimioterapéutico y/o radioterapia. Se describen ejemplos de formulaciones de anticuerpos anti-EGFR en Herbst y Shen, *Cancer* 94(5):1593-1611. Los agentes quimioterapéuticos adecuados

incluyen cisplatino, doxorubicina, topotecán, paclitaxel, vinblastina, carboplatino y etopósido.

Se describen formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea en el documento WO97/04801. Dichas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado a una alta concentración de proteínas y la formulación reconstituida puede administrarse por vía subcutánea al mamífero para tratar en el presente documento.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, citocina o agente inmunosupresor (p. ej., uno que actúa sobre linfocitos T, tal como ciclosporina o un anticuerpo que se une a linfocitos T, p. ej., uno que se une a LFA-1). La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de antagonista presente en la formulación, el tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración que se han usado en el presente documento anteriormente o aproximadamente de 1 a 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Los principios activos también pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de los Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuporelina) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las composiciones de la divulgación pueden estar en diversas formas de dosificación que incluyen, pero sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas poliméricas o microvesículas, liposomas y soluciones inyectables o infundibles. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

Las composiciones de la divulgación también incluyen preferentemente vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables convencionales conocidos en la técnica, tales como seroalbúmina humana, intercambiadores de iones, alúmina, lecitina, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio y sales o electrolitos tales como sulfato de protamina.

El modo más eficaz de administración y el régimen de dosificación para las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación dependen de la gravedad y la evolución de la enfermedad, el estado de salud del paciente y la respuesta al tratamiento y el criterio del médico tratante. En consecuencia, las dosificaciones de las composiciones deberían ajustarse al paciente individual. No obstante, una dosis eficaz de las composiciones de la presente divulgación estará en general en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2000 mg/kg. En una realización, la dosis eficaz está en el intervalo de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15,0 mg/kg. En una realización más específica, la dosis está en el intervalo de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis está en el intervalo de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg o de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg. La dosis de la presente divulgación también puede ser cualquier dosis dentro de estos intervalos, incluyendo, pero sin limitación, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg o 15,0 mg/kg.

Las moléculas descritas en el presente documento pueden estar en diversas formas de dosificación que incluyen, pero sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas poliméricas o microvesículas, liposomas y soluciones inyectables o infundibles. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

Las dosificaciones de la presente divulgación pueden, en algunos casos, determinarse mediante el uso de

biomarcadores predictivos. Los biomarcadores predictivos son marcadores moleculares que se usan para determinar (es decir, observar y/o cuantificar) un patrón de expresión y/o activación de genes o proteínas relacionadas con tumores o componentes celulares de una ruta de señalización relacionada con tumores. Dilucidar los efectos biológicos de las terapias dirigidas en tejido tumoral y correlacionar estos efectos con la respuesta clínica ayuda a identificar las rutas predominantes de crecimiento y supervivencia operativas en tumores, estableciendo de este modo un perfil de posibles respondedores y, por el contrario, proporcionando un fundamento para diseñar estrategias para superar la resistencia. Por ejemplo, los biomarcadores para terapia anti-EGFR pueden comprender moléculas que están en la ruta de señalización corriente abajo de EGFR que conduce a un trastorno de proliferación celular incluyendo, pero sin limitación, Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, STAT5 (Mitchell, Nature Biotech. 22: 363-364 (2004); Becker, Nature Biotech 22:15-18 (2004); Tsao y Herbst, Signal 4:4-9 (2003)). Los biomarcadores para terapia anti-EGFR también pueden comprender receptores de factores de crecimiento tales como EGFR, ErbB-2 (HER2/neu) y ErbB-3 (HER3) y pueden ser predictores positivos o negativos de la respuesta del paciente a la terapia anti-EGFR. Por ejemplo, se determinó que el receptor del factor de crecimiento ErbB-3 (HER3) es un biomarcador predictivo negativo para el anticuerpo anti-EGFR ABX-EGF (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2004/0132097 A1).

Los biomarcadores predictivos pueden medirse mediante ensayos celulares que se conocen bien en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, inmunohistoquímica, citometría de flujo, inmunofluorescencia, ensayos de captura y detección y ensayos de fase inversa, y/o ensayos establecidos en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2004/0132097 A1. Los biomarcadores predictivos de terapia anti-EGFR, en sí mismos, puede identificarse según las técnicas expuestas en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2003/0190689A1.

En un aspecto, la presente divulgación describe un método para tratar un trastorno relacionado con EGFR que comprende predecir una respuesta a la terapia anti-EGFR en un sujeto humano que necesita tratamiento analizando una muestra del sujeto humano antes de la terapia con uno o una pluralidad de reactivos que detectan expresión y/o activación de biomarcadores predictivos para un trastorno relacionado con EGFR tal como el cáncer; determinar un patrón de expresión y/o activación de uno o más de los biomarcadores predictivos, en donde el patrón predice la respuesta del sujeto humano a la terapia anti-EGFR; y administrar a un sujeto humano que se predice que responderá positivamente al tratamiento anti-EGFR una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una ABM de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, *un sujeto humano que se predice que responderá positivamente al tratamiento anti-EGFR* es aquel para quien el anti-EGFR tendrá un efecto medible en el trastorno relacionado con EGFR (p. ej., regresión/reducción tumoral) y para quien los beneficios de la terapia anti-EGFR no se ven compensados por los efectos adversos (p. ej., toxicidad). Como se usa en el presente documento, una muestra significa cualquier muestra biológica de un organismo, en particular, un ser humano, que comprende una o más células, incluyendo células individuales de cualquier origen, muestras de tejido o biopsia que se han extraído de órganos tales como mama, pulmón, tracto gastrointestinal, piel, cuello del útero, ovario, próstata, riñón, cerebro, cabeza y cuello, o cualquier otro órgano o tejido del cuerpo, y otras muestras corporales incluyendo, pero sin limitación, frotis, esputo, secreciones, líquido cefalorraquídeo, bilis, sangre, líquido linfático, orina y heces.

La composición que comprende una ABM de la presente divulgación se formulará, dosificará y administrará de un modo coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen la enfermedad o el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, el estado clínico del paciente individual, la causa de la enfermedad o el trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista para administrar se regirá por dichas consideraciones.

Como propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo administrado por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, estando el intervalo inicial normal de antagonista usado en el intervalo de aproximadamente 2 a 10 mg/kg. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz está en el intervalo de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15,0 mg/kg. En una realización más específica, la dosis está en el intervalo de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis está en el intervalo de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg o de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg. La dosis de la presente divulgación también puede ser cualquier dosis dentro de estos intervalos, incluyendo, pero sin limitación, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg o 15,0 mg/kg.

En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo humanizado. Las dosificaciones adecuadas para dicho anticuerpo no conjugado están, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 20 mg/m² hasta aproximadamente 1000 mg/m². Por ejemplo, se pueden administrar al paciente una o más dosis de sustancialmente menos de 375 mg/m² del anticuerpo, p. ej., donde la dosis está en el intervalo de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m², por ejemplo de aproximadamente 50 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m².

Por otra parte, se pueden administrar una o más dosis iniciales del anticuerpo seguido de una o más dosis posteriores,

en donde la dosis mg/m² del anticuerpo en la o las dosis posteriores supera la dosis mg/m² del anticuerpo en la o las dosis iniciales. Por ejemplo, la dosis inicial puede estar en el intervalo de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m² (p. ej., de aproximadamente 50 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m²) y la dosis posterior puede estar en el intervalo de aproximadamente 250 mg/m² hasta aproximadamente 1000 mg/m².

Como se ha señalado anteriormente, sin embargo, estas cantidades sugeridas de ABM están sujetas a una gran cantidad de discreción terapéutica. El factor clave para seleccionar una dosis y programación adecuadas es el resultado obtenido, como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, inicialmente se pueden necesitar dosis relativamente mayores para el tratamiento de enfermedades en curso y agudas. Para obtener los resultados más eficaces, dependiendo de la enfermedad o el trastorno, el antagonista se administra tan cerca de la primera señal, diagnóstico, aparición o inicio de la enfermedad o el trastorno como sea posible o durante remisiones de la enfermedad o el trastorno.

En el caso de anticuerpos anti-EGFR usados para tratar tumores, en general, se han logrado resultados terapéuticos óptimos con una dosis que es suficiente para saturar completamente los receptores de EGF en las células diana. La dosis necesaria para lograr saturación dependerá de varios receptores de EGF expresados por célula tumoral (que puede variar significativamente entre diferentes tipos de tumor). Concentraciones en suero tan bajas como 30 nM han sido eficaces en el tratamiento de algunos tumores, mientras que pueden ser necesarias concentraciones mayores de 100 nM para lograr un efecto terapéutico óptimo con otros tumores. La dosis necesaria para conseguir saturación de un tumor dado se puede determinar fácilmente *in vitro* mediante radioinmunoensayo o inmunoprecipitación.

En general, para terapia combinada con radiación, un régimen terapéutico adecuado implica ocho infusiones semanales de una ABM anti-EGFR de la divulgación a una dosis de carga de 100-500 mg/m² seguido de dosis de mantenimiento a 100-250 mg/m² y radiación en la cantidad de 70,0 Gy a una dosis de 2,0 Gy diariamente. Para terapia combinada con quimioterapia, un régimen terapéutico adecuado implica administrar una ABM anti-EGFR de la divulgación como dosis de carga/mantenimiento semanales de 100/100 mg/m², 400/250 mg/m² o 500/250 mg/m² en combinación con cisplatino a una dosis de 100 mg/m² cada tres semanas. Como alternativa, se puede usar gemcitabina o irinotecán en lugar de cisplatino.

La ABM de la presente divulgación se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento inmunosupresor local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el antagonista puede administrarse adecuadamente mediante infusión por pulsos, p. ej., con dosis decrecientes del antagonista. Preferentemente, la dosificación se proporciona mediante inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Se pueden administrar otros compuestos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores y/o citocinas con los antagonistas en el presente documento. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde, preferentemente, hay un periodo temporal mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen sus actividades biológicas de manera simultánea.

Resultaría evidente que la dosis de la composición de la divulgación necesaria para lograr la curación puede reducirse adicionalmente con optimización del programa.

De acuerdo con la práctica de la divulgación, el vehículo farmacéutico puede ser un vehículo lipídico. El vehículo lipídico puede ser un fosfolípido. Adicionalmente, el vehículo lipídico puede ser un ácido graso. Además, el vehículo lipídico puede ser un detergente. Como se usa en el presente documento, un detergente es cualquier sustancia que altera la tensión superficial de un líquido, en general reduciéndola.

En un ejemplo de la divulgación, el detergente puede ser un detergente no iónico. Los ejemplos de detergentes no iónicos incluyen, pero sin limitación, polisorbato 80 (también conocido como Tween 80 o (monooleato de polioxietilensorbitano), Brij y Triton (por ejemplo, Triton WR-1339 y Triton A-20).

Como alternativa, el detergente puede ser un detergente iónico. Un ejemplo de un detergente iónico incluye, pero sin limitación, bromuro de alquiltrimetilamonio.

Adicionalmente, de acuerdo con la divulgación, el vehículo lipídico puede ser un liposoma. Como se usa en la presente solicitud, un "liposoma" es cualquier vesícula unida a membrana que contiene cualquier molécula de la divulgación o combinaciones de las mismas.

En otra realización más, la divulgación se refiere a una ABM según la presente divulgación para su uso como medicamento, en particular para su uso en el tratamiento o profilaxis del cáncer o para su uso en una afección o lesión precancerosa. El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón de células broncoalveolares, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o

cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, leucemia crónica o aguda, linfomas linfocíticos, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannoma, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenomas de la hipófisis, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. La afección o lesión precancerosa incluye, por ejemplo, el grupo que consiste en leucoplasia oral, queratosis actínica (queratosis solar), pólipos precancerosos del colon o recto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome de cáncer de colon hereditario sin poliposis (HN-PCC), esófago de Barrett, displasia de vejiga y afecciones precancerosas del cuello uterino.

Preferentemente, dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de cerebro.

Otra realización más es el uso de la ABM según la presente divulgación para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis del cáncer. El cáncer es como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de cerebro.

También preferentemente, dicha molécula de unión a antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg.

También más preferentemente, dicha molécula de unión a antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg.

También más preferentemente, dicha molécula de unión a antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg.

También más preferentemente, dicha molécula de unión a antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg.

Lo más preferentemente, dicha molécula de unión a antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 1,5 mg/kg.

También lo más preferentemente, dicha molécula de unión a antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 4,5 mg/kg.

También lo más preferentemente, dicha molécula de unión a antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 12 mg/kg.

En otra realización, la presente divulgación se dirige al método de tratamiento de un trastorno relacionado con EGFR en un mamífero que necesita tratamiento del mismo, que comprende administrar al mamífero una ABM de la presente divulgación, en donde el tratamiento da como resultado concentraciones en suero de dicha ABM entre aproximadamente 1 y aproximadamente 500 µg/ml, durante un periodo de al menos 4 semanas, y en donde el tratamiento no provoca un nivel clínicamente significativo de toxicidad en dicho mamífero. En otras realizaciones, la concentración en suero es una cantidad seleccionada del grupo que consiste en más de 1 µg/ml, más de 25 µg/ml, más de 50 µg/ml, más de 100 µg/ml, más de 200 µg/ml, más de 300 µg/ml, más de 400 µg/ml, más de 500 µg/ml, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 µg/ml, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 µg/ml, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 300 µg/ml, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 400 µg/ml y entre aproximadamente 1 y aproximadamente 500 µg/ml. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano. En una realización, la ABM es un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo está modificado por glucoingeniería y tiene mayor unión a FcγRIII en comparación con una forma del anticuerpo no modificada por glucoingeniería.

Artículos de fabricación

En otra realización de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta

o prospecto sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente incluye una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-EGFR. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección elegida, tal como una enfermedad o trastorno no maligno, donde la enfermedad o trastorno implica una activación o producción anómala de un receptor EGFR y/o un ligando de EGFR, por ejemplo, una enfermedad o trastorno hiperproliferativo benigno. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un primer anticuerpo que se une a EGFR e inhibe el crecimiento de células que sobreexpresan EGFR; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un segundo anticuerpo que se une a EGFR y bloquea la activación del ligando de un receptor EGFR. El artículo de fabricación en esta realización de la divulgación puede comprender además un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones de anticuerpos pueden usarse para tratar una enfermedad o trastorno no maligno de la lista de dichas enfermedades o trastornos en la sección de definiciones anterior. Por otra parte, el prospecto puede indicar al usuario de la composición (que comprende un anticuerpo que se une a EGFR y bloquea la activación del ligando de un receptor EGFR) para combinar la terapia con el anticuerpo y cualquiera de las terapias complementarias descritas en la sección anterior (p. ej., un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido a EGFR, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, inhibidor de tirosina cinasa, un compuesto antihormonal, un cardioprotector y/o una citocina). Como alternativa, o además, el artículo de fabricación puede comprender también un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los ejemplos a continuación explican la divulgación con más detalle. Se proporcionan las siguientes preparaciones y ejemplos para permitir a los expertos en la materia entender con mayor claridad y practicar la presente divulgación.

Ejemplos

A menos que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones de restos de aminoácidos específicas en los siguientes ejemplos son según el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique otra cosa, los materiales y métodos usados para fabricar los anticuerpos descritos en estos ejemplos de trabajo están de acuerdo con los expuestos en los ejemplos de la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 10/981.738.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Enfoque de aceptor de alta homología

La búsqueda del marco conservado aceptor de anticuerpos de alta homología se realizó alineando la secuencia de la proteína ICR62 de rata con una colección de secuencias de línea germinal humana y eligiendo la secuencia humana que mostraba la mayor identidad de secuencia, conservando al mismo tiempo todos los restos canónicos en un nivel funcional. Aquí, la secuencia 1-e de la familia VH1 dentro de la base de datos VBase se eligió como la secuencia de aceptor de marco conservado de cadena pesada y la secuencia A30 de la familia VK1 de la base de datos VBase se eligió como el aceptor de marco conservado para la cadena ligera. En estos dos marcos conservados aceptores, se injertaron las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) y/o restos determinantes de especificidad de las CDR de los dominios variables pesado y ligero de ICR62 de rata. Ya que la región de marco conservado 4 no es parte de la región variable del gen de línea germinal, la alineación para esa posición se realizó individualmente. La región JH6 se eligió para la cadena pesada y la región JK2 se eligió para la cadena ligera. El modelado molecular del dominio de inmunoglobulina diseñado reveló una posición fuera de la CDR1 de Kabat que potencialmente requiere los restos de aminoácidos murinos en lugar de los humanos fuera de la CDR. La reintroducción de restos de aminoácidos murinos en el marco conservado humano generaría las denominadas "retromutaciones". Por ejemplo, el resto de aminoácido aceptor humano en la posición 27 de Kabat (glicina en 1-e) se retromutó a un resto de tirosina. Para mostrar la importancia de los restos para la unión a antígeno, se diseñaron variantes de anticuerpos humanizados que incluían u omitían las retromutaciones. La cadena ligera de anticuerpo humanizado no requirió ninguna retromutación. Después de diseñar las secuencias proteicas, se sintetizaron secuencias de ADN que codificaban estas proteínas como se detalla a continuación.

Enfoque de marco conservado mixto

Para evitar la necesidad de introducir retromutaciones en posiciones críticas (críticas para conservar buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpos) del marco conservado aceptor humano, se investigó si la región marco conservada 1 (FR1), las regiones marco conservadas 1 (FR1) y 2 (FR2) juntas o la región marco conservada 3 (FR3) de un anticuerpo funcionalmente humanizado podrían reemplazarse por secuencias de anticuerpos humanos que ya

tienen restos donantes o restos de aminoácidos que son funcionalmente equivalentes a restos donantes, en posiciones de restos importantes en la secuencia de la línea germinal humana natural. Para este fin, los marcos conservados 1, 2 y 3 de VH de la secuencia de VH de ICR62 de rata se alinearon individualmente con secuencias de línea germinal humana. Aquí, la mayor identidad de secuencia no se usó para elegir los marcos conservados aceptores; en su lugar se realizó emparejamiento de varios restos críticos. Esos restos críticos comprenden los llamados restos canónicos y también los restos en las posiciones 27, 28 y 30 (numeración de Kabat), que quedan fuera de la definición de CDR1 de Kabat, pero con frecuencia están implicados en la unión a antígeno. Además, los restos críticos son los que muestran interacción importante con las CDR, como se puede determinar usando modelado molecular. La secuencia de IMGT IGHV1-58 (número de referencia M29809), IGHV5-51 (número de referencia M99686), así como la secuencia VBase 1-02 de la familia VH1, se eligieron como adecuados para reemplazar FR1, 2 o 3. En resumen: IGHV1-58 mostró un patrón prometedor en las posiciones de Kabat 27 a 30, pero no cumple los criterios para la posición canónica 71. El IGHV5-51 tiene un resto coincidente 71, de modo que podría usarse su FR3. Además, su FR1 está cerca de la secuencia de FR1 deseada.

El 1-e de VH1 cumplió todos los criterios, excepto la posición 27. La secuencia 1-02 se consideró aceptable para las regiones FR1 y FR2, pero requeriría una retromutación en FR3.

Después de diseñar las secuencias proteicas, se sintetizaron secuencias de ADN que codificaban estas proteínas como se detalla a continuación. Usando este enfoque no fueron necesarias retromutaciones en la mayoría de las construcciones de la cadena pesada, para conservar buenos niveles de unión a antígeno. La cronología y el razonamiento de las construcciones de marco conservado mixtas se explican en la sección de resultados.

Síntesis de los genes de anticuerpos

Después de haber diseñado la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo humanizado, se generó la secuencia de ADN. Los datos de secuencia de ADN de las regiones marco conservadas individuales se encontraron en las bases de datos (p. ej., IMGT o VBase) para secuencias de línea germinal humana. La información de secuencia de ADN de las regiones CDR se tomó de la secuencia publicada del anticuerpo ICR62 de rata (véase, p. ej., publicación PCT WO 95/20045). Con estas secuencias, la secuencia de ADN completa se ensambló virtualmente. Teniendo estos datos de secuencia de ADN, se introdujeron sitios de restricción de diagnóstico en la secuencia virtual mediante la introducción de mutaciones silenciosas, creando sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción. Para obtener la cadena física de ADN, se realizó síntesis génica (véase, p. ej., Wheeler *et al.* 1995). En este método, los oligonucleótidos se diseñan a partir de los genes de interés, de modo que se obtiene una serie de oligonucleótidos de la cadena codificante y otra serie es de la cadena no codificante. Los extremos 3' y 5' de cada oligonucleótido (excepto el primero y el último de la fila) siempre muestran secuencias complementarias de dos cebadores procedentes de la cadena opuesta. Al poner estos oligonucleótidos en un tampón de reacción adecuado para cualquier polimerasa termoestable y añadir Mg^{2+} , dNTP y una ADN polimerasa, cada oligonucleótido se extiende desde su extremo 3'. El extremo 3' recién formado de un cebador se hibrida después con el siguiente cebador de la cadena opuesta y extiende su secuencia adicionalmente en condiciones adecuadas para alargamiento de la cadena de ADN dependiente del molde. El producto final se clonó en un vector convencional para propagación en *E. coli*.

Producción de anticuerpos

Para la construcción de los vectores de expresión de cadena ligera y pesada quiméricos (es decir, región V completamente de rata y C humana) y humanizados anti-EGFR, se añadieron secuencias líder humanas de cadena pesada y ligera (para secreción) cadena arriba de las secuencias de ADN de región variable. Cadena abajo de las regiones variables, se añadieron las regiones constantes de IgG1 para la cadena pesada y la región constante kappa para la cadena ligera usando técnicas convencionales de biología molecular. Las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera del anticuerpo completo resultantes se subclonaron en vectores de expresión de mamíferos (uno para la cadena ligera y otro para la cadena pesada) bajo el control del promotor de MPSV y cadena arriba de un sitio poliA sintético, cada vector porta una secuencia de OriP de VEB.

Los anticuerpos se produjeron co-transfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de cadena pesada y ligera de anticuerpo de mamífero usando un enfoque de transfección con fosfato de calcio. Se transfectaron células HEK293-EBNA en crecimiento exponencial por el método de fosfato de calcio. Para la producción de anticuerpo sin modificar, las células se transfectaron solo con vectores de expresión de cadena pesada y ligera de anticuerpo en una relación 1:1. Para la producción del anticuerpo modificado por glucoingeniería, las células se cotransfectaron con cuatro plásmidos, dos para la expresión de anticuerpos, uno para una expresión de polipéptido GnTIII de fusión y uno para expresión de manosidasa II en una relación de 4:4:1:1, respectivamente. Las células se cultivaron como cultivos monocapa adherentes en matraces T usando medio de cultivo DMEM complementado con FCS al 10 % y se transfectaron cuando tenían entre 50 y 80 % de confluencia. Para la transfección de un matraz T75, se sembraron 8 millones de células 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM complementado con FCS (a 10 % V/V final), neomicina 250 µg/ml y las células se colocaron a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de CO₂ al 5 % durante una noche. Para cada matraz T75 para transfectar, se preparó una solución de ADN, CaCl₂ y agua mezclando 47 µg de ADN de vector plasmídico total dividido en partes iguales entre los vectores de expresión de cadena ligera y pesada, 235 µl de una solución de CaCl₂ 1 M y añadiendo agua a un volumen final de 469 µl. A

esta solución, se añadieron 469 µl de una solución de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM a pH 7,05, se mezclaron inmediatamente durante 10 segundos y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 segundos. La suspensión se diluyó con 12 ml de DMEM complementado con FCS al 2 % y se añadió al T75 en lugar del medio existente. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante aproximadamente 17 a 20 horas, después se reemplazó el medio con 12 ml de DMEM, FCS al 10 %. El medio de cultivo acondicionado se recogió de 5 a 7 días después de la transfección centrifugado durante 5 minutos a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 minutos a 4000 rpm y se mantuvo a 4 °C.

Los anticuerpos secretados se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A, seguido de cromatografía de intercambio catiónico y una etapa cromatográfica de exclusión por tamaño final en una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) intercambiando el tampón por solución salina tamponada con fosfato y recogiendo los anticuerpos IgG1 monoméricos puros. La concentración de anticuerpos se estimó usando un espectrofotómetro de la absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos se formularon en un fosfato de potasio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, solución de glicina 100 mM de pH 6,7.

Se produjeron variantes de glucoingeniería del anticuerpo humanizado mediante la cotransfección de los vectores de expresión de anticuerpos junto con un vector de expresión de glucosiltransferasa GnT-III o junto con un vector de expresión de GnT-III más un vector de expresión de manosidasa II en Golgi. Los anticuerpos modificados por glucoingeniería se purificaron y formularon como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos no modificados por glucoingeniería. Los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos se analizaron mediante MALDI/TOF-MS como se describe a continuación.

Análisis de oligosacáridos

Los oligosacáridos se liberaron enzimáticamente de los anticuerpos mediante digestión con PNGasaF, estando los anticuerpos inmovilizados en una membrana de PVDF o en solución.

La solución de digestión resultante que contiene los oligosacáridos liberados se preparó directamente para el análisis MALDI/TOF-MS o se digirió adicionalmente con EndoH glucosidasa antes de la preparación de la muestra para el análisis MALDI/TOF-MS.

Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos inmovilizados en membrana de PVDF

Los pocillos de una placa de 96 pocillos hecha con una membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) se humedecieron con 100 µl de metanol y el líquido se extrajo a través de la membrana de PVDF usando vacío aplicado al colector de vacío Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). Las membranas de PVDF se lavaron tres veces con 300 µl de agua. Después se lavaron los pocillos con 50 µl de tampón RCM (urea 8 M, Tris 360 mM, EDTA 3,2 mM, pH 8,6). Se cargaron entre 30-40 µg de anticuerpo en un pocillo que contenía 10 µl de tampón RCM. El líquido en el pocillo se extrajo a través de la membrana aplicando vacío y la membrana se lavó posteriormente dos veces con 50 µl de tampón RCM. La reducción de enlaces disulfuro se realizó mediante la adición de 50 µl de ditiotreitól 0,1 M en RCM y la incubación a 37 °C durante 1 h.

Después de la reducción, se aplicó un vacío para eliminar la solución de ditiotreitól del pocillo. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de agua antes de realizar la carboximetilación de los restos de cisteína mediante la adición de 50 µl de ácido yodoacético 0,1 M en tampón RCM e incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos.

Después de la carboximetilación, los pocillos se extrajeron con vacío y posteriormente se lavaron tres veces con 300 µl de agua. Después se bloqueó la membrana de PVDF, para prevenir la adsorción de la endoglucosidasa, incubando 100 µl de una solución acuosa al 1 % de polivinilpirrolidona 360 a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se eliminó el reactivo de bloqueo mediante suave vacío seguido de tres lavados con 300 µl de agua.

Los oligosacáridos ligados a N se liberaron mediante la adición de 2,5 mU de péptido-N-glucosidasa F (N-glucanasa recombinante, GLYKO, Novato, CA) y 0,1 mU de sialidasa (GLYKO, Novato, CA), para eliminar cualquier posible resto de monosacárido con carga, en un volumen final de 25 µl en NaHCO₃ 20 mM, pH 7,0). Se realizó digestión durante 3 horas a 37 °C.

Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos en solución

Se mezclaron entre 40 y 50 µg de anticuerpo con 2,5 mU de PNGasaF (Glyko, EE. UU.) en Tris 2 mM, pH 7,0 en un volumen final de 25 microlitros y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37 °C.

Uso de digestión con endoglucosidasa H de oligosacáridos liberados por PNGasaF para la asignación de estructuras de oligosacáridos bisecados híbridos a picos de oligosacáridos neutros de MALDI/TOF-MS

Los oligosacáridos liberados por PNGasaF se digirieron posteriormente con endoglucosidasa H (EC 3.2.1.96). Para la digestión con EndoH, se añadieron 15 mU de EndoH (Roche, Suiza) a la digestión de PNGasaF (anticuerpo en el

método de solución anterior) para proporcionar un volumen final de 30 microlitros y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37 °C. EndoH escinde entre los restos de N-acetilglucosamina del núcleo de quitobiosa de oligosacáridos ligados a N. La enzima solo puede digerir oligomanosa y la mayoría de los glucanos de tipo híbrido, mientras que los oligosacáridos de tipo complejo no se hidrolizan. Preparación de muestras para MALDI/TOF-MS

Las digestiones enzimáticas que contenían los oligosacáridos liberados se incubaron durante 3 horas más a temperatura ambiente después de la adición de ácido acético a una concentración final de 150 mM y posteriormente se pasaron a través de 0,6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma de hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Suiza) empaquetada en una columna de cromatografía de micro-bio-spin (BioRad, Suiza) para eliminar cationes y proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa diana de acero inoxidable y se mezcló en la placa con 1 µl de matriz sDHB. La matriz sDHB se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0,1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro de sodio acuoso 10 mM 1:1 (v/v). Las muestras se secaron al aire, se aplicaron 0,2 µl de etanol y finalmente las muestras se dejaron recristalizar bajo aire.

MALDI/TOF-MS

El espectrómetro de masas MALDI-TOF usado para adquirir los espectros de masas fue un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento fue operado en la configuración lineal, con una aceleración de 20 kV y 80 ns de retardo. Se usó calibración externa usando patrones de oligosacáridos para la asignación de masa de los iones. Se sumaron los espectros de 200 disparos de láser para obtener el espectro final.

Ensayo de unión a antígeno

Las variantes de anticuerpos purificados, humanizados monoméricos se ensayaron para determinar la unión con el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR, también denominado en la bibliografía HER-1 o ErbB1) en la línea celular epidérmica humana A431, usando un ensayo basado en citometría de flujo. Se transfirieron 200.000 células (p. ej., de la línea celular A431 humana) en 180 µl de tampón FACS (PBS que contenía FCS al 2 % y EDTA 5 mM) a tubos de poliestireno de 5 ml y se añadieron 20 µl de muestras de anticuerpo anti-EGFR concentrado 10 veces (anticuerpo primario) (1-5000 ng/ml de concentración final) o solo PBS. Después de mezclar suavemente las muestras, los tubos se incubaron a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y se sedimentaron a 300 x g durante 3 minutos. Se aspiró el sobrenadante y las células se recogieron en 50 µl de tampón FACS y se añadieron 2 µl de anticuerpo secundario (fragmentos F(ab')₂-FITC específicos anti-Fc (Jackson Immuno Research Laboratories, EE. UU.)) y los tubos se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y se recogieron en 500 µl de tampón FACS para análisis por citometría de flujo. La unión se determinó trazando la media geométrica de fluorescencia frente a las concentraciones de anticuerpo.

Unión de glucovariantes de IgG1 monoméricas a la línea celular CHO que expresa FcγRIIIA

Se transfectaron células CHO por electroporación (280 V, 950 µF, 0,4 cm) con un vector de expresión que codifica la cadena α de FcγRIIIA-Va1158 y la cadena γ. Los transfectantes se seleccionaron mediante la adición de puomicina 6 µg/ml y los clones estables se analizaron mediante FACS usando 10 µl de anticuerpo monoclonal conjugado con FITC-anti-FcγRIII 3G8 (BD Biosciences, Allschwil/Suiza) para 106 células. Se realizó unión de IgG1 con células CHO que expresaban FcγRIIIA-Va1158. En resumen, los fragmentos F(ab')₂ anti-FcγRIIIA 3G8 (Ansell, Bayport, MN/EE.UU.) se añadieron a una concentración de 10 µg/ml para competir con la unión de las glucovariantes de anticuerpos (3 µg/ml). La intensidad de fluorescencia que se refiere a las variantes de anticuerpos unidos se determinó en un FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Suiza).

Ensayo ADCC

Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como células efectoras y se prepararon usando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 EE.UU.) siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. En resumen, se tomó sangre venosa con jeringas heparinizadas de voluntarios sanos. La sangre se diluyó 1:0,75-1,3 con PBS (que no contenía Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺) y se colocó en capas en Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) sin interrupciones. Se recogió la interfase que contenía el PBMC y se lavó con PBS (50 ml por célula de dos gradientes) y se recogió por centrifugación a 300 x g durante 10 minutos a TA. Después de la resuspensión del sedimento con PBS, las PBMC se contaron y se lavaron por segunda vez por centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a TA. Las células se resuspendieron después en el medio adecuado para los procedimientos posteriores.

La relación de efector con respecto a diana usada para los ensayos de ADCC fue de 25:1 y 10:1 para células PBMC y NK, respectivamente. Las células efectoras se prepararon en medio AIM-V a la concentración apropiada para añadir 50 µl por pocillo de placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las células diana eran células que expresaban EGFR humano (p. ej., A431, EBC-1 o LN229) cultivadas en DMEM que contenía FCS al 10 %. Las células diana se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a 0,3 millones por ml para añadir 30.000 células en 100 µl por micropocillo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, se añadieron en 50 µl a las células diana previamente sembradas

en placas y se permitió que se unieran a las dianas durante 10 minutos a TA. Después se añadieron las células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %. Se evaluó la destrucción de células diana mediante la medición de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de células dañadas usando el kit de detección de citotoxicidad (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Después de la incubación de 4 horas, las placas se centrifugaron a 800 x g. Se transfirieron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa transparente de fondo plano de 96 pocillos. Se añadieron 100 µl de tampón de sustrato de color del kit por pocillo. Los valores de V_{máx} de la reacción de color se determinaron en un lector de ELISA a 490 nm durante al menos 10 minutos usando el software SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, EE.UU.). La liberación espontánea de LDH se midió a partir de pocillos que contenían solo células diana y efectoras, pero no anticuerpos. La liberación máxima se determinó a partir de pocillos que contenían solo células diana y Triton X-100 al 1 %. El porcentaje de destrucción mediada por anticuerpos específicos se calculó de la siguiente manera: $((x - LE)/(LM - LE)) \times 100$, donde x es la media de V_{máx} a una concentración de anticuerpo específica, LE es la media de V_{máx} de la liberación espontánea y LM es la media de V_{máx} de la liberación máxima.

Ejemplo 2

Resultados y análisis

Comparación de la unión al receptor de EGF humano de las variantes de anticuerpos I-HHA, I-HHB, I-HHC, I-HLA, I-HLB, I-HLC, I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, I-HLA6, I-HLA7, I-HLA8, I-HLA9, I-HHD, I-HHE, I-HHF e I-HHG, bien en complejo con la cadena ligera de ICR62 quimérica o con las cadenas ligeras de ICR62 humanizadas (I-KA, I-KB o I-KC) y el anticuerpo quimérico precursor ch-ICR62 muestra que todos los anticuerpos tienen, con un margen de una unidad logarítmica, valores de CE50 similares. Solo el I-HHA tiene actividad de unión fuertemente disminuida (véase figura 2). La figura 1 muestra la actividad funcional de las cadenas polipeptídicas individuales de ICR62 quimérico (ch-ICR62) cuando se combinan con las construcciones humanizadas I-HHC e I-KB, respectivamente. En este experimento, la cadena ligera, la cadena pesada o ambas cadenas simultáneamente del ch-ICR62 fueron reemplazadas por las construcciones humanizadas mencionadas anteriormente. Esto muestra que la formación de la interfaz VH/VL parece funcionar tan bien en el anticuerpo de roedor como en las construcciones humanizadas.

Como se muestra en la figura 2, la cadena pesada humanizada I-HHA no pudo restaurar la actividad de unión con el I-KA o la cadena ligera de I-KB. Dado que el I-HLA mostró unión con el I-KA y el I-KB, los presentes inventores concluyeron que la cadena pesada de I-HHA no es funcional en la unión a antígeno. Las figuras 1 y 2, combinadas con la figura 3, muestran que las construcciones de cadena ligera I-KA, I-KB e I-KC muestran comportamiento de unión indistinguible del homólogo de roedores. La variante I-KC no posee retromutaciones posteriores y además tiene su CDR1 parcialmente humanizada, de modo que los restos 24-29 pueden proceder de la secuencia aceptora humana (A30 de VK1, como se ha mencionado anteriormente).

En la serie I-HHA, I-HHB y I-HHC, solo las dos últimas variantes mostraron comportamiento de unión satisfactorio (figuras 2 y 3). El análisis de secuencia del I-HHA reveló tres posibles restos de aminoácidos responsables de este comportamiento: Lys33, His35 y Tyr50. Las construcciones que tenían Lys33 reemplazada por tirosina mostraron buena unión, así como construcciones que tenían la Tyr50 reemplazada por triptófano. Solo cuando estos dos restos fueron reemplazados por alanina y glicina, respectivamente, se perdió la unión. Ya que I-HHC no mostró mejor unión que I-HHB, los presentes inventores concluyeron que no es necesario que los restos Asn60, Glu61, Lys64 y Ser65 sean de origen roedor; o pueden reemplazarse por Ala, Gln, Gln y Gly, respectivamente. Este procedimiento conduce a una construcción en la que la CDR2 está más humanizada, ya que las posiciones de aminoácidos 60 a 65 son parte de la definición de CDR de Kabat, pero no hay necesidad de injertar los restos de donantes de roedores para este anticuerpo.

Las figuras 4 y 5 comparan las construcciones de las series I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5 y I-HLA6. El mejor comportamiento de unión se observó en las construcciones ch-ICR62, I-HLA1 e I-HLA2, con un valor de CE50 de aprox. 300 ng/ml. Las otras construcciones tenían este valor aumentado en un factor de dos y por lo tanto tienen actividad de unión ligeramente reducida. La primera conclusión de estos datos es que, dentro de la CDR1 de Kabat, se toleraron las sustituciones Lys33Tyr e Ile34Met. Estas dos posiciones están ubicadas dentro de la definición de Kabat de CDR1, pero fuera de los límites de CDR de Chothia (que se basaron en el análisis estructural en lugar de análisis de secuencia). En la parte final de CDR1, entonces, se permite al menos cierta promiscuidad.

La segunda conclusión es que, dentro de CDR2, además del reemplazo mencionado anteriormente de los restos Asn60 y Glu61 por restos no donantes, también se permitieron las sustituciones no donantes Asn60Ser, Glu61Pro y Lys62Ser dentro de la CDR de Kabat. Estos restos procedieron de la secuencia del aceptor IGHV5-51 de línea germinal humana, que se usó como una secuencia aceptora de FR3. Las construcciones I-HLA3 e I-HLA4 difieren de I-HLA1 e I-HLA2 solo por la eliminación de la retromutación Phe27Tyr y las construcciones I-HLA3 e I-HLA4 pierden afinidad en comparación con su construcción parental. Por lo tanto, la tercera conclusión de la comparación de I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5 e I-HLA6 es la participación de Phe27 en la unión a antígeno, bien directa o bien indirectamente, mediante la modificación de la conformación de bucle de CDR1.

Las variantes I-HLA5 e I-HLA6 tienen la FR1 de I-HLA1 e I-HLA2, respectivamente, reemplazada por otra secuencia

aceptora de línea germinal con la Phe27 presente de manera natural (es decir, IGHV1-58). Esto solo podría lograrse mediante la introducción simultánea de varias otras mutaciones que son: Val2Met, Ala9Pro y Ala16Thr. Al hacerlo, se anuló de nuevo el efecto beneficioso de (re)introducir la Phe27.

- 5 La construcción I-HLA7 se evaluó para determinar si la restauración de restos de donantes adicionales en las CDR1 y CDR2 de cadena pesada de la construcción I-HLA6 restablecería la actividad de unión completa en comparación con ICR62. Como se muestra en la figura 6, esto no fue así.

10 Como se muestra en las figuras 7 y 8, dos construcciones adicionales, I-HLA8 y I-HLA9, se ensayaron para determinar si se podía lograr la actividad de unión completa en comparación con ch-ICR62. A partir de la construcción I-HHB, las regiones FR1 fueron reemplazadas por regiones FR1 que tenían homología máxima dentro de la región CDR1 de Chothia. La construcción I-HLA8 tiene la FR1 de la secuencia de IGHV1-58 y el I-HLA9 tiene la región FR1 de IGHV5-51. Ambas construcciones se unieron al antígeno al menos tan bien como el anticuerpo ch-ICR62. La construcción I-HLA8 puede, de hecho, ser aún mejor, con el CE50 reducido en un factor de 2. La construcción I-HLA8 tiene la misma secuencia de FR1 que las construcciones I-HLA5 e I-HLA6 y, por lo tanto, tiene los mismos restos no donantes (es decir, Val2Met, Ala9Pro y Ala16Thr), lo que sugiere que la presencia de estos restos no donantes no tiene un efecto negativo en la unión. Las mutaciones no beneficiosas que se producen en I-HLA5 y 6 surgen de la combinación de un VH1 FR1 emparejado con un VH5 FR3, que podría compensarse potencialmente teniendo un FR1 y un FR3 de la misma familia de VH.

20 En la Figura 8 se muestran construcciones que contienen restos no donantes dentro de las CDR. Por tanto, estas construcciones se humanizan aún más dentro de las CDR porque los restos no donantes aparecen en las regiones marco conservadas humanas que se eligieron para estas construcciones. Las construcciones I-HHE (His35Ser), I-HHF (Thr58Asn) e I-HHG (Ser57Ala) tienen un resto dentro de la CDR1 o CDR2 que está humanizado (en comparación con la construcción I-HHB). También se ensayó la construcción I-HHD (Gly24Ala). I-HHF mostró una unión reducida lo que indica la importancia de Thr58. A diferencia del resto 58 de CDR de Kabat, el aminoácido 57 es más tolerante a las sustituciones, ya que la mutación Ser57Ala aparentemente no tiene influencia en la unión (figura 8).

25 Ya que la región FR3 de IGHV5-51 parecía mostrar propiedades prometedoras en las construcciones I-HLA1 y 2 y la FR1 de la misma secuencia de línea germinal demostró ser útil en la construcción I-HLA9, la FR1, FR2 y FR3 de IGHV5-51 se diseñaron para usarse juntas como un aceptor para injerto de asa.

Resumen del análisis de los restos canónicos en construcciones ICR62 humanizadas:

VL: posición de Kabat 2: Ile probablemente necesario.
posición de Kabat 71: Ile o Phe permitido.

VH: Pos. 24, Gly, Thr, Ala, Val, Ser permitido.
Pos. 26, Gly permitido.
Pos. 29, Phe, Ile, Leu, Val, Ser permitido.
Pos. 34, Ile, Met, Leu, Val, Trp, Tyr, Thr permitido.
Pos. 71, Ala, Leu, Val, Thr permitido.
Pos 94, Arg, Gly, Asn, Lys, Ser, His, Thr, Ala permitido

35 Resultados de los experimentos de ADCC

La figura 9 muestra una comparación de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) que se muestra para las diversas glucoformas del anticuerpo quimérico ICR62, así como para la variante humanizada I-HLA4. Las diferentes glucoformas están marcadas por una etiqueta que indica no modificada por glucoingeniería (TS), Glucoforma 1 (G1) o Glucoforma 2 (G2). "G1" se refiere a glucoingeniería del anticuerpo por coexpresión con GnTIII. "G2" se refiere a glucoingeniería del anticuerpo por coexpresión con GnTIII y ManII. "TS" se refiere a anticuerpos que no fueron modificados por glucoingeniería. La cadena ligera para todas las construcciones humanizadas es la variante I-KC y no se etiquetó de manera explícita.

45 La potencia y eficacia del anticuerpo quimérico así como del humanizado fueron mejoradas por los dos enfoques diferentes de glucoingeniería. La construcción ch-ICR62 funcionó ligeramente mejor que I-HLA4 para el tipo salvaje o las glucoformas, respectivamente. Como se observa en la figura 4, al comparar las afinidades de los dos anticuerpos hacia su antígeno, el ch-ICR62 tenía un valor de CE50 dos veces menor. Esta diferencia de afinidad se refleja aquí en diferencias de eficacia.

50 La figura 10 muestra una comparación de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) para la forma no modificada por glucoingeniería ("tipo silvestre") y la glucoforma G2 de las construcciones de anticuerpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7. Los mismos anticuerpos se aplicaron a dos líneas celulares diana diferentes. En el panel A de la figura 10, se usa la línea celular diana LN229; y en el panel B de la figura 10, se usó la línea celular A431. Las células A431 son aparentemente más susceptibles a la muerte celular mediada por anticuerpos que las células LN229. Los que es más importante, la glucoingeniería mejoró la potencia de ambos anticuerpos. Este efecto parecía ser más

pronunciado para el I-HLA7 que para el I-HHB. El porcentaje de muerte celular a la concentración máxima de anticuerpos para el I-HHB podría desplazarse de ~30 % a ~40 % mediante la introducción de la variante modificada por glucoingeniería G2, cuando se usa la línea celular diana LN229. Cuando se usó la línea celular A431, este valor aparentemente no había cambiado. Este comportamiento fue completamente diferente para el anticuerpo I-HLA7. La destrucción de células diana a la concentración máxima de anticuerpos se desplazó de aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 %, para las células LN229, y de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 % para las células A431 mediante la introducción de las variantes modificadas por glucoingeniería G2. En este caso, a pesar de tener menor actividad en el anticuerpo no modificado por glucoingeniería para el I-HLA7 en relación con el I-HHB, la clasificación de la actividad se invierte para los anticuerpos modificados por glucoingeniería. Las figuras 11 y 12 también muestran comparaciones de formas no modificadas por glucoingeniería (TS) y glucoformas G2 de ICR62 quimérico y las construcciones de anticuerpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7.

Ejemplo 3

Estudio preliminar de toxicidad por administración intravenosa (embolada) a monos cynomolgus - análisis bioanalítico INTRODUCCIÓN

Ensayo de anti-EGFR modificado por glucoingeniería

Este análisis bioanalítico describe la medición de anti-EGFR en muestras procedentes de monos cynomolgus después de la administración intravenosa (embolada) de anti-EGFR (anticuerpo anti-EGFR recombinante, modificado por glucoingeniería, producido a partir de células de mamífero transfectadas en cultivo con vectores de expresión de anticuerpos que albergan los genes de cadena pesada I-HHB y de cadena ligera I-KC como se ha descrito anteriormente y purificado como se ha descrito anteriormente) como se describe en el protocolo expuesto a continuación en el presente documento. Un total de 78 muestras de suero de mono se almacenaron congeladas a aproximadamente -20 °C hasta su uso.

Los métodos bioanalíticos usados para la determinación de anti-EGFR usaron un método de ELISA para medir las concentraciones en suero de anti-EGFR. Los criterios de aceptación se establecieron en ± 20 % (± 25 % QC bajo) para precisión e imprecisión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo: El objetivo de este estudio fue la evaluación del potencial tóxico sistémico de la administración intravenosa (embolada) de Gluco-mAb (anti-EGFR) a monos cynomolgus seguido de un periodo de recuperación de 8 semanas.

TABLA 8

Modelo animal	Monos cynomolgus, aceptados por las agencias reguladoras, datos de fondo disponibles.
Justificación para el uso del primate	El primate era la especie no roedora elegida porque solo esta conserva dos parámetros críticos: reconocimiento del antígeno de EGFR por el anticuerpo de ensayo y reconocimiento de la región Fc del anticuerpo de ensayo por receptores de Fc del sistema inmunitario.
Vía	Intravenosa (embolada), para simular las condiciones de administración clínica.

TABLA 9: Grupos y dosificaciones de tratamiento

Grupo	1	2	3
Compuesto	_____ Gluco-mAb (Anti-EGFR)		
Dosificación (mg/kg/día)	1,5	4,5	12

Justificación de la selección del nivel de dosificación

1,5-7,5 mg/kg es el intervalo esperado para estudios en seres humanos (7,5 mg/kg es la dosis correspondiente para un compuesto similar en seres humanos).

TABLA 10: Identidad de los grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosificación (mg/kg/día) #	Número de animales		Números de identificación de animales	
			Macho	Hembra	Macho	Hembra
1	Gluco-mAb (Anti-EGFR)	1,5	1	1	623	590

(continuación)

Grupo	Tratamiento	Dosificación (mg/kg/día) #	Número de animales		Números de identificación de animales	
			Macho	Hembra	Macho	Hembra
2	Glucó-mAb (Anti-EGFR)	4,5	1	1	461	462
3	Glucó-mAb (Anti-EGFR)	12	1	1	463	612

Expresado en términos de la sustancia de ensayo suministrada.

TABLA 11: Animales

Especie	Mono cynomolgus (criado específicamente).
Edad a la que se recibió	Aproximadamente 15 meses.
Intervalo de peso ordenado	de 1,5 a 2,5 kg.

TABLA 12: Administración de anti-EGFR

Vía	Inyección intravenosa.
Tratado en	Dosificaciones constantes en mg/kg/ocasión.
Dosificación de volumen	Calculado por adelantado, basado en el peso corporal registrado más recientemente.
Volumen de dosis individual	1 ml/kg/día
Frecuencia	Días 1, 8, 15 y 22, inmediatamente antes de alimentarse.
Secuencia	Por grupo.
Sitios de dosis	Usando las venas safenas izquierdas.
Inyección	Embolada, nueva aguja estéril desechable por animal.
Formulación	Se mantuvo un registro del uso de la formulación basado en los pesos. Este saldo se compara con el uso esperado como una comprobación de la administración correcta.

5

TABLA 13: Observaciones clínicas

Animales y sus bandejas de jaulas	Inspeccionado visualmente al menos dos veces al día para hallar pruebas de reacción al tratamiento o problemas de salud.
Desviaciones de lo normal registradas en el momento con respecto a	Naturaleza y gravedad. Fecha y hora de inicio. Duración y progreso de la condición observada.
Examen físico	Una vez por semana para todos los animales.
Registros diarios de bandejas de jaulas	Para vómito, sangre, diarrea, etc.

TABLA 14: Frecuencia de dosificación:

Frecuencia	1. Inmediatamente antes de la dosis. 2. ½ a 2 horas después de completar la dosificación. 3. Lo más tarde posible en la jornada laboral.
Sitios de inyección	Diariamente.

10

TABLA 15: Toxicocinética

Día	Animales	Tiempos de toma de muestras horas después de la dosificación.
1	Todos los animales	1, 4, 12, 24, 72, 120.
8	Todos los animales	Antes de la dosis, 1 hora después de la dosis (169 horas después de la dosis del día 1).
15	Todos los animales	Antes de la dosis, 1 hora después de la dosis (337 horas después de la dosis del día 1).
22	Todos los animales	Antes de la dosis, 1 hora después de la dosis (505 horas después de la dosis del día 1).
29	Todos los animales	672 horas después de la dosis del día 1.

TABLA 16: Muestras

Sitio de muestra	Vena adecuada.
Volumen de anticoagulante/muestra	Sin anticoagulante/0,7 ml.
Número total de muestras tomadas	104.

(continuación)

Separación de suero	Por centrifugación a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario para proporcionar un mínimo de 0,3 ml, cuando sea posible.
Almacenamiento de suero	Tubos de plástico debidamente etiquetados. Ultracongelado (aproximadamente -20 °C), mientras se espera el bioanálisis.

Histología

TABLA 17: Fijación del tejido

Patrón	Formalina tamponada neutra al 10 %.
Otros	Testículos y epidídimos: Inicialmente en el líquido de Bouin. Ojos: Inicialmente en el líquido de Davidson.

5

TABLA 18: Histología

Procesamiento	Todos los animales.
Tinción rutinaria	Secciones de 4-5 µm teñidas con hematoxilina y eosina.

Procedimiento de inmunoensayo

10 Una placa se revistió con 100 µl por pocillo de solución de recubrimiento (5 µl de IgG antihumana de oveja (IgG adsorbida en mono, The Binding Site, Reino Unido) añadida a 11495 µl de tampón de bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) y se incubó durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 µl por pocillo de solución de lavado (PBS (Sigma Chemical Co., Reino Unido) 0,01 % (v/v) Triton-X100 (Sigma Chemical Co., Reino Unido)) y se secó por golpecitos.

15 Se añadió tampón de ensayo (BSA 1 % p/v, Sigma Chemical Co., Reino Unido) a 200 µl por pocillo y se incubó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 µl por pocillo de solución de lavado y se secó por golpecitos.

20 Los patrones de calibración, controles de calidad (QC) y/o muestras se añadieron a 100 µl por pocillo y se incubaron durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente, después de lo cual, la placa se lavó 3 veces con 400 µl por pocillo de solución de lavado y se secó por golpecitos.

25 La solución de conjugado (6 µl de conjugado de cabra anti-IgG kappa humano-HRP (Bethyl Laboratories Inc., EE. UU.) añadido a 12 ml de tampón de ensayo) se añadió a 100 µl por pocillo y se incubó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 µl por pocillo de solución de lavado y se secó por golpecitos.

30 Se añadió trimetilbencidina (TMB; Europa Bioproducts, Ely, Reino Unido) a 100 µl por pocillo. La placa se cubrió y se incubó durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 100 µl de solución de parada (HCl 0,5 M, Fisher, Reino Unido) a cada pocillo. Las absorbancias se leyeron a 450 nm (filtro de referencia 630 nm) en un lector de microplacas DYNATECH MRX (Mettler Instruments, Reino Unido).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

35

Análisis de muestra de ensayo

40 Las concentraciones de anti-EGFR se midieron mediante un método de inmunoensayo (ELISA) en 78 muestras de suero de mono generadas según el protocolo descrito anteriormente en el presente documento. Estos resultados se presentan en las tablas 19-21, a continuación.

TABLA 29

Concentración en suero de anti-EGFR en suero de mono (µg/ml) después de la administración intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22 (GRUPO 1)				
Punto temporal	Número de animal		Media	dt
	1M 623	1F 590		
Día 1 1 hora	33,42	30,86	32,14	1,8
Día 1 4 horas	27,33	27,49	27,41	0,1
Día 1 12 horas	13,09	17,01	15,05	2,8
Día 1 24 horas	9,656	9,468	9,562	0,1
Día 1 72 horas	2,528	0,786	1,657	1,2

(continuación)

Concentración en suero de anti-EGFR en suero de mono (µg/ml) después de la administración intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22 (GRUPO 1)				
Punto temporal	Número de animal		Media	dt
	1M 623	1F 590		
Día 1 120 horas	0,845	0,431	0,638	0,3
Día 8 antes de la dosis	0,538	0,287	0,413	0,2
Día 8 1 hora	30,02	19,07	24,55	7,7
Día 15 antes de la dosis	0,902	0,382	0,642	0,4
Día 15 1 hora	17,91	33,08	25,50	10,7
Día 22 antes de la dosis	1,065	0,595	0,830	0,3
Día 22 1 hora	19,41	33,00	26,21	9,6
Día 1 672 horas	1,202	0,362	0,782	0,6
dt desviación típica				

TABLA 20

Concentración en suero de anti-EGFR en suero de mono (µg/ml) después de la administración intravenosa de 5,0 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22 (GRUPO 2)				
Punto temporal	Número de animal		Media	dt
	2M 461	2F 462		
Día 1 1 hora	32,45	29,51	30,98	2,1
Día 1 4 horas	32,39	29,57	30,98	2,0
Día 1 12 horas	28,05	25,88	26,97	1,5
Día 1 24 horas	23,70	23,78	23,74	0,1
Día 1 72 horas	14,03	14,38	14,21	0,2
Día 1 120 horas	10,42	8,137	9,279	1,6
Día 8 antes de la dosis	4,672	3,683	4,178	0,7
Día 8 1 hora	25,91	31,06	28,49	3,6
Día 15 antes de la dosis	5,752	5,450	5,601	0,2
Día 15 1 hora	32,20	35,38	33,79	2,2
Día 22 antes de la dosis	BLQ	6,497	3,249	-
Día 22 1 hora	26,98	30,23	28,61	2,3
Día 1 672 horas	BLQ	4,845	2,423	-
BLQ por debajo del límite de cuantificación (<0,195 µg/ml)				
dt desviación típica				
Nota: BLQ ingresado como cero en los cálculos				

TABLA 21

Concentración en suero de anti-EGFR en suero de mono (µg/ml) después de la administración intravenosa de 15 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22 (GRUPO 3)				
Punto temporal	Número de animal		Media	dt
	3M 463	3F 612		
Día 1 1 hora	262,2	168,0	215,1	66,6
Día 1 4 horas	223,3	174,5	198,9	34,5
Día 1 12 horas	164,9	165,7	165,3	0,6
Día 1 24 horas	141,7	146,0	143,9	3,0
Día 1 72 horas	99,54	86,64	93,09	9,1
Día 1 120 horas	86,64	69,08	77,86	12,4
Día 8 antes de la dosis	65,86	45,21	55,54	14,6
Día 8 1 hora	282,1	209,9	246,0	51,1
Día 15 antes de la dosis	98,43	71,21	84,82	19,2
Día 15 1 hora	385,9	231,4	308,7	109,2
Día 22 antes de la dosis	117,3	105,6	111,5	8,3
Día 22 1 hora	234,1	402,5	318,3	119,1
Día 1 672 horas	127,5	122,9	125,2	3,3
dt desviación típica				

Estudio preliminar de toxicidad por administración intravenosa (embolada) a monos cynomolgus – Toxicocinética

Resumen

5

A tres grupos de monos cynomolgus (1 macho y 1 hembra por grupo) se les administraron dosis intravenosas en embolada de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22 de un estudio de toxicidad de 28 días para evaluar la exposición sistémica de los animales a anti-EGFR. Las concentraciones en suero de anti-EGFR en muestras recogidas hasta 672 horas después de la primera dosis se determinaron por medio de un método de inmunoensayo. El análisis farmacocinético de los datos de concentración en suero-tiempo dio como resultado los siguientes parámetros farmacocinéticos:

10

TABLA 22

Dosis (mg/kg)	Animal	C _{máx} (µg/ml)	T _{máx} (h)	ABC _t (µg.h/ml)	ABC (µg.h/ml)	CL (ml/h/kg)	V _{ss} (ml/kg)	k (1/h)	t _{1/2} (h)
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ^a	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M461	32,45	1	2537	3005	1,488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1,663	133,2	0,0121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a
a	El valor es una estimación ya que los datos no cumplieron todos los criterios de aceptación definidos en el procesamiento de datos y deberían tratarse con precaución								

Las relaciones entre áreas bajo las curvas de concentración de anti-EGFR en suero-tiempo (ABC_{168}) y el nivel de dosis el día 1 se presentan a continuación:

TABLA 23

Nivel de dosis (mg/kg/ocasión)	Nivel de dosis relación	Relación ABC_{168}	
		Machos	Hembras
1,5	1	1	1
4,5	3,0	3,1	3,2
12	8,0	22,0	21,4

La tasa y el grado de exposición sistémica de los monos a anti-EGFR, caracterizado por ABC_{168} , aumentó de manera aproximadamente proporcional con el aumento de la dosis en el intervalo de dosis de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasión, pero en más del aumento proporcional de la dosis en el intervalo de dosis de 4,5 a 12 mg/kg/ocasión el día 1. A la mayor dosis (12 mg/kg/ocasión) la ABC_{168} era aproximadamente 2,8 veces mayor que la predicha por una relación lineal.

El grado (ABC_{168}) de exposición sistémica de monos hembras a anti-EGFR fue en general similar a la exposición en monos machos.

Después de dosis intravenosas repetidas, las concentraciones en suero antes de la dosis de anti-EGFR fueron en general mayores que los valores después de una dosis única e indicaron la acumulación de anti-EGFR en suero durante todo el periodo del estudio.

La semivida terminal no se pudo estimar adecuadamente para todos los animales, pero donde se pudo estimar fue en el intervalo de 32,5 a 63,1 horas y pareció aumentar con la dosis en animales machos. La eliminación total en suero de anti-EGFR parecía ser independiente de la dosis en el intervalo de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasión, pero se redujo al nivel de dosis máximo en monos machos y hembras.

En conclusión, el grado de exposición sistémica de monos cynomolgus a anti-EGFR parecía caracterizarse por cinética no lineal (dependiente de la dosis) en el intervalo de dosis de 1,5 a 12 mg/kg/ocasión el día 1 del estudio de toxicidad intravenosa. Es probable que el aumento de la dosis de anti-EGFR por encima de 4,5 mg/kg/ocasión dé como resultado una exposición sistémica mayor de lo que se predeciría a partir de una relación lineal, lo cual es coherente con la posibilidad de un proceso de capacidad limitada para la eliminación de anti-EGFR.

Además, el estudio también proporcionó pruebas de que, en general, no hubo diferencias en la exposición sistémica de monos machos y hembras a anti-EGFR y que hubo acumulación después de la administración intravenosa repetida.

Introducción

A tres grupos de un mono cynomolgus macho y uno hembra se les administró anti-EGFR mediante inyección intravenosa en embolada, a niveles de dosis de 1,5, 4,5 y 12 mg/kg/ocasión los días 1, 8, 15 y 22 de un estudio preliminar de toxicidad. Se tomaron muestras de sangre de cada animal en los siguientes puntos temporales después de la administración el día 1: 1, 4, 12, 24, 72 y 120 horas después de la dosis. Además, se tomaron muestras antes de la dosis y 1 hora después de la dosis los días 8, 15 y 22 y a las 672 horas después de la primera dosis el día 1. El suero separado se congeló a aproximadamente -20 °C antes del análisis de las concentraciones en suero de anti-EGFR por un método de inmunoensayo.

Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva de concentración en suero-tiempo a tiempo infinito
ABC_{168}	Área bajo la curva de concentración en suero-tiempo durante un intervalo de dosificación de 168 horas
BLQ	Por debajo del límite de cuantificación
ca	Aproximadamente
CL	Aclaramiento sérico total
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración máxima en suero
F	Hembra
k	Constante de velocidad terminal
M	Macho
$t_{1/2}$	Semivida terminal
$T_{m\acute{a}x}$	Tiempo en el que se produjo $C_{m\acute{a}x}$
Vss	Volumen de distribución en estado estacionario

Anticuerpo usado para el estudio

Glucó-mAb (Anti-EGFR), un anticuerpo anti-EGFR modificado por ingeniería genética con Fc para aumentar la afinidad de unión al receptor Fc-FcγRIII y aumentar la ADCC, se produjo, se purificó y se caracterizó como se ha descrito anteriormente. En resumen, el anticuerpo se produjo por cotransfección de células HEK-293-EBNA con vectores de ADN plasmídico para la expresión de la cadena pesada del anticuerpo I-HHB, cadena ligera del anticuerpo I-KC, GnT-III y ManII. Se empleó una versión ampliada linealmente del método de transfección descrito anteriormente, transfectando monocapas de células cultivadas en frascos rotatorios en lugar de matraces en T. Se incluyó una etapa cromatográfica de intercambio aniónico de flujo continuo adicional usando matriz Q-sepharose en el proceso de purificación inmediatamente antes de la etapa cromatográfica de exclusión por tamaño descrita anteriormente.

El patrón de glucosilación del anticuerpo modificado por ingeniería genética con Fc se analizó como se ha descrito anteriormente usando espectrometría MALDI/TOF-MS de oligosacáridos procedentes de Fc liberados enzimáticamente. El perfil de oligosacáridos se muestra en la figura 23.

La unión al EGFR humano y EGFR de mono se demostró mediante la unión a células completas como se ha descrito anteriormente usando células A431 y COS-7, respectivamente, y análisis basado en FACS. Se muestran curvas de unión en las figuras 24 y 25 respectivamente.

El aumento de la unión al receptor FcγRIII resultante de la ingeniería de Fc aplicada se demostró como se ha descrito anteriormente usando unión de células completas a células CHO modificadas por ingeniería genética para la expresión en superficie de FcγRIII humano y análisis basado en FACS. Los resultados se muestran en la figura 26. Adicionalmente, el anticuerpo modificado tiene un grado equivalente de modificación por ingeniería genética con Fc al anticuerpo "Glucó-2" (75 % de los oligosacáridos Fc son de tipo no fucosilado) descritos en otra parte (Ferrara, C. *et al.*, J Biol Chem. 5 de diciembre de 2005; [Publicación electrónica antes de la impresión]). Dichos anticuerpos modificados por ingeniería genética con Fc tienen afinidad de unión hasta 50 veces mayor por FcγRIII humano en relación con un anticuerpo convencional sin modificar por ingeniería genética con Fc (constante de disociación en equilibrio de 15 y 150 nM para las variantes polimórficas 158V y 158F del receptor humano frente a 750 y 5000 nM para las mismas variantes de receptor, respectivamente, cuando se une a anticuerpos IgG1 humanos no modificados por ingeniería genética con Fc).

ADCC se midió como se ha descrito anteriormente usando dos líneas celulares diana: Células de carcinoma de pulmón humano A549 y células de queratinocitos de mono cynomolgus CYNOM-K1. Los resultados se muestran en las figuras 27 y 28, respectivamente.

Procesamiento de datos

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando el programa informático WinNonlin Pro versión 3.3 (Pharsight Corporation, EE. UU.).

Todas las concentraciones en suero proporcionadas como parte de este estudio se indicaron hasta 4 cifras significativas o 3 decimales. Los parámetros farmacocinéticos se presentaron de la siguiente manera: C_{máx}, ABC₁₆₈, CL y V_{ss} hasta 4 cifras significativas; k hasta 4 decimales; t_{1/2} hasta 1 decimal.

Los valores que eran BLQ (<0,195 µg/ml) se ingresaron como cero en el procesamiento farmacocinético.

Toxicocinética

Las concentraciones máximas en suero de anti-EGFR (C_{máx}) y sus tiempos de aparición (T_{máx}) fueron los valores observados. Las áreas bajo las curvas de concentración de suero anti-EGFR-tiempo dentro de un intervalo de dosificación de 168 horas (ABC₁₆₈), se estimaron mediante la regla trapezoidal lineal. En el cálculo de los valores de ABC₁₆₈ las concentraciones en suero de anti-EGFR a las cero horas se estimaron mediante extrapolación inversa usando análisis de regresión lineal logarítmica, basándose en los dos primeros momentos de muestreo, sin embargo, si la concentración en suero no disminuyó durante este periodo, entonces la concentración en suero a las cero horas se consideró equivalente a la concentración en el primer momento de muestreo. Se estimaron las áreas bajo las curvas de concentración de anti-EGFR en suero-tiempo a tiempo infinito (ABC), mediante la siguiente expresión:

$$ABC = ABC_{168} + C_{final}/k$$

Donde C_{final} es la concentración en suero pronosticada en el último punto de muestra cuantificable y k es la constante de velocidad terminal.

Las constantes de velocidad terminal (k) se estimaron ajustando una regresión lineal de la concentración logarítmica frente al tiempo. Para que la estimación de k sea aceptada como fiable, se impusieron los siguientes criterios:

1. Los puntos de datos terminales aparentemente se distribuyeron aleatoriamente alrededor de una única línea recta (en inspección visual)
2. Se dispuso de un mínimo de 3 puntos de datos para la regresión

3. El coeficiente de regresión fue $\geq 0,95$ y la fracción de la varianza explicada fue $\geq 0,90$
4. El intervalo que incluye los puntos de datos elegidos para la regresión fue al menos dos veces mayor que la semivida en sí misma

Se calcularon las semividas terminales ($t_{1/2}$) como $\ln 2/k$. El aclaramiento sérico total (CL) se calculó como dosis / ABC. El volumen de distribución en estado estacionario (Vss) se calculó como Dose.AUMC/ABC². La acumulación (R) se evaluó como la relación entre la concentración mínima después de la última dosis (día 22) y la concentración mínima después de la primera dosis (día 1) es decir concentración en suero a las 672 horas/concentración en suero a las 168 horas (antes de la dosis el día 8).

Resultados y análisis

Se tomaron muestras de sangre hasta 120 horas después de la dosificación el día 1; antes de la dosis y 1 hora después de la dosis los días 8, 15 y 22, y a las 672 horas después de la dosificación el día 1 durante un estudio de toxicidad para evaluar la exposición sistémica de monos machos y hembras a anti-EGFR después de la administración intravenosa en embolada de anti-EGFR a niveles de dosis de 1,5, 4,5 y 12 mg/kg/ocasión los días 1, 8, 15 y 22 del estudio. Las concentraciones en suero de anti-EGFR en muestras tomadas hasta 168 horas después de la dosis se presentan en las tablas 27-29 y los perfiles medios de concentración en suero-tiempo se ilustran en las figuras 18 y 19.

Los parámetros farmacocinéticos de anti-EGFR se presentan en la tabla 50 y los valores de ABC₁₆₈ se resumen a continuación:

TABLA 24

Nivel de dosis (mg/kg/ocasión)	ABC ₁₆₈ (µg.h/ml)	
	Machos	Hembras
1,5	830,4	748,4
4,5	2537	2378
12	18310	15980

Los tiempos en los que se produjeron las concentraciones máximas en suero ($T_{\text{máx}}$) fueron en general 1 hora después de la dosis (el primer punto de muestra) pero se produjeron a las 4 horas después de la dosis (el segundo punto de muestra) en las hembras 2F462 (4,5 mg/kg) y 3F612 (12 mg/kg). Sin embargo, para ambas de estas hembras, las concentraciones a las 4 horas después de la dosis fueron muy similares a las concentraciones 1 hora después de la dosis y probablemente estuvieron dentro de la variabilidad del ensayo. Por lo tanto, es poco probable que el retraso aparente en $T_{\text{máx}}$ tenga alguna importancia.

Las concentraciones en suero de anti-EGFR antes de la siguiente dosis fueron cuantificables en todos los animales excepto el macho 2M461 el día 22 (nivel de dosis de 4,5 mg/kg/ocasión) por lo tanto, en general, los animales fueron expuestos continuamente a concentraciones cuantificables de anti-EGFR durante un intervalo de dosificación.

Las relaciones entre áreas bajo las curvas de concentración de anti-EGFR en suero-tiempo (ABC₁₆₈) y el nivel de dosis el día 1 se presentan a continuación:

TABLA 25

Nivel de dosis (mg/kg/ocasión)	Nivel de dosis relación	Relación ABC ₁₆₈	
		Machos	Hembras
1,5	1	1	1
4,5	3,0	3,1	3,2
12	8,0	22,0	21,4

La tasa y el grado de exposición sistémica de los monos a anti-EGFR, caracterizado por ABC₁₆₈, aumentó de manera aproximadamente proporcional con el aumento de la dosis en el intervalo de dosis de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasión, pero en más del aumento proporcional de la dosis en el intervalo de dosis de 4,5 a 12 mg/kg/ocasión el día 1. A la mayor dosis (12 mg/kg/ocasión) la ABC₁₆₈ era aproximadamente 2,8 veces mayor que la predicha por una relación lineal (figura 20).

El grado (ABC₁₆₈) de exposición sistémica de monos hembras a anti-EGFR fue en general similar a la exposición en monos machos.

Después de dosis intravenosas repetidas, las concentraciones en suero antes de la dosis de anti-EGFR fueron en general mayores que los valores después de una dosis única (figuras 21-22) e indicaron la acumulación de anti-EGFR en suero durante todo el periodo del estudio. Esta acumulación fue en general menor en hembras que en machos,

excepto en el mayor nivel de dosis. Las relaciones de las concentraciones mínimas (antes de la dosis) después de la última dosis el día 22 (672 horas después de la dosis del día 1) a la concentración mínima posterior a la primera dosis el día 1 se presentan en la tabla 26, a continuación:

5

TABLA 26

Nivel de dosis (mg/kg/ocasión)	R	
	Machos	Hembras
1,5	2,23	1,26
4,5	*	1,32
12	1,94	2,72
*No se pudo calcular ya que la concentración mínima fue BLQ		

10

Las constantes de velocidad terminal (k) y semividas terminales correspondientes ($t_{1/2}$), de anti-EGFR el día 1 se presentan en la tabla 30. La semivida terminal no se pudo estimar adecuadamente para todos los animales, pero donde se pudo estimar fue en el intervalo de 32,5 a 63,1 horas y pareció aumentar con la dosis en animales machos. La eliminación total en suero de anti-EGFR parecía ser independiente de la dosis en el intervalo de 1,5 - 4,5 mg/kg/ocasión, pero se redujo al mayor nivel de dosis en monos machos y hembras.

15

En conclusión, el grado de exposición sistémica de monos cynomolgus a anti-EGFR parecía caracterizarse por cinética no lineal (dependiente de la dosis) en el intervalo de dosis de 1,5 a 12 mg/kg/ocasión el día 1 del estudio de toxicidad intravenosa. Es probable que el aumento de la dosis de anti-EGFR por encima de 4,5 mg/kg/ocasión dé como resultado una exposición sistémica mayor de lo que se predeciría a partir de una relación lineal, lo cual es coherente con la posibilidad de un proceso de capacidad limitada para la eliminación de anti-EGFR.

20

Además, el estudio también proporcionó pruebas de que, en general, no hubo diferencias en la exposición sistémica de monos machos y hembras a anti-EGFR y que hubo acumulación después de la administración intravenosa repetida.

TABLA 27

Concentraciones en suero ($\mu\text{g/ml}$) de anti-EGFR en suero de mono después de la administración intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22		
Punto temporal	Número de animal	
	1M 623	1F 590
Día 1 1 hora	33,42	30,86
Día 1 4 horas	27,33	27,49
Día 1 12 horas	13,09	17,01
Día 1 24 horas	9,656	9,468
Día 1 72 horas	2,528	0,786
Día 1 120 horas	0,845	0,431
Día 8 antes de la dosis	0,538	0,287
Día 8 1 hora	30,02	19,07
Día 15 antes de la dosis	0,902	0,382
Día 15 1 hora	17,91	33,08
Día 22 antes de la dosis	1,065	0,595
Día 22 1 hora	19,41	33,00
Día 1 672 horas	1,202	0,362

TABLA 28

Concentraciones en suero ($\mu\text{g/ml}$) de anti-EGFR en suero de mono cynomolgus después de la administración intravenosa de 4,5 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22		
Punto temporal	Número de animal	
	2M 461	2F 462
Día 1 1 hora	32,45	29,51
Día 1 4 horas	32,39	29,57
Día 1 12 horas	28,05	25,88
Día 1 24 horas	23,70	23,78
Día 1 72 horas	14,03	14,38
Día 1 120 horas	10,42	8,137
Día 8 antes de la dosis	4,672	3,683
Día 8 1 hora	25,91	31,06
Día 15 antes de la dosis	5,752	5,450

25

(continuación)

Concentraciones en suero (µg/ml) de anti-EGFR en suero de mono cynomolgus después de la administración intravenosa de 4,5 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22		
Punto temporal	Número de animal	
	2M 461	2F 462
Día 15 1 hora	32,20	35,38
Día 22 antes de la dosis	BLQ	6,497
Día 22 1 hora	26,98	30,23
Día 1 672 horas	BLQ	4,845

TABLA 29

Concentraciones en suero (µg/ml) de anti-EGFR en suero de mono cynomolgus después de la administración intravenosa de 12 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22		
Punto temporal	Número de animal	
	1M 623	1F 590
Día 1 1 hora	262,2	168,0
Día 1 4 horas	223,3	174,5
Día 1 12 horas	164,9	165,7
Día 1 24 horas	141,7	146,0
Día 1 72 horas	99,54	86,64
Día 1 120 horas	86,64	69,08
Día 8 antes de la dosis	65,86	45,21
Día 8 1 hora	282,1	209,9
Día 15 antes de la dosis	98,43	71,21
Día 15 1 hora	385,9	231,4
Día 22 antes de la dosis	117,3	105,6
Día 22 1 hora	234,1	402,5
Día 1 672 horas	127,5	122,9

TABLA 30

Parámetros farmacocinéticos de anti-EGFR el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a monos cynomolgus									
Dosis (mg/kg)	Animal	C _{máx} (µg/ml)	T _{máx} (h)	ABC _t (µg.h/ml)	ABC (µg.h/ml)	CL (ml/h/kg)	V _{ss} (ml/kg)	k (1/h)	t _{1/2} (h)
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ³	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M461	32,45	1	2537	3005	1,488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1,663	133,2	0,0121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a

^a El valor es una estimación ya que los datos no cumplieron todos los criterios de aceptación definidos en el procesamiento de datos y deberían tratarse con precaución

5

Química de la sangre y hematología

Se tomaron muestras de sangre de la vena femoral de monos cynomolgus a los que se les había administrado una inyección de embolada intravenosa de GlucoMAB anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22. Se tomaron muestras de la extremidad no usada para la administración de la dosis, después de la privación de alimentos durante una noche (no fallecidos). Las muestras fueron examinadas en el pretratamiento, tres días después de la segunda dosis y al finalizar para determinar los siguientes parámetros, usando heparina de litio como anticoagulante:

- 15 Fosfatasa alcalina
- Alanina aminotransferasa
- Aspartato aminotransferasa
- Bilirrubina – total
- Urea
- 20 Creatinina
- Glucosa
- Colesterol - total
- Triglicéridos

- 5 Sodio
Potasio
Cloruro
Calcio
Fósforo
Proteína total
Electroforetograma de proteínas
Relación de albúmina/globulina

10 Se presentan datos de análisis de química de sangre de mono cynomolgus normal promedio en la tabla 31.

TABLA 31

Monos Cynomolgus (origen Mauricio)--Química de la sangre									
Parámetro	sexo	n	1 %	5 %	50 %	95 %	99 %	media	d.t.
ALP	M	949	837	1339	2147	3201	3899	2175,5	565,44
	F	881	946	1342	2144	3163	3740	2164,1	552,82
ALP-N	M	511	481	579	881	1453	1771	928,0	260,88
	F	499	427	546	846	1362	1694	879,5	240,24
ALT	M	1489	24	30	50	87	127	53,7	19,07
	F	1407	23	28	46	84	111	49,3	18,65
AST	M	1487	26	30	41	63	101	43,6	17,57
	F	1404	25	29	39	61	89	41,7	13,59
gGT	M	663	95	118	178	292	342	188,5	52,47
	F	641	81	102	153	232	266	158,6	38,38
LAP	M	207	18	26	40	79	217	45,1	28,25
	F	205	15	20	35	62	89	37,1	12,73
GLDH	M	159	8	10	17	35	126	20,1	16,46
	F	159	6	8	15	27	35	16,3	5,97
Bilirrubina	M	1494	1	1	3	8	11	3,8	2,04
	F	1413	1	2	4	8	11	4,1	2,07
LDH	M	99	160	596	808	1166	2029	838,3	218,75
	F	82	477	529	711	945	1021	715,0	117,07
CPK	M	331	68	83	179	713	1867	287,4	464,03
	F	335	57	77	184	925	2628	309,7	534,02
Indir Bili	M	59	1	2	4	10	11	4,2	2,15
	F	57	1	2	4	5	7	3,6	1,13
Bilirrubina directa	M	59	0	0	0	2	3	0,2	0,65
	F	57	0	0	0	1	3	0,2	0,52
Ácidos biliares	M	386	0,9	2,5	6,4	15,3	23,4	7,38	4,574
	F	380	1,4	3,0	7,0	12,9	17,8	7,41	3,474
Urea	M	1457	3,01	3,66	5,50	8,81	10,53	5,775	1,5710
	F	1379	2,77	3,42	5,33	8,56	9,90	5,559	1,5432
Creatinina	M	1458	55	59	71	87	94	71,6	8,67
	F	1383	56	60	72	87	85	72,7	8,36
Glucosa	M	1455	2,22	2,64	3,71	5,21	6,37	3,809	0,8135
	F	1380	2,23	2,65	3,63	5,18	6,34	3,735	0,7990
Colesterol	M	1455	1,69	1,93	2,68	3,55	3,96	2,706	1,4909
	F	1382	1,83	2,15	2,86	3,69	4,05	2,885	0,4813
Col HDL	M	45	1,26	1,34	1,79	2,23	2,59	1,784	0,3128
	F	45	1,09	1,31	1,82	2,43	2,55	1,844	0,3179
Col VLDL	M	45	0,00	0,00	0,00	0,03	0,11	0,004	0,0175
	F	45	0,00	0,00	0,00	0,12	0,19	0,012	0,0370
NEFA	M	132	0,10	0,28	0,98	1,84	2,44	0,994	0,4700
	F	132	0,14	0,22	1,06	1,90	2,18	1,070	0,4704
Triglicéridos	M	1453	0,26	0,32	0,53	0,86	1,30	0,561	0,2051
	F	1374	0,26	0,34	0,57	0,90	1,14	0,587	0,1778
Ph lípido	M	64	1,65	1,68	2,18	2,91	3,15	2,254	0,3769
	F	49	1,77	1,83	2,44	2,91	2,98	2,405	0,3267

(continuación)

Monos Cynomolgus (origen Mauricio)--Química de la sangre									
Ácido úrico	M	17	0	0	0	8	8	1,1	2,34
	F	17	0	0	0	1	1	0,4	0,51
Parámetro	sexo	n	1 %	5 %	50 %	95 %	99 %	media	d.t.
Na	M	1461	141	142	147	152	155	146,8	3,00
	F	1382	140	142	147	153	157	147,3	3,34
K	M	1460	3,2	3,4	4,0	5,0	5,6	4,08	0,511
	F	1382	3,2	3,3	4,0	4,9	5,4	4,01	0,484
Cl	M	1461	102	104	108	112	115	107,7	2,71
	F	1382	102	104	108	113	116	108,4	2,83
Ca	M	1462	2,31	2,39	2,56	2,76	2,87	2,568	0,1176
	F	1382	2,32	2,39	2,57	2,77	2,89	2,572	0,1168
Fos	M	1172	1,16	1,40	1,93	2,43	2,69	1,921	0,3126
	F	1098	1,17	1,37	1,84	2,35	2,60	1,844	0,2978
Col LDL	M	45	0,54	0,62	1,20	1,87	1,92	1,253	0,3694
	F	45	0,69	0,78	1,19	1,83	1,88	1,233	0,2906
Bicarbonato	M	288	7	10	17	22	25	16,5	3,51
	F	283	6	10	16	22	25	15,9	3,81
Proteína total	M	1455	71	74	80	87	90	80,2	4,06
	F	1381	71	74	81	89	92	81,2	4,32
Albúmina (Química)	M	346	34	38	43	46	49	42,6	2,67
	F	342	36	38	43	47	49	42,7	2,60
Albúmina	M	1089	33	36	45	51	54	44,3	4,46
	F	1019	34	37	45	52	55	44,7	4,58
Globulina	M	289	31	32	36	41	45	36,3	2,83
	F	285	30	32	37	43	48	37,5	3,59
Relación A/G (Química)	M	340	0,79	0,98	1,17	1,39	1,45	1,172	0,1215
	F	336	0,84	0,95	1,14	1,34	1,42	1,143	0,1274
Relación A/G	M	1068	0,68	0,80	1,26	1,65	1,82	1,252	0,2522
	F	998	0,67	0,79	1,26	1,66	1,81	1,247	0,2647
Globulina A1	M	1105	2	2	3	4	4	2,8	0,62
	F	1035	2	2	3	4	5	2,8	0,64
Globulina A2	M	1105	3	3	4	6	7	4,2	0,92
	F	1035	3	3	4	6	7	4,2	1,01
beta globulina	M	1105	12	13	16	22	24	16,6	2,63
	F	1035	12	13	16	22	25	16,8	2,85
gamma globulina	M	1105	8	9	12	17	18	12,6	2,26
	F	1035	8	9	13	17	20	13,1	2,52
Aldolasa	M	96	9	14	21	38	57	22,0	7,48
	F	97	10	13	19	48	84	21,9	11,91
CHE en plasma	M	17	4159	4159	5745	9160	9160	5919,8	1181,68
	F	17	3371	3371	5869	8367	8367	5689,2	1512,98
CRP	M	57	0,000	0,000	0,002	0,013	0,026	0,0032	0,00414
	F	56	0,000	0,000	0,002	0,004	0,007	0,0017	0,00167
T3	M	40	1,90	1,90	2,50	3,38	3,58	2,537	0,4011
	F	40	1,71	1,96	2,59	3,06	4,02	2,631	0,3799
T4	M	40	35	42	59	86	92	59,7	11,84
	F	40	38	40	56	81	107	58,6	14,37

Se tomaron muestras para análisis hematológico de sangre periférica de la vena femoral de mono cynomolgus a los que se les había administrado una inyección de embolada intravenosa de GlucoMAB anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22. Se tomaron muestras de la extremidad no usada para la administración de la dosis, después de la privación de alimentos durante una noche (no fallecidos). Las muestras fueron examinadas en el pretratamiento, tres días después de la segunda dosis y al finalizar para determinar los siguientes parámetros:

1) Uso de EDTA como anticoagulante -

	Hematocrito	Concentración de hemoglobina
	Recuento de eritrocitos	
	Reticulocitos	
	Hemoglobina celular media	
5	Concentración media de hemoglobina celular	
	Volumen celular medio	
	Recuento total de leucocitos	
	Recuento diferencial de leucocitos	
	Recuento plaquetario	
10	Anomalías de la morfología de la sangre	
	Anisocitosis	
	Microcitosis	
	Macrocitosis	
15	Hipocromasia	
	Hipercromasia	

2) Uso de citrato como anticoagulante -

20	Tiempo de protrombina
	Tiempo de tromboplastina parcial activada

Se presentan datos de análisis de hematología de mono cynomolgus normal promedio en la tabla 32.

25 TABLA 32

Monos cynomolgus (origen Mauricio)--Hematología									
Parámetro	sexo	n	1 %	5 %	50 %	95 %	99 %	media	d.t.
HCT	M	1495	0,385	0,401	0,443	0,488	0,512	0,4435	0,02776
	F	1426	0,376	0,399	0,442	0,489	0,508	0,4424	0,02947
Hemoglobina	M	1495	11,4	12,1	13,3	14,5	15,1	13,31	0,769
	F	1426	11,2	11,9	13,2	14,5	15,1	13,21	0,855
RBC	M	1495	5,67	6,04	6,74	7,51	7,92	6,744	0,4792
	F	1426	5,58	5,96	6,71	7,45	7,73	6,707	0,4894
Retic (1) %	M	20	0,1	0,1	0,4	1,8	1,8	0,48	0,438
	F	20	0,1	0,1	0,3	0,9	0,9	0,42	0,268
Retic (2) %	M	1476	0,21	0,27	0,49	0,95	1,58	0,551	0,3804
	F	1408	0,22	0,28	0,54	1,06	1,60	0,595	0,2934
MCH	M	1495	17,0	17,8	19,8	21,6	22,5	19,80	1,432
	F	1425	16,7	17,7	19,7	21,8	22,6	19,74	1,216
MCHC	M	1495	27,2	28,2	30,1	31,9	32,7	30,06	1,801
	F	1425	27,0	27,9	29,9	31,8	32,6	29,88	1,174
MCV	M	1495	57,9	60,5	65,8	71,4	73,5	65,88	3,278
	F	1425	58,3	60,4	66,0	71,7	74,5	66,07	3,353
ADE	M	280	12,6	12,9	14,4	16,1	16,7	14,40	0,934
	F	285	12,4	12,8	14,2	15,7	16,3	14,21	0,879
WBC	M	1507	5,61	6,62	10,52	18,59	30,24	11,372	4,7766
	F	1432	5,39	6,58	10,62	19,55	28,79	11,637	4,7307
Neutrófilos	M	1507	0,88	1,28	3,49	10,24	16,27	4,319	3,1741
	F	1432	1,06	1,62	4,45	12,27	17,41	5,392	3,4777
Linfocitos	M	1507	2,19	2,96	5,53	9,81	15,91	6,021	3,4066
	F	1432	2,16	2,67	4,86	8,55	13,95	5,265	2,9997
Eosinófilos	M	1507	0,00	0,01	0,17	0,81	1,49	0,254	0,3127
	F	1432	0,00	0,01	0,14	0,73	1,55	0,232	0,3188
Basófilos	M	1507	0,01	0,02	0,04	0,10	0,25	0,053	0,0627
	F	1432	0,01	0,02	0,04	0,10	0,21	0,051	0,0540
Monocitos	M	1507	0,17	0,25	0,51	1,03	1,45	0,562	0,2575
	F	1432	0,16	0,23	0,49	1,04	1,56	0,547	0,2705
Células grandes sin teñir	M	1507	0,04	0,06	0,14	0,32	0,60	0,163	0,1330
	F	1432	0,04	0,06	0,13	0,29	0,50	0,148	0,1147

(continuación)

Monos cynomolgus (origen Mauricio)--Hematología									
Parámetro	sexo	n	1 %	5 %	50 %	95 %	99 %	media	d.t.
Plaquetas	M	1495	158	238	359	497	575	362,1	81,69
	F	1426	181	234	359	496	560	360,5	80,04
TP	M	1481	9,6	9,9	10,8	12,0	14,8	10,88	0,877
	F	1406	9,7	10,0	10,8	12,1	14,1	10,93	0,847
TTP act	M	1483	23,1	24,4	29,1	37,9	50,1	30,06	5,267
	F	1408	22,8	24,4	29,4	37,4	47,2	30,19	5,185
Fibrinógeno	M	265	1,61	1,86	2,61	3,51	4,88	2,664	0,6178
	F	252	1,58	1,84	2,43	3,27	3,89	2,487	0,4545

Los valores individuales acumulativos de bioquímica para los monos se presentan en las tablas 33a-h, a continuación:

TABLA 33a

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	ALP U/l	ALT U/l	AST U/l	Bili µmol/l	Urea mmol/l	Creat µmol/l	Gluc mmol/l	Col mmol/l
615	1M	TP	740	36	39	3	5,35	69	3,65	2,34
		D11	743	35	33	3	5,43	73	3,66	2,00
		TERM	597	29	31	2	5,16	76	3,74	2,30
465	2M	TP	647	44	33	3	5,73	70	4,69	2,50
		PD	775	47	36	2	3,60	73	4,50	2,72
		D11	655	74	46	5	4,34	74	3,35	2,64
		TERM	768	48	38	3	4,42	73	3,67	2,54
639	2M	PD	741	29	26	2	4,41	87	3,31	3,22
		D11	629	29	28	3	3,87	99	2,64	2,99
		TERM	599	34	22	2	3,62	83	3,46	2,45
613	3M	TP	1003	37	31	5	3,80	90	5,72	2,61
		D11	793	36	29	4	4,45	80	3,28	2,70
		TERM	931	34	32	5	5,16	83	2,78	2,46
631	4M	PD	590	34	37	2	3,43	83	3,92	2,49
		D11	508	38	36	3	3,33	82	3,38	2,30
		TERM	578	25	25	2	4,00	89	3,70	2,26

TABLA 33b

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	Trig mmol/l	Na mmol/l	K mmol/l	Cl mmol/l	Ca mmol/l	Fos mmol/l	Prot total g/l	Alb g/l
615	1M	TP	0,24	146	4,7	108	2,54	1,77	91	35
		D11	0,39	145	3,9	106	2,55	1,85	94	41
		TERM	0,34	147	4,2	107	2,47	1,63	87	38
465	2M	TP	0,74	147	3,7	108	2,71	1,32	81	37
		PD	0,93	147	4,1	109	2,70	1,54	84	46
		D11	0,66	151	3,9	111	2,70	1,98	83	39
		TERM	0,51	146	3,6	105	2,67	1,85	80	40
639	2M	PD	0,27	146	4,2	107	2,68	1,85	84	44
		D11	0,32	150	4,8	108	2,81	2,07	85	42
		TERM	0,38	146	4,5	107	2,70	2,03	74	39
613	3M	TP	0,47	151	4,5	106	2,75	1,85	83	41
		D11	0,44	147	4,2	106	2,69	1,76	80	45
		TERM	0,69	147	4,3	106	2,63	1,62	76	40
631	4M	PD	0,45	149	4,2	107	2,67	2,00	87	46
		D11	0,77	151	5,0	112	2,68	2,00	84	39
		TERM	0,64	150	4,7	107	2,77	1,89	86	46

TABLA 33c

Animal Número	Grupo/Sexo	ocn. Código	a1 g/l	a2 g/l	Beta g/l	Gamma g/l	A/G Relación	% Alb	% a1	% a2
615	1M	TP	3	5	25	23	0,63	39,0	3,4	5,1
		D11	3	4	22	25	0,77	43,1	3,0	4,5
		TERM	3	4	21	21	0,78	43,5	3,3	4,9
465	2M	TP	4	5	22	13	0,84	45,7	4,5	5,9
		PD	3	4	18	12	1,21	54,9	3,6	5,0
		D11	4	5	20	15	0,89	46,7	4,9	6,4
		TERM	3	5	20	11	1,00	50,5	4,0	5,8
639	2M	PD	3	5	17	14	1,10	52,9	3,5	5,8
		D11	3	6	18	16	0,98	49,1	4,1	6,6
		TERM	3	4	17	11	1,11	52,2	3,7	6,0
613	3M	TP	4	4	20	14	0,98	49,5	5,0	4,7
		D11	3	3	17	13	1,29	55,8	3,7	3,7
		TERM	3	3	15	14	1,11	53,0	4,6	3,9
631	4M	PD	3	4	18	16	1,12	53,3	3,6	4,3
		D11	4	4	19	18	0,87	46,4	4,4	4,4
		TERM	3	4	19	15	1,15	53,1	3,4	4,3

TABLA 33d

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	% beta	% gamma
615	1M	TP	27,3	25,3
		D11	23,2	26,2
		TERM	24,4	23,9
465	2M	TP	27,4	16,6
		PD	21,8	14,7
		D11	24,0	17,9
		TERM	25,5	14,2
639	2M	PD	20,7	17,0
		D11	21,5	18,7
		TERM	23,2	14,9
613	3M	TP	24,5	16,3
		D11	21,0	15,8
		TERM	20,0	18,5
631	4M	PD	20,7	18,0
		D11	22,8	22,0
		TERM	22,1	17,1

TABLA 33e

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	ALP U/l	ALT U/l	AST U/l	Bili µmol/l	Urea mmol/l	Creat µmol/l	Gluc mmol/l	Col mmol/l
614	1F	TP	687	71	50	3	4,92	60	4,45	2,77
		D11	576	63	44	2	5,22	63	4,32	2,73
		TERM	517	59	41	3	4,78	70	3,98	2,83
652	1F	TP	598	43	25	3	7,26	69	3,26	2,42
		D11	540	40	28	3	6,94	78	3,28	2,46
		TERM	511	40	27	4	6,78	80	3,46	2,38
624	2F	PD	533	56	35	3	3,85	73	3,91	2,31
		D11	410	40	34	13	4,18	78	2,72	2,56
		TERM	432	41	25	3	3,70	78	3,30	2,16
632	3F	TP	559	35	34	5	5,44	80	3,08	2,47
		D11	510	37	31	5	4,36	85	3,89	2,61
		TERM	428	37	34	5	5,32	88	3,10	2,63
640	4F	PD	343	23	32	4	4,09	65	3,46	1,24
		D11	292	25	28	4	4,12	63	2,69	1,13
		TERM	266	22	27	2	4,55	69	3,69	1,00

TABLA 33f

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	Trig mmol/l	Na mmol/l	K mmol/l	Cl mmol/l	Ca mmol/l	Fos mmol/l	Prot total g/l	Alb g/l
614	1F	TP	0,37	148	4,6	109	2,69	2,03	80	39
		D11	0,33	147	4,1	109	2,72	2,08	82	43
		TERM	0,54	148	3,6	108	2,59	1,84	80	41
652	1F	TP	0,57	147	4,3	105	2,58	1,52	78	35
		D11	0,43	149	4,7	108	2,74	1,80	88	43
		TERM	0,59	149	4,4	108	2,59	1,51	80	40
624	2F	PD	0,60	145	4,1	108	2,54	1,50	77	40
		D11	0,51	148	4,0	111	2,58	1,42	77	39
		TERM	0,43	146	3,9	108	2,56	1,46	76	44
632	3F	TP	0,31	151	4,5	109	2,48	1,72	76	34
		D11	0,34	149	4,6	109	2,58	1,85	80	39
		TERM	0,49	150	4,5	111	2,55	1,47	78	38
640	4F	PD	0,36	144	4,8	111	2,31	1,45	68	29
		D11	0,31	145	4,3	112	2,24	1,53	63	25
		TERM	0,27	144	4,7	108	2,20	1,33	60	25

TABLA 33g

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	a1 g/l	a2 g/l	Beta g/l	Gamma g/l	Relación A/G	% Alb	% a1	% a2
614	1F	TP	4	5	20	13	0,95	49,2	4,4	5,9
		D11	3	4	19	13	1,10	52,7	3,3	4,9
		TERM	3	4	18	13	1,05	51,7	3,8	5,2
652	1F	TP	4	5	19	15	0,81	45,1	4,6	5,9
		D11	3	5	20	17	0,96	49,3	3,4	5,5
		TERM	4	5	18	14	1,00	49,4	4,7	6,2
624	2F	PD	3	4	16	14	1,08	52,2	4,1	5,4
		D11	4	4	17	14	1,03	50,1	4,9	5,5
		TERM	3	4	15	10	1,38	58,5	3,4	5,3
632	3F	TP	4	4	19	15	0,81	44,7	5,1	5,0
		D11	3	4	17	16	0,95	49,2	4,2	4,7
		TERM	4	4	17	15	0,95	49,2	4,6	4,9
640	4F	PD	4	4	17	15	0,74	42,2	5,7	5,6
		D11	4	3	17	13	0,66	40,1	6,6	5,5
		TERM	4	3	16	13	0,71	41,4	6,4	4,6

TABLA 33h

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	% beta	% gamma
614	1F	TP	24,8	15,7
		D11	23,1	16,0
		TERM	22,8	16,5
652	1F	TP	24,7	19,7
		D11	22,3	19,4
		TERM	22,1	17,6
624	2F	PD	20,7	17,6
		D11	21,6	18,0
		TERM	19,9	12,9
632	3F	TP	24,9	20,2
		D11	21,5	20,4
		TERM	21,8	19,5
640	4F	PD	24,9	21,6
		D11	26,9	20,9
		TERM	26,5	21,1

5 Los valores individuales acumulativos de hematología para los monos se presentan en la tabla 34a-1, a continuación:

TABLA 34a

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	Hct L/l	Hb g/dl	RBC $\times 10^{12}/l$	Retic %	MCH pg	MCHC g/dl	MCV fL
615	1M	TP	0,389	12,4	5,94	0,38	20,9	31,9	65,5
		D11	0,366	11,5	5,59	0,76	20,6	31,4	65,5
		TERM	0,381	11,8	5,91	0,25	20,0	31,0	64,5
465	2M	TP	0,439	13,2	6,76	0,56	19,5	30,1	65,0
		PTR							
		PD	0,460	13,7	7,22	0,50	19,0	29,9	63,8
		D11	0,391	11,7	6,11	1,62	19,1	29,9	64,0
		TERM	0,441	13,6	6,93	0,65	19,7	30,9	63,7

ES 2 755 976 T3

(continuación)

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	Hct L/l	Hb g/dl	RBC x10 ¹² /l	Retic %	MCH pg	MCHC g/dl	MCV fL
639	2M	PD	0,419	12,7	6,23	0,51	20,4	30,3	67,2
		D11	0,400	11,7	5,99	0,52	19,6	29,3	66,7
		TERM	0,388	12,2	5,70	1,14	21,4	31,4	68,1
613	3M	TP	0,461	14,1	6,79	0,48	20,7	30,5	67,8
		PTR							
		D11	0,396	12,7	6,05	0,92	21,0	32,1	65,4
		TERM	0,410	12,9	6,23	0,49	20,8	31,5	65,9

TABLA 34b

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	WBC x10 ⁹ /l	N x10 ⁹ /l	L x10 ⁹ /l	E x10 ⁹ /l	Basófilo X10-9/l	Monocito X10-9/l	LUC x10 ⁹ /l	Plt x10 ⁹ /l
615	1M	TP	7,57	3,06	3,68	0,06	0,03	0,53	0,20	236
		D11	7,56	2,78	4,35	0,06	0,02	0,21	0,13	284
	2M	TERM	7,93	3,77	3,52	0,06	0,02	0,49	0,07	254
		TP	14,19	1,78	10,37	1,24	0,05	0,55	0,20	302
465		PTR	13,69	3,69	8,25	0,93	0,04	0,47	0,29	
		PD	13,36	1,55	9,95	1,01	0,04	0,58	0,25	325
		D11	12,26	4,70	5,63	1,27	0,04	0,51	0,11	403
		TERM	15,45	1,54	11,57	1,65	0,07	0,42	0,20	356
639	2M	PD	10,02	5,21	3,42	0,90	0,01	0,39	0,10	306
		D11	8,26	4,06	2,47	1,17	0,01	0,45	0,10	371
		TERM	8,70	2,55	4,20	1,04	0,02	0,80	0,09	253
613	3M									
		TP	20,21	12,99	6,45	0,02	0,04	0,50	0,21	438
		PTR	16,85	8,87	6,90	0,08	0,06	0,67	0,26	
		D11	10,85	6,11	4,15	0,03	0,02	0,41	0,12	441
		TERM	23,26	17,70	4,27	0,05	0,04	1,11	0,08	434

TABLA 34c

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	TP sec	TTPA sec
615	1M	TP	11,3	37,3
		D11	10,3	32,7
		TERM	11,3	33,3
465	2M	TP	10,0	33,9
		PTR		
		PD	9,9	26,1
		D11	10,0	31,6
		TERM	10,2	29,4
639	2M	PD	10,6	22,6
		D11	10,5	26,3
		TERM	10,3	28,9
613	3M	TP	10,3	35,5
		PTR		
		D11	11,4	26,7
		TERM	10,3	30,8

TABLA 34d

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	Anisocitosis	Microcitosis	Macrocitosis	Hipocromasia	Hiperchromasia
615	1M	TP	-	-	-	-	+
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	+
465	2M	TP	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-
		PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
639	2M	TERM	-	-	-	-	-
		PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
613	3M	TERM	-	-	-	-	-
		TP	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	+
		TERM	-	-	-	-	-

TABLA 34e

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	Hct L/l	Hb g/dl	RBC x10 ¹² /l	Retic %	MCH pg	MCHC g/dl	MCV fL
631	4M	PD	0,460	13,6	7,11	0,43	19,1	29,5	64,6
		D11	0,395	11,9	6,36	0,45	18,7	30,2	62,1
		TERM	0,449	13,7	6,97	0,30	19,6	30,5	64,4
614	1F	TP	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR							
		D11	0,404	13,1	6,33	0,57	20,6	32,3	63,8
652	1F	TERM	0,424	13,0	6,59	0,68	19,7	30,7	64,3
		TP	0,390	11,3	5,72	1,15	19,8	29,1	68,2
		D11	0,374	11,9	5,55	1,06	21,4	31,7	67,4
624	2F	TERM	0,384	11,5	5,71	0,58	20,2	30,0	67,2
		PD	0,407	11,8	7,14	0,73	16,6	29,0	57,1
		D11	0,377	10,8	6,69	0,48	16,1	28,6	56,3
		TERM	0,401	11,7	6,99	1,07	16,7	29,1	57,4

TABLA 34f

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	WBCx10 ⁹ /l	N x10 ⁹ /l	L x10 ⁹ /l	E x10 ⁹ /l	Basófilo	Monocito	LUC x10 ⁹ /l	Pltx10 ⁹ /l
631	4M	PD	10,53	2,82	6,36	0,62	0,02	0,58	0,13	378
		D11	7,97	2,86	3,81	0,61	0,01	0,53	0,16	424
		TERM	8,08	1,73	5,04	0,63	0,02	0,60	0,05	384
		TP	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
614	1F	PTR	11,32	3,47	6,36	0,17	0,05	0,96	0,31	
		D11	9,70	4,74	3,73	0,09	0,02	0,84	0,28	429
		TERM	9,64	3,65	5,09	0,13	0,01	0,62	0,13	414
652	1F	TP	10,66	3,21	6,05	0,42	0,03	0,80	0,15	373
		D11	12,01	5,53	5,20	0,34	0,02	0,78	0,13	380
		TERM	11,88	7,59	3,24	0,35	0,02	0,61	0,08	338
624	2F	PD	9,06	3,10	5,02	0,41	0,02	0,33	0,18	362
		D11	7,82	5,14	2,06	0,14	0,02	0,34	0,13	353
		TERM	11,69	4,33	5,46	0,96	0,02	0,76	0,16	426

TABLA 34 g

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	TP sec	TTPA sec
631	4M	PD	10,9	29,3
		D11	11,3	27,9
		TERM	10,8	32,1
614	1F	TP	CTD	CTD
		PTR		
		D11	10,2	32,1
		TERM	10,5	29,3
652	1F	TP	10,2	33,0
		D11	9,6	27,9
		TERM	10,3	30,3
624	2F	PD	10,6	27,1
		D11	10,6	29,7
		TERM	10,8	33,3

TABLA 34h

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocr.	Anisocitosis	Microcitosis	Macrocitosis	Hipocromasia	Hipercromasia
631	4M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
614	1F	TP	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR					
		D11	-	-	-	-	-
652	1F	TERM	-	-	-	-	-
		TP	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
624	2F	PD	-	+	-	-	-
		D11	-	+	-	-	-
		TERM	+	+	-	-	-

TABLA 34i

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	Hct L/l	Hb g/dl	RBC x10 ¹² /l	Retic %	MCH pg	MCHC g/dl	MCV fL
632	3F	TP	0,416	12,4	6,36	0,83	19,6	29,9	65,4
		PTR	0,410	12,2	6,29	0,64	19,5	29,8	65,3
		D11	0,392	12,2	6,19	0,73	19,7	31,0	63,4
		TERM	0,412	12,3	6,46	0,55	19,1	29,9	63,8
640	4F	PD	0,398	11,8	5,81	0,95	20,3	29,7	68,5
		D11	0,369	11,0	5,30	1,17	20,7	29,8	69,6
		TERM	0,401	11,9	5,58	0,83	21,3	29,6	71,9

TABLA 34j

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	WBC x10 ⁹ /l	Nx10 ⁹ /l	L x10 ⁹ /l	E x10 ⁹ /l	Basófilo	Monocito	LUC x10 ⁹ /l	Plt x10 ⁹ /l
632	3F	TP	18,12	10,58	5,61	1,07	0,04	0,61	0,21	335
		PTR	15,16	5,99	7,24	0,95	0,03	0,63	0,31	308
		D11	10,23	4,69	4,15	0,66	0,01	0,48	0,23	348
		TERM	13,04	6,89	4,62	0,44	0,03	0,93	0,13	321
640	4F	PD	12,49	8,29	2,91	0,46	0,02	0,64	0,17	567
		D11	13,71	10,31	2,18	0,34	0,01	0,74	0,12	578
		TERM	11,49	5,41	4,18	0,63	0,03	1,12	0,12	555

TABLA 34k

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	TP sec	TTPA sec
632	3F	TP	10,6	47,8
		PTR	10,6	44,7
		D11	10,2	33,1
		TERM	10,6	37,2
640	4F	PD	12,0	25,8
		D11	12,4	28,0
		TERM	12,8	30,1

TABLA 34I

Número de animal	Grupo/Sexo	Código de ocn.	Anisocitosis	Microcitosis	Macrocitosis	Hipocromasia	Hipercromasia
632	3F	TP	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
640	4F	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

Patología microscópica--Hallazgos relacionados con el tratamiento

- 5 Se notificó pericolangitis (inflamación del tejido conjuntivo alrededor del conducto biliar) en el mono hembra dosificado a 12 mg/kg/día, pero no en otros monos hembras o machos. Este hallazgo puede estar relacionado con el tratamiento con Gluco-mAb (Anti-EGFR), pero con un número tan pequeño de animales, la significación es incierta. Todos los demás hallazgos se consideraron menores y sin importancia toxicológica.

Macropatología e histopatología

- 10 El resumen de histopatología para todos los animales ensayados se expone en la tabla 35, a continuación:

TABLA 35

Histopatología - distribución grupal y gravedad de los hallazgos para todos los animales								
Grupo		1		2		3		
Compuesto		-GLUCO-MAB (ANTI-EGFR)-						
Dosificación		1,5		4,5		12		
		Número de animales afectados						
	Sexo	Macho			Hembra			
	Grupo	1	2	3	1	2	3	
Órgano/tejido examinado	Número	1	1	1	1	1	1	
Colon	N.º examinado	1	1	1	1	1	1	
Corazón	N.º examinado	1	1	1	1	1	1	
Riñones	N.º examinado	1	1	1	1	1	1	
Infiltración linfocítica cortical	Mínima	1	1	0	0	1	1	
	Ligera	0	0	0	1	0	[?]	
	Total	1	1	0	1	1	1	
Cefálica izquierda	N.º examinado	0	0	0	0	0	0	
Izquierda safena	N.º examinado	1	1	1	1	1	1	
--Hiperplasia epidérmica	Mínima	0	0	0	1	0	0	
	Total	0	0	0	1	0	0	
Hígado --Focos de células inflamatorias	N.º examinado	1	1	1	1	1	1	
	Mínimo	1	1	1	1	1	1	
	Total	1	1	1	1	1	1	
--Proliferación del conducto biliar	Mínima	0	0	0	0	0	1	
	Total	0	0	0	0	0	1	
--Vacuolación de hepatocitos - Hendidura media	Mínima	0	1	0	0	0	0	
	Total	0	1	0	0	0	0	
--Pericolangitis	Mínima	0	0	0	0	0	1	
	Total	0	0	0	0	0	1	
		Número de animales afectados						
	Sexo	Macho			Hembra			
	Grupo	1	2	3	1	2	3	
Pulmones y bronquios	N.º examinado	1	1	1	1	1	1	
--Bronquios/Bronquiolos - Células inflamatorias mucosas/submucosas	Ligeras	1	0	0	0	0	0	
	Total	1	0	0	0	0	0	
--Macrófagos alveolares	Mínimos	0	1	0	0	0	1	
	Total	0	1	0	0	0	1	
--Células inflamatorias/linfoides perivasculares	Mínimas	0	0	1	0	0	1	
	Total	0	0	1	0	0	1	
--Agregados linfoides	Mínimos	0	0	1	0	0	0	
	Total	0	0	1	0	0	0	

(continuación)

	Sexo	Número de animales afectados					
		Macho			Hembra		
		1	2	3	1	2	3
Esófago	N.º examinado	1	1	1	1	1	1
--Agregados linfoides	Mínimos	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	1
Órgano/tejido examinado	Número	1	1	1	1	1	1
Ovarios	N.º examinado	0	0	0	1	1	1
--Quiste folicular (S)	Presente	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
--Cuerpos lúteos prominentes	Presentes	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
Páncreas	N.º examinado	1	1	1	1	1	1
--Atrofia acinar	Mínima	0	0	1	1	0	1
	Total	0	0	1	1	0	1
--Agregados linfoides	Mínimos	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
Cefálica derecha	N.º examinado	0	0	0	0	0	0
Derecha safena	N.º examinado	0	0	0	0	0	0
Piel (protocolo)	N.º examinado	1	1	1	1	1	1
--Hiperplasia epidérmica	Mínima	0	0	0	0	0	1
	Moderada	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	1
	Sexo	Número de animales afectados					
		Macho			Hembra		
		1	2	3	1	2	3
Médula espinal	N.º examinado	1	1	1	1	1	1
--Hemorragia	Mínima	0	0	1	1	1	1
	Ligera	0	1	0	0	0	0
	Total	0	1	1	1	1	1
Bazo	N.º examinado	1	1	1	1	1	1
Esternón y médula ósea	N.º examinado	0	0	0	0	0	0
Estómago	N.º examinado	1	1	1	1	1	1
Testículos	N.º examinado	1	1	1	0	0	0
--Inmadurez	Presente	1	1	1	0	0	0
	Total	1	1	1	0	0	0
Timo	N.º examinado	1	1	1	1	1	1
--Quiste (S)	Presente	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
--Involución/atrofia	Mínima	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
Órgano/tejido examinado	Número	1	1	1	1	1	1
Vejiga urinaria	N.º examinado	1	1	1	1	1	1
Cuello uterino	N.º examinado	0	0	0	1	1	1
--Mucificación epitelial	Presente	0	0	0	1	1	1

(continuación)

		Número de animales afectados					
	Sexo	Macho			Hembra		
	Grupo	1	2	3	1	2	3
	Total	0	0	0	1	1	1
Útero	N.º examinado	0	0	0	1	1	1
--Congestión	Mínima	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
Ciego	N.º examinado	1	0	0	1	0	0
--Tejido adiposo submucoso prominente	Mínimo	1	0	0	1	0	0
	Total	1	0	0	1	0	0
Trompa de Falopio	N.º examinado	0	0	0	1	1	1
		Número de animales afectados					
	Sexo	Macho			Hembra		
	Grupo	1	2	3	1	2	3
Ln mesentérico	N.º examinado	0	0	0	1	0	0
--Aumento de macrófagos pigmentados	Ligero	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0

Hallazgos individuales para todos los animales

Las observaciones de patología para animales individuales se exponen en la tabla 36, a continuación:

5

TABLA 36

Macropatología e histopatología - hallazgos individuales para todos los animales			
Grupo	1	2	3
Compuesto	-GLUCO-MAB (ANTI-EGFR)-		
Dosificación	1,5	4,5	12
Observaciones de patología			
Sexo	Macho	Grupo de dosis	1
N.º de animal	0623	Semana de estudio del sacrificio	11
Peso corporal terminal	2715,0 gramos	Día de estudio del sacrificio	77
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
Ciego:		Ciego:	
-Área elevada (S); Aspecto mucoso, múltiples, hasta 3 mm.		-Tejido adiposo submucoso prominente, -Mínimo, Focal	
Colon:		Colon:	
-Área elevada (S); Aspecto mucoso, múltiples, hasta 2 mm.		Sin lesión significativa	
		Riñones:	
		-Infiltración linfocítica cortical, -Mínima	
Hígado:		Hígado:	
-Área pálida de hendidura media (S); Una, subcapsular, 3 mm.		-Focos de células inflamatorias, -Mínimos	
		Pulmones y bronquios:	
		-Bronquios/Bronquiolos Células inflamatorias de la mucosa/submucosa, -Ligero	
Estómago:		Estómago:	
-Área elevada del cuerpo (S); Mucosa, Una, Cerca del antro, 3 mm.		>Sin lesión significativa	
		Testículos:	
		-Inmadurez, -Presente	

(continuación)

NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
Sexo	Macho	Grupo de dosis	2
N.º de animal	0461	Semana de estudio del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2573,0 gramos	Día de estudio del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Riñones	
		-Infiltración linfocítica cortical, -Mínima	
Hígado:		Hígado	
-Área pálida de hendidura media (S); Una, subcapsular, 4 mm.		-Focos de células inflamatorias, -Mínimos -Vacuolación de hepatocitos -Hendidura media, -Mínima	
Pulmones y bronquios:		Pulmones y bronquios:	
-Colapso incompleto; Lóbulos derechos.		-Macrófagos alveolares, -Mínimos	
		Médula espinal:	
		-Hemorragia, -Ligera, Multifocal	
		Testículos:	
		-Inmadurez, -Presente	
Sexo	Macho	Grupo de dosis	3
N.º de animal	0463	Semana de estudio del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2919,0 gramos	Día de estudio del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Hígado:	
		-Focos de células inflamatorias, -Mínimos	
		Pulmones y bronquios:	
		-Células inflamatorias/linfoides perivasculares, -Mínimas - Agregados linfoides, -Mínimos, Focal	
		Páncreas:	
		-Atrofia acinar, -Mínima, Focal	
		Médula espinal:	
		-Hemorragia, -Mínima	
		Testículos:	
		-Inmadurez, -Presente	
El animal no tiene observaciones generales registradas			
Sexo	Hembra	Grupo de dosis	1
N.º de animal	0590	Semana de estudio del sacrificio	11
Peso corporal terminal	3176,0 gramos	Día de estudio del sacrificio	77
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
Ciego:		Ciego:	
-Área elevada (S); Aspecto mucoso, múltiples, hasta 2 mm.		-Tejido adiposo submucoso prominente, -Mínimo, Multifocal	
Colon:		Colon:	
-Área elevada (S); Aspecto mucoso, múltiples, hasta 2 mm.		>Sin lesión significativa	
		Riñones:	
		-Infiltración linfocítica cortical, -Ligera, Focal	
		Izquierda safena:	
		-Hiperplasia epidérmica, -Mínima	
Hígado:		Hígado:	
-Área pálida de hendidura media (S); Una, subcapsular, 3 mm.		-Focos de células inflamatorias, -Mínimos	
Ln Mesentérico:		Ln Mesentérico:	
-Congestionado, Mínimo		-Aumento de los macrófagos pigmentados, -Ligero	
Ovarios:		Ovarios:	
-Quiste (S); Izquierdo, Uno, Lleno de líquido transparente, 4 mm.		-Quiste folicular (S), -Presente	

(continuación)

NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Páncreas:	
		-Atrofia Acinar, -Mínima -Agregados linfoides, -Mínimos	
		Piel (Protocolo):	
		-Hiperplasia epidérmica, - Moderada	
		Médula espinal:	
		-Hemorragia, -Mínima	
Bazo:		Bazo:	
-Capsula engrosada; Área, difusa.		>Sin lesión significativa	
		Cuello uterino:	
		-Mucificación epitelial, -Presente	
Sexo	Hembra	Grupo de dosis	2
N.º de animal	0462	Semana de estudio del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2910,0 gramos	Día de estudio del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Riñones:	
		-Infiltración linfocítica cortical, -Mínima, Focal	
		Hígado:	
		-Focos de células inflamatorias, -Mínimos	
Pulmones y bronquios:		Pulmones y bronquios:	
-Colapso incompleto; Lóbulos izquierdos.		Sin lesión significativa	
Ovarios:		Ovarios:	
-Área elevada (S); Una en cada uno, izquierdo, 3 mm; derecho, 2 mm. (Folículos)		-Cuerpos lúteos prominentes, -Presente	
		Médula espinal:	
		-Hemorragia, -Mínima	
Timo:		Timo:	
-Pequeño; 1,066 g.		-Quiste (S), -Presente	
		-Involución/atrofia, -Mínima	
		Cuello uterino:	
		-Mucificación epitelial, -Presente	
Útero:		Útero:	
-Congestionado, Mínimo		-Congestión, -Mínima	
Sexo	Hembra	Grupo de dosis	3
N.º de animal	0612	Semana de estudio del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2934,0 gramos	Día de estudio del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Riñones:	
		-Infiltración linfocítica cortical, -Mínima, Focal	
Hígado:		Hígado:	
-Área pálida de hendidura media (S); Una, subcapsular, 3 mm.		-Focos de células inflamatorias, -Mínimos	
-Quiste (S); Dentro de la hendidura, una, Lleno de líquido oscuro, verde, 2 mm.		-Proliferación del conducto biliar, -Mínima	
Pulmones y bronquios:		-Pericolangitis, -Mínima	
-Colapso incompleto; Lóbulos izquierdos.		Pulmones y bronquios:	
		-Macrófagos alveolares, -Mínimos	
		-Células inflamatorias/linfoides perivasculares, -Mínimas	
		Esófago:	
		-Agregados Linfoides, -Mínimos	
		Páncreas:	
		-Atrofia acinar, -Mínima, Focal	
		Piel (Protocolo):	
		-Hiperplasia epidérmica, -Mínima	
		Médula espinal:	

(continuación)

NECROPSIA	HISTOPATOLOGÍA
	-Hemorragia, -Mínima
	Cuello uterino:
	-Mucificación epitelial, -Presente

Los pesos corporales individuales de los monos cynomolgus se presentan en la tabla 37, a continuación:

TABLA 37: Pesos corporales: Valores individuales

N.º de animal	Peso corporal (kg) el día														Cambio de peso (kg)	
	-17	-9	1*	8*	15*	22*	29	36	50	57	64	71	77	D 1 a 71	D 29 a 71	
Grupo 1: GA201-ge, 1,5 mg/kg/ocasión																
623m	2,67	2,65 (-0,02)	2,69 (+0,04)	2,72 (+0,03)	2,76 (+0,04)	2,62 (-0,14)	2,72 (+0,10)	2,65 (-0,07)	2,71 (+0,06)	2,73 (+0,02)	2,74 (+0,13)	2,71 (-0,03)	2,75 (+0,04)	+0,06	+0,03	
590f	2,98	2,92 (-0,06)	2,97 (+0,05)	3,14 (+0,17)	3,13 (-0,01)	3,01 (-0,12)	3,06 (+0,05)	3,00 (-0,06)	3,19 (+0,19)	3,16 (-0,03)	3,18 (+0,07)	3,27 (+0,09)	3,23 (-0,04)	+0,27	+0,17	
Grupo 2: GA201-ge, 4,5 mg/kg/ocasión																
461m	2,50	2,56 (+0,06)	2,53 (-0,03)	2,47 (-0,06)	2,53 (+0,06)	NC	2,53 NC	2,61 (+0,08)	2,53 (-0,08)	2,45 (-0,08)	2,60 (+0,06)	2,59 (-0,01)		+0,03	+0,06	
462f	2,87	2,96 +0,09	2,91 (-0,05)	2,82 (-0,09)	2,95 (+0,13)	2,89 (-0,06)	2,88 (-0,01)	2,79 (-0,09)	2,91 (+0,12)	2,95 (+0,04)	3,02 (-0,03)	2,96 (-0,06)		+0,05	+0,08	
Grupo 3: GA201-ge, 12 mg/kg/ocasión																
463m	2,69	2,81 (+0,12)	2,86 (+0,05)	2,74 (-0,12)	2,81 (+0,07)	NC	2,81 NC	2,81 NC	2,75 (-0,06)	2,71 (-0,04)	2,92 (+0,21)	3,09 (+0,11)		+0,23	+0,28	
612f	2,84	2,96 +0,12	2,92 (-0,04)	2,98 (+0,06)	3,06 (+0,08)	3,01 (-0,05)	3,01 NC	2,94 (-0,07)	2,91 (-0,03)	2,81 (-0,10)	3,04 (+0,23)	3,10 (0,05)		+0,18	+0,09	

Conclusiones

No hubo ningún efecto de tratamiento en los sitios de inyección ni hallazgos clínicos que se consideren relacionados con el tratamiento con Gluco-mAb (anti-EGFR). Los cambios en el peso corporal estuvieron dentro de los intervalos normales esperados. No hubo ningún hallazgo que se considerara relacionado con el tratamiento en el examen macroscópico y los pesos de los órganos de los animales estuvieron dentro de los intervalos normales esperados. En conclusión, el tratamiento a 1,5, 4,5 o 12 mg/kg/ocasión fue bien tolerado sin hallazgos evidentes de toxicidad sistémica.

EGFR no es una diana específica de tumor, ya que está presente en la superficie de diversos tejidos normales, incluyendo hígado, riñón y piel. Se han administrado previamente anticuerpos anti-EGFR con la región Fc de IgG1 humana a seres humanos y han mostrado un perfil de efectos secundarios tolerable (Vanhoefer, U. *et al.*, Clin. Oncol. 1 de enero de 2004; 22(1): 175-84; Needle MN, Semin Oncol. octubre de 2002; 29 (5 Supl 14):55-60). Claramente, existiría una preocupación importante por administrar a un ser humano u otro mamífero un anticuerpo anti-EGFR con ADCC significativamente mayor, debido a actividad de destrucción potenciada que podría presentarse contra tejidos normales críticos tales como hígado, riñón y piel. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que administrar dicho anticuerpo anti-EGFR, modificado por ingeniería genética con Fc como se ha descrito anteriormente y con actividad ADCC hasta 1000 veces mayor, *in vivo* a los mamíferos no condujo a toxicidades significativas. Las concentraciones de anticuerpo se mantuvieron por encima de 1 microgramo por mililitro durante al menos 4 semanas (y por encima de 100 microgramos por mililitro para algunos animales). Dichos niveles de exposición son típicos para terapia con anticuerpos. La ADCC máxima para el anticuerpo de este estudio ya se consigue a concentraciones de 1 microgramo por mililitro. Las administraciones de dosis única de dosis de 40 y 100 mg de anticuerpo anti-EGFR (el anticuerpo ICR62 de rata parental) a pacientes humanos con cáncer han mostrado direccionamiento específico de tumores *in vivo* (Modjtahedi, H. *et al.*, Br J Cancer. enero de 1996;73(2):228-35). Las células efectoras de mono cynomolgus tienen receptor FcγRIII de alta homología y se ha mostrado que median en ADCC potenciada con anticuerpos modificados por ingeniería genética con Fc (y con anticuerpos modificados por glucoingeniería para aumentar los niveles de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc). El nivel de aumento de ADCC es muy similar al observado con células efectoras humanas (PBMC).

En resumen, los inventores han descubierto que los anticuerpos anti-EGFR modificados por ingeniería genética con Fc para aumentar la afinidad de unión de Fc-γRIII y para aumentar la ADCC se pueden administrar a mamíferos para proporcionar concentraciones superiores a 1 microgramo de anticuerpo por mililitro de suero durante un periodo de al menos 4 semanas para proporcionar exposiciones a fármacos normalmente asociadas con acumulación significativa de anticuerpo en células diana *in vivo*, sin conducir a toxicidad significativa.

La toxicidad de una molécula de unión a antígeno de la presente invención se puede medir y/o determinar usando cualquiera de los métodos y/o parámetros (por ejemplo, valores de química sanguínea, indicadores histopatológicos, etc.) descritos anteriormente en el presente documento, o por cualquier medio conocido por los expertos en la materia. Un experto en la técnica entiende que un nivel de toxicidad clínicamente significativo es un nivel que excede los niveles aceptados en general por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos para anticuerpos administrados clínicamente

Ejemplo 5

Modificaciones de las CDR de cadena ligera

Usando los métodos descritos anteriormente, se generaron variantes de región variable de cadena ligera anti-EGFR a partir de la construcción de región variable de cadena ligera I-KC (SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 45), en donde la secuencia que codifica el resto de aminoácido en diversas posiciones en las CDR de ICR62 de rata se reemplazó con el resto de aminoácido correspondiente de una secuencia génica variable de línea germinal humana. La tabla 38 muestra las sustituciones que se realizaron en las CDR de la construcción de región variable de cadena ligera I-KC (SEQ ID NO: 45):

Tabla 38: CDR de cadena ligera minimizadas

NOMBRE DE CONSTRUCCIÓN	SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDOS REALIZADA EN LA SEQ ID NO: 45	CDR DE CADENA LIGERA EN LA QUE SE REALIZÓ LA SUSTITUCIÓN
I-KC1	N30R*	CDR1
I-KC2	Y32W	CDR1
I-KC3	N34G	CDR1
I-KC4	N50T	CDR2
I-KC5	T51A	CDR2
I-KC6	N52S	CDR2
I-KC7	N53S	CDR2

(continuación)

NOMBRE DE CONSTRUCCIÓN	SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDOS REALIZADA EN LA SEQ ID NO: 45	CDR DE CADENA LIGERA EN LA QUE SE REALIZÓ LA SUSTITUCIÓN
I-KC8	T56S	CDR2
I-KC9	F94Y	CDR3
* Identificado según la nomenclatura convencional (por ejemplo, "N30R" significa que el resto de asparagina (N) en la posición 30 de la SEQ ID NO: 45 se reemplaza con un resto de arginina (R)).		

Todos los restos de sustitución identificados anteriormente se obtuvieron de la secuencia aceptora de VK1_6 humano, excepto por el intercambio Y32W, en donde el W de una secuencia de línea germinal humana relacionada fue sustituido por la Y en la posición 32 en la SEQ ID NO: 45.

Cada una de las construcciones variantes de I-KC (I-KC1 a I-KC9) se emparejó con una región variable de cadena pesada que comprende la construcción I-HHD (SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 15) y un ensayo de unión realizado según los métodos descritos en los ejemplos anteriores. Las construcciones I-KC1 a I-KC9 se compararon con la construcción I-KC (SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 45) con respecto a la afinidad de unión a EGFR en células diana A431 (figura 29). Como se observa en la figura 29, solo la modificación del resto 34 a su secuencia humana correspondiente (N34G) dio como resultado una ligera disminución de la afinidad de unión (el valor de CE50 aumentó en un factor de 10). Todas las otras construcciones conservaron la actividad de unión comparable a la construcción I-KC (SEQ ID NO: 45). Por lo tanto, cuando se empareja con una construcción de cadena pesada quimérica (p. ej., humanizada) específica para EGFR, la cadena ligera puede ser completamente humana (p. ej., a partir de una secuencia del gen V de la cadena ligera humana) y aún conservar unión específica para EGFR. En particular, CDR2 y CDR3 pueden estar completamente en forma de línea germinal humana.

Moléculas de unión a antígeno que comprenden CDR específicas de EGFR

Por lo tanto, la presente divulgación contempla una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada quimérica (por ejemplo, humanizada) que comprende CDR específicas de EGFR emparejadas con una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena ligera tiene menos de diez restos de aminoácidos no humanos. En otras realizaciones, la región variable de la cadena ligera tiene menos de nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un restos de aminoácidos no humanos. En realizaciones preferidas, la región variable de cadena ligera tiene menos de dos o menos de un (es decir, ningún) restos de aminoácidos no humanos. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende una o más secuencias de genes de región variable de línea germinal humana. Se conocen en la técnica secuencias de genes de región variable de línea germinal humana que codifican regiones variables de cadena ligera y se pueden encontrar, por ejemplo, en la base de datos IMGT, disponible en <http://imgt.cines.fr/home.html>. En una realización preferida, la secuencia de la línea germinal humana procede de la secuencia de línea germinal VK1_6. En otras realizaciones, los restos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de línea germinal humana pueden sustituirse con uno o más restos de otra secuencia de región variable de cadena ligera de línea germinal humana.

En una realización, la presente divulgación se dirige a una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; y SEQ ID NO: 121, y una cadena ligera que comprende un polipéptido codificado por una o más secuencias de genes variables de línea germinal humana. En una realización preferida, la secuencia de línea germinal humana procede de la secuencia de línea germinal VK1_6.

En otra realización, la presente divulgación se dirige a una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 124; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 126; (c) SEQ ID NO: 108; y (d) un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera humana codificada por una o más secuencias de genes de línea germinal humana. En una realización particular, la secuencia de línea germinal humana procede de la secuencia de línea germinal VK1_6. En otra realización, la secuencia del gen de región variable de línea germinal humana comprende la secuencia del gen de línea germinal VK1_6 con una sustitución de uno o más codones de aminoácidos con una secuencia de una secuencia de gen de región variable de cadena ligera de línea germinal humana diferente.

En otras realizaciones, la molécula de unión a antígeno de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada específica de EGFR de la presente divulgación, y una variante de la SEQ ID NO: 45. En una realización, la variante de la SEQ ID NO: 45 comprende una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones en las regiones determinantes de complementariedad (CDR). En realizaciones específicas, la sustitución es de un resto

de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: posición de aminoácido 30 de la SEQ ID NO: 45; posición de aminoácido 32 de la SEQ ID NO: 45; posición de aminoácido 34 de la SEQ ID NO: 45; posición de aminoácido 50 de la SEQ ID NO: 45; posición de aminoácido 51 de la SEQ ID NO: 45; posición de aminoácido 52 de la SEQ ID NO: 45; posición de aminoácido 53 de la SEQ ID NO: 45; posición de aminoácido 56 de la SEQ ID NO: 45; posición de aminoácido 94 de la SEQ ID NO: 45; y cualquier combinación de sustituciones de los mismos. En realizaciones más específicas, la sustitución en la SEQ ID NO: 45 se selecciona del grupo que consiste en: sustitución con una arginina (R) de la asparagina (N) en la posición 30 de la SEQ ID NO: 45; sustitución con un triptófano (W) de la tirosina (Y) en la posición 32 de la SEQ ID NO: 45; sustitución con una glicina (G) de la asparagina (N) en la posición 34 de la SEQ ID NO: 45; sustitución con una treonina (T) de la asparagina (N) en la posición 50 de la SEQ ID NO: 45; sustitución con una alanina (R) de la treonina (T) en la posición 51 de la SEQ ID NO: 45; sustitución con una serina (S) de la asparagina (N) en la posición 52 de la SEQ ID NO: 45; sustitución con una serina (S) de la asparagina (N) en la posición 53 de la SEQ ID NO: 45; sustitución con una serina (R) de la treonina (T) en la posición 56 de la SEQ ID NO: 45; sustitución con una tirosina (Y) de la fenilalanina (F) en la posición 94 de la SEQ ID NO: 45; y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, Todas estas sustituciones de restos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 45 se incorporan en una única variante de cadena ligera. En realizaciones preferidas, las moléculas de unión a antígeno que comprenden las variantes de cadena ligera con sustituciones de aminoácidos para las CDR de ICR62 conservan unión específica con EGFR (en comparación con una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 45) cuando la variante de cadena ligera se empareja con un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada de la presente divulgación.

La presente divulgación también se dirige a polinucleótidos que codifican cualquiera de los polipéptidos y/o moléculas de unión a antígeno anteriores. La presente divulgación se dirige además a las moléculas de unión a antígeno descritas anteriormente, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GlycArt Biotechnology AG

<120> Moléculas de unión a antígeno que se unen a EGFR, vectores que las codifican y usos de las mismas

<130> 1975.043PC02/TJS/T-M

<150> 60/650.115

<151> 07/02/2005

<160> 127

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> *Rattus* sp.

<220>

<223> ICR62 VH

<400> 1

ES 2 755 976 T3

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2
 <211> 359
 <212> ADN
 <213> *Rattus* sp.

<220>
 <223> ICR62 VH

<400> 2

cagggtcaacc tactgcagtc tggggctgca ctggtgaagc ctggggcctc tgtgaagttg 60

tcttgcaaag gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gaagcagagt 120

catggaaaga gccttgagtg gattgggtat tttaatccta acagtgggta tagtacctac 180

aatgaaaagt tcaagagcaa ggccacattg actgcagaca aatccaccga tacagcctat 240

atggagctta ccagttctgac atctgaggac tctgcaacct attactgtac aagactatcc 300

ccaggggggtt actatgttat ggatgcctgg ggtcaaggag cttcagtcac tgtctcctc 359

<210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> I-HHA

ES 2 755 976 T3

<400> 3

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

5 <210> 4
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> I-HHA

<400> 4

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctggatt	tacattcact	gactacgcc	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggctcgagt	gatgggaggg	atcaatccta	acagtgggta	tagtacctac	180
gcacagaagt	tccagggcag	ggtcaccatt	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagactatcc	300
ccaggcggtt	actatgttat	ggatgcctgg	ggccaagggg	ccaccgtgac	cgtctcctca	360

15 <210> 5
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

ES 2 755 976 T3

<223> I-HHB

<400> 5

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 6
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> I-HHB

15

<400> 6

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

20

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 755 976 T3

<223> I-HHC

<400> 7

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

<210> 8

<211> 360

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> I-HHC

<400> 8

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	gttctggttt	tacattcact	gactacaaga	tacactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggctcgagtg	gatgggatat	ttcaacccta	acagcgggta	tagtacctac	180
aatgaaaagt	tcaagagcag	ggtcaccatt	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagactatcc	300
ccaggcgggt	actatgttat	ggatgcctgg	ggccaaggga	ccaccgtgac	cgtctcctca	360

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 755 976 T3

<223> I-HLA

<400> 9

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 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 10

$\langle 211 \rangle$ 360

<212> ADN

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> I-HLA

<400> 10

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtggtta tagtacctac 180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagggg ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 11

 $\langle 211 \rangle$ 120

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 755 976 T3

<220>
<223> I-HLB

5 <400> 11

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

10 <210> 12
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> I-HLB

20 <400> 12

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggagcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	gttctggttt	tacattcact	gactacaaga	tccactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggctcgagtg	gatgggatac	ttcaacccta	acagcggtta	tagtacctac	180
gcacagaagt	tccagggcag	ggtcaccatg	accgccgaca	cgtccatcag	cacagcctac	240
atggagctga	gcaggctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagactatcc	300
ccaggcggtt	actatgttat	ggatgcctgg	ggccaaggga	ccaccgtgac	cgtctcctca	360

ES 2 755 976 T3

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> I-HLC
 10
 <400> 13
 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 Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 15
 <210> 14
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> I-HLC
 <400> 14

ES 2 755 976 T3

cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcggtta cagtacttac 180
 aacgagaagt tcaagagccg ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggggggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> I-HHD

<400> 15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr 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 Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> I-HHD

ES 2 755 976 T3

<400> 16

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctctgggttt cacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagggg ccaccgtgac cgtctcctca      360
```

5

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> I-HHE

15

<400> 17

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
          20          25          30

Lys Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr 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 Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120
```

<210> 18
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

20

<220>
<223> I-HHE

5 <400> 18

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg gttctggttt cacattcact gactacaaga ttcctgggt gcgacaggct      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360
```

10 <210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> I-HHF

<400> 19

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
          20          25          30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr 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 Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120
```

20 <210> 20
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

25

ES 2 755 976 T3

<220>
<223> I-HHF

<400> 20

5

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta ttcgaactac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360
```

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> I-HHG

15

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
                20              25              30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
                35              40              45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50              55              60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr 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 Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
                100             105             110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                115             120
```

20

<210> 22
<211> 360
<212> ADN

ES 2 755 976 T3

<213> Artificial

<220>

<223> I-HHG

5

<400> 22

```

caggtgcagc tggatgcagc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tgccacgtac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360

```

10

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> I-HLA1

<400> 23

```

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 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20          25          30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100         105         110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

20

<210> 24

<211> 360

<212> ADN

ES 2 755 976 T3

<213> Artificial

<220>

<223> I-HLA1

5

<400> 24

```

caggtgcagc  tgggtgcagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctggagcctc  ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg  cctctggttt  tacattcact  gactactata  tgcactgggt  gcgacaggcc     120
cctggacaag  ggctcgagtg  gatgggctgg  atcaatccta  acagtggtta  tagtacctac     180
agcccaagct  tccaaggcca  ggtcaccatc  tcagccgaca  agtccatcag  caccgcctac     240
ctgcagtgga  gcagcctgaa  ggctcggac  accgccatgt  attactgtgc  gagactatcc     300
ccaggcggtt  actatgttat  ggatgcctgg  ggccaaggga  ccaccgtgac  cgtctcctca     360

```

10

<210> 25

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> I-HLA2

<400> 25

```

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 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
          20           25           30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35           40           45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50           55           60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

20

<210> 26

<211> 360

ES 2 755 976 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> I-HLA2

<400> 26

```
caggtgcagc  tgggtgcagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctggagcctc  ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg  cctctggttt  tacattcact  gactactata  tgcactgggt  gcgacaggcc     120
cctggacaag  ggctcgagtg  gatgggctgg  atcaatccta  acagtgggta  tagtacctac     180
aacgagaagt  tccaaggcca  ggtcaccatc  tcagccgaca  agtccatcag  caccgcctac     240
ctgcagtgga  gcagcctgaa  ggccctggac  accgccatgt  attactgtgc  gagactatcc     300
ccaggcggtt  actatgttat  ggatgcctgg  ggccaaggga  ccaccgtgac  cgtctcctca     360
```

10 <210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> I-HLA3

20 <400> 27

```
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 Asp Tyr
                20              25              30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35              40              45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100             105             110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115             120
```

<210> 28

ES 2 755 976 T3

<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> I-HLA3

<400> 28

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctctgggta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac      180
agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360
```

10

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> I-HLA4

20 <400> 29

```
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 Asp Tyr
                20              25              30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50              55              60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
                100              105              110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115              120
```

<210> 30

ES 2 755 976 T3

<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> I-HLA4

<400> 30

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctctgggta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac      180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360
```

10

<210> 31
<211> 120
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> I-HLA5

20 <400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
          20              25              30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35              40              45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100              105              110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115              120
```

<210> 32

ES 2 755 976 T3

<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> I-HLA5

<400> 32

```
cagatgcagc tggatgcagtc tgggcccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac      180
agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
```

10 ctgcagtggg gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

15 <210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> I-HLA6

<400> 33

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

```
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20              25              30
```

```
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35              40              45
```

```
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50              55              60
```

```
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
```

```
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85              90              95
```

```
Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100             105             110
```

```
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115             120
```

25 <210> 34

ES 2 755 976 T3

<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> I-HLA6

<400> 34

```
cagatgcagc tggatgcagc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac      180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
ctgcagtggg gcagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360
```

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA7

<400> 35

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20           25           30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35           40           45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50           55           60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120
```

ES 2 755 976 T3

<210> 36
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> I-HLA7
 10
 <400> 36
 cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
 cgcggaacaac ggctcgagtg gatcggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
 aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
 15
 <210> 37
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> I-HLA8
 <400> 37

ES 2 755 976 T3

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr 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 Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA8

<400> 38

cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctggttt tacattcaact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA9

<400> 39

ES 2 755 976 T3

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

5 <210> 40
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> I-HLA9

<400> 40

gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gttgaagatc 60
 tcctgcaagg gttctgggta ttcattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

15 <210> 41
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de señal

ES 2 755 976 T3

<400> 41

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

5

<210> 42
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Secuencia de señal

<400> 42

15 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

20

<220>
<223> ICR62 VL

25

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

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

30

<210> 44
<211> 324
<212> ADN
<213> *Rattus* sp.

35

ES 2 755 976 T3

<220>
<223> ICR62 VL

<400> 44

5
gacatccaga tgacccagtc tccttcattc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60
atcaactgca aagcaagtca gaatattaac aattacttaa actgggtatca gcaaaagctt 120
ggagaagctc ccaaacgcct gatataataat acaaacaatt tgcaaacagg catcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagagat tacacactca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacatatatt ctgcttgacag cataatagtt ttcccacggt tggagctggg 300
accaagctgg aactgaaacg tacg 324

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> I-KC

15

<400> 45

Asp	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	Asn	Asn	Tyr
				20					25					30	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asn	Thr	Asn	Asn	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	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Phe	Pro	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr				
			100					105							

20
<210> 46
<211> 324
<212> ADN
<213> Artificial

25
<220>
<223> I-KC

ES 2 755 976 T3

<400> 46

```

gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc      60
atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca      120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgtag cataatagtt ttcccacggt tggccagggc      300
accaagctcg agatcaagcg tacg                                             324

```

5

<210> 47
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Secuencia de señal

15

<400> 47

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1              5              10              15

```

```

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
                20

```

20

<210> 48
<211> 66
<212> ADN
<213> Artificial

25

<220>
<223> Secuencia de señal

<400> 48

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccagggtgcc      60
aggtgt                                             66

```

30

<210> 49
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> I-KA

<400> 49

ES 2 755 976 T3

Asp 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 Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

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

<210> 50
<211> 327
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-KA

<400> 50

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgag cataatagtt ttcccacggt tggccagggc 300
accaagctcg agatcaagcg tacggtg 327

<210> 51
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> I-KB

<400> 51

ES 2 755 976 T3

Asp 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 Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

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

<210> 52
<211> 327
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-KB

<400> 52

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
atcacctgca aagcaagtca gaatattaac aattacttaa actggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgcag cataatagtt ttcccacggt tggccagggc 300
accaagctcg agatcaagcg tacggtg 327

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 53

ES 2 755 976 T3

Asp Tyr Lys Ile His
1 5

5 <210> 54
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 54
gactacaaga tacac 15

15 <210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 55

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

25 <210> 56
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

35 <400> 56
gactacgcca tcagc 15

40 <210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

45 <400> 57

Asp Tyr Tyr Met His
1 5

50 <210> 58
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 58
gactactata tgcac 15

ES 2 755 976 T3

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada Chothia
 <400> 59
 10
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5
 .
 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada Chothia
 20
 <400> 60
 gggtttacat tcactgacta c 21
 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada Chothia
 30
 <400> 61
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5
 35
 <210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada Chothia
 <400> 62
 45 gggtacacat tcactgacta c 21
 <210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada Chothia
 55
 <400> 63
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 1 5

ES 2 755 976 T3

5	<210> 64 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> CDR1 de cadena pesada Chothia	
10	<400> 64 gggtattcat tcactgacta c	21
15	<210> 65 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial	
20	<220> <223> CDR1 de cadena pesada AbM	
	<400> 65	
	Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His 1 5 10	
25	<210> 66 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> CDR1 de cadena pesada AbM	
35	<400> 66 gggtttacat tcactgacta caagatacac	30
40	<210> 67 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial	
45	<220> <223> CDR1 de cadena pesada AbM	
	<400> 67	
	Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Ser 1 5 10	
50	<210> 68 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> CDR1 de cadena pesada AbM	
	<400> 68 gggtttacat tcactgacta cgccatcagc	30
60	<210> 69 <211> 10 <212> PRT	

ES 2 755 976 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM
 5
 <400> 69

 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10

 10
 <210> 70
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM

 <400> 70
 gggtttacat tcactgacta ctatatgcac 30
 20
 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM

 <400> 71
 30

 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10

 35
 <210> 72
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM
 40
 <400> 72
 gggttacacat tcactgacta ctatatgcac 30
 45
 <210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM
 50
 <400> 73

 Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
 1 5 10
 55
 <210> 74
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 755 976 T3

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM

5 <400> 74
 ggttattcat tcactgacta caagatacac 30

10 <210> 75
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat
 <400> 75

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ser

20 <210> 76
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

30 <400> 76
 tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacaatgaaa agttcaagag c 51

35 <210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat
 <400> 77

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

Gly

45 <210> 78
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat
 <400> 78
 gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

55 <210> 79
 <211> 17

ES 2 755 976 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

 <400> 79

 Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

 Gly
 10
 <210> 80
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

 <400> 80
 20 tatttcaacc ctaacagcgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

 <210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat
 30
 <400> 81

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

 Gly

 35
 <210> 82
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

 <400> 82
 tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agtttcaggg c 51
 45
 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

 <400> 83

ES 2 755 976 T3

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

Gly

5 <210> 84
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

<400> 84
 tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gcttccaagg c 51

15 <210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

<400> 85

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

Gly

25 <210> 86
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

35 <400> 86
 tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacaacgaga agttccaagg c 51

40 <210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

45 <400> 87

	Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
	1				5					10					15	

Gly

50 <210> 88
 <211> 51
 <212> ADN

ES 2 755 976 T3

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada Kabat

5

<400> 88
tatttcaacc ctaacagcgg ttattcgaac tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 89

10 <211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

<400> 89

Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

20

<210> 90
<211> 51
<212> ADN
<213> Artificial

25

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada Kabat

<400> 90
tatttcaacc ctaacagcgg ttatgccacg tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada Chothia

40

<400> 91

	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr
	1				5			

<210> 92
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

45

<220>

50 <223> CDR2 de cadena pesada Chothia

<400> 92
aatcctaaca gtggttatag tacc 24

55

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 755 976 T3

[illegible]

ES 2 755 976 T3

```

<220>
<223> CDR2 de cadena pesada AbM

5  <400> 98
    tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30

    <210> 99
    <211> 10
    <212> PRT
10  <213> Artificial

    <220>
    <223> CDR2 de cadena pesada AbM

15  <400> 99

        Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
        1             5             10

    <210> 100
    <211> 30
    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
25  <223> CDR2 de cadena pesada AbM

    <400> 100
    gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30

30  <210> 101
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Artificial

35  <220>
    <223> CDR2 de cadena pesada AbM

    <400> 101

        Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
        1             5             10

40  <210> 102
    <211> 30
    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> CDR2 de cadena pesada AbM

50  <400> 102
    tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30

    <210> 103
    <211> 10
55  <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
    <223> CDR2 de cadena pesada AbM

60  <400> 103

```

ES 2 755 976 T3

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ES 2 755 976 T3

<211> 328
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> Región constante de IgG1
 <400> 109

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 20 25 30

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

10

ES 2 755 976 T3

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

ES 2 755 976 T3

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
290 295 300

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 110
<211> 987
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Región constante de IgG1

<400> 110

```

acc aagg ggc cat cgg tctt ccc cct ggca cct cct cca agg cac ctc tgg ggg gca 60
gcg gcc ctg gct gcct ggt caagg actac ttccc gaac cgg tgac ggt gtc gtg gaac 120
tcagg cgccc tgacc agcgg cgt gcac acc ttccc ggctg tct acag tc cagg actc 180
tact cct ca gcag cgt ggt gacc gtgcc tcc agc agct tgg gcaccca gacct acatc 240
tgca acgtga atcaca agc cagcaac acc aagg tggaca agaa agcaga gccaa atct 300
tgt gacaaaa ctcac acatg ccac cgtgc ccag cacctg aact cctggg ggg accgtca 360
gtct tctct tcccc caaa accca aggac accct catga tctccc ggac cctg aggtc 420
acat gcgtgg tgg tggacgt gagcc acgaa gacct gagg tca agttcaa ctggt acgtg 480
gacgg cgtgg aggtgc ataa tgcca agaca aagcc gcggg agg agcag ta caac agcacg 540
tacc gtgtgg tcag cgtcct caccgt cctg cacc aggact ggct gaattg caagg agtac 600
aagt gcaagg tctcca acaa agcct ccca gcccc atcg agaaa accat ctcca aagcc 660
aaagg gcagc cccg agaacc acagg tgtac accct gcccc catccc ggga tgag ctgacc 720
aaga accagg tcag cctgac ctgc ctggtc aaagg cttct atccc agcga catc gccgtg 780
gagt gggaga gcaat gggca gccgg agaac aactaca aga ccacgc cctcc cgtg ctggac 840
tccg acggct cctt cttct ctac agcaag ctac cgtgg aca agagc ag gtggc agcag 900
ggga acgtct tctcat gctc cgtgat gcat gaggt cctgc aca accacta cacgc agaag 960
agcct cctccc tgtct ccggg taaat ga 987

```

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera de Kabat

ES 2 755 976 T3

<400> 111

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

5

<210> 112
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera de Kabat

15

<400> 112
aaagcaagtc agaataataa caattactta aac 33

20

<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera de Kabat

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

30

<210> 114
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera de Kabat

40

<400> 114
cgggcaagtc agggcattaa caattactta aat 33

45

<210> 115
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

50

<220>
<223> CDR2 de cadena ligera de Kabat

<400> 115

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

50

<210> 116
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

55

<220>

ES 2 755 976 T3

	<223> CDR2 de cadena ligera de Kabat	
	<400> 116	
5	aatacaaaca attgcaaac a	21
	<210> 117	
	<211> 8	
	<212> PRT	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CDR3 de cadena ligera de Kabat	
	<400> 117	
15	Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr	
	1 5	
	<210> 118	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CDR2 de cadena ligera de Kabat	
25	<400> 118	
	aataccaaca actgcagac a	21
	<210> 119	
30	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> CDR3 de cadena ligera de Kabat	
	<400> 119	
	ttgcagcata atagtttcc cacg	24
40	<210> 120	
	<211> 361	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> I-HLA10	
	<400> 120	
	gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gttgaagatc	60
	tcctgcaagg gttctgggta ttcattcact gactacaaga tccactgggt gcgacagatg	120
	cctggaaagg gcctcgagtg gatgggctac ttcaatccta acagtgggta tagtacctac	180
	agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
	ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc	300
	ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca	360
50	g	361

ES 2 755 976 T3

<210> 121
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> I-HLA10
 10 <400> 121

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

 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

 Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

 Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 15 <210> 122
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> CDR1 de cadena pesada de Kabat

 <400> 122
 gactacaaga tatcc 15

 25 <210> 123
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada de Kabat

 <400> 123

ES 2 755 976 T3

		Asp	Tyr	Lys	Ile	Ser											
		1				5											
5	<210> 124																
	<211> 30																
	<212> ADN																
	<213> Artificial																
10	<220>																
	<223> CDR1 de cadena pesada de AbM																
	<400> 124																
	ggtttcacat tactgacta caagatatcc					30											
15	<210> 125																
	<211> 10																
	<212> PRT																
	<213> Artificial																
20	<220>																
	<223> CDR1 de cadena pesada de AbM																
	<400> 125																
25		Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Ser						
		1				5					10						
30	<210> 126																
	<211> 51																
	<212> ADN																
	<213> Artificial																
35	<220>																
	<223> CDR2 de cadena pesada de Kabat																
	<400> 126																
	tactcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gcttccaagg c									51							
40	<210> 127																
	<211> 17																
	<212> PRT																
	<213> Artificial																
45	<220>																
	<223> CDR2 de cadena pesada de Kabat																
	<400> 127																
		Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
		1				5					10						15
	Gly																

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-EGFR humanizado que se une específicamente a EGFR humano, en donde dicho anticuerpo comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 15; y
- (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 45;

y en donde dicho anticuerpo comprende una región Fc humana, modificada por glucoingeniería, que tiene un número reducido de restos de fucosa en comparación con la forma no modificada por glucoingeniería del anticuerpo.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicha región Fc se ha modificado por glucoingeniería:

- (a) para tener al menos 70 % de oligosacáridos no fucosilados;
- (b) para tener una mayor relación de restos de GlcNAc con respecto a restos de fucosa en comparación con la forma no modificada por glucoingeniería del anticuerpo;
- (c) para tener una mayor afinidad de unión al receptor de Fc en comparación con la forma no modificada por glucoingeniería del anticuerpo; o
- (d) para tener una mayor función efectora en comparación con la forma no modificada por glucoingeniería del anticuerpo.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde dicha función efectora se selecciona del grupo que consiste en mayor citotoxicidad celular mediada por Fc, mayor unión a linfocitos NK, mayor unión a macrófagos, mayor unión a células polimorfonucleares, mayor unión a monocitos, mayor señalización directa inductora de apoptosis, mayor maduración de células dendríticas y mayor sensibilización de linfocitos T.

4. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una región variable de cadena ligera del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. El vector de la reivindicación 6, que es policistrónico.

8. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el vector de la reivindicación 6 o 7.

9. La célula hospedadora de la reivindicación 8, en donde dicha célula hospedadora se modifica por ingeniería genética para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.

10. La célula hospedadora de la reivindicación 9, en donde dicha célula hospedadora se modifica por ingeniería genética adicionalmente para expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad manosidasa II del Golgi.

11. La célula hospedadora de la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión que comprende además el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi.

12. La célula hospedadora de la reivindicación 11, en donde dicho dominio de localización en el Golgi se selecciona del dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, manosidasa I o $\alpha 1$ -6 núcleo fucosiltransferasa.

13. Un método para producir un anticuerpo anti-EGFR modificado por glucoingeniería humanizado que tiene una región Fc humana, modificada por glucoingeniería, que es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata por unirse a EGFR humano, en donde dicho anticuerpo ICR62 de rata comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 43, comprendiendo dicho método:

- (a) cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 en condiciones que permitan la producción de dicho anticuerpo; y

(b) aislar dicho anticuerpo.

- 5 14. Un anticuerpo que se une específicamente a EGFR humano, en donde dicho anticuerpo se puede obtener por el método de la reivindicación 13 o se puede obtener por la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.
15. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 16. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 14 para su uso como medicamento.
17. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 14 para su uso en el tratamiento o la profilaxis del cáncer.
- 15 18. Uso de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 14 para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis del cáncer.
- 20 19. El anticuerpo de la reivindicación 17 o el uso de la reivindicación 18, en donde dicho anticuerpo se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de 1,0 mg/kg a 15 mg/kg.
- 20 20. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 o el uso de la reivindicación 18 o 19, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de piel y cáncer de riñón.

Figura 1

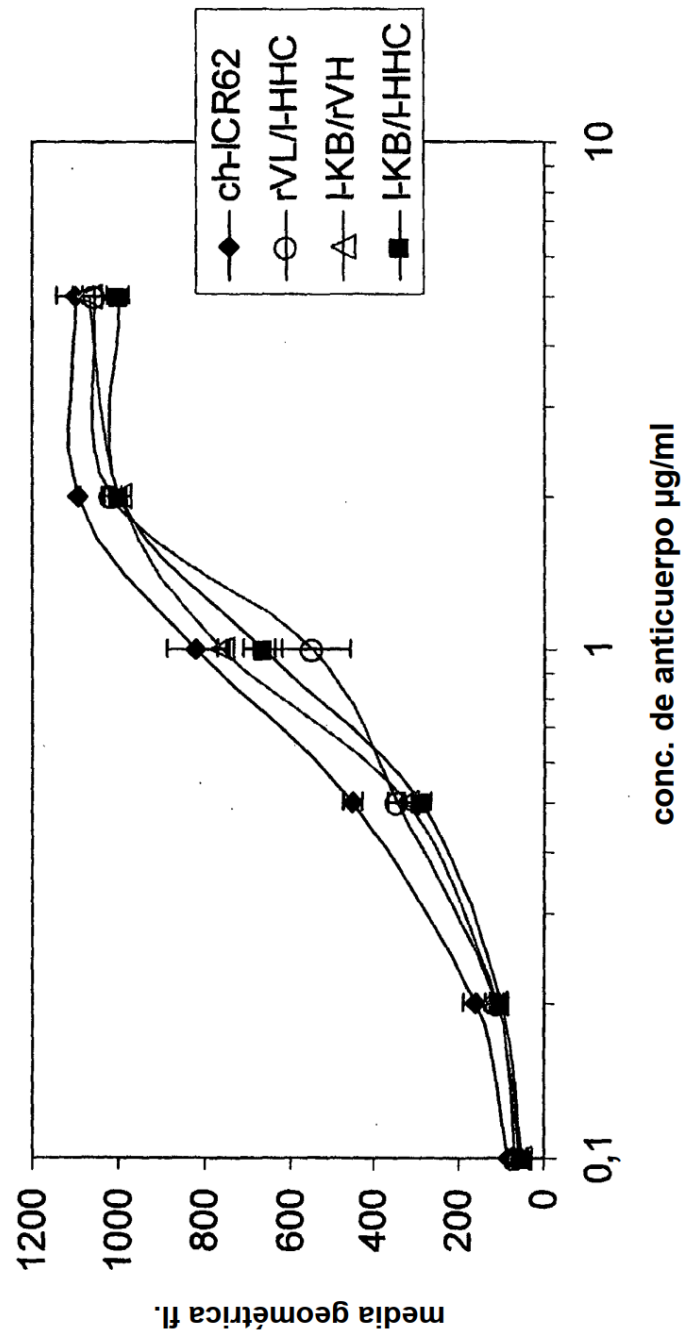


Figura 2

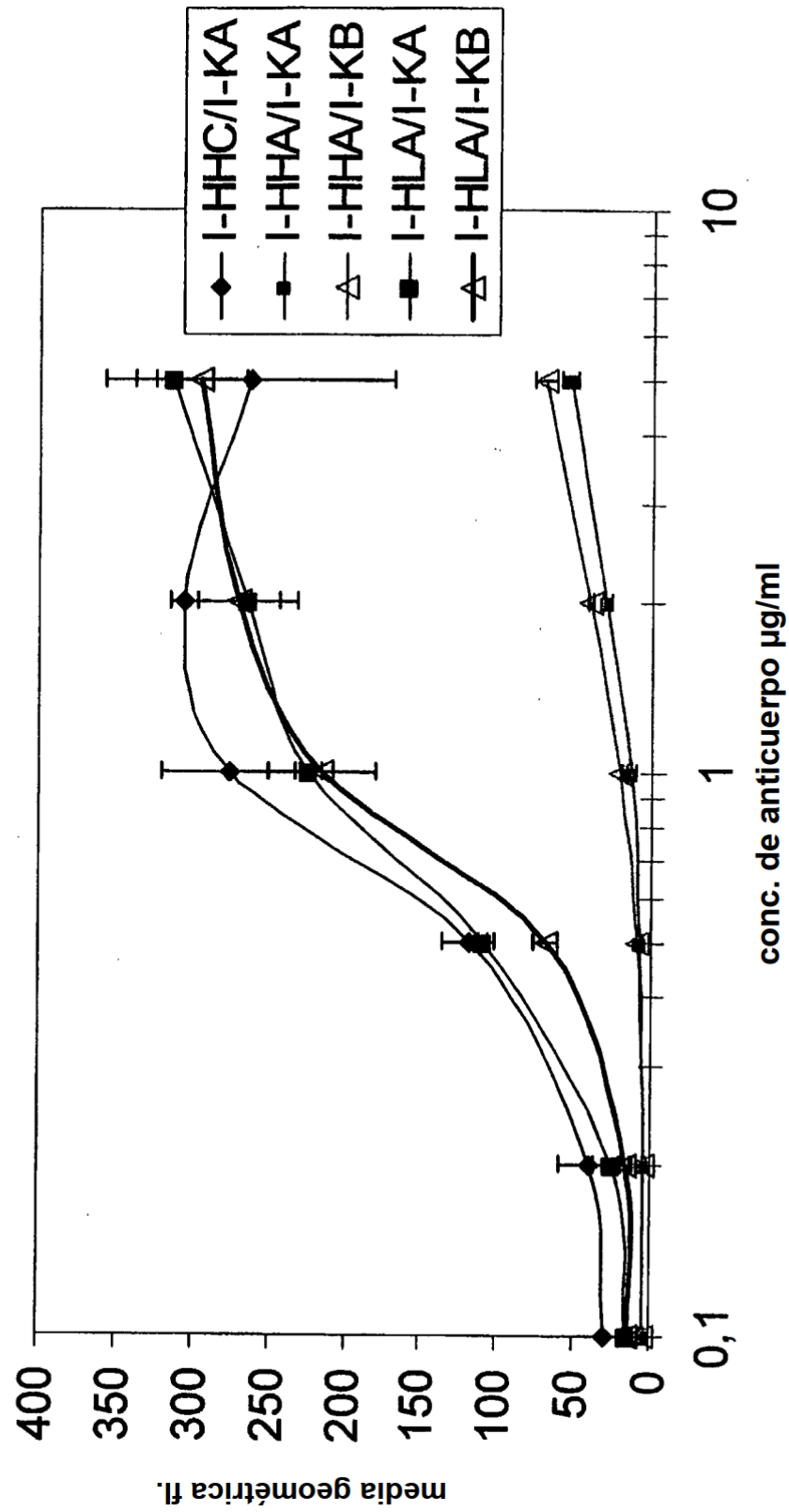


Figura 3

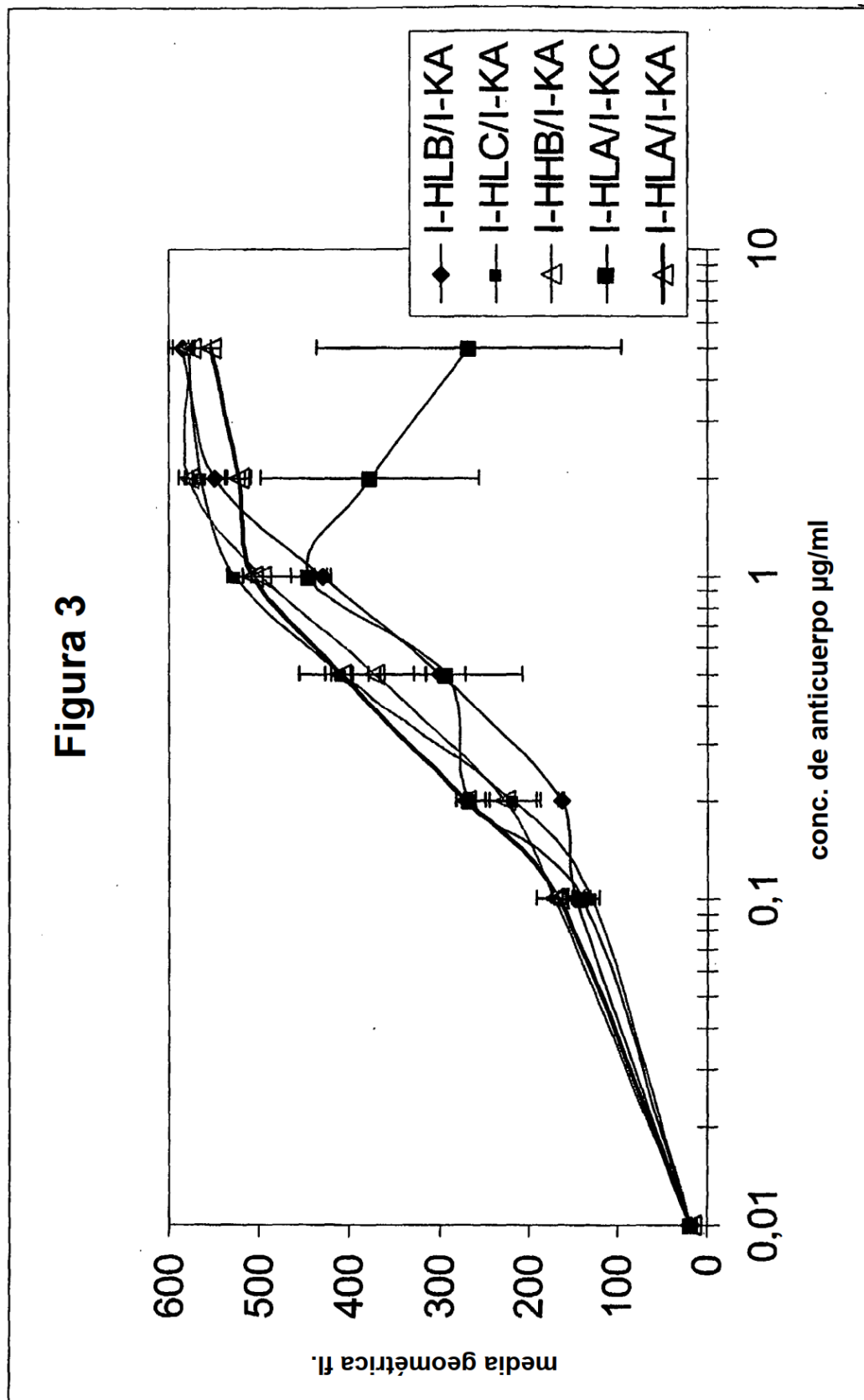


Figura 4

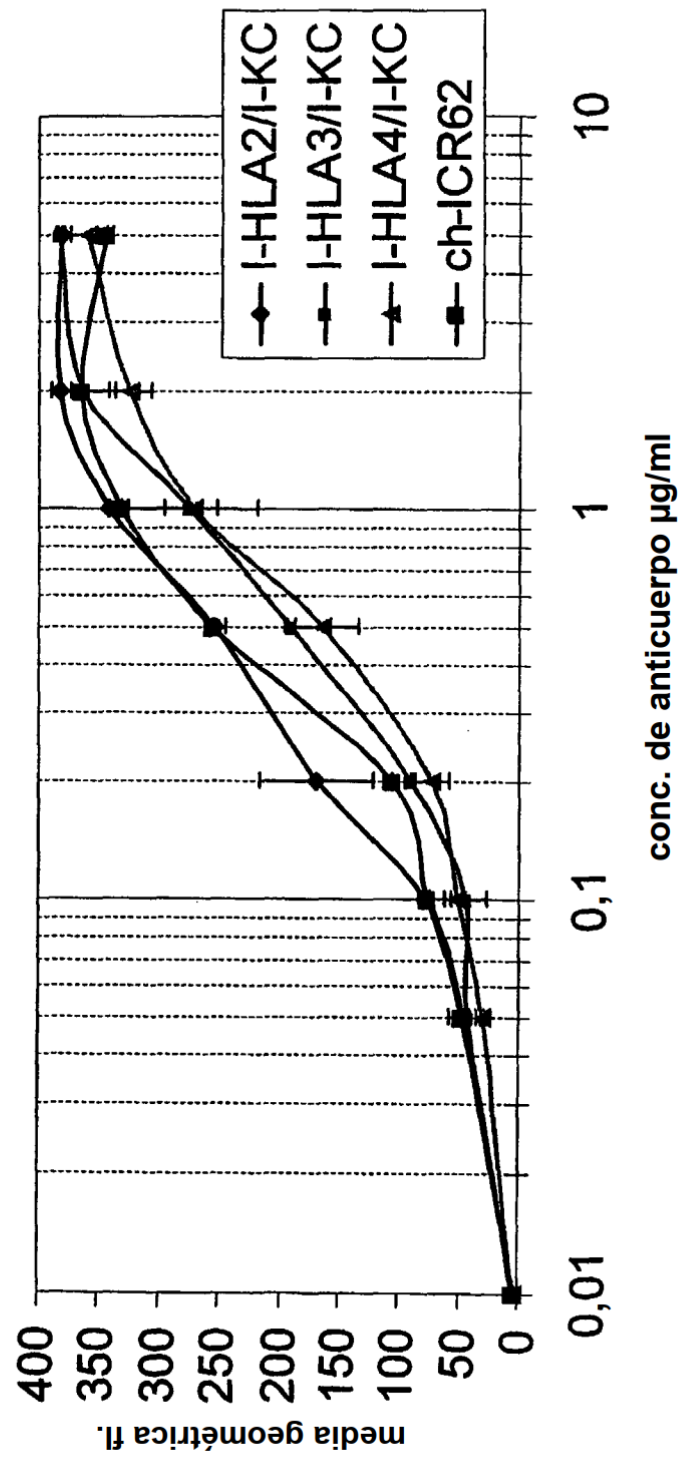


Figura 5

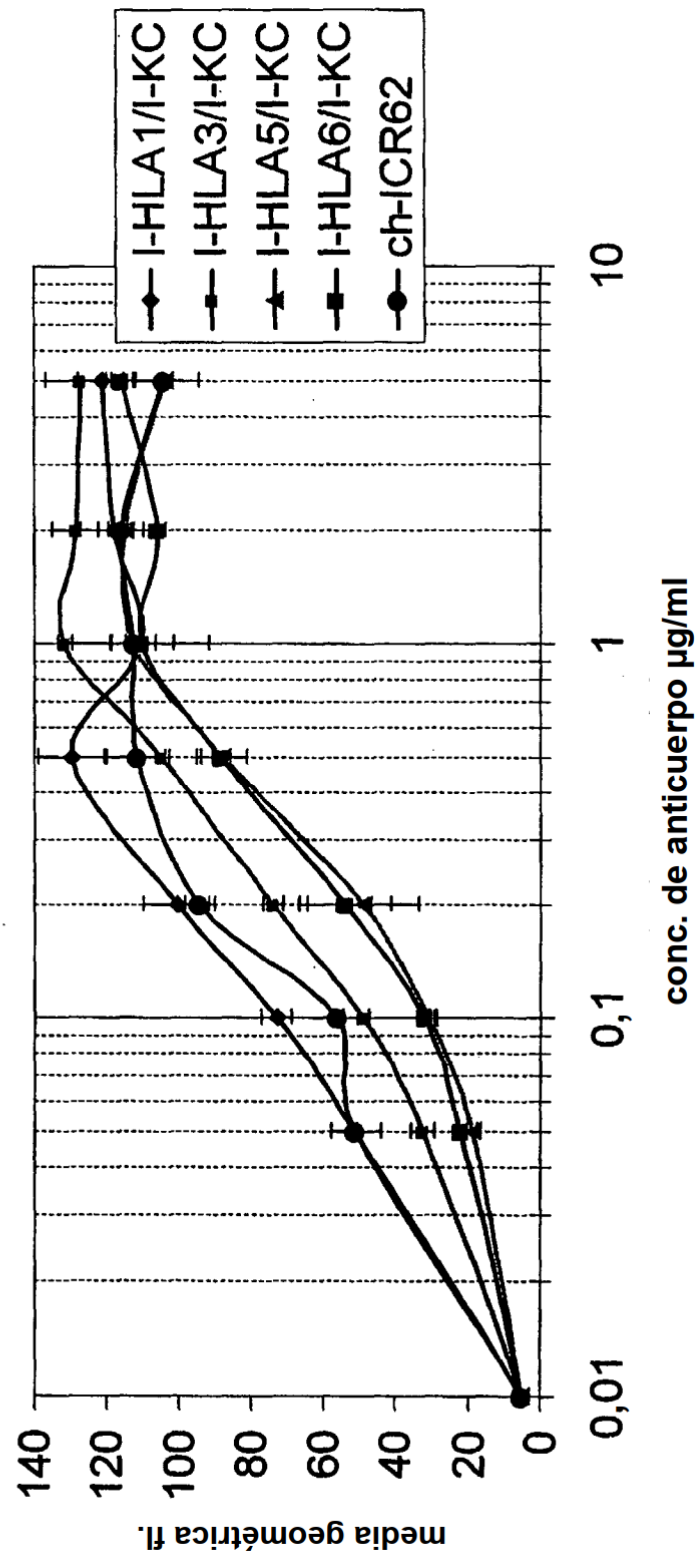


Figura 6

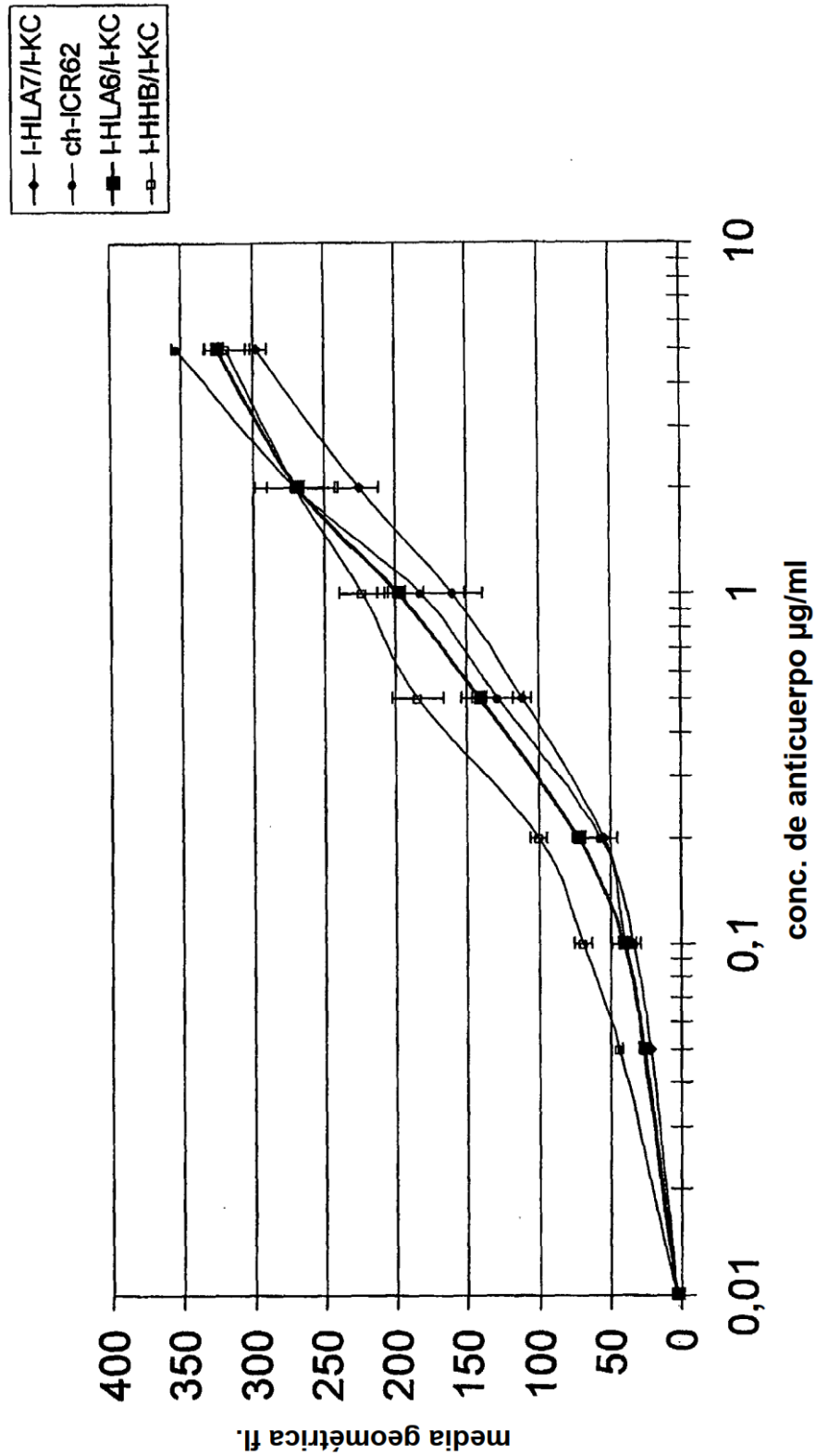


Figura 7

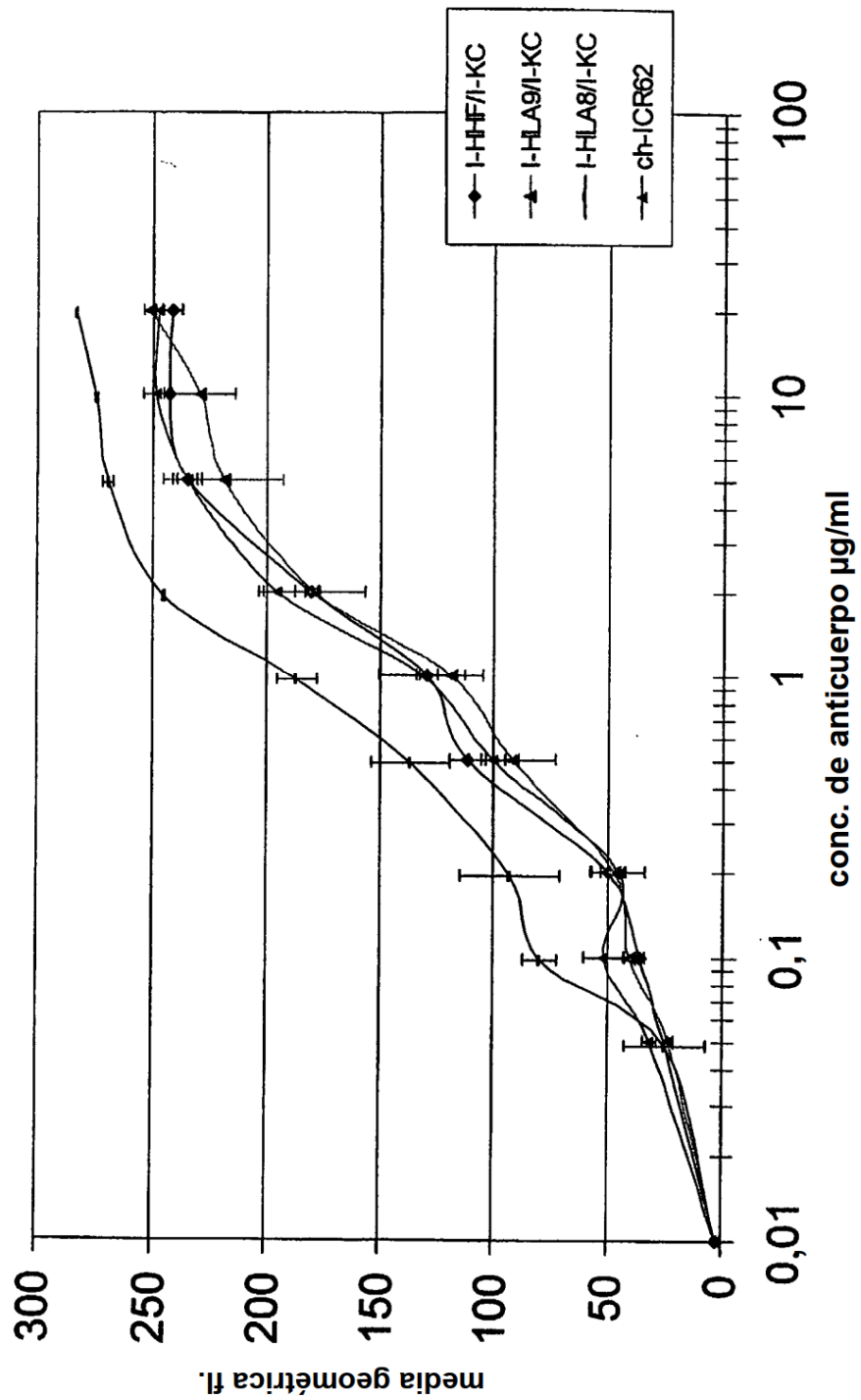


Figura 8

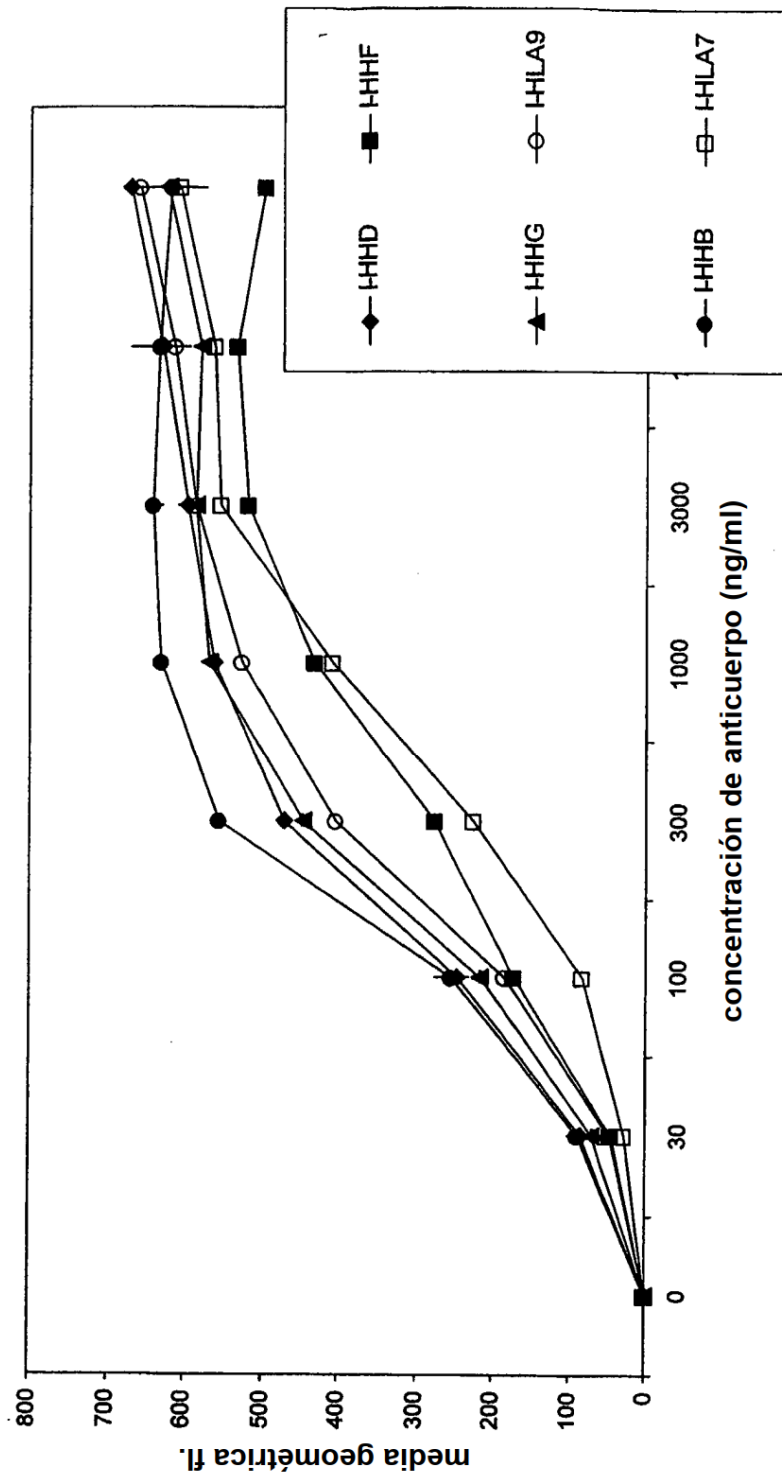
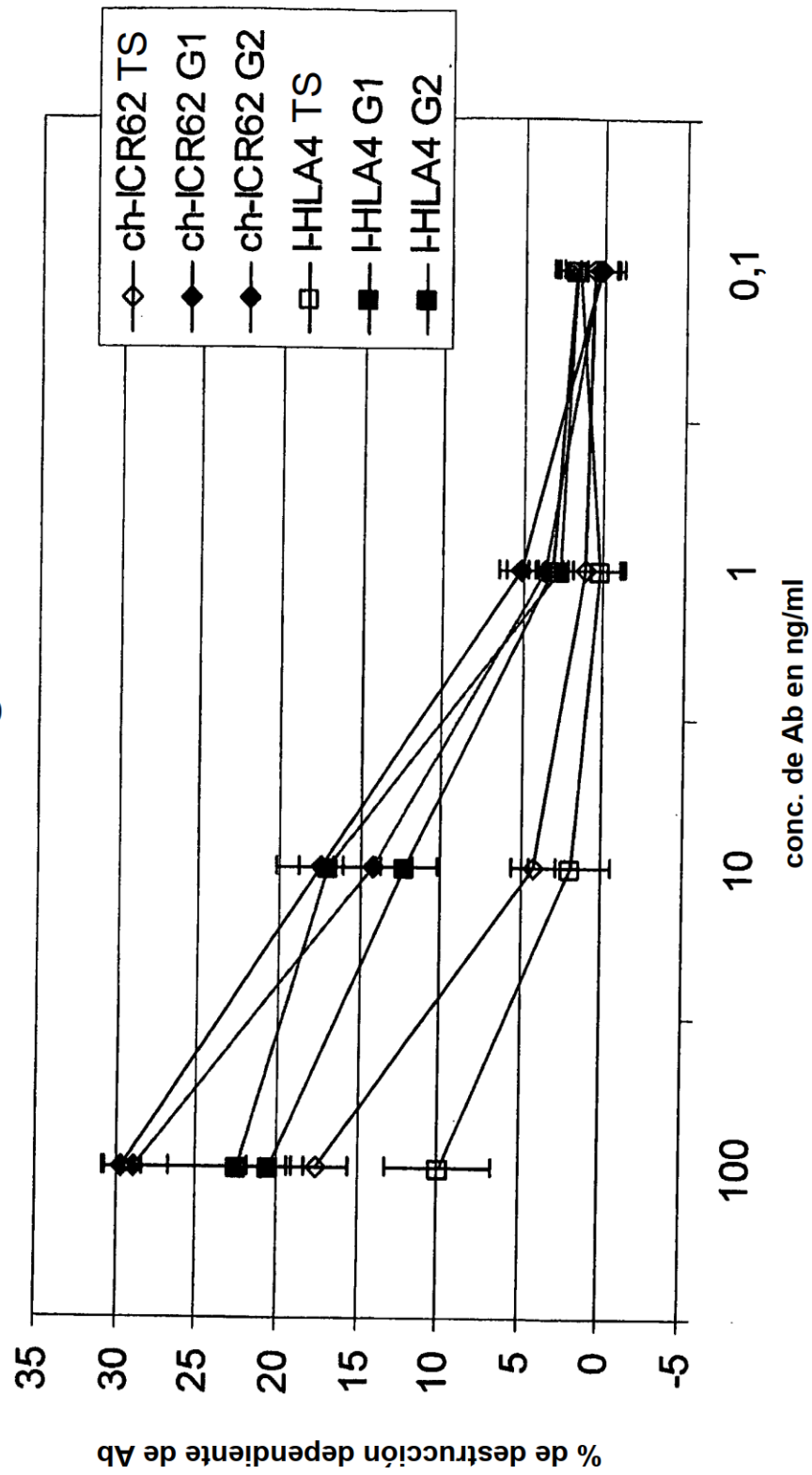
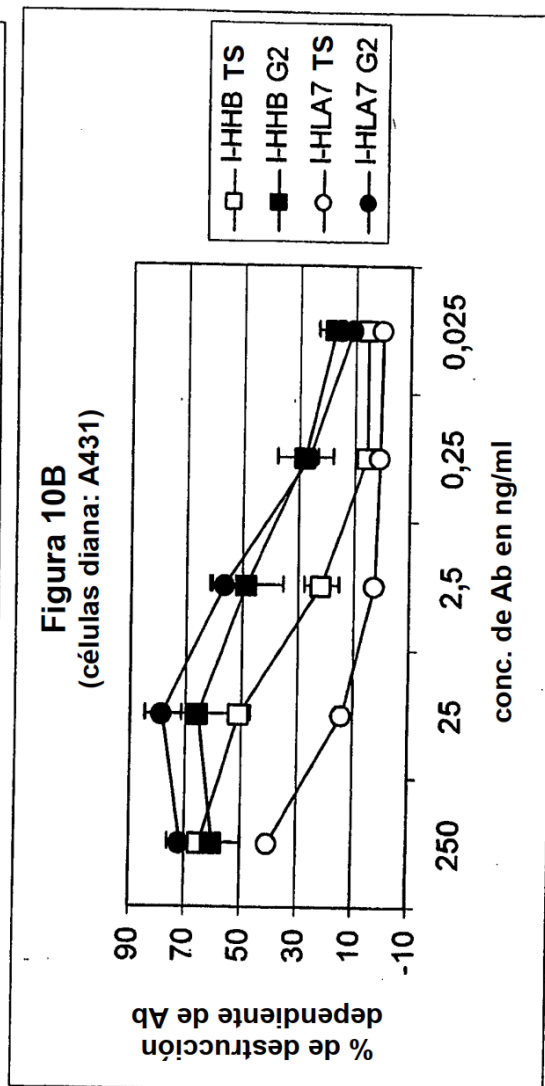
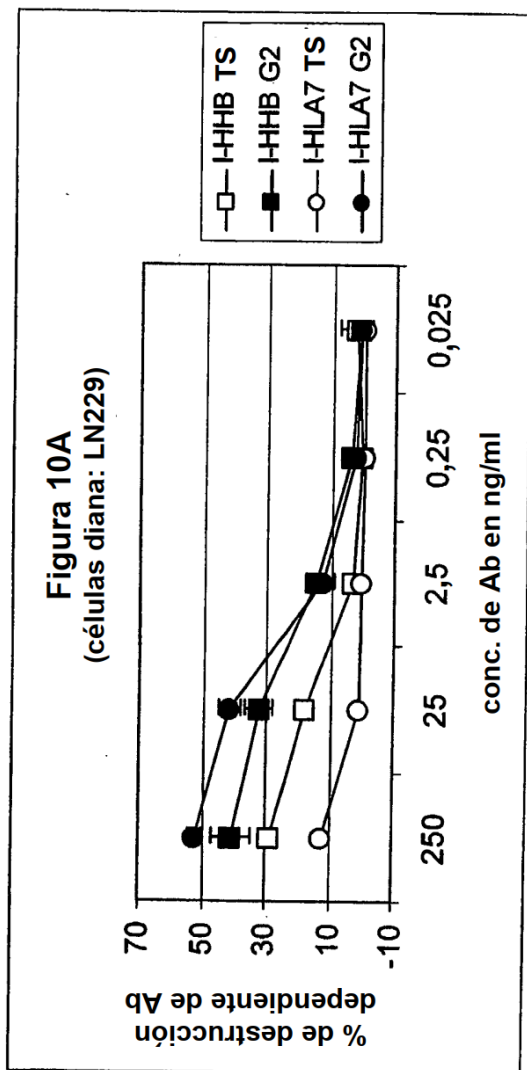


Figura 9





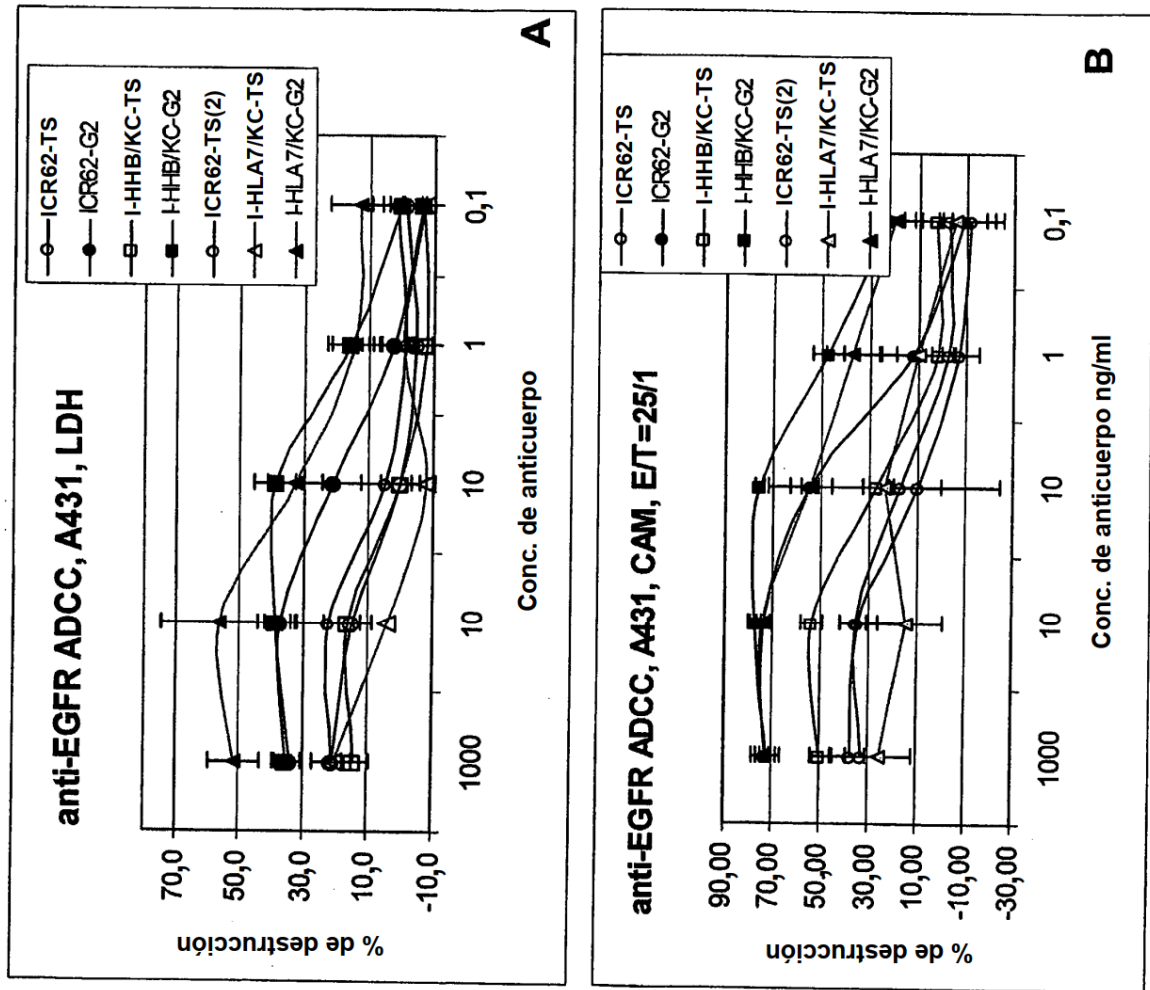


Figura 11

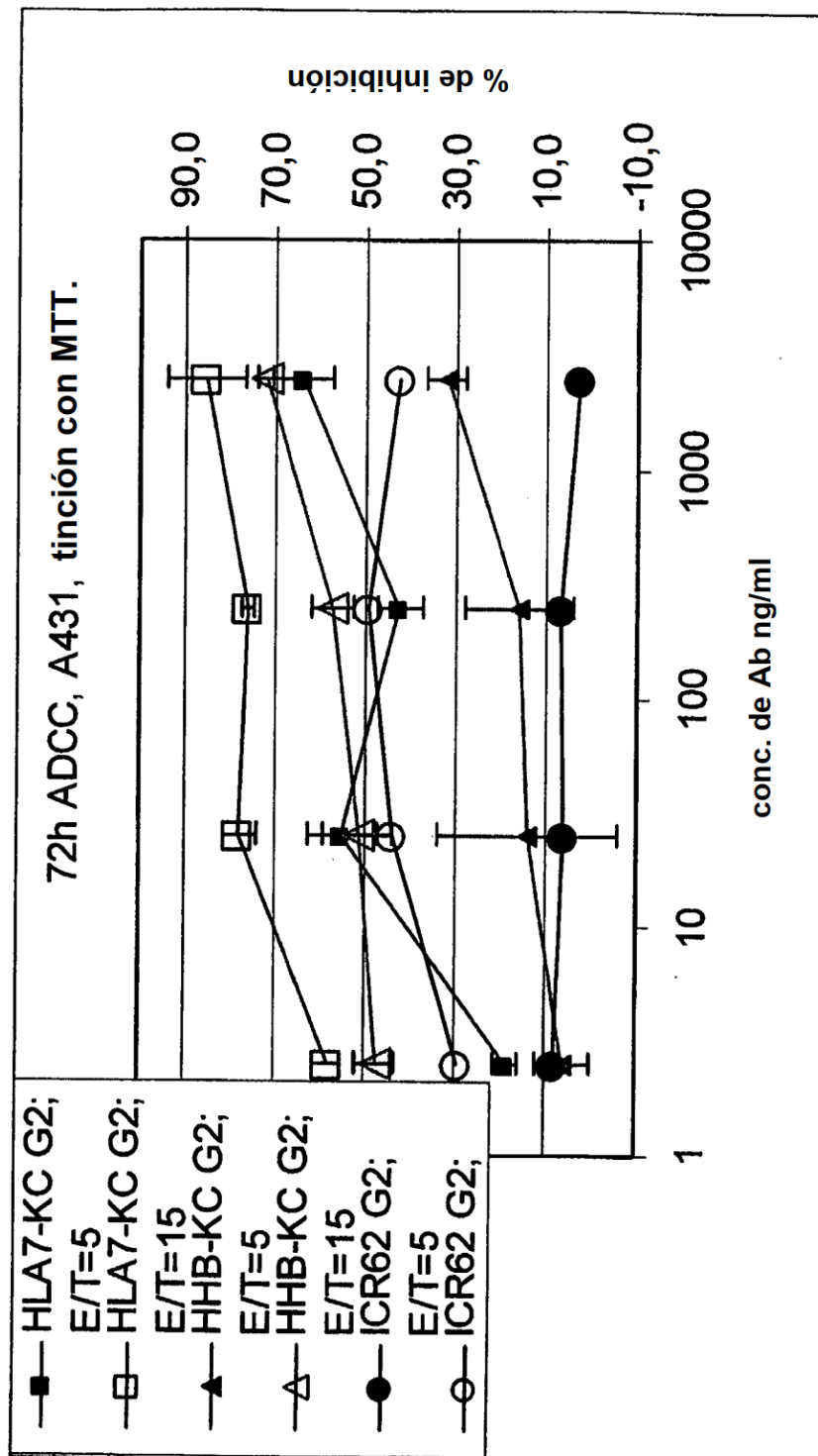


Figura 12

ICR62-VH	1 QVNLQSGAALVKPGASVKLSCKGSGFTFTDYKTHWVKQSHGKSLWIGYFNPNSGYSTYNEKFKATLTADKSTDTAYMELTSLTSED
I-HHA.pep	1 ..Q.V...EVK...S...V...A.....A.S..R.AP.QG..M.GI.....AQ..QGRV.I.....S.....S..R...
I-HHB.pep	1 ..Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S..R...
I-HHC.pep	1 ..Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S..R...
I-HHD.pep	1 ..Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....RV.I.....S.....S..R...
I-HHE.pep	1 ..Q.V...EVK...S...V...A.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S..R...
I-HHF.pep	1 ..Q.V...EVK...S...V.....S..R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S..R...
I-HHG.pep	1 ..Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....N.AQ..QGRV.I.....S.....S..R...
I-HLA.pep	1 ..Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....A..AQ..QGRV.I.....S.....S..R...
I-HLB.pep	1 ..Q.V...EVK...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....AQ..QGRV.M...T.IS...SR.R.D.
I-HLC.pep	1 ..Q.V...EVK...V.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.M...T.IS...SR.R.D.
I-HLA1.pep	1 ..Q.V...EVK...V...A.....YM..R.AP.QG..M.....RV.M...T.IS...SR.R.D.
I-HLA2.pep	1 ..Q.V...EVK...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA3.pep	1 ..Q.V...EVK...V...A...Y...YM..R.AP.QG..M.WI.....QGV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA4.pep	1 ..Q.V...EVK...V...A...Y...YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA5.pep	1 ..MQ.V...PEVK...T...V...A...Y...YM..R.AP.QG..M.WI.....QGV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA6.pep	1 ..MQ.V...PEVK...T...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA7.pep	1 ..MQ.V...PEVK...T...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....QGV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA8.pep	1 ..MQ.V...PEVK...T...V...A.....R.AR.QR.....QGV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA9.pep	1 E.Q.V...EVK...E.L.I.....YS.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S..R...
I-HLA10.pep	1 E.Q.V...EVK...E.L.I.....YS.....R.MP..G..M.....SPS.QGV.IS...IS...LQWS..KAS.
ICR62-VH-ts	91 SATYYCTRLSPGGYYVMDAWGQGSATVSS
I-HHA.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHB.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHC.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHD.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHE.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHF.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHG.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLA.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLB.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLC.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLA1.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA2.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA3.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA4.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA5.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA6.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA7.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA8.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLA9.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLA10.pep	91 T.M...A.....TT.....

Figura 13

FcgammaRIIIa – ensayo de unión de Fc usando células CHO
que presentan FcgammaRIIIa humano recombinante

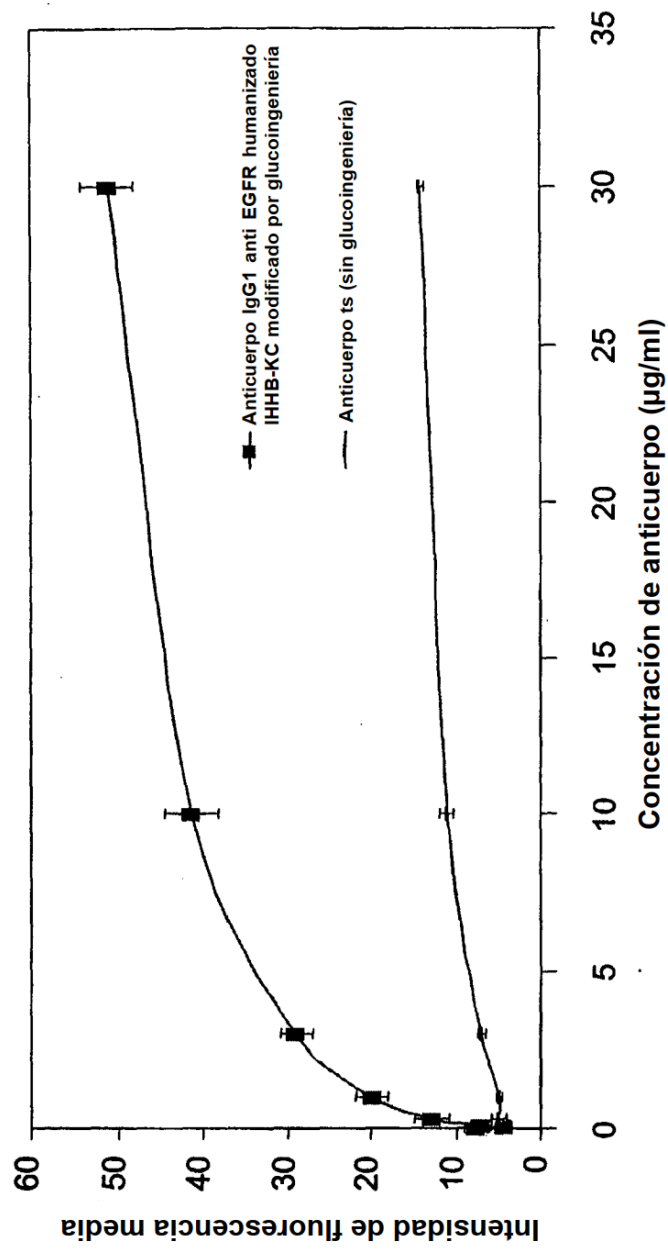


Figura 14

Figura 15

Perfil de oligosacáridos MALDI/TOF-MS para anticuerpo IgG1 anti EGFR humanizado modificado por glucoingeniería IHHB-KC.

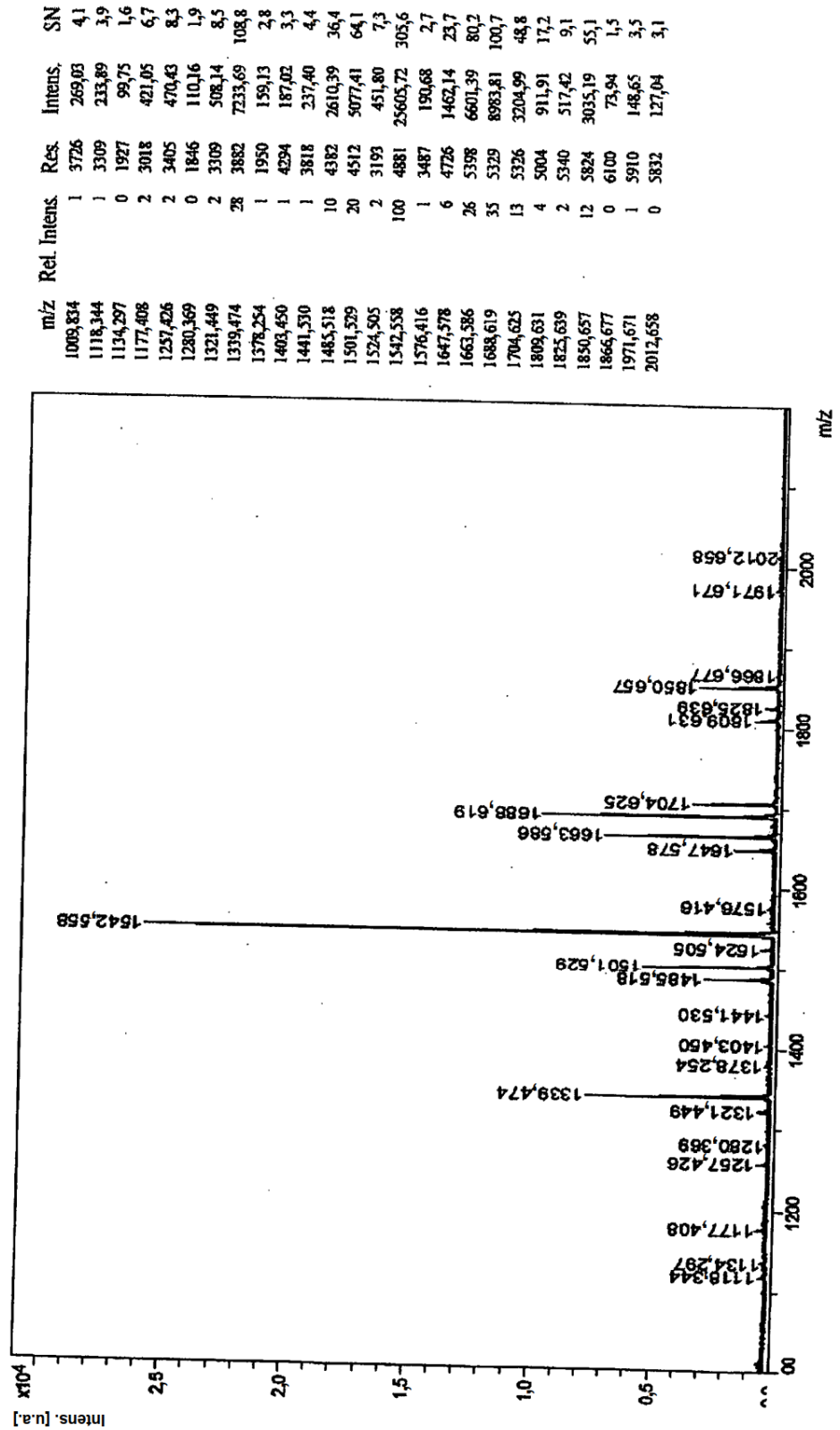


FIGURA 16
PERFIL DE PRECISI3N ANTI EGFR

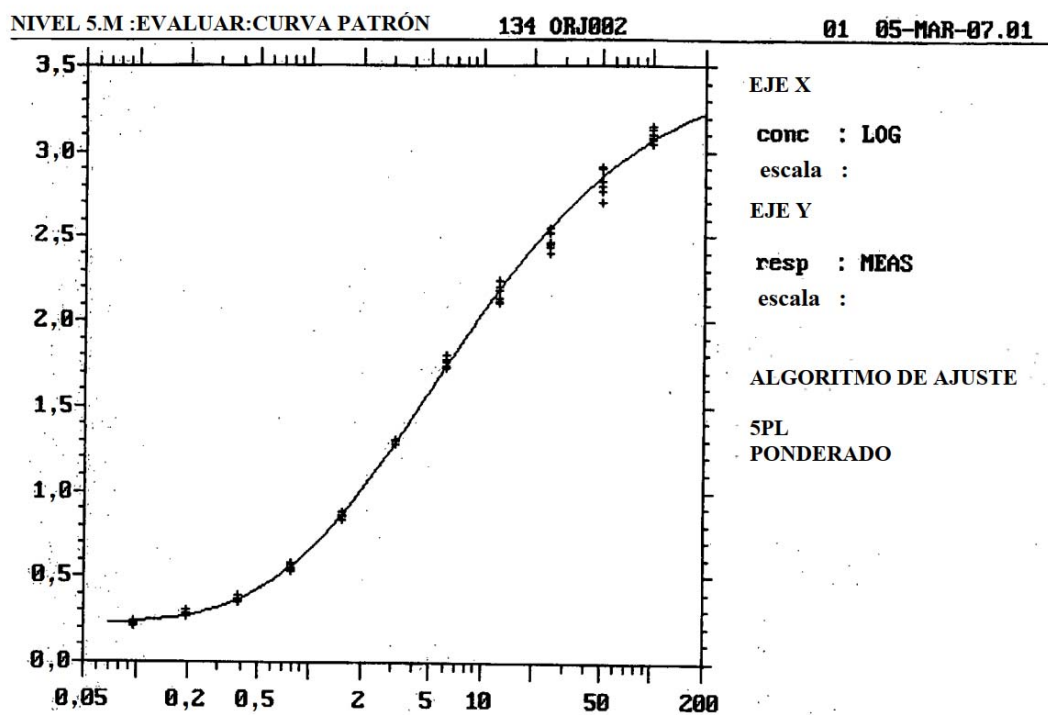


FIGURA 17

CURVA DE CALIBRACIÓN ANTI EGFR REPRESENTATIVA

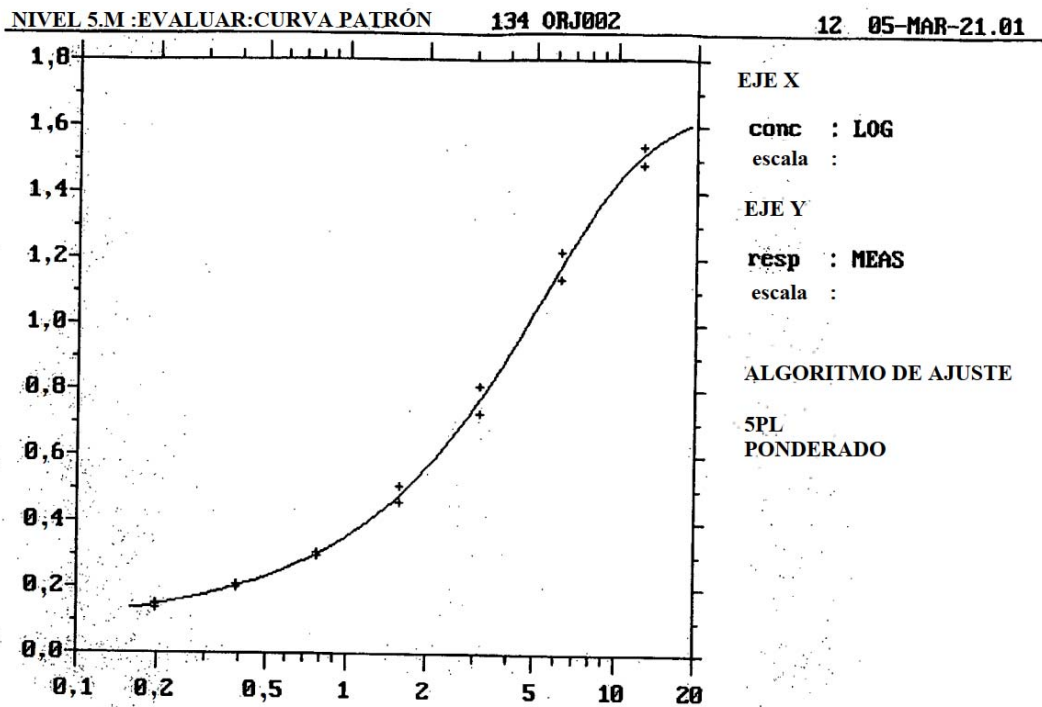


Figura 18

**Concentraciones en suero de anti EGFR el día 1 de administración intravenosa
semanal de anti EGFR a monos cynomolgus machos**

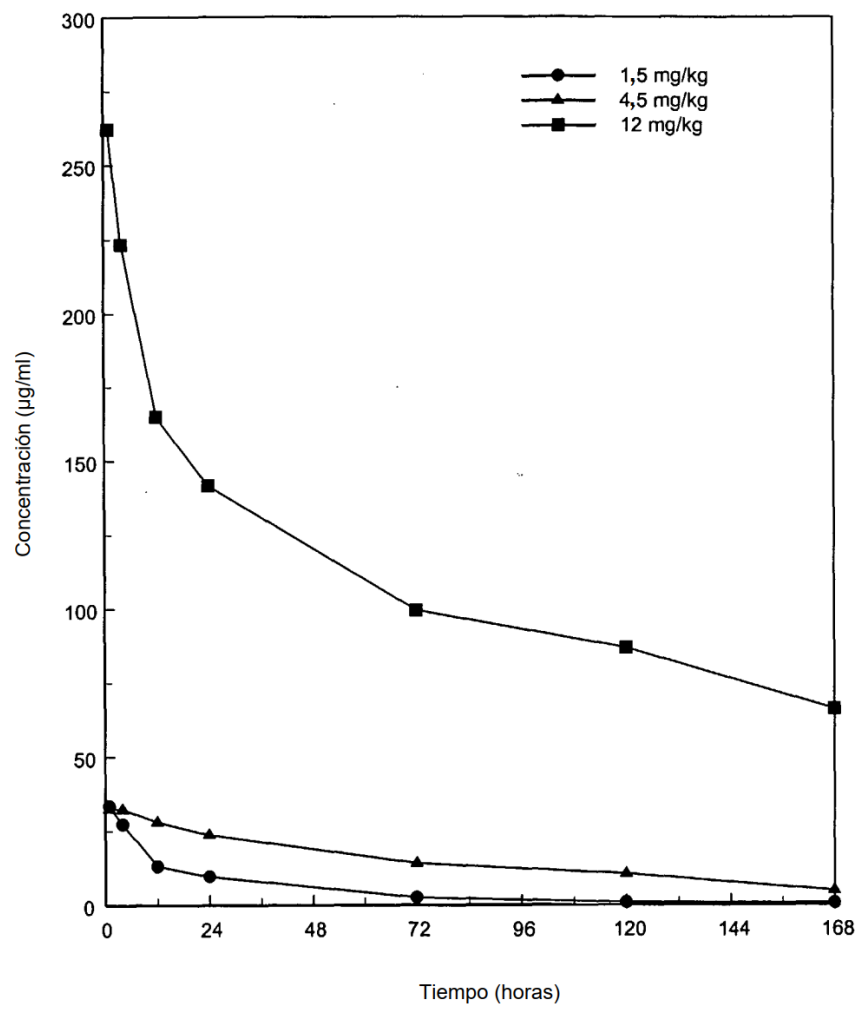


Figura 19

**Concentraciones en suero de anti EGFR el día 1 de administración intravenosa
semanal de anti EGFR a monos cynomolgus hembras**

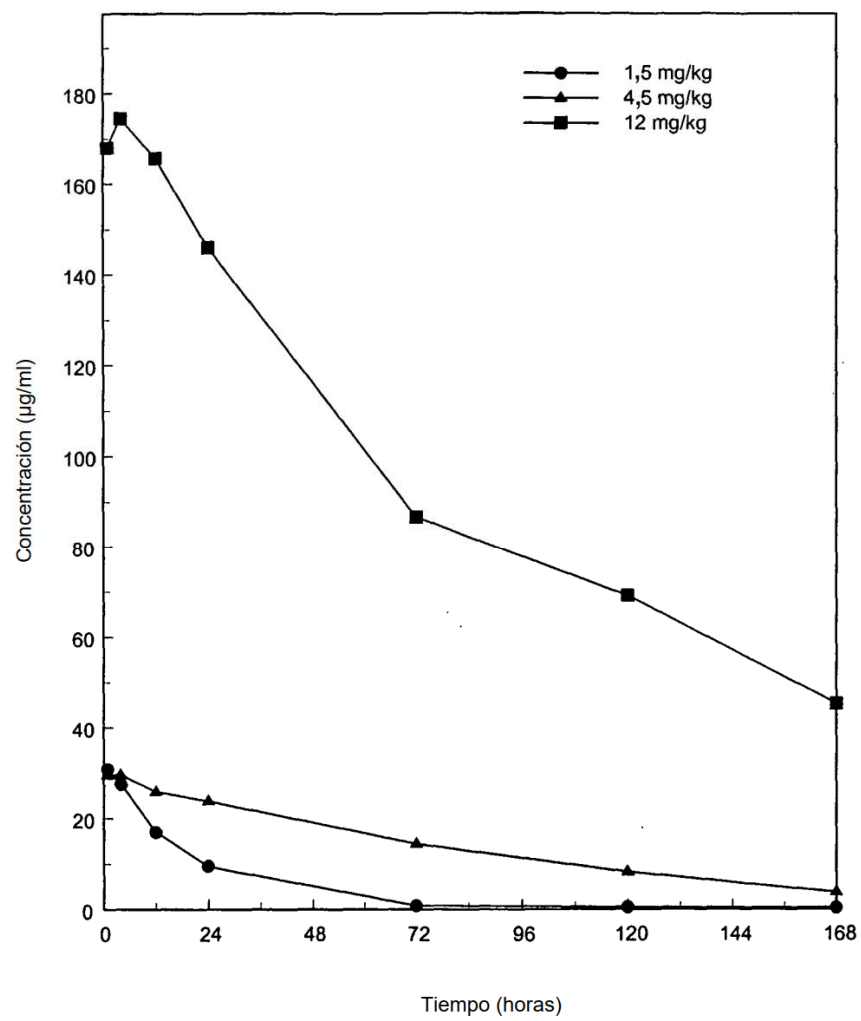


Figura 20
Relación entre áreas bajo las curvas de concentración/tiempo anti EGFR en suero (ABC_{168}) y nivel de dosis el día 1 de administración intravenosa semanal de anti EGFR a monos cynomolgus

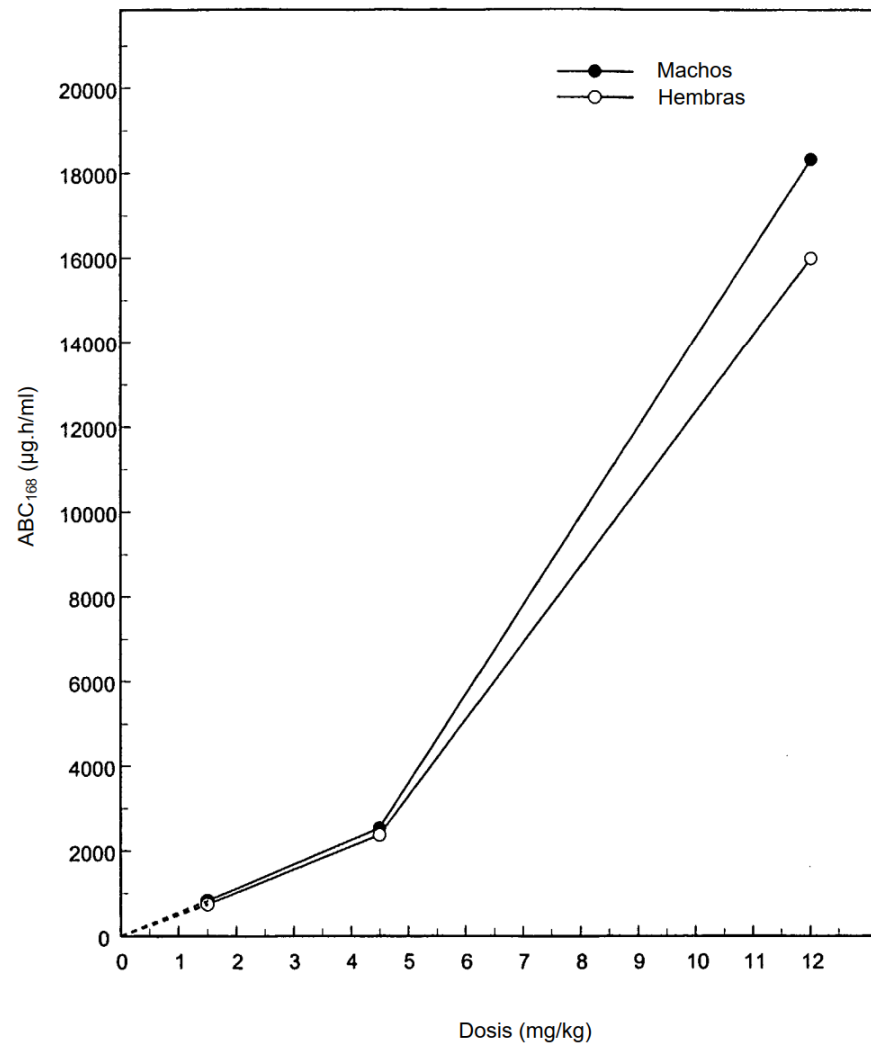


Figura 21

**Concentraciones en suero de anti EGFR durante administración intravenosa
semanal de anti EGFR a monos cynomolgus machos**

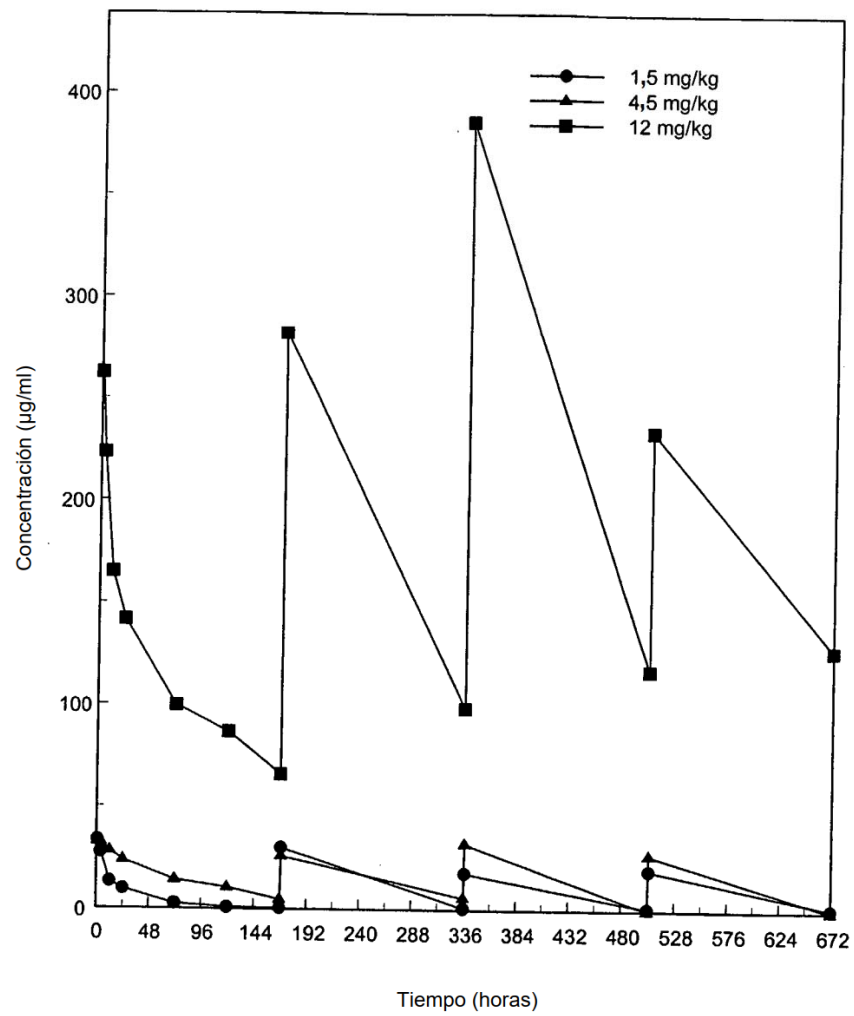


Figura 22
Concentraciones en suero de anti EGFR durante administración intravenosa semanal de anti EGFR a monos cynomolgus hembras

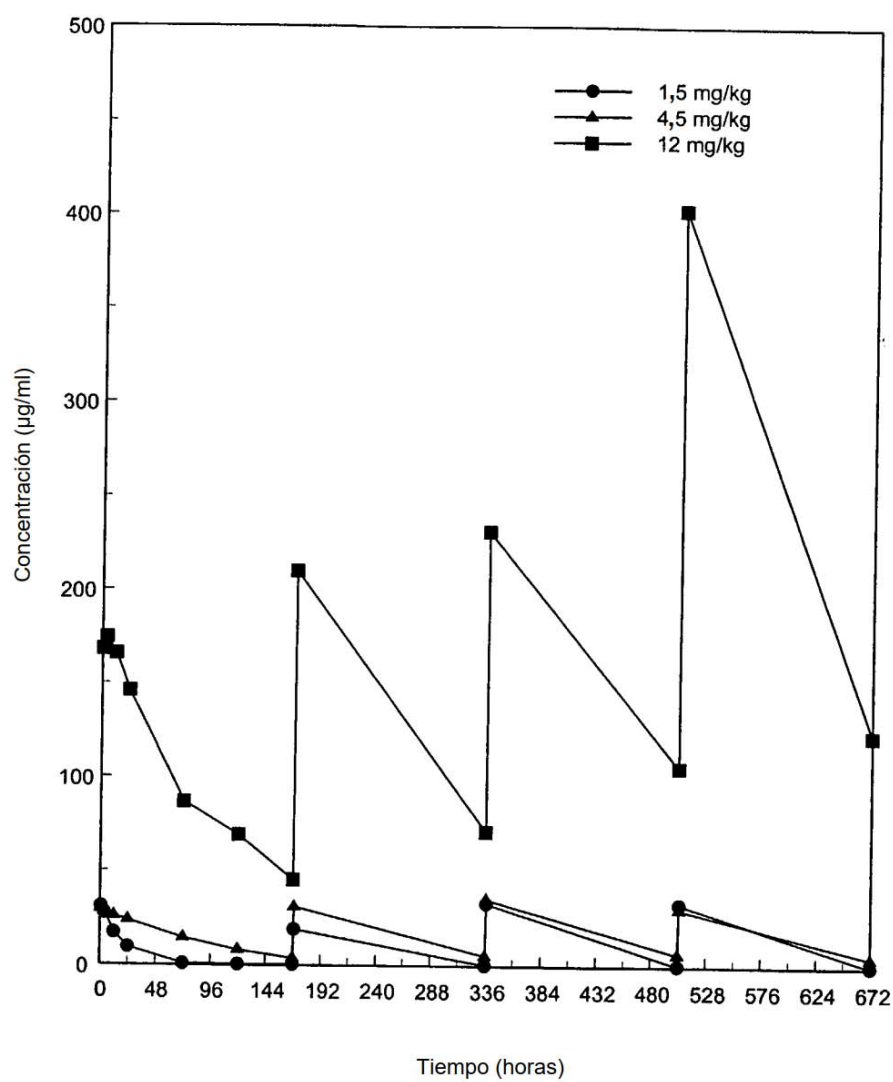


Figura 23

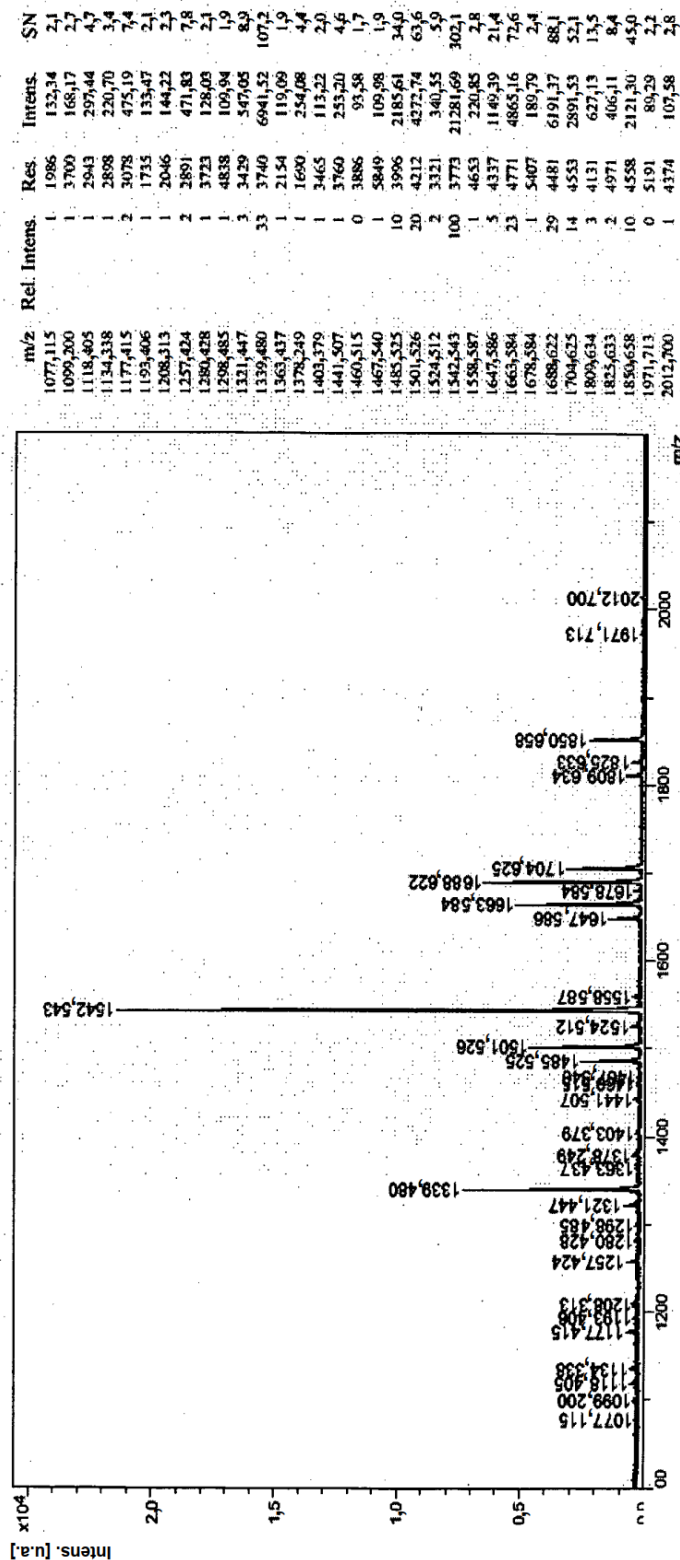


Figura 24

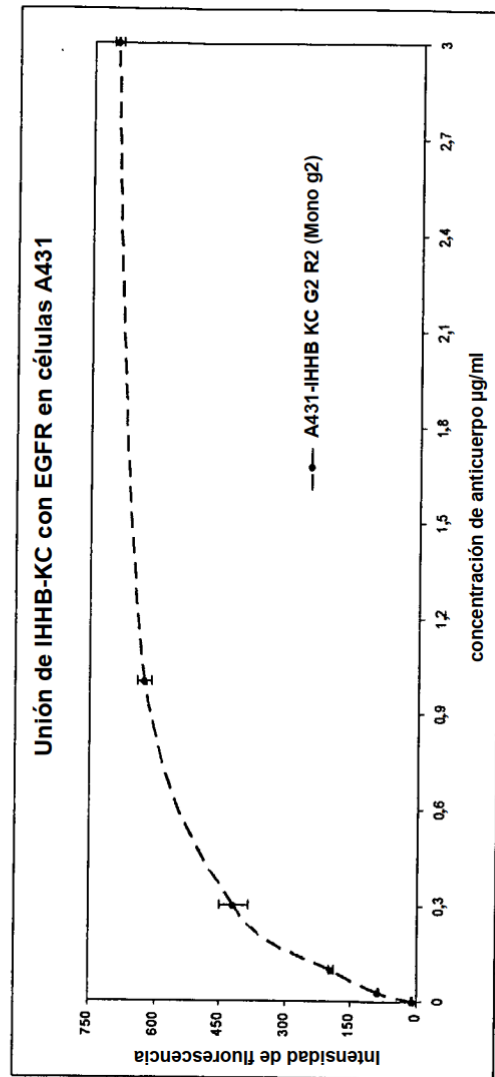


Figura 25

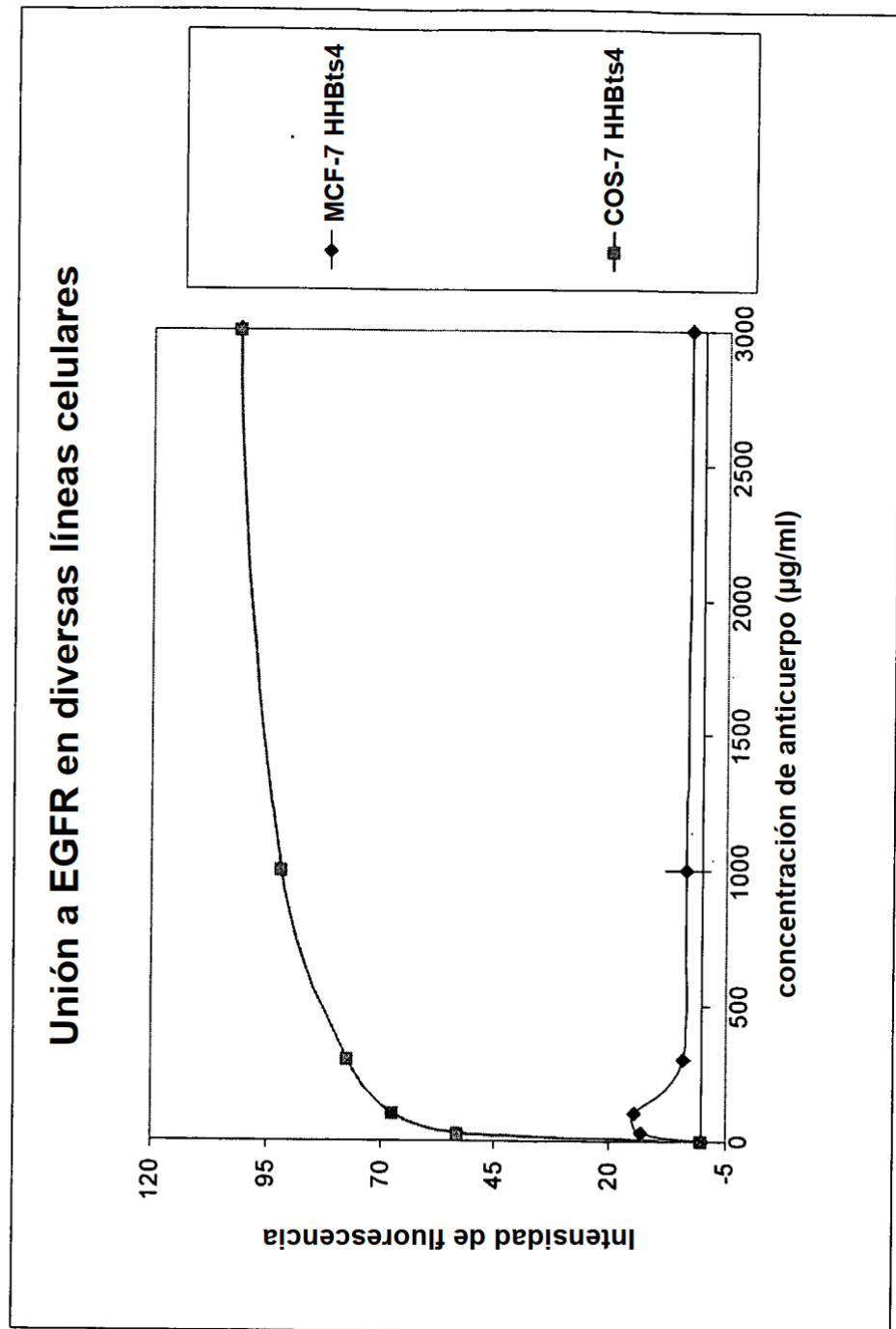


Figura 26

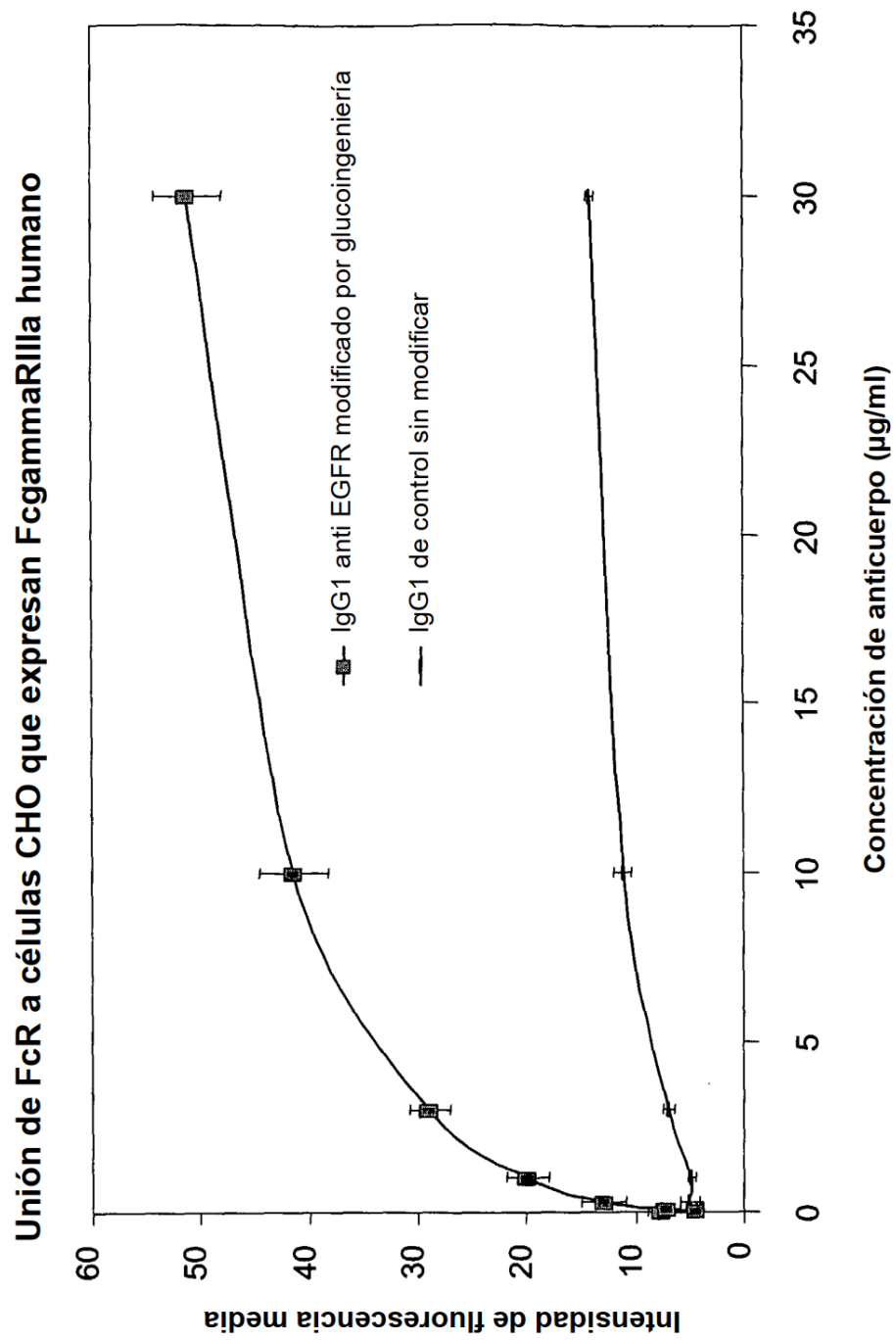


Figura 27

Ensayo de ADCC de 4 h usando células diana (T) A-549.
ADCC medida por el método basado en la liberación de LDH.
PBMC humanas efectoras (E). relación E:T = 25:1

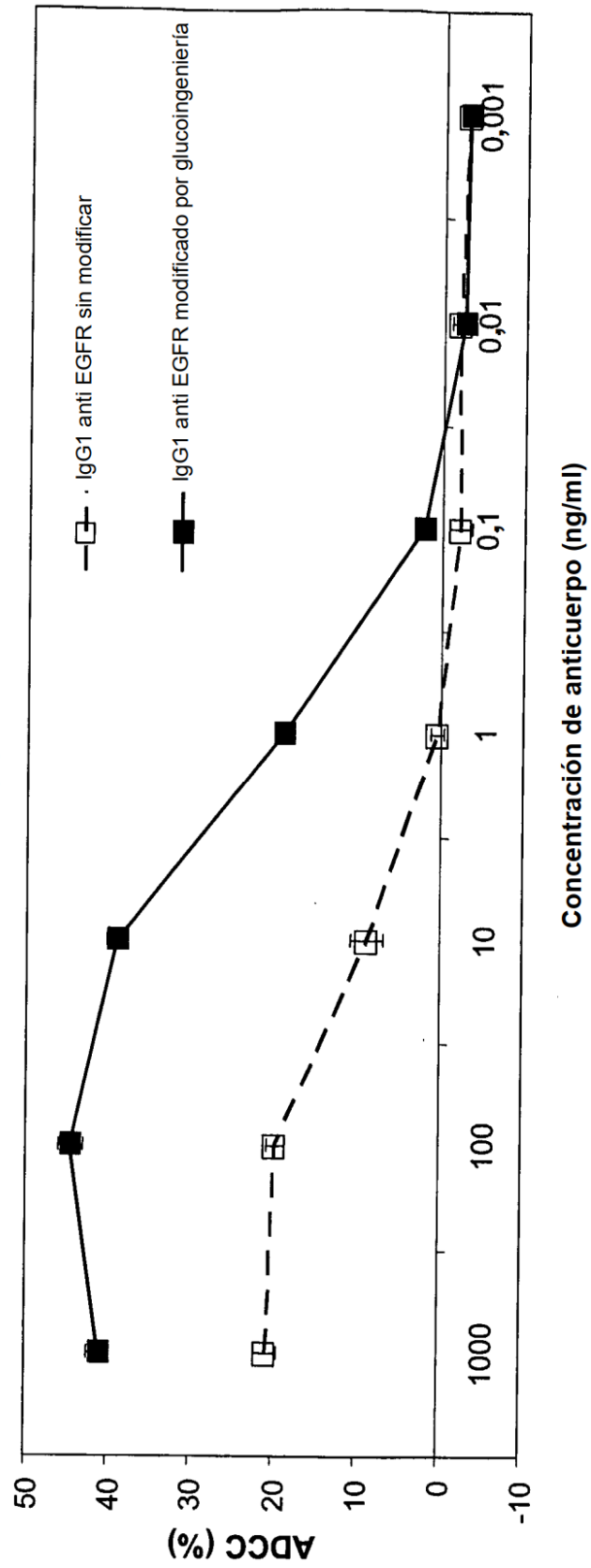


Figura 28

Ensayo de ADCC de 4 h usando células diana (T) CYNOM-K1.
ADCC medida por el método basado en la liberación de LDH.
PBMC humanas efectoras (E). relación E:T = 25:1

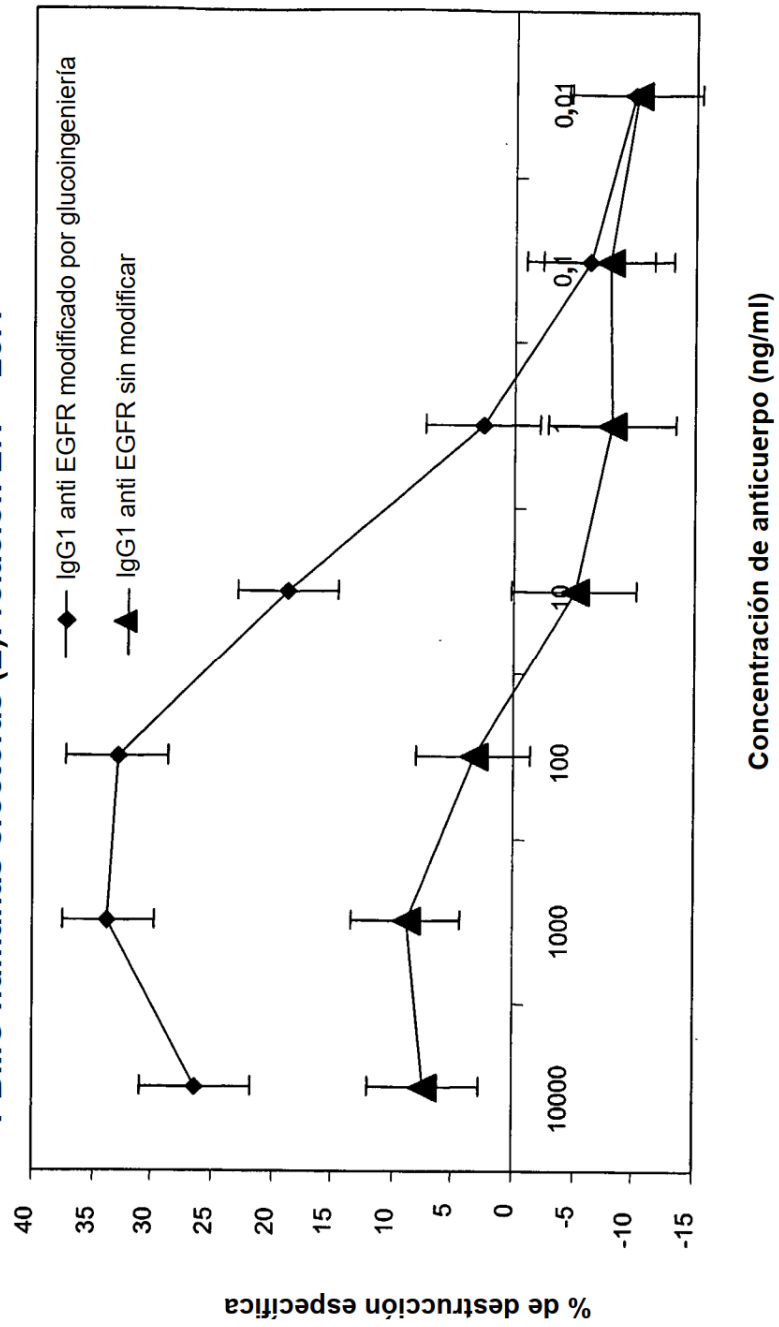


FIG. 29

Unión dirigida a EGFR con células diana A431

