(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 779 974**

(51) Int. Cl.:

A61K 41/00	(2010.01)
A61K 47/68	(2007.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
C12N 15/70	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015** **PCT/FI2015/050422**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015** **WO15189477**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015** **E 15734421 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020** **EP 3154587**

(54) Título: **Conjugados que comprenden un anticuerpo anti-egfr1**

(30) Prioridad:

13.06.2014 FI 20145552
20.02.2015 FI 20155114

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.08.2020

(73) Titular/es:

TENBORON OY (100.0%)
Viikinkaari 6
00790 Helsinki, FI

(72) Inventor/es:

LEPPÄNEN, ANNE;
EKHOLM, FILIP S.;
HELIN, JARI;
SALO, HANNA y
KANERVA, ANNE

(74) Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 779 974 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

Conjugados que comprenden un anticuerpo anti-egfr1

Campo de la invención

La invención se refiere a un conjugado y a una composición farmacéutica.

Antecedentes de la invención

La terapia de captura de neutrones de boro (BNCT) es una forma de terapia no invasiva de tumores malignos, tales como los tumores cerebrales primarios y el cáncer de cabeza y cuello. En la BNCT, a un paciente se le inyecta un fármaco que tiene la capacidad de localizarse en el tumor y que porta átomos de boro-10 no radioactivos. Cuando el fármaco se irradia con neutrones térmicos de baja energía, se emiten partículas alfa biológicamente destructivas y núcleos de litio-7.

Para la BNCT se requieren fármacos tales como los conjugados que tienen un alto contenido de boro-10 y que son capaces de localizarse específicamente en el tumor. Tales conjugados deben producirse fácilmente, ser estables, solubles y seguros. Sin embargo, la provisión de tales conjugados es complicada, por ejemplo, porque algunos tipos de productos químicos no parecen funcionar con los compuestos que contienen boro-10.

El propósito de la presente invención es proporcionar conjugados que tienen propiedades mejoradas en comparación con los conjugados conocidos y que contienen un alto contenido de boro-10.

Barth y otros, Applied Radiation and Isotopes 2004, 61 (5), 899-903 evalúan el anticuerpo monoclonal cetuximab como un agente de suministro de boro para la terapia de captura de neutrones (NCT) de los tumores cerebrales.

Pettersson y otros, Journal of Immunological Methods 1990, 126 (1), 95-102, describen estudios de inmunorreactividad para dos anticuerpos monoclonales con dextrano-boro, anticuerpo anti proteína ácida fibrilar glial y anticuerpo anti-hialuronectina.

Gedda y otros, Bioconjugate Chemistry 1996, 7 (5), 584-591, describen el desarrollo de conjugados que comprenden EGF y BSH unidos covalentemente a cadenas de dextrano aliladas.

Resumen de la invención

El conjugado de acuerdo con la presente invención se caracteriza por lo que se presenta en la reivindicación 1.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se caracteriza por lo que se presenta en la reivindicación 13.

El conjugado o composición farmacéutica para usar como un medicamento, de acuerdo con la presente invención, se caracteriza por lo que se presenta en la reivindicación 14.

El conjugado o composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la presente invención se caracteriza por lo que se presenta en la reivindicación 15.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención y constituyen una parte de esta descripción, ilustran modalidades de la invención y, junto con la descripción, ayudan a explicar los principios de la invención. En los dibujos:

Figura 1. Espectro de RMN de protón de BSH-dextrano. Los protones unidos al boro resuenan entre 0,8-2,0 ppm, y la carga de boro de BSH-dextrano puede estimarse mediante la comparación de la integral de los protones de boro con respecto a la integral de los protones de dextrano. Los grupos alilo sin reaccionar producen señales a 4,22, 5,29, 5,39 y 5,99 ppm. La señal aguda a 2,225 ppm es acetona (estándar interno).

Figura 2. Análisis de filtración en gel de conjugados BSH-Dex.

A. Anti-EGFR1-Fab-BSH(800B)-Dex. El conjugado eluye a 7,8 mL cuando se analiza con la columna de filtración en gel Yarra SEC-3000. En comparación, el anti-EGFR1-Fab eluye a 9,1 mL. B. Anti-EGFR1-Fab2-BSH(800B)-Dex. El conjugado eluye a 6,9 mL cuando se analiza con la columna de filtración en gel Yarra SEC-3000. En comparación, el anti-EGFR1-Fab2 eluye a 8,4 mL.

Figura 3. Análisis SDS-PAGE de los conjugados de boro Fab/F(ab')2 anti-EGFR1 marcados con fluorescencia con diferentes cantidades de boro en condiciones no reductoras (panel A) y reductoras (panel B). Conjugados anti-EGFR1-Fab-BSH-Dex: Carril 1 (900B), carril 2 (700B), carril 4 (560B), carril 6 (360B). Conjugados anti-EGFR1-F(ab')2-BSH-Dex: Carril 3 (700B), carril 5 (560B), carril 7 (360B). El carril 8 es Anti-EGFR1-Fab-Dex y el carril 9 es un control que contiene una mezcla de anti-EGFR1-F(ab')2 y fragmentos Fc (en el gel los fragmentos Fab migran como fragmentos Fc). Tinción del gel con azul de Coomassie.

Figura 4. Unión a la superficie celular e internalización de anti-EGFR1-F(ab')2 (paneles A y C) y anti-EGFR1-F(ab')2-BSH (900B)-Dex (paneles B y D) marcados con fluorescencia, por células HSC-2. Las incubaciones se realizaron a +4 ºC (unión a la superficie celular) y a +37 ºC (unión a la superficie celular e internalización). El análisis se realizó por microscopía de fluorescencia.

Figura 5. Un ejemplo de la configuración del vector para la optimización del péptido señal. Promotor T5, sitios de unión a ribosomas (RBS), péptidos señal y secuencias identificadas de las cadenas pesadas y ligeras del Fab anti-EGFR1.

Figura 6. Resultados de la optimización del promotor para la expresión del Fab. Se prepararon cultivos de expresión de 10 mL en medio LB líquido con W3110 pGF119 (A) o BL21(De3) pGF121 (B). Los cultivos posteriores a la inducción se cultivaron durante toda la noche a +20 °C, se cosecharon muestras de 1 mL y las extracciones periplásmicas se siguieron mediante detección por transferencia Western. 1) cepa de fondo sin el vector de expresión; 2) W3110 pGF119 clon # 1; 3) W3110 pGF119 clon # 2; 4) W3110 pGF119 clon # 3; C) 250 ng del Fab control.

Figura 7. Resultados de la optimización del promotor para la expresión del Fab. Se prepararon cultivos de expresión de 10 mL en medio LB líquido con W3110 pGF132 en tres temperaturas diferentes después de la inducción; A) +20 ˚C; B) +28 ˚C y C) +37 ˚C. Se usaron diferentes concentraciones de ramnosa para la inducción: 1) rha 0; 2) rha 0,25 mM; 3) rha 1 mM; 4) rha 4 mM; 5) rha 8 mM. C = 100 ng del fab control. Los cultivos posteriores a la inducción se cultivaron 4 horas a las temperaturas indicadas, se cosecharon muestras de 1 mL y se realizaron extracciones periplásmicas seguidas de la detección por transferencia Western.

Figura 8. Comparación de la configuración de promotor dicistrónico con respecto a la configuración dual. pGF119 y pGF121 son dicistrónicos, pGF120 y pGF131 son vectores con promotores duales. 1) control no inducido 2) W3110 pGF119#1 3) W3110 pGF119#2 4) W3110 pGF120 no inducido 5) W3110 pGF120#1 6) W3110 pGF120#2 7) Lemo21(De3) pGF131#1 8) Lemo21(De3) pGF131#2 9) Lemo21(De3) pGF121#1 10) BL21(De3) pGF131#1 11) BL21(De3) pGF131#2 C) 100 ng del fab control.

Figura 9. Expresión del Fab anti-EGFR1 en *E. coli* Lemo21(De3) y BL21(De3) con chaperonas periplásmicas SKP (pGF134) y SKP/FkpA (pGF135). Los cultivos de Lemo21(De3) se realizaron mediante el uso de la característica de la cepa incorporada, que permite la regulación precisa con ramnosa. Carril 1) Lemo21(De3) pGF131 2) Lemo21(De3) pGF131 pGF134 3) Lemo21(De3) pGF131 pGF135 4) BL21(De3) pGF131 5) BL21(De3) pGF131 pGF134 6) BL21(De3) pGF131 pGF135 C) control Fab 100 ng. A +28 °C con 250 uM de ramnosa, Lemo21(De3) pGF131 pGF134 y – pGF135 (carriles 2 y 3) produjeron una cantidad claramente aumentada del Fab anti-EGFR1 en comparación con Lemo21(De3) pGF131 (carril 1). En +20 °C, BL21(De3) pGF131 pGF134 y – pGF135 (carriles 5 y 6) produjeron una cantidad claramente aumentada del Fab anti-EGFR1 en comparación con BL21(De3) pGF131 (carril 4).

Figura 10. Análisis de Transferencia Western del Fab anti-EGFR1 expresado en el periplasma. Carril 1) Marcador de Peso Molecular; Carril 2) proteína control Fab anti-EGFR1, 100 ng; Carril 3) Vacío; Carril 4) muestra de pellet de células de preinducción; Carril 5) muestra de pellet de células 4 horas después de la inducción; Carril 6) muestra de pellet de células 16 horas después de la inducción; Carriles 7-9) Vacío; Carril 10) muestra de sobrenadante de cultivo de preinducción; Carril 11) muestra de sobrenadante de cultivo 4 horas después de la inducción; Carril 12) muestra de sobrenadante de cultivo 16 horas después de la inducción. Todas las muestras representaron 10 µl del cultivo de suspensión del fermentador. La concentración del Fab anti-EGFR1 en el extracto periplásmico de células de *E. coli* cultivadas en fermentador se estimó mediante la comparación de la intensidad de las bandas en la muestra de pellet de células 16 horas después de la inducción (Carril 6) con la intensidad de la banda del Fab anti-EGR1 control en el carril 2 (100 ng). Se estimó que el carril 6 contenía 300 ng del Fab anti-EGR1: 300 ng/10 µL = 30 mg/L.

Figura 11. Cromatograma de extracto periplásmico purificado por HiTrap SP FF. Las fracciones A5-A10 se agruparon para etapas de purificación adicionales.

Figura 12. Cromatograma de la muestra de purificada por Proteína L. Las fracciones A5-A7 se agruparon.

Figura 13. Análisis de SDS-PAGE del Fab anti-EGFR1 purificado. Las muestras se cargaron en cantidades iguales (24 µL). Carril 1) Marcador de Peso Molecular; Carril 2) Fab anti-EGFR1 derivado de la digestión con papaína; Carril 3) 10 % de la muestra del Fab producido en *E. coli*; Carril 4) 40 % de la muestra del Fab producido en *E. coli*. En los carriles 3 y 4 se separaron las bandas LC (superior) y HC (inferior). En el carril 2, el Fab está glicosilado y LC y HC no pueden separarse.

Figura 14. Unión del Fab anti-EGFR1 (panel superior) o Fab BSH-dextrano (panel inferior) al EGFR1 en portaobjetos de microarreglos.

Descripción detallada

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para usar en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. La presente invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, y al menos un derivado del dextrano, en donde

el derivado del dextrano comprende al menos una unidad D-glucopiranosilo, en donde al menos un carbono seleccionado del carbono 2, 3 o 4 de la al menos una unidad D-glucopiranosilo se sustituye por un sustituyente de la fórmula

$-O-(CH_2)_n-S-B_{12}H_{11}^{2-}$

en donde n está en el rango de 3 a 10; y

el derivado del dextrano se une al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, a través de un enlace formado por una reacción entre al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano y un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

El conjugado es adecuado para usar en la terapia de captura de neutrones de boro. La "terapia de captura de neutrones de boro" (BNCT) debe entenderse como una radioterapia dirigida, en donde el boro-10 no radiactivo se irradia con neutrones térmicos de baja energía para producir partículas alfa biológicamente destructivas y núcleos de litio-7. El boro-10 no radioactivo puede dirigirse mediante su incorporación en un fármaco de localización tumoral tal como un conjugado de localización tumoral.

"EGFR1" en la presente descripción debe entenderse que se refiere al receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR1) que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1.

Debe entenderse que "anticuerpo anti-EGFR1" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al EGFR1. El término "unión específica" se refiere a la capacidad del anticuerpo para discriminar entre el EGFR1 y cualquier otra proteína en la medida en que, a partir de un conjunto de una pluralidad de proteínas diferentes como posibles parejas de unión, solo el EGFR1 se une o se une significativamente. Como ejemplos solamente, las mediciones cinéticas y/o de unión específicas pueden analizarse, por ejemplo, mediante el uso de los métodos basados en resonancia de plasmón superficial en un equipo Biacore, mediante métodos inmunológicos tales como ELISA o, por ejemplo, microarreglos de proteínas.

Debe entenderse que "un fragmento de unión al EGFR1 de este" se refiere a cualquier fragmento de un anticuerpo anti-EGFR1 que es capaz de unirse específicamente al EGFR1.

En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR1 es cetuximab, imgatuzumab, matuzumab, nimotuzumab, necitumumab, panitumumab, o zalutumumab.

En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR1 es cetuximab.

En una modalidad, el cetuximab tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 2 y 3.

En una modalidad, el cetuximab comprende o consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 2 y 3.

En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR1 es nimotuzumab.

En una modalidad, el nimotuzumab tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 4 y 5.

En una modalidad, el nimotuzumab comprende o consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 4 y 5.

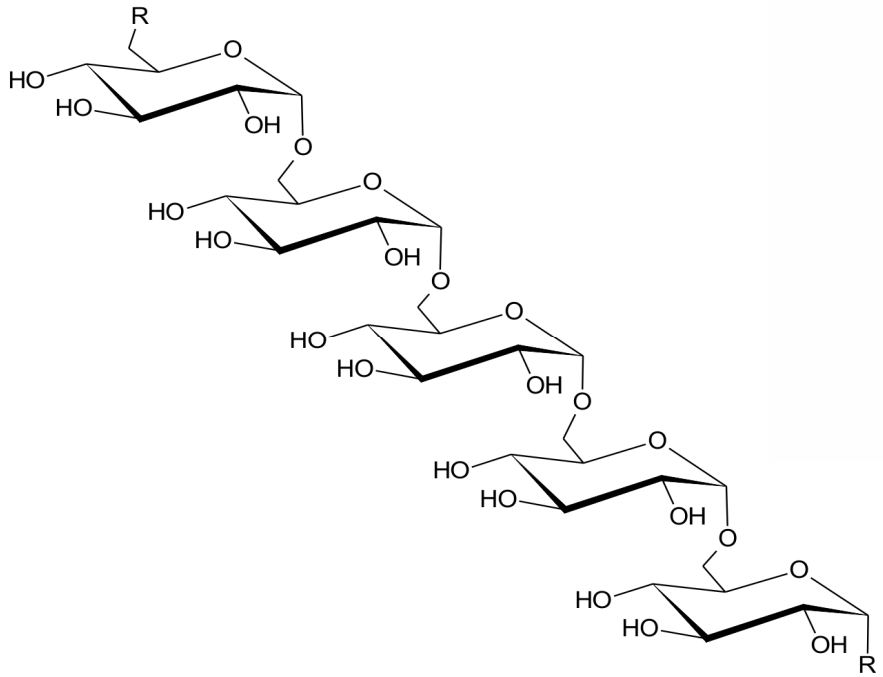
Un anticuerpo anti-EGFR1 puede ser, por ejemplo, un scFv, un anticuerpo de dominio único, un Fv, un anticuerpo VHH, un diacuerpo, un diacuerpo en tándem, un Fab, un Fab', un $F(ab')_2$, un Db, un dAb-Fc, un taFv, un scDb, un dAb_2, un DVD-Ig, un $Bs(scFv)_4$-IgG, un taFv-Fc, un scFv-Fc-scFv, un Db-Fc, un scDb-Fc, un scDb-C_H3, o un dAb-Fc-dAb. Además, el anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, puede estar presente en formas monovalentes monoespecíficas, multivalentes monoespecíficas, bivalentes monoespecíficas, o multivalentes multiespecíficas.

En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR1 es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. En este contexto, el término "anticuerpo humano", como se usa comúnmente en la técnica, debe entenderse que significa anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto el marco como las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se derivan de secuencias de origen humano. En este contexto, el término "anticuerpo humanizado", como se usa comúnmente en la técnica, debe entenderse que significa anticuerpos en donde los residuos de una CDR de un anticuerpo de origen humano se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (tales como ratón, rata o conejo) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad convenientes.

En una modalidad, el fragmento de anticuerpo anti-EGFR1 comprende un fragmento Fab de cetuximab. En una modalidad, el fragmento Fab anti-EGFR1 tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 6 y 3. En una modalidad, el fragmento Fab anti-EGFR1 comprende o consiste en una secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 6 y 3.

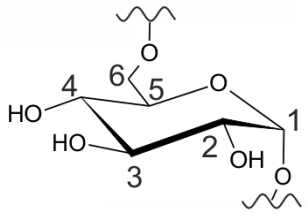
En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR1 comprende un fragmento F(ab')2 de cetuximab. En una modalidad, el fragmento F(ab')2 anti-EGFR1 tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 7 y 3. En una modalidad, el fragmento F(ab')2 anti-EGFR1 comprende o consiste en una secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 7 y 3.

Debe entenderse que "dextrano" se refiere a un glucano ramificado compuesto de cadenas de diferentes longitudes, en donde la cadena lineal consiste en enlaces glicosídicos α-1,6 entre las unidades de D-glucopiranosilo. Las ramificaciones se unen mediante enlaces glicosídicos α-1,3 y, en menor medida, mediante enlaces glicosídicos α-1,2 y/o α-1,4. Una porción de una cadena lineal de una molécula de dextrano se representa en la representación esquemática más abajo.



Debe entenderse que "unidad de D-glucopiranosilo" se refiere a una sola molécula de D-glucopiranosilo. Por lo tanto, dextrano comprende una pluralidad de unidades de D-glucopiranosilo. En el dextrano, cada unidad de D-glucopiranosilo se une al menos a otra unidad de D-glucopiranosilo a través de un enlace glicosídico α-1,6, a través de un enlace glicosídico α-1,3 o a través de ambos.

Cada unidad de D-glucopiranosilo del dextrano comprende 6 átomos de carbono, que se enumeran del 1 al 6 en la representación esquemática más abajo. La representación esquemática muestra una sola unidad de D-glucopiranosilo unida a otras dos unidades de D-glucopiranosilo (no mostradas) a través de enlaces glicosídicos α-1,6.



Los carbonos 2, 3 y 4 pueden contener grupos hidroxilo libres. En las unidades de D-glucopiranosilo unidas a una segunda unidad de D-glucopiranosilo a través de un enlace glicosídico α-1,3, en donde el carbono 3 de la unidad de D-glucopiranosilo se une mediante un enlace éter al carbono 1 de la segunda unidad de D-glucopiranosilo, los carbonos 2 y 4 pueden sustituirse por grupos hidroxilo libres. En las unidades D-glucopiranosilo unidas a una segunda unidad D-glucopiranosilo a través de un enlace glicosídico α-1,2 o α-1,4, en donde el carbono 2 o 4 de la unidad D-glucopiranosilo se une a través de un enlace éter al carbono 1 de la segunda unidad de D-glucopiranosilo, los carbonos 3 y 4 o 2 y 3, respectivamente, pueden sustituirse por grupos hidroxilo libres.

La nomenclatura de los carbohidratos está esencialmente de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión IUPAC-IUB de Nomenclatura Bioquímica (por ejemplo, Carbohydrate Res. 1998, 312, 167; Carbohydrate Res. 1997, 297, 1; Eur. J. Biochem. 1998, 257, 293).

El término "derivado del dextrano" debe entenderse como que se refiere al dextrano, en donde al menos un carbono seleccionado del carbono 2, 3 o 4 de la al menos una unidad D-glucopiranosilo se sustituye por un sustituyente de la fórmula

$-O-(CH_2)_n-S-B_{12}H_{11}^{2-}$

en donde n está en el rango de 3 a 10; y

el derivado del dextrano se une al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, a través de un enlace formado por una reacción entre al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano y un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este. El derivado del dextrano puede contener otras modificaciones de la estructura básica del dextrano, por ejemplo, como se describe más abajo.

Debe entenderse que “BSH”, “$B_{12}H_{11}$-SH” y “$Na_2B_{12}H_{11}SH$” se refieren al borocaptato de sodio, conocido además como mercaptododecaborato de sodio y sulfuro de hidruro de boro. “$B_{12}H_{11}^{2-}$” se refiere, por lo tanto, a la porción hidruro de boro del BSH.

Uno o más, es decir, uno, dos o tres carbonos seleccionados de los carbonos 2, 3 y 4 de la al menos una unidad D-glucopiranosilo pueden sustituirse por un sustituyente de la fórmula $-O-(CH_2)_n-S-B_{12}H_{11}^{2-}$.

En una modalidad, n es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una modalidad, n está en el rango de 3 a 4, o en el rango de 3 a 5, o en el rango de 3 a 6, o en el rango de 3 a 7, o en el rango de 3 a 8, o en el rango de 3 a 9.

Las unidades D-glucopiranosilo del dextrano pueden escindirse mediante la escisión oxidativa de un enlace entre dos carbonos adyacentes sustituidos por un grupo hidroxilo. La escisión oxidativa escinde dioles vecinales, es decir, unidades de D-glucopiranosilo en las que dos grupos hidroxilo (libres) ocupan posiciones vecinales. Las unidades de D-glucopiranosilo en las que los carbonos 2, 3 y 4 contienen grupos hidroxilo libres pueden dividirse oxidativamente entre los carbonos 2 y 3 o los carbonos 3 y 4. Por lo tanto, un enlace seleccionado del enlace entre los carbonos 2 y 3 y el enlace entre los carbonos 3 y 4 pueden escindirse oxidativamente. Las unidades D-glucopiranosilo del dextrano pueden escindirse por escisión oxidativa mediante el uso de un agente oxidante tal como el periodato de sodio, ácido periódico y acetato de plomo (IV), o cualquier otro agente oxidante capaz de escindir oxidativamente los dioles vecinales.

La escisión oxidativa de una unidad de D-glucopiranosilo forma dos grupos aldehído, un grupo aldehído en cada extremo de la cadena formado por la escisión oxidativa. En el conjugado, los grupos aldehído pueden ser, en principio, grupos aldehído libres. Sin embargo, la presencia de grupos aldehído libres en el conjugado es, típicamente, inconveniente. Por lo tanto, los grupos aldehído libres pueden estar protegidos o hacerse reaccionar con un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, o por ejemplo con una molécula de trazabilidad.

El derivado del dextrano se une al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, a través de un enlace formado por una reacción entre al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano y un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

El derivado del dextrano puede unirse, además, al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, a través de un grupo formado por una reacción entre al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano y un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

El grupo aldehído formado por escisión oxidativa reacciona fácilmente con un grupo amino en solución, tal como una solución acuosa. Sin embargo, el grupo o enlace resultante formado puede variar y no siempre puede predecirse y/o caracterizarse fácilmente. La reacción entre al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano y un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al

EGFR1 de este, puede resultar, por ejemplo, en la formación de una base de Schiff. Por lo tanto, el grupo a través del cual el derivado del dextrano se une al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, puede ser, por ejemplo, una base de Schiff (imina) o una base de Schiff reducida (amina secundaria).

En una modalidad, el derivado del dextrano tiene una masa molecular en el rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 2000 kDa. En este contexto, debe entenderse que la masa molecular del derivado del dextrano incluye la masa molecular del derivado del dextrano que contiene el dextrano y sus sustituyentes, pero no la masa molecular del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este. En una modalidad, el derivado del dextrano tiene una masa molecular en el rango de aproximadamente 30 a aproximadamente 300 kDa.

En una modalidad, el conjugado comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 300, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 150 sustituyentes de la fórmula $-O-(CH_2)_n-S-B_{12}H_{11}^{2-}$.

En una modalidad, el conjugado comprende aproximadamente 300 átomos de boro (300B), aproximadamente 800 átomos de boro (800B), aproximadamente 900 átomos de boro (900B), o aproximadamente 1200 átomos de boro. Por ejemplo, "900B" se refiere a un conjugado que porta por un mol de proteína un mol de dextrano, que transporta aproximadamente 900 moles de átomos de boro en moléculas BSH.

El anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, contiene típicamente, al menos un grupo amino, tal como un grupo amino N-terminal y/o el grupo amino de un residuo de lisina.

En una modalidad, el grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, es el grupo amino de un residuo de lisina del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

En una modalidad, el conjugado comprende, además, al menos una molécula de trazabilidad unida al derivado del dextrano o al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

"Molécula de trazabilidad" se refiere a una molécula detectable. Tal molécula detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, tal como ^{14}C, un compuesto que comprende un radioisótopo, un radionúclido, un compuesto que comprende un radionúclido, una molécula marcadora fluorescente (tal como FITC, TRITC, los colorantes Alexa y Cy, etcétera), un quelante, tal como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), o una molécula activa de MRI, tal como gadolinio-DTPA (pentacetato de gadolinio-dietilentriamina). Los procedimientos para lograr la unión de la molécula de trazabilidad al derivado del dextrano o al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, son bien conocidos en la técnica. Una molécula de trazabilidad puede permitir localizar el conjugado después de que se haya administrado a un paciente y de dirigirse a células específicas; de esta manera, es posible dirigir la irradiación de neutrones térmicos de baja energía a la localización del conjugado dirigido.

En una modalidad, la molécula de trazabilidad se une al derivado del dextrano a través de un enlace o un grupo formado por una reacción entre al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano y un grupo de la molécula de trazabilidad. Un grupo adecuado de la molécula de trazabilidad puede ser, por ejemplo, un grupo amino.

Es posible que uno o más grupos aldehído formados por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano no reaccionen con un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, o con una molécula de trazabilidad.

En una modalidad, el derivado del dextrano comprende al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano que está protegido.

El al menos un grupo aldehído puede protegerse por un grupo adecuado, tal como una base reducida de Schiff.

El al menos un grupo aldehído puede protegerse, además, por un grupo formado por una reacción entre el al menos un grupo aldehído y un agente de protección hidrófilo, tal como etanolamina, lisina, glicina o Tris.

En una modalidad, la etanolamina comprende ^{14}C.

La protección puede estabilizarse mediante el uso de un agente reductor, tal como $NaCNBH_3$. Por lo tanto, puede formarse un grupo de protección tal como una base de Schiff reducida.

En una modalidad, el derivado del dextrano comprende al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano que no reacciona con un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, o con una molécula de trazabilidad y la que está protegido.

En una modalidad, esencialmente todos los grupos aldehído formados por escisión oxidativa de una o más unidades D-glucopiranosilo del derivado del dextrano están protegidos.

En una modalidad, el derivado del dextrano comprende una pluralidad de grupos aldehído formados por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano, en donde esencialmente todos los grupos aldehído formados por escisión oxidativa de una o más unidades D-glucopiranosilo del derivado del dextrano están protegidos.

En una modalidad, al menos un carbono seleccionado del carbono 2, 3 o 4 de al menos una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano se sustituye por un sustituyente de la fórmula

$-O-(CH_2)_mCH=CH_2$

en donde m está en el rango de 1 a 8. Si bien tal modalidad es, típicamente, inconveniente, puede ocurrir como un producto secundario, cuando dicho sustituyente no ha reaccionado con BSH.

En una modalidad, el conjugado puede obtenerse mediante un método que comprende las etapas de:

a) alquenilar al menos un grupo hidroxilo del dextrano para obtener dextrano alquenilado;

b) hacer reaccionar borocaptato de sodio (BSH) con el dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) para obtener BSH-dextrano;

c) escindir oxidativamente al menos un residuo D-glucopiranosilo del BSH-dextrano de manera que se formen grupos aldehído;

d) hacer reaccionar el BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c) con un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, para obtener un conjugado.

La presente invención se refiere, además, a un conjugado que se obtiene mediante un método que comprende las etapas de:

a) alquenilar al menos un grupo hidroxilo del dextrano para obtener dextrano alquenilado;

b) hacer reaccionar borocaptato de sodio (BSH) con el dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) para obtener BSH-dextrano;

c) escindir oxidativamente al menos un residuo D-glucopiranosilo del BSH-dextrano de manera que se formen grupos aldehído;

d) hacer reaccionar el BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c) con un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, para obtener un conjugado.

En una modalidad, el dextrano tiene una masa molecular en el rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 2000 kDa, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 kDa, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 kDa. El dextrano que tiene una masa molecular en dicho rango debe entenderse que se refiere al dextrano que no se ha sometido a las etapas a)-d).

En este contexto, el término "alquenilación" o "alquenilante" debe entenderse que se refiere a la transferencia de un grupo alquenilo a una unidad D-glucopiranosilo del dextrano para dar un éter alquenílico. En otras palabras, al menos un grupo hidroxilo de la unidad D-glucopiranosilo del dextrano se convierte en un grupo alqueniloxi.

En la etapa a), uno o más de los grupos hidroxilo unidos a los carbonos 2, 3 o 4 de al menos una unidad D-glucopiranosilo del dextrano pueden reaccionar en la reacción de alquenilación. Una o más, o una pluralidad, de unidades de D-glucopiranosilo del dextrano pueden estar alqueniladas.

En una modalidad, el dextrano se alquenila en la etapa a) mediante el uso de un agente alquenilante, en donde el agente alquenilante tiene una estructura de acuerdo con la fórmula

$X-(CH_2)_mCH=CH_2$

en donde m está en el rango de 1 a 8, y X es Br, Cl, o I.

En una modalidad, m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En una modalidad, m está en el rango de 1 a 2, o en el rango de 1 a 3, o en el rango de 1 a 4, o en el rango de 1 a 5, o en el rango de 1 a 6, o en el rango de 1 a 7.

En una modalidad, el agente alquenilante es bromuro de alilo.

En una modalidad, al menos un carbono seleccionado del carbono 2, 3 o 4 de al menos una unidad D-glucopiranosilo del dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) se sustituye por un sustituyente de la fórmula

$-O-(CH_2)_mCH=CH_2$,

en donde m está en el rango de 1 a 8.

En una modalidad, m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En una modalidad, m está en el rango de 1 a 2, o en el rango de 1 a 3, o en el rango de 1 a 4, o en el rango de 1 a 5, o en el rango de 1 a 6, o en el rango de 1 a 7.

En la etapa b), el grupo sulfidrilo del BSH puede reaccionar con un grupo alquenilo del dextrano alquenilado para formar BSH-dextrano para dar un tioéter. Una o más moléculas de BSH pueden reaccionar con el dextrano alquenilado. Por lo tanto, el BSH-dextrano que se obtiene de la etapa b) puede contener una pluralidad de porciones BSH (es decir, grupos de la fórmula $-S-B_{12}H_{11}^{2-}$). Los grupos sulfidrilo del BSH pueden reaccionar con grupos alquenilo de una sola unidad D-glucopiranosilo alquenilada que contiene más de un grupo alquenilo o con grupos alquenilo de dos o más unidades D-glucopiranosilo alqueniladas.

Por lo tanto, el BSH-dextrano que se obtiene de la etapa b) puede ser un derivado del dextrano en el que al menos un carbono seleccionado del carbono 2, 3 o 4 de la al menos una unidad D-glucopiranosilo se sustituye por un sustituyente de la fórmula

$-O-(CH_2)_n-S-B_{12}H_{11}^{2-}$

en donde n está en el rango de 3 a 10.

En una modalidad, el BSH-dextrano que se obtiene a partir de la etapa b) comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 o de aproximadamente 20 a 100 sustituyentes o de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 o de aproximadamente 20 a aproximadamente 150 de la fórmula $-O-(CH_2)_n-S-B_{12}H_{11}^{2-}$, en donde n está en el rango de 3 a 10.

En una modalidad, el BSH se hace reaccionar con el dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) en presencia de un iniciador radical en la etapa b). El iniciador radical es capaz de catalizar la reacción entre el grupo o los grupos sulfidrilo del BSH y con el grupo o los grupos alquenilo del dextrano alquenilado.

En este contexto, "iniciador radical" debe entenderse como un agente capaz de producir especies radicales en condiciones suaves y promover reacciones radicales. El término "iniciador radical" puede referirse, además, a la luz UV (ultravioleta). La irradiación con luz UV es capaz de generar radicales, por ejemplo, en presencia de un fotoiniciador adecuado. Los iniciadores radicales adecuados incluyen, pero no se limitan a, peróxidos inorgánicos tales como persulfato de amonio o persulfato de potasio, peróxidos orgánicos, y luz UV.

En una modalidad, el BSH se hace reaccionar con el dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) en presencia de un iniciador radical seleccionado del grupo que consiste en persulfato de amonio, persulfato de potasio y luz UV en la etapa b).

En la etapa b), la relación en peso o la relación molar del BSH con respecto al dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) puede seleccionarse adecuadamente para obtener conjugados en los que el número de porciones del BSH (es decir, el número de sustituyentes de la fórmula $-O-(CH_2)_n-S-B_{12}H_{11}^{2-}$) por porciones del dextrano (del derivado del dextrano) varía. El número de porciones del BSH por porciones del dextrano del BSH-dextrano puede medirse, por ejemplo, mediante resonancia magnética nuclear como se describió en el Ejemplo 2, o por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) como se describió en el Ejemplo 9.

En una modalidad, la relación del BSH con respecto al dextrano alquenilado presente en la etapa b) está en el rango de 1:5 a 2:1, o en el rango de 1:4 a 1:1 en peso, o en el rango de 1:2 a 3:4 en peso. Típicamente, cuanto mayor es la relación del BSH con respecto al dextrano alquenilado, mayor es el número de porciones del BSH por porciones del dextrano del BSH-dextrano.

La relación del iniciador radical, tal como el persulfato de amonio o el persulfato de potasio, puede variar, además, en la etapa b). En una modalidad, la relación del iniciador radical con respecto al BSH y/o al dextrano presente en la etapa b) está en el rango de 1:5 a 2:1, o en el rango de 1:4 a 1:1 en peso, o en el rango de 1:2 a 3:4 en peso.

En una modalidad, la relación del iniciador radical con respecto al dextrano alquenilado en la etapa b) está en el rango de 1:5 a 2:1, o en el rango de 1:4 a 1:1 en peso, o en el rango de 1:2 a 3:4 en peso.

Como se describió anteriormente, un enlace seleccionado del enlace entre los carbonos 2 y 3 y el enlace entre los carbonos 3 y 4 puede escindirse oxidativamente en la etapa c). En la escisión oxidativa, el anillo D-glucopiranosilo se abre entre dioles vecinales, dejando dos grupos aldehído. Los grupos aldehído del BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c) pueden reaccionar con un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión

al EGFR1 de este, para obtener un conjugado. Los grupos aldehído pueden reaccionar con un grupo adecuado tal como un grupo amino.

El al menos un residuo de D-glucopiranosilo del BSH-dextrano puede, en principio, escindirse oxidativamente mediante el uso de cualquier agente oxidante capaz de escindir oxidativamente la unidad de D-glucopiranosilo entre dos carbonos vecinales sustituidos por grupos hidroxilo libres. El agente oxidante puede seleccionarse, además, de manera que esencialmente escinde oxidativamente específicamente el al menos un residuo D-glucopiranosilo del BSH-dextrano. Tal agente oxidante puede no oxidar otros grupos o porciones del BSH-dextrano.

En una modalidad, el al menos un residuo D-glucopiranosilo del BSH-dextrano se escinde oxidativamente en la etapa c) mediante el uso de un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en periodato de sodio, ácido periódico y acetato de plomo (IV).

En una modalidad, el al menos un residuo de D-glucopiranosilo del BSH-dextrano se escinde oxidativamente en la etapa c) en una solución acuosa.

En una modalidad, el método comprende, además, la etapa de hacer reaccionar el BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c) o el conjugado que se obtiene de la etapa d) con una molécula de trazabilidad.

En este contexto, la molécula de trazabilidad puede ser cualquier molécula de trazabilidad descrita en este documento.

La molécula de trazabilidad puede reaccionar con al menos un grupo aldehído del BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c). Un grupo adecuado de la molécula de trazabilidad que puede reaccionar con el al menos un grupo aldehído puede ser, por ejemplo, un grupo amino.

En una modalidad, el método comprende, además, la etapa e) de proteger los grupos aldehído sin reaccionar del BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c) o el conjugado que se obtiene de la etapa d).

En una modalidad, los grupos aldehído sin reaccionar se protegen mediante el uso de un agente de protección hidrófilo, tal como etanolamina, lisina, glicina o Tris.

En una modalidad, el agente de protección hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en etanolamina, lisina, glicina y Tris.

En una modalidad, la etanolamina que comprende ^{14}C es una molécula de trazabilidad.

En una modalidad, una o más etapas seleccionadas de las etapas a), b), c) y d) se realizan en una solución acuosa. Una solución acuosa adecuada puede ser, por ejemplo, un tampón fosfato acuoso que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8.

En una modalidad, todas las etapas a)-d) se realizan en una solución acuosa.

El anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, contiene, típicamente, al menos un grupo amino, tal como el grupo amino N-terminal y/o el grupo amino de un residuo de lisina. En la etapa d), los grupos aldehído del BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c) pueden reaccionar, por lo tanto, con el al menos un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

En una modalidad, el grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, es el grupo amino de un residuo de lisina del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

En una modalidad, el BSH-dextrano escindido oxidativamente se hace reaccionar con el anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, mediante la incubación del BSH-dextrano escindido oxidativamente y el anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, a temperatura ambiente en tampón fosfato acuoso que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, en la etapa d).

El conjugado puede purificarse, por ejemplo, mediante filtración en gel, por ejemplo, como se describió en el Ejemplo 4.

Además, en la presente descripción se describe la producción de anticuerpos anti-EGFR1 o fragmentos de unión al EGFR1 de estos, en células huésped procariotas. En comparación con otros sistemas de producción de polipéptidos, las bacterias, particularmente *E. coli*, ofrecen muchas ventajas únicas. Las materias primas usadas (es decir, las células bacterianas) son económicas y fáciles de cultivar, lo que reduce el costo de los productos. Los huéspedes procariotas crecen mucho más rápido que, por ejemplo, las células de mamíferos, lo que permite un análisis más rápido de las manipulaciones genéticas. El tiempo de generación más corto y la facilidad del escalado, además, hacen que la fermentación bacteriana sea un medio más atractivo para la producción de proteínas en grandes cantidades. La estructura genómica y la actividad biológica de muchas especies bacterianas, que incluye *E. coli,* se han estudiado a

profundidad y existe una amplia gama de vectores adecuados disponibles, lo que hace que la expresión de un anticuerpo deseable sea más conveniente. La expresión de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en sistemas procariotas puede realizarse en diferentes escalas. Los cultivos en frascos de agitación (en el intervalo de 2-5 litros), típicamente, generan menos de 5 mg/litro de los productos (por ejemplo, fragmento de anticuerpo) mientras que pueden obtenerse escalas de 50-300 mg/litro en los sistemas de fermentación.

Además, las células huésped procariotas pueden permitir la producción de anticuerpos anti-EGFR aglicosilados o fragmentos de unión al EGFR1 de estos.

En una modalidad, la célula huésped procariota comprende uno o más polinucleótidos codificantes de

i) una región variable de la cadena ligera y

ii) una región variable de cadena pesada

de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este. El término "uno o más polinucleótidos" puede referirse a dos o más polinucleótidos o moléculas de polinucleótidos que pueden o no unirse covalentemente, directa o indirectamente a través de una o más secuencias. Por ejemplo, los dos o más polinucleótidos pueden estar comprendidos en un casete de expresión o en un vector. Los dos o más polinucleótidos pueden, como ejemplo, fusionarse, directa o indirectamente, para codificar una proteína de fusión que comprende tanto la región variable de la cadena ligera como la región variable de la cadena pesada. Además, pueden estar comprendidos en dos casetes o vectores de expresión separados. El término "uno o más polinucleótidos" puede referirse, además, a una única molécula de polinucleótido continua que comprende uno o más polinucleótidos o tramos de polinucleótidos codificantes de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

En una modalidad, la célula huésped comprende un polinucleótido de acuerdo con una o más modalidades descritas en esta descripción codificante de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este. La célula huésped puede comprender uno o más polinucleótidos que codifican colectivamente el anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante tal como un vector de expresión.

Puede usarse cualquiera de una variedad de células huésped procariotas.

En una modalidad, la célula huésped procariota es una célula de *E. coli*.

En una modalidad, el uno o más polinucleótidos codificantes de la región variable de la cadena ligera y de la región variable de la cadena pesada son optimizados por codones para la célula huésped, tal como una célula de *E. coli*.

En una modalidad, la célula huésped procariota comprende un único polinucleótido continuo codificante de la región variable de la cadena ligera y de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este. Tal polinucleótido continuo puede ser dicistrónico o policistrónico.

En una modalidad, la célula huésped procariota comprende un polinucleótido codificante de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, y otro polinucleótido codificante de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera está precedida por un péptido señal. Por lo tanto, el polinucleótido codifica el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena ligera. El péptido señal puede preceder inmediatamente a la región variable de la cadena ligera, o puede haber un tramo de secuencia entre el péptido señal y la región variable de la cadena ligera. El péptido señal puede seleccionarse del grupo que consiste en gIII, malE, phoA, ompA, pelB, stII, y stII. El péptido señal, además, puede seleccionarse del grupo que consiste en ompA, pelB, stII y stII. Estos péptidos señal pueden permitir rendimientos particularmente altos en la producción del anticuerpo o fragmento en una célula huésped procariota, tal como *E. coli*.

En una modalidad, la región variable de la cadena pesada está precedida por un péptido señal. El péptido señal puede seleccionarse del grupo que consiste en gIII, malE, phoA, ompA, pelB, stII, y stII. El péptido señal, además, puede seleccionarse del grupo que consiste en ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada están precedidas por un péptido señal.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera es diferente del péptido señal que precede a la región variable de la cadena pesada.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera y a la región variable de la cadena pesada se seleccionan independientemente del grupo que consiste en gIII, malE, phoA, ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera y a la región variable de la cadena pesada se seleccionan independientemente del grupo que consiste en ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera es el mismo que el péptido señal que precede a la región variable de la cadena pesada, y en donde el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en gIII, malE, phoA, ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera es el mismo que el péptido señal que precede a la región variable de la cadena pesada, y en donde el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera está precedida por el péptido señal pelB y la región variable de la cadena pesada está precedida por el péptido señal ompA.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada están precedidas por el péptido señal stII.

En una modalidad, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8 y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98, % o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 8, y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98, % o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, el polinucleótido codificante de una región variable de cadena ligera comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8 y el polinucleótido codificante de una región variable de la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, el polinucleótido codificante de una región variable de la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 8, y el polinucleótido codificante de una región variable de cadena pesada comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, la célula huésped procariota comprende uno o más polinucleótidos codificantes de

i) una cadena ligera y

ii) una cadena pesada de un fragmento de unión anti-EGFR1 de un anticuerpo.

En una modalidad, el uno o más polinucleótidos codifican un fragmento de unión anti-EGFR1 que es un Fab o un scFv.

En una modalidad, el polinucleótido codificante de la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10, y el polinucleótido codificante de la secuencia de cadena pesada comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad, el polinucleótido codificante de la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 10, y el polinucleótido codificante de la secuencia de la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad, el uno o más polinucleótidos comprenden o consisten en la secuencia de la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 10 y la secuencia de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad, el uno o más polinucleótidos comprenden o consisten en la secuencia de la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 10 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ

ID NO: 10, y la secuencia de la cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 11 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad, la célula huésped comprende un polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 12 .

En una modalidad, la célula huésped comprende un polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13 .

En una modalidad, la célula huésped comprende una proteína chaperona y/o uno o más polinucleótidos codificantes de una proteína chaperona. La proteína chaperona puede ser una proteína chaperona procariota, tal como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, FkpA y/o DsbG.

En una modalidad, la proteína chaperona se sobreexpresa en la célula huésped.

En una modalidad, la proteína chaperona es DsbA y/o DsbC.

En una modalidad, la proteína chaperona se selecciona del grupo que consiste en DnaK, DnaJ, GrpE, Skp, FkpA, GroEL, y GroES.

En una modalidad, la proteína chaperona es Skp.

El término "célula huésped procariota", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a una célula procariota que se ha alterado genéticamente, o que puede alterarse genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no solo a la célula sujeto particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias ambientales, tal progenie de hecho, puede no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance del término "célula huésped procariota" como se usa en la presente descripción.

Las células huésped procarióticas se transfectan y se transforman, preferentemente, con los polinucleótidos descritos anteriormente codificantes del anticuerpo anti-EGFR1 o los fragmentos de unión al EGFR1 de estos, por ejemplo, en vectores de expresión o clonación y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes codificantes del anticuerpo deseado o las secuencias de fragmentos de anticuerpos. Los promotores adecuados para usar con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotores de β-lactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac o el trc. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otras bacterias conocidas) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, lo que permite a un experto calificado ligarlas operativamente a cistrones codificantes de las cadenas ligeras y pesadas diana (Siebenlist y otros, (1980) Cell 20: 269) mediante el uso de conectores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción requerido.

En una modalidad, el uno o más polinucleótidos son conducidos por, es decir, unidos operativamente a, un promotor seleccionado independientemente del grupo que consiste en T7, T5, y Rham.

En una modalidad, uno o más polinucleótidos son conducidos por el promotor T7.Las células huésped procariotas usadas para producir los anticuerpos anti-EGFR1 o los fragmentos de unión al EGFR1 de estos, pueden cultivarse como se describe generalmente en el manual de laboratorio “Molecular Cloning” (Michael Green and Joseph Sambrook; cuarta edición; Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2012). Las células huésped procariotas adecuadas para expresar anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen Archaebacteria y Eubacteria, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (por ejemplo, *E. coli*), Bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacterias, especies de Pseudomonas (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, o Paracoccus. En una modalidad, se usan células gramnegativas. En una modalidad, las células de *E. coli* se usan como huéspedes como se describió en la presente descripción. Los ejemplos de cepas de E. coli incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; ATCC Deposito Núm. 27,325) y derivados de estas, que incluyen la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δomp TΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de los EE.UU. núm. 5 639 635) y las cepas 63C1 y 64B4. Además, son adecuadas otras cepas y derivados de estas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31 446), *E. coli* B, *E. coli*, 1776 (ATCC 31 537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31 608). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitativos. En general, puede ser necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la capacidad de replicación del replicón en las

células de una bacteria. Por ejemplo, las especies de *E. coli* pueden usarse adecuadamente como el huésped cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC 177, o pKN410 para proporcionar el replicón. Típicamente, la célula huésped puede secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse, convenientemente, inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

En una modalidad, la célula huésped es deficiente para una o más enzimas proteolíticas.

En una modalidad, la enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI, y Lon.

Después de la transformación, las células procariotas usadas para producir los anticuerpos anti-EGFR1 o los fragmentos de unión al EGFR1 de estos, se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huéspedes seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB), caldo Terrific (TB) y medios sintéticos Mínimos más suplementos nutritivos tales como extracto de levadura, hidrolizado de soja y otros hidrolizados vegetales. En algunas modalidades, los medios contienen, además, un agente de selección, que se escoge en función de la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de las células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, la ampicilina se añade a los medios para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a la ampicilina. Cualquier suplemento necesario, además de las fuentes de carbono, nitrógeno, y fosfato inorgánico, puede incluirse en concentraciones apropiadas, introducido solo o como una mezcla con otro suplemento o medio, tal como una fuente compleja de nitrógeno. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, principalmente en dependencia del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es, preferentemente, de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y con mayor preferencia de aproximadamente 7,0. Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión, se induce la expresión de proteína del anticuerpo anti-EGFR1 o del fragmento de unión al EGFR1 en condiciones adecuadas para la activación del promotor.

En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR1 o el fragmento de unión al EGFR1 de este, se secretan y se recuperan del periplasma de las células huéspedes procariotas. La recuperación de proteínas generalmente implica la ruptura del microorganismo, generalmente por medios tales como shock osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se rompen, los restos celulares o las células completas pueden eliminarse mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad o columnas de proteína L adecuadas para la purificación de fragmentos Fab. Alternativamente, las proteínas pueden transportarse a los medios de cultivo y aislarse a partir de estos. Las células pueden eliminarse del cultivo y el sobrenadante del cultivo puede filtrarse y concentrarse para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente mediante el uso de métodos comúnmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

En un aspecto, la producción del anticuerpo anti-EGFR1 o fragmento de unión al EGFR1 se realiza a gran escala mediante un proceso de fermentación. Diversos procedimientos de fermentación a gran escala en lotes alimentados están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 500 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferida de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia, típicamente, después que las células se han cultivado en condiciones adecuadas hasta lograr una densidad conveniente, por ejemplo, una OD_{550} de aproximadamente 180-220, etapa en que las células se encuentran en la fase estacionaria temprana. Pueden usarse una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción del vector empleado, como se conoce en la técnica y se describió anteriormente. Las células pueden crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células generalmente se inducen durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad del anticuerpo anti-EGFR1 o los fragmentos de unión al EGFR1, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y el plegamiento correcto de los polipéptidos de los anticuerpos secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, y/o DsbG), Skp o FkpA (un peptidilprolil cis, trans -isomerasa con actividad de chaperona) para co-transformar las células procariotas huéspedes. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad adecuados de las proteínas heterólogas producidas en las células huéspedes bacterianas. Chen y otros, (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou y otros, patente de los EE.UU. núm. 6 083 715; Georgiou y otros, patente de los EE.UU. núm. 6 027 888;

Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie y otros, (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

En una modalidad, las chaperonas tales como DnaK/DnaJ/GrpE, Skp, Skp/FkpA, GroEL/GroES se expresan en la célula huésped bacteriana tal como *E. coli*.

Para minimizar la proteólisis del anticuerpo anti-EGFR1 o los fragmentos de unión al EGFR1 expresados (especialmente aquellos que son sensibles proteolíticamente), pueden usarse determinadas cepas huésped deficientes en enzimas proteolíticas. Por ejemplo, las cepas de la célula huésped pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas en los genes codificantes de proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI, y combinaciones de estas. Algunas cepas de *E. coli* deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly y otros, (1998), supra; Georgiou y otros, Patente de EE.UU. núm. 5 264 365; Georgiou y otros, Patente de EE.UU. núm. 5 508 192; Hara y otros, Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

En una modalidad, las cepas de *E. coli* deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas se usan como células huésped en el sistema de expresión descrito en la presente descripción.

La purificación de anticuerpos anti-EGFR1 o fragmentos de unión al EGFR1 de estos, puede lograrse mediante el uso de métodos reconocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ilustrativos de los procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel mediante el uso de, por ejemplo, Sephadex G-75.

En una modalidad, la proteína A inmovilizada en una fase sólida se usa para la purificación por inmunoafinidad de los anticuerpos anti-EGFR1.

En una modalidad, la proteína L inmovilizada en una fase sólida se usa para la purificación por inmunoafinidad de los fragmentos de anticuerpo anti-EGFR1 descritos en la presente descripción.

Como la primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular, como se describió anteriormente, se aplica sobre la fase sólida inmovilizada de proteína A o proteína L para permitir la unión específica del anticuerpo anti-EGFR1 a la proteína A, o del fragmento de anticuerpo anti-EGFR1, tal como el fragmento Fab, a la proteína L. Después la fase sólida se lava para eliminar los contaminantes unidos inespecíficamente a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se recupera de la fase sólida mediante elución.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera está precedida por el péptido señal pelB y la región variable de la cadena pesada está precedida por el péptido señal ompA; la célula huésped comprende la proteína chaperona Skp y/o un polinucleótido codificante de la proteína chaperona Skp; y la célula huésped es deficiente para las enzimas proteolíticas Lon y OmpT.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada están precedidas por el péptido señal stII; la célula huésped comprende la proteína chaperona Skp y/o un polinucleótido codificante de la proteína chaperona Skp; y la célula huésped es deficiente para las enzimas proteolíticas Lon y OmpT.

Además, se describe un polinucleótido codificante de

i) una región variable de la cadena ligera y

ii) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

El término "un polinucleótido" puede referirse, en este contexto, a uno, dos o más polinucleótidos o moléculas de polinucleótidos que pueden o no unirse covalentemente, directa o indirectamente a través de una o más secuencias. Por ejemplo, los dos o más polinucleótidos pueden estar comprendidos en un casete de expresión o en un vector. Los dos o más polinucleótidos pueden, como ejemplo, fusionarse, directa o indirectamente, para codificar una proteína de fusión que comprende tanto la región variable de la cadena ligera como la región variable de la cadena pesada. Además, pueden estar comprendidos en dos casetes o vectores de expresión separados. El término "un polinucleótido" puede referirse, además, a una única molécula de polinucleótido continuo que comprende uno o más polinucleótidos o tramos de polinucleótidos codificantes de la región variable de la cadena ligera y de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.El polinucleótido puede ser dicistrónico o policistrónico.

En una modalidad, el polinucleótido codificante de la región variable de la cadena ligera y de la región variable de la cadena pesada es optimizado por codón para una célula huésped. La célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula de *E. coli*.

En una modalidad, el polinucleótido codificante de una región variable de la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, el polinucleótido codificante de una región variable de la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, el polinucleótido codificante de una región variable de cadena ligera comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8 y el polinucleótido codificante de una región variable de la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, el polinucleótido codificante de una región variable de la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 8, y el polinucleótido codificante de una región variable de cadena pesada comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, a al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, el polinucleótido codifica

i) una cadena ligera y

ii) una cadena pesada de un fragmento de unión anti-EGFR1 de un anticuerpo.

En una modalidad, el polinucleótido codifica un fragmento de unión anti-EGFR1 que es un Fab o un scFv.

En una modalidad, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia de la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 10, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 10.

En una modalidad, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 11, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia de la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 10 y la secuencia de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia de la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 10, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 10, y la secuencia de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 11, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94%, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 12.

En una modalidad, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada están precedidas por un péptido señal. Por lo tanto, el polinucleótido codifica un péptido señal y la región variable de la cadena ligera, y un péptido señal y la región variable de la cadena pesada. Los dos péptidos señal pueden seleccionarse independientemente uno del otro, o pueden ser el mismo péptido señal.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera es diferente del péptido señal que precede a la región variable de la cadena pesada.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera y a la región variable de la cadena pesada se seleccionan independientemente del grupo que consiste en gIII, malE, phoA, ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera y a la región variable de la cadena pesada se seleccionan independientemente del grupo que consiste en ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera es el mismo que el péptido señal que precede a la región variable de la cadena pesada, y en donde el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en gIII, malE, phoA, ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, el péptido señal que precede a la región variable de la cadena ligera es el mismo que el péptido señal que precede a la región variable de la cadena pesada, y en donde el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en ompA, pelB, stII, y stII.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera está precedida por el péptido señal pelB y la región variable de la cadena pesada está precedida por el péptido señal ompA.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada están precedidas por el péptido señal stII.

Además, el polinucleótido puede unirse operativamente a, es decir, es conducido por, o comprende un promotor. El promotor puede permitir la expresión eficiente del polinucleótido. El promotor puede ser, además, un promotor inducible, por lo que permite la expresión inducible del polinucleótido.

En una modalidad, el polinucleótido es conducido por, es decir, se une operativamente a, o comprende, un promotor seleccionado del grupo que consiste en T7, T5 y Rham.

En una modalidad, el polinucleótido es conducido por o comprende el promotor T7.En una modalidad, una célula huésped procariota produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragamento de unión al EGFR1 de un anticuerpo anti-EGFR1. En una modalidad, una célula *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de un anticuerpo anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un Fab anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un scFv anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* comprende o consiste en el polinucleótido establecido en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 8, y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9, y la célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de un anticuerpo anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* comprende o consiste en el polinucleótido establecido en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 8, y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9, y la célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un Fab anti-EGFR1 o un scFv anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* comprende o consiste en el polinucleótido establecido en la SEQ ID NO: 8 y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9 y la célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un Fab anti-EGFR1 o un scFv anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* comprende o consiste en el polinucleótido establecido en la SEQ ID NO: 10, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 10, y la secuencia de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 11, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %

idéntica a la SEQ ID NO: 11, y la célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de un anticuerpo anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* comprende o consiste en el polinucleótido establecido en la SEQ ID NO: 10, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 10, y la secuencia de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 11, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11, y la célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un Fab anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* comprende o consiste en el polinucleótido establecido en la SEQ ID NO: 12, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 12, y la célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un scFv anti-EGFR1.

En una modalidad, una célula de *E. coli* comprende o consiste en el polinucleótido establecido en la SEQ ID NO: 13, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13, y la célula de *E. coli* produce al menos 20 mg/L, al menos 30 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 200 mg/L, o al menos 500 mg/L de un scFv anti-EGFR1.

La presente invención se refiere, además, a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, además, un vehículo aceptable farmacéuticamente. Los ejemplos de vehículos aceptables farmacéuticamente adecuados son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones de aceite/agua, agentes humectantes, y liposomas. Las composiciones que comprenden tales vehículos pueden formularse mediante métodos bien conocidos en la técnica. La composición farmacéutica puede comprender, además, otros componentes tales como vehículos, aditivos, conservantes, otras composiciones farmacéuticas administradas simultáneamente, y similares.

En una modalidad, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz del conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la invención.

En una modalidad, la composición farmacéutica comprende una cantidad con eficacia terapéutica del conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la invención.

El término "cantidad con eficacia terapéutica" o "cantidad eficaz" del conjugado debe entenderse como el régimen de dosificación para modular el crecimiento de células cancerosas y/o tratar la enfermedad de un paciente cuando las células cancerosas se bombardean con radiación de neutrones o se exponen a BNCT. La cantidad con eficacia terapéutica puede seleccionarse de acuerdo con una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso, el sexo, la dieta y la afección médica del paciente, la gravedad de la enfermedad, y las consideraciones farmacológicas, tales como la actividad, la eficacia, la farmacocinética y los perfiles de toxicología del conjugado particular usado. La cantidad con eficacia terapéutica puede determinarse, además, mediante la referencia a textos médicos estándar, tal como el Physicians Desk Reference 2004. El paciente puede ser hombre o mujer, y puede ser un bebé, un niño o un adulto.

El término "tratamiento" o "tratar" se usa en el sentido convencional y significa atender, cuidar y asistir a un paciente con el objetivo de combatir, reducir, atenuar o aliviar una enfermedad o anormalidad de salud y mejorar las condiciones de vida deterioradas por esta enfermedad, tal como, por ejemplo, con una enfermedad cancerosa.

En una modalidad, la composición farmacéutica comprende una composición para, por ejemplo, administración oral, parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal, intratumoral (i.t.) y/o intranasal o para inyección directa en el tejido. La administración de la composición farmacéutica puede realizarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratumoral, tópica o intradérmica.

La presente invención se refiere, además, al conjugado de acuerdo a una o más modalidades de la presente invención o la composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo a una o más modalidades de la presente invención para usar como un medicamento.

Además, se describe el conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención o la composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención para usar como un medicamento para la terapia de captura de neutrones de boro.

La "terapia de captura de neutrones de boro" (BNCT) debe entenderse como una radioterapia dirigida, en donde el boro-10 no radiactivo se irradia con neutrones térmicos de baja energía para producir partículas alfa y núcleos de litio-7. El boro-10 no radioactivo puede dirigirse mediante su incorporación en un fármaco de localización tumoral tal como un conjugado de localización tumoral.

Además, se describe el conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención o la composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención para usar en la terapia de captura de neutrones de boro.

La presente invención se refiere, además, al conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención o la composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención para usar en el tratamiento del cáncer.

En una modalidad, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello.

En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer escamoso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer resistente a múltiples fármacos y cáncer testicular.

La presente invención se refiere, además, al conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención o la composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención para usar en el tratamiento del cáncer mediante la terapia de captura de neutrones de boro.

Además, se describe el uso del conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención en la fabricación de un medicamento.

Además, se describe el uso del conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención en la fabricación de un medicamento para la terapia de captura de neutrones de boro.

Se describe, además, el uso del conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En una modalidad, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello.

En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer escamoso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer resistente a múltiples fármacos y cáncer testicular.

Además, se describe el uso del conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer mediante terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, el medicamento es para el tratamiento intratumoral del cáncer de cabeza y cuello mediante terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, el medicamento es para el tratamiento intravenoso del cáncer de cabeza y cuello mediante la terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, el medicamento es para el tratamiento intratumoral e intravenoso del cáncer de cabeza y cuello mediante la terapia de captura de neutrones de boro.

Además, se describe un método para tratar o modular el crecimiento de células tumorales que expresan EGFR1 en un humano, en donde el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran a un humano en una cantidad eficaz.

En una modalidad, el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran a un humano en una cantidad eficaz en la terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, la concentración de boro se analiza en células tumorales después de administrar el conjugado o la composición farmacéutica.

En una modalidad, la concentración de boro se analiza en sangre después de administrar el conjugado o la composición farmacéutica.

En una modalidad, la concentración de boro se analiza en el músculo, o en otro tejido no tumoral, después de administrar el conjugado o la composición farmacéutica.

La concentración de boro en células tumorales, en sangre o en ambas puede analizarse o medirse, por ejemplo, mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) o espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) (por ejemplo, Ejemplo 9). Estos métodos miden la cantidad (en moles) o la concentración de átomos de boro en la muestra.

Además, la concentración de boro en las células tumorales, en la sangre o en ambas puede analizarse o medirse indirectamente, por ejemplo, mediante el uso de una modalidad del conjugado que comprende una molécula de trazabilidad y mediante análisis o medidas de la concentración de la molécula de trazabilidad. Por ejemplo, si la molécula de trazabilidad es fluorescente o radioactiva, la fluorescencia o radioactividad de la molécula de trazabilidad puede medirse o visualizarse.

En una modalidad, la concentración de boro se analiza en células tumorales y en sangre después de administrar el conjugado o la composición farmacéutica, y la relación de la concentración de boro en células tumorales con respecto a la concentración de boro en sangre es mayor que 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 110:1, 120:1, 130:1, 140:1, 150:1, 200:1, 210:1, 220:1, 230:1, 240:1, o 250:1.

En una modalidad, la concentración de boro se analiza en células tumorales y en un músculo, o en otro tejido no tumoral, después de administrar el conjugado o la composición farmacéutica, y la relación de la concentración de boro en células tumorales con respecto a la concentración del boro en un músculo u otro tejido no tumoral es mayor que 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 110:1, 120:1, 130:1, 140:1, 150:1, 200:1, 210:1, 220:1, 230:1, 240:1, o 250:1.

En una modalidad, la relación de la concentración de boro en células tumorales con respecto a la concentración de boro en sangre, en un músculo o en otro tejido no tumoral es la relación molar de átomos de boro en células tumorales con respecto a los átomos de boro en sangre, en un músculo o en otro tejido no tumoral.

Además, se describe un método para modular el crecimiento de una población celular que expresa la proteína EGFR1, en donde el método comprende la etapa de

poner en contacto el conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención con la población celular que expresa la proteína EGFR1.

En una modalidad, la población celular que expresa la proteína EGFR1 es una población de células cancerosas o una población de células tumorales.

En este contexto, el término "una población de células cancerosas" debe entenderse como una referencia a una o más poblaciones de células cancerosas.

El conjugado puede ponerse en contacto *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo* con la población celular, por ejemplo, células cancerosas, que incluyen, por ejemplo, cáncer de sangre, plasma, pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, cerebro, huesos, ovarios, testículos y órganos linfáticos; con mayor preferencia cáncer de pulmón, colon, próstata, plasma, sangre o colon; "La modulación del crecimiento de las poblaciones de células cancerosas" incluye la inhibición de la proliferación de poblaciones de células que se dividen para producir más células; reducir la tasa de aumento en la división celular en comparación, por ejemplo, con células no tratadas; destruir poblaciones de células; y/o evitar que las poblaciones celulares (tales como las células cancerosas) hagan metástasis. El crecimiento de las poblaciones celulares puede modularse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer escamoso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer resistente a múltiples fármacos y cáncer testicular.

Además, se describe un método para tratar y/o modular el crecimiento y/o la profilaxis de células tumorales en humanos, en donde el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administra a un humano en una cantidad eficaz.

En una modalidad, la cantidad eficaz es una cantidad con eficacia terapéutica.

En una modalidad, el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran a un humano en una cantidad eficaz en la terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, las células tumorales se seleccionan del grupo que consiste en células de leucemia, células de linfoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer de ovario, células de cáncer

colorrectal, células de cáncer gástrico, células de cáncer escamoso, células de cáncer de pulmón de células pequeñas, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer resistentes a múltiples fármacos, y células de cáncer testicular, células de cáncer metastásico, avanzado, resistentes a fármacos u hormonas, resistentes a múltiples fármacos, y versiones de estas.

Además, se describe un método para tratar el cáncer en humanos, en donde el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran a un humano en una cantidad eficaz.

En una modalidad, el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran a un humano en una cantidad eficaz en la terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, la cantidad eficaz es una cantidad con eficacia terapéutica.

En una modalidad, el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran por vía intravenosa a un humano en una cantidad con eficacia terapéutica en la terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran intratumoralmente a un humano en una cantidad con eficacia terapéutica en la terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran intratumoral e intravenosamente a un humano en una cantidad con eficacia terapéutica en la terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades de la invención se administran intratumoralmente en el tumor de cabeza y cuello en una cantidad con eficacia terapéutica en la terapia de captura de neutrones de boro.

En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer escamoso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer resistente a múltiples fármacos y cáncer testicular.

En una modalidad, el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades comprende un anticuerpo anti-EGFR1 o fragmento de unión al EGFR1 de este, que se obtiene mediante un método que comprende

cultivar la célula huésped procariota de acuerdo con una o más modalidades; y

aislar y/o purificar el anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, del conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.

Además, se describe un método para tratar o modular el crecimiento de células tumorales que expresan EGFR1 en un ser humano, en donde el conjugado de acuerdo con una o más modalidades o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más modalidades se administran a un humano en una cantidad eficaz.

Las modalidades de la invención descritas anteriormente en la presente descripción pueden usarse en cualquier combinación entre sí. Varias de las modalidades pueden combinarse entre sí para formar una modalidad adicional de la invención. Un producto, un uso o un método con el que se relaciona la invención pueden comprender al menos una de las modalidades de la invención descritas anteriormente en la presente descripción.

El conjugado de acuerdo una o más modalidades de la invención tiene varias propiedades ventajosas.

El conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la invención es relativamente no tóxico en ausencia de irradiación de neutrones de baja energía y tiene baja antigenicidad.

Contiene una gran cantidad de átomos de boro-10 por molécula del conjugado. Además, exhibe una solubilidad acuosa relativamente buena.

El conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la invención, además, exhibe una buena farmacocinética. Tiene una retención adecuada en la sangre, una alta absorción en las células a las que se dirige y una baja absorción en las células y órganos a los que no se dirige.

Su proceso de producción es relativamente simple y puede realizarse en soluciones acuosas.

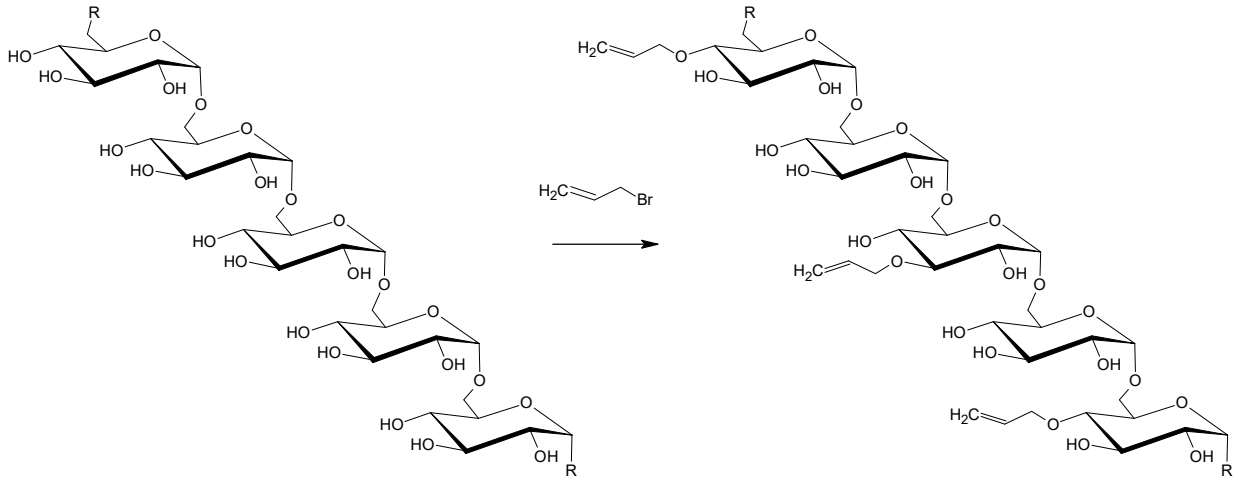
El conjugado de acuerdo con una o más modalidades de la invención es suficientemente estable frente a la degradación química o bioquímica durante la fabricación o en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en sangre, suero, plasma o tejidos.

EJEMPLOS

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle. Ahora se hará referencia en detalle a las modalidades de la presente invención, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. La descripción más abajo describe algunas modalidades de la invención con tal detalle que una persona experta en la técnica puede utilizar la invención basándose en la descripción. No todas las etapas de las modalidades se discuten en detalle, ya que muchas de las etapas serán obvias para el experto en la técnica basándose en esta descripción.

EJEMPLO 1. Alilación del dextrano

Se disolvieron 200 mg de Dextrano 70 kD (Sigma) en 2 mL de NaOH 0,6 M. Se añadieron 250 µl de bromuro de alilo (Sigma), y la reacción se dejó continuar durante 3 horas a 60 °C. La mezcla de reacción se neutralizó después con ácido acético 1 M y el producto se aisló mediante precipitación con 10 volúmenes de acetona fría (-20 ºC). El precipitado se recolectó por centrifugación y se lavó dos veces con acetona. El dextrano alilado (Esquema 1) se sometió a análisis de ^{1}H-NMR, que mostró que el nivel de alilación era de aproximadamente 36 %.

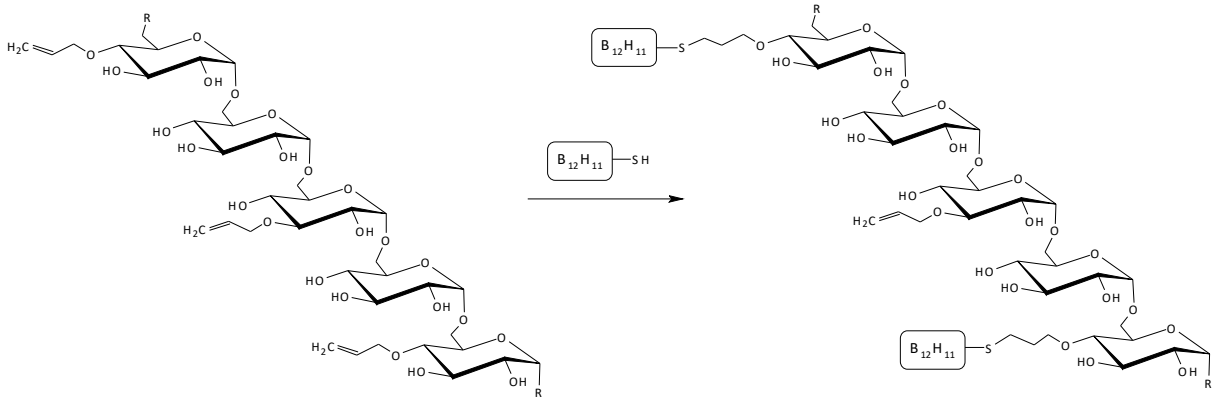


Esquema 1. Alilación del dextrano mediante el uso de bromuro de alilo.

EJEMPLO 2. Adición de BSH al alil dextrano

Se preparó 50 mg de alilo dextrano 70 kD como se describió en el Ejemplo 1, persulfato de amonio 50 mg y borocaptato de sodio 50 mg (BSH; Katchem Ltd, República Checa) se disolvieron en 0,5 mL H_2O.

La reacción se dejó proceder durante 2 horas a 50 °C. El producto de reacción, BSH-dextrano (Esquema 2), se aisló con ultrafiltración mediante el uso de un filtro centrífugo (Amicon, corte de 10K). El análisis de ^{1}H-NMR mostró que, en promedio, 100 unidades de BSH se unieron al alil dextrano, lo que corresponde a 1200 átomos de boro por cadena del dextrano (Fig. 1). Con modificaciones menores, por ejemplo, mediante el uso de un nivel de alilación más bajo en el dextrano, se obtuvo BSH dextrano con aproximadamente 900 boros u 800 boros por cadena del dextrano.

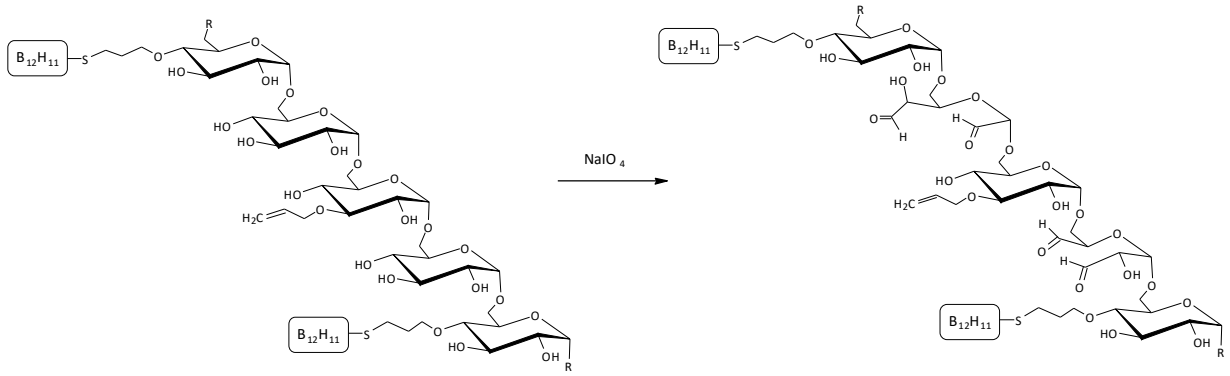


Esquema 2. Adición de borocaptato de sodio al alil dextrano en una reacción catalizada por persulfato.

Al variar la cantidad de BSH y persulfato en la reacción descrita anteriormente, fue posible preparar BSH-dextranos con un nivel de BSH claramente inferior: 1) En una reacción que contenía 20 mg de alil dextrano, 15 mg de persulfato de amonio y 15 mg de BSH, se encontró que el BSH-dextrano aislado contenía aproximadamente 700 átomos de boro por cadena del dextrano. 2) En una reacción que contenía 20 mg de alil dextrano, 10 mg de persulfato de amonio y 10 mg de BSH, se encontró que el BSH-dextrano aislado contenía aproximadamente 560 átomos de boro por cadena del dextrano. 3) En una reacción que contenía 20 mg de alil dextrano, 5 mg de persulfato de amonio y 5 mg de BSH, se descubrió que el BSH-dextrano aislado contenía aproximadamente 360 átomos de boro por cadena del dextrano.

EJEMPLO 3. Oxidación del BSH-dextrano

Se disolvieron 50 mg del BSH-dextrano, preparado como se describió en el Ejemplo 2, en 3 mL de $NaIO_4$ 25 mM en acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5. El tubo de reacción se cubrió con papel de aluminio y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. El producto de reacción, BSH-dextrano oxidado (Esquema 3), se aisló con ultrafiltración mediante el uso de un filtro centrífugo (Amicon, corte de 10K).



Esquema 3. Oxidación del BSH-dextrano mediante el uso de periodato de sodio.

EJEMPLO 4. Conjugación del BSH-dextrano oxidado al Fab/F(ab')2 anti-EGFR1

Se mezclaron 2 mg (40 nmol) del Fab anti-EGFR1 en 2 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 5,1 mg (60 nmol) del BSH-dextrano oxidado (Ejemplo 3) en 1,6 mL de PBS. La reacción se dejó proceder durante toda la noche a temperatura ambiente. A la reacción se añadieron 400 µl de $NaCNBH_3$ 0,5 M para estabilizar los vínculos aldehído-lisina y la reacción se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 800 µl de etanolamina-HCl 0,2 M pH 8 y la reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Para estabilizar la protección con etanolamina se añadieron 400 µl de $NaCNBH_3$ 0,5 M y la reacción se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Los reactivos de bajo peso molecular se eliminaron mediante una unidad de filtro centrífugo Amicon (MWCO 30K) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, mediante el uso de PBS como eluyente de lavado.

Se mezclaron 2 mg (40 nmol) del F(ab')2 anti-EGFR1 en 2 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 2,56 mg (30 nmol) del BSH-dextrano oxidado (Ejemplo 3) en 1,6 mL de PBS. El conjugado se estabilizó, se protegió y se purificó mediante ultrafiltración como anteriormente.

Ambos conjugados se analizaron mediante el purificador Äkta (GE Healthcare) con una columna de filtración de gel SEC-3000 Yarra de 3 µm (300 x 7,8 mm; Phenomenex) mediante el uso de acetonitrilo al 10 % (ACN)-50 mM Tris-HCl, pH 7,5 como el tampón de elución (Figura 2).

EJEMPLO 5. Generación del Fab y -F(ab')2 anti-EGFR1 y fragmentos Fab y -F(ab')2 de control

Se generaron fragmentos Fab y F(ab')2 a partir de cetuximab comercial (Erbitux, Roche) o de cetuximab producido en células CHO (kit Freedom CHO-S, Invitrogen). El kit Freedom CHO-S (Life Technologies) se usó para el desarrollo de líneas celulares estables que producen cetuximab. El trabajo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de nucleótidos optimizadas codificantes de las secuencias de la cadena pesada y ligera se adquirieron de GeneArt (Life Technologies) y se clonaron por separado en vectores de expresión pCEP4 (Life Technologies). Para la expresión estable, las células FreeStyle™ CHO-S se transfectaron con vectores de cadena ligera y de cadena pesada 1:1 linealizados. Los transfectantes se seleccionaron con puromicina y metotrexato, después de lo cual el aislamiento del clon se realizó mediante clonación por dilución limitante. Las líneas celulares clonadas se escalaron y se evaluaron para determinar la productividad.

Se generaron fragmentos -Fab y -F(ab')2 Control a partir de omalizumab comercial (anti-IgE) (Xolair, Novartis).

Los fragmentos del Fab anti-EGFR1 se prepararon mediante la digestión del anticuerpo con papaína inmovilizada (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con modificaciones menores. La relación enzima a sustrato que se usó fue 1:60 (p/p) y el tiempo de incubación fue de 7 horas. Los fragmentos Fab se separaron de los fragmentos IgG y Fc no digeridos con una columna de proteína A inmovilizada (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos F(ab')2 anti-EGFR1 se prepararon mediante la digestión del anticuerpo con FragIT MaxiSpin (Genovis) de acuerdo con las instrucciones del fabricante o con la enzima Fabricator (Genovis) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con modificaciones menores. La digestión enzimática con la enzima Fabricator se realizó con 120 unidades de enzima por mg de anticuerpo en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,6 y el tiempo de incubación fue de 1 hora a +37 °C. Los fragmentos F(ab')2 se purificaron con una columna de proteína L HiTrap inmovilizada (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de reacción se cambió a PBS con concentrador Amicon Ultra (Millipore) (corte de 10 kDa).

Los fragmentos generados se identificaron con SDS-PAGE y se determinó la concentración de proteína de cada fragmento midiendo la absorbancia UV a 280 nm.

EJEMPLO 6. Análisis por SDS-PAGE de los conjugados de boro

Los conjugados de boro de los fragmentos Fab y F(ab')2 anti-EGFR1 se analizaron mediante el uso de SDS-PAGE para verificar que las conjugaciones tuvieron éxito y que los fragmentos Fab o F(ab')2 no conjugados no estuvieran presentes después de la conjugación. La Figura 3 muestra un análisis por SDS-PAGE de los conjugados de boro Fab/F(ab')2 anti-EGFR1 con diferentes cantidades de boro en un gel de gradiente (Bio-Rad, 4-15 %) en condiciones no reductoras (panel A) y reductoras (panel B). Los resultados del panel A muestran que la conjugación fue completa (o casi completa) porque los fragmentos Fab o F(ab')2 no conjugados no eran visibles. El BSH es una molécula cargada negativamente y cuando se conjuga con una proteína, la velocidad de migración de un conjugado es más rápida en un gel de lo esperado en función de su peso molecular teórico. El ejemplo de la Figura 3 (Panel A) indica que los conjugados con alta cantidad de boro migran más rápido en un gel no reductor que los conjugados con menor cantidad de boro (por ejemplo, comparar los carriles 1, 2, 4 y 6). Los resultados de la Figura 3 (Panel A) indican, además, que en un gel no reductor la mayoría de los conjugados se separan en dos bandas, lo que implica que las muestras contienen una mezcla de dos tipos diferentes de conjugados. El análisis por SDS-PAGE de los conjugados de boro en condiciones reductoras (Figura 3, panel B) muestra que en el gel en condiciones reductoras todos los conjugados Fab con diferentes cantidades de boro migran de manera similar (Carriles 1, 2, 4, 6). Del mismo modo, los conjugados F(ab')2 reducidos con diferentes cantidades de boro migran de forma idéntica (carriles 3, 5, 7). En general, los conjugados de boro reducidos migran más rápido en el gel que los conjugados no reducidos.

EJEMPLO 7. Ensayos de internalización *in vitro* de los conjugados de boro

Marcaje con AlexaFluor488 de los conjugados de boro

Se incubaron 5 µg de ácido carboxílico AlexaFluor488, marcador de éster succinimidílico (Invitrogen) con 100 µg de los conjugados de boro (Fab anti-EGFR1, F(ab')2 anti-EGFR1, AcM anti-EGFR1, Fab control, F(ab')2 control, AcM control) o compuestos no conjugados correspondientes durante 15 min a temperatura ambiente en un tampón que contiene 10 µl de $NaHCO_3$, 1 M pH 9 en 100 µl de PBS. Después de la incubación, se eliminó el exceso de marcaje mediante el cambio del tampón a PBS con concentrador Amicon Ultra (Millipore) (corte de 10 kDa). La concentración de proteína de cada compuesto se determinó midiendo la absorbancia UV a 280 nm y el grado de marcaje se calculó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

Marcaje con tritio de los conjugados de boro

Después de la eliminación del disolvente de tolueno mediante evaporación, se incubaron 100 µCi de propionato de N-succinimidilo marcado con tritio (Perkin Elmer) con 100 µg de anti-EGFR1-Fab-BSH(800B)-Dex, anti-EGFR1-F(ab')2-BSH(800B)-Dex, AcM anti-EGFR1 y AcM control en un tampón que contiene 20 µl de tampón de borato de Na 1 M, pH 8,8 en 100 µl de PBS. Se dejó que la reacción continuara durante toda la noche a temperatura ambiente y después se eliminó el exceso de marcaje mediante el cambio del tampón a PBS con un concentrador Amicon Ultra (límite de 10 kDa). La cantidad de radiactividad se midió con un contador de centelleo en presencia de un cóctel de líquido de centelleo (Ultima Gold, Perkin Elmer). La cantidad de marcaje de tritio en los compuestos se calculó como cpm/µg de proteína.

Cultivo de células

Las células HSC-2 (carcinoma humano de células escamosas de la boca, JCRP Cellbank, Japón) y las células FaDu (carcinoma humano de células escamosas de faringe, ATCC) se cultivaron en frascos T75 en medio esencial mínimo de Eagle con glutamina 2 %, suero fetal bovino 10 % y penicilina/estreptomicina 1 %. Las células HEK (riñón embrionario humano, ATCC) se cultivaron en frascos T75 en medio Eagle modificado de Dulbecco con glutamina 2%, suero fetal bovino 10 % y penicilina/estreptomicina 1 %.

Ensayo de internalización visualizado en microscopía de fluorescencia

Las células HSC-2 ($5x10^4$) se sembraron en un portaobjetos de cámara y se dejaron crecer durante 24 horas. Después, las células se incubaron durante 3 horas a +37 °C o a +4 °C en 100 µl de medio que contenía 10 µg/mL de conjugados BSH marcados con AlexaFluor488. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos. Se añadió medio de montaje (reactivo antifade Prolong Gold con DAPI) y las células se cubrieron con cubreobjetos de microscopía. Las células se fotografiaron con microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio Scope A1; ProgRes C5, JENOPTIK AG).

La internalización del anti-EGFR1-F(ab')2 -BSH(900B)-Dex y anti-EGFR1-F(ab')2 no conjugado por la línea celular tumoral HSC-2 se analizó por microscopía de fluorescencia (Figura 4). El experimento se realizó a +4 ºC (los compuestos se unen a la superficie celular pero no pueden internalizarse) y a + 37 ºC (las células pueden internalizar los compuestos unidos a la superficie). Tanto el anti-EGFR1-F(ab')2 no conjugado como el conjugado de boro se unieron a la superficie celular a +4 ºC (paneles A y B) y se internalizaron a +37 ºC (paneles C y D). De hecho, el conjugado de boro se internalizó de manera más eficiente que el anti-EGFR1-F(ab')2 no conjugado. El ensayo de internalización con anti-EGFR1-Fab-BSH(900B)-Dex y EGFR1-AcM-BSH(900B)-Dex y los correspondientes anti-EGFR1-Fab y AcM anti-EGFR1 no conjugados dieron resultados muy similares a los datos presentados en la Figura 4 (no mostrado). El efecto de la carga de boro para la internalización se examinó mediante el uso de conjugados de boro anti-EGFR1-Fab-BSH-Dex y anti-EGFR1-F(ab')2-BSH-Dex) con diferentes cantidades de boro. Los resultados indicaron que los conjugados con más boro se internalizaron de manera más eficiente por las células HSC-2 que los conjugados con baja carga de boro a +37 ºC (no mostrado). Control-F(ab')2 -BSH(900B)-Dex se internalizó solo muy débilmente (no mostrado).

Ensayo de internalización (FACS)

Las células HSC-2, FaDu y HEK ($2x10^5$) se sembraron en una placa de 24 pocillos y se dejaron crecer durante 24 horas. Después, las células se incubaron durante 3 horas a +37 °C en 300 µl de medio que contenía 5 µg/mL de compuestos marcados con AlexaFluor488. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se separaron mediante la incubación con 100 µl de Tripsina-EDTA durante 10 minutos a +37 ºC. Las células se neutralizaron mediante la adición de 300 µl de medio y se suspendieron en PBS y se analizaron mediante el uso de un citómetro de flujo (FACS LRS II). La intensidad de fluorescencia media de cada muestra se calculó mediante el uso del programa informático FACS Diva. Los datos presentados en las Tablas 1-3 se expresan como "Intensidad de fluorescencia media normalizada" donde la intensidad de fluorescencia se normalizó con respecto al grado del marcaje para cada compuesto.

Ensayos con FACS

La internalización de los conjugados de boro marcados fluorescentemente (900 átomos de boro) y fragmentos de Ac no conjugados por la línea celular de cáncer HNC humano HSC-2 se evaluó mediante el uso de la FACS. Los resultados representan los compuestos unidos a la superficie celular más los internalizados, que ocurre cuando las células se incubaron a +37 ºC (Tabla 1). El anti-EGFR1-Fab-BSH-Dex se internalizó de manera más eficiente que los otros conjugados de boro o que el Fab anti-EGFR1- no conjugado. Otros conjugados de boro anti-EGFR1 (anti-EGFR1-F(ab')2-BSH-Dex y anti-EGFR1-AcM-BSH-Dex) se internalizaron igualmente bien que el anti-EGFR1-Fab y anti-EGFR1-F(ab')2 no conjugados. Los conjugados de boro de control-F(ab')2 y -AcM se internalizaron muy débilmente.

Tabla 1. Unión a la superficie celular e internalización de los conjugados de boro marcados fluorescentemente y de los compuestos no conjugados, por las células HSC-2. El análisis se realizó mediante FACS y la intensidad de fluorescencia se normalizó con respecto al grado de marcaje para cada compuesto.

Muestra	HSC-2 Intensidad de fluorescencia media normalizada
Anti-EGFR1-Fab-BSH(900B)-Dex	158700
Anti-EGFR1-F(ab')2-BSH(900B)-Dex	81100
Control-F(ab')2-BSH(900B)-Dex	2200
Anti-EGFR1-AcM-BSH(900B)-Dex	92700
Control-AcM-BSH(900B)-Dex	8200
Anti-EGFR1-Fab	99500
Anti-EGFR1-F(ab')2	93100
Anti-EGFR1-AcM	21300
Control-AcM	700

Los conjugados de boro con diferentes cantidades de boro (360-900 átomos de boro) se sintetizaron a partir del F(ab')2 y -Fab anti-EGFR1 para estudiar el efecto de la carga de boro en el proceso de internalización. El ejemplo muestra el ensayo de internalización con conjugados marcados con fluorescencia mediante el uso de la línea celular de cáncer humano HNC HSC-2 y una línea celular humana HEK de control. Los resultados del análisis de citometría de flujo representan los compuestos unidos a la superficie celular más los internalizados, que ocurren cuando las células se incubaron a +37 ºC (Tabla 2). La internalización de todos los conjugados de boro de los fragmentos de Ac del anti-EGFR1 fue muy similar a la analizada mediante citometría de flujo. Sin embargo, los experimentos con microscopía revelaron que los conjugados con más boro se internalizaron de manera más eficiente que los conjugados con baja carga de boro (no mostrado).

Tabla 2. Unión a la superficie celular e internalización de los conjugados de boro marcados con fluorescencia con diferentes cantidades de boro por las células HSC-2 y HEK. El análisis se realizó mediante citometría de flujo y la intensidad de fluorescencia se normalizó con respecto al grado de marcaje para cada compuesto.

Muestra	HSC-2	HEK
	Intensidad de fluorescencia media normalizada	
Anti-EGFR1-Fab-BSH(900B)-Dex	33900	
Anti-EGFR1-Fab-BSH(700B)-Dex	48300	590
Anti-EGFR1-Fab-BSH(560B)-Dex	48000	860
Anti-EGFR1-Fab-BSH(360B)-Dex	37000	470
Anti-EGFR1-F(ab')2 -BSH(700B)-Dex	41900	600
Anti-EGFR1-F(ab')2 -BSH(560B)-Dex	48400	530
Anti-EGFR1-F(ab')2 -BSH(360B)-Dex	43100	470
Anti-EGFR1-AcM	10700	110

La internalización de los conjugados de boro marcados fluorescentemente (1200 u 800 átomos de boro) y los fragmentos de Ac no conjugados por líneas celulares de cáncer humano HNC (HSC-2 y FaDu) y una línea celular HEK de control se evaluó mediante el uso de la citometría de flujo. Los resultados representan los compuestos unidos a la superficie celular más los internalizados, que ocurren cuando las células se incubaron a +37 ºC (Tabla 3). El anti-EGFR1-Fab-BSH(1200B)-Dex y el Fab anti-EGFR1 no conjugado mostraron la internalización más fuerte por las células HSC-2 y FaDu. La internalización por las células FaDu fue consistentemente más débil que la de las células HSC-2, probablemente debido a la menor cantidad de receptores EGFR1 en la superficie celular. Los conjugados de boro de control (control-Fab-BSH(800B)-Dex y control-F(ab')2 -BSH(800B)-Dex) y los correspondientes compuestos no conjugados se internalizaron muy débilmente. La línea celular HEK de control internalizó los conjugados de boro y los compuestos no conjugados solo muy débilmente.

Tabla 3. Unión a la superficie celular e internalización de los conjugados de boro marcados con fluorescencia (1200B u 800B) y de los compuestos no conjugados, por las células HSC-2, FaDu y HEK. El análisis se realizó mediante citometría de flujo y la intensidad de fluorescencia se normalizó con respecto al grado de marcaje para cada compuesto.

Muestra	HSC-2	FaDu	HEK
	Intensidad de fluorescencia media normalizada		
Anti-EGFR1-Fab	43006	6820	274
Anti-EGFR1-F(ab')2	18432	3461	168
Control-Fab	1165	970	555
Control-F(ab')2	823	443	337
Anti-EGFR1-Fab-BSH(1200)-Dex	45270	8060	615
Anti-EGFR1-F(ab')2-BSH(1200)-Dex	10043	2813	198
Control-Fab-BSH(800)-Dex	1233	428	158
Control-F(ab')2 -BSH(800)-Dex	236	169	61

Ensayo de internalización con muestras radiomarcadas

Las células HSC-2, FaDu y HEK ($2x10^5$) se sembraron en una placa de 24 pocillos y se dejaron crecer durante 24 horas. Después, las células se incubaron durante 3 horas a +37 °C en 300 µl de medio que contenía 5 µg/mL de compuestos marcados con tritio. Después de la incubación, se retiraron los medios y las células se lavaron tres veces con PBS y se lisaron mediante la adición de 300 µl de NaOH 1 M. La cantidad de radiactividad en los medios y en los lisados celulares se midió con contador de centelleo en presencia del cóctel de líquido de centelleo (Ultima Gold). La cantidad de compuestos internalizados se calculó a partir de la cantidad total de radiactividad por pocillo y se normalizó con respecto a 100 000 células.

Los conjugados de boro (800 átomos de boro) del anti-EGFR1-Fab y –F(ab')2, así como también el AcM anti-EGFR1 no conjugado se marcaron con tritio en los residuos de lisina de una parte de la proteína. El ensayo de internalización con los compuestos radiomarcados se realizó mediante el uso de líneas celulares de cáncer humano HNC, HSC-2 y FaDu, así como también en una línea celular HEK de control. Los resultados representan los compuestos internalizados más los unidos a la superficie celular, que ocurren cuando las células se incubaron a +37 ºC. Los resultados (Tabla 4) indican que los conjugados de boro del anti-EGFR1-Fab y –F(ab')2 se internalizaron tan eficientemente como el AcM anti-EGFR1 no conjugado por las células HSC-2 y FaDu. La internalización por las células HSC-2 fue 100 veces más fuerte que por las células FaDu, probablemente debido a la mayor cantidad de receptores EGFR1 en la superficie celular en las células HSC-2. La línea celular HEK de control mostró solo una internalización muy débil.

Tabla 4. Internalización de los conjugados de boro radiomarcados por las células HSC-2, FaDu y HEK. La cantidad de compuestos internalizados se calculó a partir de la cantidad total de radiactividad por pocillo y se normalizó con respecto a 100 000 células. Los resultados son un promedio de tres determinaciones +/- S.D.

Muestras	HSC-2	FaDu	HEK
	% internalizado/100000 células		
Anti-EGFR1-Fab-BSH(800B)-Dex	4,0±0,3	0,04±0,02	0,004±0,001
Anti-EGFR1-F(ab')2-BSH(800B)-Dex	5,4±1,0	0,06±0,02	0,006±0,001
Anti-EGFR1-AcM	5,0±0,5	0,04±0,02	0,007±0,001
Control-AcM	0,1±0,1	0,01±0,01	0,002±0,002

EJEMPLO 8. Experimentos in vivo con los conjugados marcados con tritio

Preparación de muestras de tejidos de ratón y de sangre para el conteo del líquido de centelleo

Los órganos de ratón pesados se disolvieron en 1 mL de solubilizante de tejidos (Solvable™, Perkin Elmer) por 0,2 g de tejido. Las muestras se incubaron durante toda la noche a +60 °C. Después, se añadieron 150 µl de H_2O_2 por 300 µl de órgano disuelto y las muestras se incubaron durante una hora a +60 °C. Los huesos se trataron primero con HCl 1 M durante toda la noche a +60 °C y después con Solvable y H_2O_2. La cantidad de radiactividad en los órganos se midió con un contador de centelleo en presencia de cóctel de líquido de centelleo (Ultima Gold ™, Perkin Elmer). Los datos se presentan como el porcentaje de la dosis total inyectada en g de tejido. Los resultados son un promedio de tres ratones +/- SEM. Dado que cada uno de los ratones tenía dos tumores, los resultados en los tumores son un promedio de seis determinaciones +/- SEM.

Las muestras de sangre en las pruebas de aclaramiento se recolectaron en tubos Eppendorf y se midieron los volúmenes después de agregar 100 µl de Solvable y de incubar durante toda la noche a +60 °C. Después, se añadieron 100 µl de H_2O_2 y las muestras se incubaron durante una hora a +60 °C. La cantidad de radiactividad en las muestras de sangre se midió con un contador de centelleo en presencia de cóctel de líquido de centelleo (Ultima Gold, Perkin Elmer). Los datos se presentan como un porcentaje de la dosis total inyectada. Los resultados son un promedio de dos ratones.

Aclaramiento en sangre de los conjugados de boro en ratones no portadores de tumores

Se usaron ratones adultos hembras de la misma edad (Harlan HSD:Atímico desnudo Foxn1nu). Los conjugados de boro radiomarcados (3H) del anti-EGFR1-Fab y -F(ab')2 con una carga de boro de 800B y 300B se inyectaron por vía i.v. a través de la vena de la cola en 100 µl de PBS. La dosis inyectada fue de 30 µg = 1,3-2 x 106 cpm por ratón y se usaron dos ratones por muestra. Antes y después de la inyección en diferentes puntos de tiempo se recolectaron las muestras de sangre de aproximadamente 10 µl y se contó la radioactividad. Al final del experimento (48 horas) se sacrificaron los ratones y se recolectaron los órganos y se contó la radioactividad para determinar la biodistribución de los conjugados en los tejidos.

El estudio de aclaramiento en sangre en los ratones que no portaban tumores se realizó mediante el uso de conjugados de boro marcados con 3H del anti-EGFR1-Fab y -F(ab')2 con una carga de boro 800B y 300B. Se usaron dos cargas de boro diferentes para ver si la carga de boro tiene un efecto sobre la tasa de aclaramiento del conjugado de la circulación sanguínea. Los resultados indican que el aclaramiento sanguíneo de los conjugados de boro fue rápido e independiente de la carga de boro (Tabla 5). La tasa de aclaramiento fue comparable al aclaramiento de los fragmentos F(ab')2 y Fab correspondientes no conjugados (no mostrados). El estudio de distribución en los tejidos indicó que los conjugados de boro no se acumularon en ningún órgano a las 48 horas (no mostrado).

Tabla 5. Aclaramiento en sangre de los conjugados de boro en ratones no portadores de tumores. Los resultados son un promedio de dos determinaciones. El tiempo es el tiempo después de la administración (min) y los valores en % de la dosis total inyectada.

Hora	Anti-EGFR-Fab-BSH(300)-Dex	Anti-EGFR-Fab-BSH(800)-Dex	Anti-EGFR – Fab2-BSH(300)-Dex	Anti-EGFR - Fab2-BSH(800)-Dex
0	100,0	100,0	100,0	100,0
5	35,4	31,3	42,9	40,8
15	31,8	19,9	34,3	20,2
30	26,7	10,5	29,3	16,3
60	13,6	10,7	22,6	9,7
120	6,8	5,2	16,1	6,3
240	4,6	2,5	9,4	4,3
460	2,4	2,0	4,1	1,7
1440	0,9	0,8	1,7	1,1
2880	0,4	0,4	0,6	

Biodistribución de los conjugados de boro en ratones portadores de tumor HSC-2

Se usaron ratones adultos hembras de la misma edad (Harlan HSD:Atímico desnudo Foxn1nu). Se inocularon de dos y medio a tres millones de células HSC-2 (JCRP Cellbank, Japón) en 150 µl en medio EME y Matrigel al 50 % en ambos flancos de los ratones desnudos. La dosificación se administró cuando al menos un tumor por ratón creció hasta un tamaño de al menos 6 mm de diámetro (6 – 10 mm) correspondiente aproximadamente al volumen del tumor de 100-500 mm^3. Los conjugados de boro radiomarcados (3H) (800B) del anti-EGFR1-Fab/F(ab')2 y el control-Fab/F(ab')2 se inyectaron por vía i.v. a través de la vena de la cola en 100 µl de PBS. La dosis inyectada fue de 50 µg = 1,3-2,6 x 106 cpm por ratón y se usaron tres ratones por muestra. Los ratones se sacrificaron en diferentes puntos de tiempo (24 horas, 48 horas y 72 horas) y los órganos se recolectaron y se contó la radioactividad para determinar la biodistribución de los conjugados en los tejidos.

La distribución de los conjugados de boro en los tejidos (Tabla 6) muestra que los conjugados de boro del anti-EGFR1-Fab y -F(ab')2 se acumularon en los tumores pero no en ningún otro órgano, mientras que los conjugados de boro del control no se acumularon significativamente en los tumores. La acumulación de los conjugados de boro del anti-EGFR1-Fab y -F(ab')2 en los tumores fue más alta a las 24 horas y disminuyó lentamente en los puntos de tiempo posteriores (48 horas y 72 horas).

Tabla 6. Biodistribución de los conjugados de boro en ratones portadores de tumor HSC-2. Los resultados representan un promedio de tres determinaciones +/- SEM, excepto para los tumores que son un promedio de seis determinaciones +/- SEM. Los valores son el % de la dosis total inyectada/g de órgano.

24 h Órgano	Anti-EGFR-Fab-BSH(800)-Dex	Anti-EGFR-Fab2-BSH(800)-Dex	Control-Fab-BSH(800)-Dex	Control-Fab2-BSH(800)-Dex
sangre	0,23±0,02	0,34±0,07	0,23±0,05	0,47±0,23
orina	0,16±0,07	2,22±0,9	0,94±0,05	3,03±1,16
hígado	0,34±0,03	0,28±0,03	0,26±0,07	0,29±0,14
riñón	0,28±0,01	0,31±0,04	0,24±0,05	0,32±0,15
pulmón	0,19±0,02	0,44±0,14	0,19±0,04	0,45±0,30
músculo	0,19±0,01	0,21±0,05	0,17±0,06	0,20±0,09
piel	0,23±0,02	0,31±0,03	0,22±0,04	0,29±0,15
tumor	1,00±0,08	0,75±0,15	0,32±0,60	0,57±0,27

48 h Órgano	Anti-EGFR-Fab-BSH(800)-Dex	Anti-EGFR-Fab2-BSH(800)-Dex	Control-Fab-BSH(800)-Dex	Control-Fab2-BSH(800)-Dex
sangre	0,10±0,02	0,10±0,01	0,10±0,01	0,20±0,02
orina	0,36±0,11	0,46±0,04	0,28±0,17	1,00±0,32
hígado	0,23±0,04	0,18±0,03	0,15±0,01	0,14±0,03
riñón	0,17±0,02	0,14±0,01	0,15±0,02	0,17±0,01
pulmón	0,10±0,02	0,10±0,01	0,09±0,02	0,12±0,01
músculo	0,11±0,01	0,12±0,01	0,11±0,01	0,15±0,01
piel	0,12±0,01	0,14±0,01	0,11±0,04	0,18±0,02
tumor	0,41±0,06	0,58±0,06	0,21±0,03	0,29±0,02

72 h Órgano	Anti-EGFR-Fab-BSH(800)-Dex	Anti-EGFR-Fab2-BSH(800)-Dex	Control-Fab-BSH(800)-Dex	Control-Fab2-BSH(800)-Dex
sangre	0,06±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,10±0,01
orina	0,23±0,07	0,24±0,10	0,23±0,02	0,30±0,05
hígado	0,11±0,01	0,15±0,02	0,12±0,01	0,09±0,01
riñón	0,11±0,02	0,12±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01
pulmón	0,05±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,08±0,01
músculo	0,07±0,01	0,10±0,02	0,09±0,01	0,08±0,02
piel	0,08±0,01	0,11±0,01	0,08±0,01	0,09±0,01
tumor	0,25±0,04	0,30±0,05	0,11±0,01	0,18±0,02

La distribución de los conjugados de boro en los tumores versus en la sangre en ratones con xenoinjerto de HSC-2 se calculó en diferentes puntos de tiempo (24 horas, 48 horas y 72 horas) (Tabla 7). La relación tumor/sangre fue 4-5 para el conjugado anti-EGFR1-Fab y 2-6 para el conjugado anti-EGFR1-F(ab')2. El anti-EGFR1-Fab-BSH-Dex alcanzó la relación máxima antes (24 horas) que el anti-EGFR1-F(ab')2-BSH-Dex (48 horas). La relación tumor/sangre de los conjugados de control permaneció a un nivel constante durante todo el estudio (aproximadamente 1-2).

Tabla 7. Distribución de los conjugados de boro tumores/sangre en ratones portadores de tumor HSC-2. Los resultados se basan en un promedio de tres determinaciones para las muestras de sangre y un promedio de seis determinaciones para los tumores (2 tumores por ratón) +/- S.D.

Conjugado de boro	24h	48h	72h
Anti-EGFR-Fab-BSH(800B)	4,2±0,3	4,2±1,1	4,0±0,9
Anti-EGFR-Fab2-BSH(800B)-dex	2,2±0,3	6,1±1,4	3,8±1,0
Control-Fab-BSH(800B)-dex	1,5±0,3	2,2±0,5	1,5±0,3
Control-Fab2-BSH(800B)-dex	1,5±0,5	1,8±0,2	1,9±0,5

Biodistribución de los conjugados de boro en ratones portadores de tumor FaDu

Se usaron ratones hembras adultas de la misma edad (Charles River Crl:Atímico desnudo Foxn1nu). Se inocularon tres millones de células FaDu (ATCC) en 150 µl en medio EME y Matrigel al 50 % en ambos flancos de los ratones desnudos. La dosificación se administró cuando al menos un tumor por ratón creció hasta un tamaño de al menos 6 mm de diámetro (6 – 10 mm) correspondiente aproximadamente al volumen del tumor de 100-500 mm^3. Los conjugados de

boro radiomarcados (3H) (800B o 1200B) del anti-EGFR1-Fab/F(ab')2 y control-Fab/F(ab')2 se inyectaron por vía i.v. a través de la vena de la cola en 100 µl de PBS. La dosis inyectada fue de 50 µg = 2,3-2,7 x 10^6 cpm por ratón y se usaron tres ratones por muestra. Los ratones se sacrificaron en dos puntos de tiempo diferentes (24 horas y 48 horas) y los órganos se recolectaron y se contó la radiactividad para determinar la biodistribución de los conjugados en los tejidos.

El estudio de biodistribución en ratones portadores de tumor de xenoinjerto FaDu se realizó mediante el uso de los conjugados anti-EGFR1-F(ab')2-BSH(800B)-Dex y anti-EGFR1-Fab(800B o 1200B)-BSH-Dex y los conjugados de boro (800B) de control-F(ab')2 y -Fab. Los conjugados se marcaron radioactivamente (3H) en los residuos de lisina de una proteína. La radiactividad en las muestras de tejido, que incluye los tumores y la sangre, se contó en dos puntos de tiempo diferentes (24 horas y 48 horas). La distribución de los conjugados de boro en los tejidos (Tabla 8) muestra que los conjugados de boro del anti-EGFR1-Fab y -F(ab')2 se acumularon en los tumores pero no significativamente en ningún otro órgano, mientras que los conjugados de boro de control no se acumularon significativamente en los tumores. El control-F(ab')2-BSH(800B)-Dex puede encontrarse aún en la circulación sanguínea y en todos los órganos a las 24 horas, pero se aclaró de la circulación a las 48 horas. La acumulación de los conjugados de boro en el tumor de los anti-EGFR1-Fab y -F(ab')2 fue mayor a las 24 horas y disminuyó a las 48 horas.

Tabla 8. Biodistribución de los conjugados de boro en ratones portadores de tumor FaDu. Los resultados representan un promedio de tres determinaciones +/- SEM, excepto para los tumores que son un promedio de seis determinaciones +/- SEM. Los valores son el % de la dosis total inyectada/g de órgano.

24 h	**Anti-EGFR-**	**Anti-EGFR-**	**Anti-EGFR-**		
Órgano	**Fab-BSH(800)-Dex**	**Fab-BSH(1200)-Dex**	**Fab2-BSH(1200)-Dex**	**Control-Fab-BSH(800)-Dex**	**Control-Fab2-BSH(800)-Dex**
sangre	0,34±0,03	0,13±0,01	0,10±0,01	0,20±0,02	0,52±0,05
orina	2,45±0,58	0,94±0,06	0,59±0,25	1,95±0,38	3,48±0,42
hígado	0,30±0,02	0,35±0,01	0,29±0,04	0,30±0,04	0,38±0,05
riñón	0,29±0,01	0,21±0,02	0,15±0,02	0,29±0,02	0,44±0,05
pulmón	0,15±0,01	0,11±0,01	0,09±0,02	0,18±0,01	0,32±0,04
músculo	0,15±0,01	0,16±0,02	0,11±0,01	0,19±0,01	0,24±0,03
piel	0,20±0,02	0,21±0,04	0,16±0,01	0,23±0,04	0,53±0,09
tumor	1,44±0,34	0,93±0,23	0,73±0,10	0,41±0,06	0,86±0,13

48 h	**Anti-EGFR-**	**Anti-EGFR-**	**Anti-EGFR-**		
Órgano	**Fab-BSH(800)-Dex**	**Fab-BSH(1200)-Dex**	**Fab2-BSH(1200)-Dex**	**Control-Fab-BSH(800)-Dex**	**Control-Fab2-BSH(800) -Dex**
sangre	0,14±0,04	0,12±0,01	0,08±0,01	0,13±0,01	0,22±0,04
orina	0,77±0,07	0,33±0,05	0,42±0,08	0,66±0,09	1,05±0,15
hígado	0,17±0,03	0,14±0,03	0,18±0,04	0,16±0,01	0,15±0,03
riñón	0,14±0,01	0,12±0,02	0,12±0,02	0,17±0,01	0,17±0,02
pulmón	0,09±0,01	0,08±0,02	0,07±0,01	0,11±0,01	0,13±0,01
músculo	0,12±0,01	0,11±0,03	0,10±0,01	0,13±0,01	0,13±0,02
piel	0,11±0,01	0,08±0,02	0,09±0,01	0,13±0,01	0,16±0,01
tumor	0,70±0,11	0,39±0,13	0,31±0,04	0,19±0,02	0,24±0,04

La distribución de los conjugados de boro en los tumores versus la sangre en ratones portadores de xenoinjerto FaDu se calculó a las 24 horas y 48 horas (Tabla 9). La relación tumor/sangre fue de aproximadamente 7 para los conjugados anti-EGFR1-Fab y -F(ab')2 con 1200 boros a las 24 horas, y la proporción disminuyó a 3-4 a las 48 horas, lo que sugiere que la proteína marcada se degrada y se secreta fuera de las células. La relación tumor/sangre del conjugado anti-EGFR1-Fab con 800 boros fue de aproximadamente 4-5 en ambos puntos de tiempo. La relación de los conjugados de control se mantuvo en un nivel constante (aproximadamente 1-2).

Tabla 9. Distribución de los conjugados de boro en tumores/sangre en ratones portadores de tumor FaDu. Los resultados se basan en un promedio de tres determinaciones para las muestras de sangre y un promedio de seis determinaciones para los tumores (2 tumores por ratón) +/- S.D.

Conjugado de boro	24h	48h
anti-EGFR-Fab-BSH(800)-dex	4,4±2,2	5,5±1,5
anti-EGFR-Fab-BSH(1200)-dex	6,9±2,8	3,4±2,0
anti-EGFR-Fab2-BSH(1200)-dex	7,6±1,7	4,2±1,1
control-Fab-BSH(800)-dex	1,8±0,5	1,5±0,2
control-Fab2-BSH(800)-dex	1,7±0,4	1,2±0,4

EJEMPLO 9. Cuantificación de boro en el BSH-Dextrano por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (mol de boro por mol de BSH-Dextrano)

La carga de boro del BSH-dextrano se estimó a partir del espectro de RMN de protón del BSH-dextrano (Figura 1) y se usó ICP-MS para cuantificar la cantidad de boro en las muestras. Se estimó que la muestra de BSH-Dextrano analizada en este ejemplo contenía aproximadamente 1200 boros según el análisis de RMN. Aproximadamente 2,1 µg (0,0228 nmol) del BSH-Dextrano (MW promedio 92 kDa) se licuaron con cenizas húmedas con la ayuda del microondas y se analizaron mediante ICP-MS esencialmente como se describe en Laakso *y otros,* 2001, Clinical Chemistry 47, 1796-1803. Diferentes diluciones de la muestra se analizaron mediante ICP-MS y el boro de fondo se sustrajo de las muestras. Los resultados que representan un promedio de 7 determinaciones indican que la muestra contiene aproximadamente 0,341 µg (31,5 nmol) de átomos de boro, o un mol del BSH-Dextrano contiene 1381 moles de átomos de boro.

EJEMPLO 10. Experimentos in vivo y cuantificación de boro

Se usaron ratones hembras adultas de la misma edad (Charles River Crl:Atímico desnudo Foxn1nu). Se inocularon 2,3 millones de células HSC-2 o 5 millones de células FaDu en 150 µl en medios EME y 50 % de Matrigel en el flanco derecho de los ratones desnudos. La dosis se administró cuando el tumor creció hasta un tamaño de al menos 6 mm de diámetro (6 – 10 mm) correspondiente aproximadamente al volumen del tumor de 100-500 mm^3. Los conjugados Anti-EGFR-Fab-BSH(1200)-dex o anti-EGFR-F(ab')2-BSH(1200)-dex (ambos no marcados) se inyectaron i.v. a través de la vena de la cola en 100 µl de PBS. La dosis inyectada fue de 50 µg o 250 µg por ratón y se usaron tres ratones por muestra. Los ratones se sacrificaron a las 24 horas y 48 horas y se recolectaron los órganos para la determinación de boro.

Las muestras de tejido (que incluye la sangre) se digirieron en recipientes cerrados de teflón en un horno de microondas (Milestone, ETHOS 1200). La temperatura de digestión fue de 200 °C y la duración de la digestión fue de 50 minutos. El ácido usado en las digestiones fue HNO_3 (6,0 mL, E. Merck, Suprapur). Después de enfriar, la solución resultante se diluyó hasta 25 mL con agua Milli-Q. Las muestras digeridas se diluyeron adicionalmente (1:10 o 1:50) con HNO_3 1% para el análisis de ICP-MS. Se añadió el berilio estándar interno a la muestra para obtener la concentración final, 10 ppb de Be, en las muestras. Las soluciones estándar con concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg/L para los análisis se diluyeron a partir de la solución estándar de un solo elemento Spectrascan (1000 ug/mL de boro como H_3BO_3 en H_2O). La muestra de control para el análisis se preparó a partir de una solución estándar de elementos múltiples mediante SPEX (CLMS-4). Los análisis se realizaron con el espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente en campo sectorial de alta resolución (HR-ICP-MS, Element2, Thermo Scientific). La concentración de boro en muestras diluidas se definió a partir de los picos de 10B y 11B, tanto en modo de baja resolución (R ≈ 300) como de resolución media (R ≈ 4000). Entre las muestras, el sistema de introducción de muestras se lavó primero con HNO_3 5 % y después con HNO_3 1 % para excluir el efecto de memoria típico del boro.

El análisis inicial de boro de dos ratones portadores de tumor HSC-2 a las 24 horas indicó que las relaciones del boro del tumor por músculo fueron 5,3 y 6,3.

El músculo se usó como tejido de control en lugar de sangre porque las mediciones iniciales de boro de la sangre no fueron concluyentes o superaron el límite de detección.

EJEMPLO 11. En experimentos in vivo con anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano marcado con ^{14}C

Preparación del anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano

Se preparó BSH-dextrano como se describió en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente. Según el análisis de RMN, el BSH-dextrano contenía aproximadamente 650 boros. La oxidación se realizó como se describió en el Ejemplo 3 pero en dos lotes; uno con 50 mg y el otro con 100 mg de BSH-dextrano.

Los fragmentos Fab anti-EGFR1 se prepararon mediante digestión con papaína como se describió en el Ejemplo 5. Las reacciones de conjugación se realizaron como en el Ejemplo 4 pero en cuatro lotes: 1) 29 mg de BSH-dextrano oxidado

y 10,4 mg del Fab anti-EGFR1, 2) 16,5 mg de Dextrano BSH oxidado y 5,9 mg del Fab anti-EGFR1, 3) 50 mg BSH-dextrano oxidado y 19,8 mg del Fab anti-EGFR1, 4) 50 mg de dextrano BSH oxidado y 19,7 mg del Fab anti-EGFR1 que producen juntos 55,8 mg del Fab anti-EGFR1. Todos se analizaron en SDS-PAGE como en el Ejemplo 6 y las muestras de cada uno se marcaron con Alexa Fluor 488-NHS. El ensayo de internalización con moléculas marcadas con Alexa Fluor 488 se realizó con las células HSC-2 como se describió en el Ejemplo 7.

Se combinaron lotes del Fab-BSH-dextrano sin marcar para producir 39 mg del Fab BSH-dextrano anti-EGFR1. El tampón de muestra se cambió a manitol 5 % - Tween80 0,1 % en PBS antes de combinar el no marcado y el anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano marcado con ^{14}C y filtración estéril posterior.

Preparación de anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano marcado con ^{14}C

3 mg del Fab-BSH-dextrano (antes de la protección con etanolamina) se marcaron con ^{14}C mediante la incubación con 66 µCi de ^{14}C-etanolamina (American Radiolabeled Chemicals Inc.) en PBS que contiene $NaCNBH_3$ (como en el Ejemplo 4) o/n después de lo cual se terminó la protección con etanolamina no radioactiva durante 2 horas, y los reactivos de bajo peso molecular se eliminaron como se describió en el Ejemplo 4. Esta reacción resultó en anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano marcado con ^{14}C que contenía 9,21 µCi de radiactividad.

Para el estudio en animales el anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano marcado con ^{14}C se mezcló con anti-EGFR1 Fab BSH dextrano no marcado “frío” en porciones que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Preparación de materiales de prueba.

Grupo	Cantidad de anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano marcado con ^{14}C (µg del Fab)	Cantidad de anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano "frío" (µg del Fab)
I	250	750
II	250	1750
III	250	3750
IV	250	5750
V	250	7750
X	250	750
VIII	250+250	1500
IX	250+250	1500

Experimento in vivo con anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano marcado con ^{14}C

Se generaron ratones portadores de xenoinjerto como se describió en el Ejemplo 8, excepto porque las células HSC-2 se inocularon en el flanco derecho y porque se administró la dosis cuando el tumor había crecido al menos hasta un diámetro de 8 mm (8 – 12 mm) correspondiente aproximadamente al volumen tumoral de 200 -800 mm^3. Los conjugados de boro anti-EGFR1-Fab radiomarcados (^{14}C) se inyectaron por vía i.v. a través de la vena de la cola o mediante inyección intratumoral (Grupo X) en 100 µl de PBS que contenía manitol 5 % y polisorbato 0,1 % (los grupos de estudio se enumeran en la Tabla 10). Se usaron tres ratones por muestra. A cada ratón se le administraron aproximadamente 400 000 cpm del conjugado (ver anteriormente la preparación de los conjugados anti-EGFR1 Fab BSH dextrano para el estudio en animales; Tabla 10). Los ratones se sacrificaron a las 24 horas o 48 horas (Grupo IX) y los órganos se recolectaron y se contó la radioactividad para determinar la biodistribución de los conjugados en los tejidos. Además, se recolectaron muestras de sangre a los 30 min, 2 horas y 8 horas después de la administración de los conjugados de boro.

Los tejidos se prepararon para la cuantificación de ^{14}C como se describió en el Ejemplo 8. Las muestras de sangre en las pruebas de aclaramiento se prepararon como en el Ejemplo 8 con la excepción de que se usaron 200 µl de Solvable y 90 µl de H_2O_2. Los resultados son un promedio de tres ratones.

La Tabla 11 muestra las relaciones de tumor a sangre para los ratones administrados con el conjugado anti-EGFR1 Fab dextrano marcado con ^{14}C.

Tabla 11. Relación tumor/sangre del conjugado de boro ^{14}C en ratones portadores de tumor HSC-2. El valor para el G IX es la relación tumor/cerebro ya que se determinó que la radioactividad en la sangre era del 0 % (todas las muestras de sangre fueron negativas después de deducir los niveles de fondo). Grupo I: 250 µg; Grupo II: 500 µg; Grupo III 1000 µg; Grupo IV: 1500 µg; Grupo V: 2000 µg; Grupo X: 250 µg; Grupo VIII: 250 µg + 250 µg después de 2 horas; y Grupo IX: 250 µg + 250 µg después de 24 horas. Todos los grupos se administraron por vía *iv* excepto el Grupo X que se administró intratumoral. Los órganos se recolectaron a las 24 horas excepto el Grupo IX a las 48 horas. Relación tumor/sangre del Grupo VIII de un ratón (debido a la presencia de un valor de cpm en sangre en el grupo).

G I	G II	G III	G IV	G V	G X	G VIII	G IX
11,2	12,8	9,7	23,8	28,8	4394,3	9,3	6,2

Tabla 12. Aclaramiento en sangre de los conjugados de boro ^{14}C en los tres grupos. La columna izquierda muestra el tiempo después de la administración (min/hora) y los valores son el % de la dosis total inyectada/g de sangre.

	G I	G III	G V
30 min	6,546±0,991 %	9,809±0,876 %	7,486±0,235 %
2 h	1,461±0,256 %	2,802±0,416 %	1,854±0,608 %
8 h	0,489±0,034 %	0,74±0,055 %	1,76±1,109 %
24 h	0,089±0,016 %	0,122±0,014 %	0,086±0,051 %

EJEMPLO 12. Experimentos in vivo con anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano mediante cuantificación directa de boro

Preparación del anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano

El anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano se preparó como se describió en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente. La oxidación se realizó como se describió en el Ejemplo 3 pero en dos lotes; uno con 80 mg, el otro con 96 mg de BSH-dextrano. Según los análisis de RMN, las muestras del BSH-dextrano contenían aproximadamente 880 y 500 boros, respectivamente.

Los fragmentos Fab anti -EGFR1 se prepararon mediante digestión con papaína como se describió en el Ejemplo 5. Las reacciones de conjugación se realizaron como en el Ejemplo 4 pero en cuatro lotes: dos con 15,7 mg del Fab anti-EGFR1 y 40 mg de ox-BSH-dextrano, otros dos con 18,8 mg del Fab anti-EGFR1 y 48 mg de ox-BSH-dextrano.

Todos los conjugados de boro se analizaron en SDS-PAGE como en el Ejemplo 6 y se marcaron con Alexa Fluor® 488-NHS. El ensayo de internalización con células HSC-2 se realizó con las moléculas marcadas con Alexa Fluor como se describió en el Ejemplo 7.

El tampón de muestra se cambió a manitol 5 % – Tween80 0,1 % en PBS antes de la preparación de la muestra de prueba para el ratón y la filtración estéril.

Experimento in vivo con anti-EGFR Fab BSH-dextrano

Se generaron ratones portadores de xenoinjerto como en el Ejemplo 11. El anti-EGFR Fab BSH-dextrano se administró en 100 µl de solución de manitol/Tween/PBS i.v. o en 40 µl de solución de manitol/Tween/PBS por vía intratumoral (i.t.). En la administración i.t., la aguja se pasó al tumor a través de un único sitio de inyección y se movió en una técnica de abanico para distribuir la sustancia de prueba por todo el tumor. En dependencia del tamaño y la forma del tumor, se usó un total de tres o cuatro pasadas.

Los órganos se recolectaron a las 24 horas y las muestras de sangre se recolectaron a los 30 min, 2 horas y 8 horas (grupos de estudio II y V).

Cuantificación de boro

Los tejidos se prepararon para la cuantificación directa de boro mediante ICP-MS como se describió anteriormente. Además, se digirieron tres muestras de control que contenían ~ 50 mg del estándar de referencia NIST, 1573 hojas de tomate. Las muestras digeridas se diluyeron a 1:10 o 1:100.

La tabla 13 ilustra el boro en órganos seleccionados y la tabla 14 muestra las relaciones tumor a sangre. La administración intratumoral muestra una concentración de boro tumoral considerablemente mayor en comparación con la administración iv.

Tabla 13. Biodistribución de los conjugados Fab BSH-dextrano anti-EGFR1 en ratones portadores de tumor HSC-2 mediante cuantificación de boro. Los resultados representan un promedio de cuatro determinaciones +/- SEM. Los grupos de estudio fueron: Grupo I: tampón solamente (manitol/Tween/PBS) i.v.; Grupo II: 2 mg i.v.; Grupo III: 2 mg + dextrano i.v.; Grupo IV: 250 µg i.t.; Grupo V: 2 mg i.t. Los valores son µg de boro en g de órgano. Se realizó la prueba t de Student (mediante el uso del programa informático Statistica 12[StatSoft]) para los valores de boro del tumor de los grupos II vs III y para los grupos IV vs V. Los grupos IV y V mostraron diferencias significativas entre las cantidades de boro (valor de p = 0,009).

	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo I
Sangre	0,56±0,18	0,87±0,14	0,1±0,05	0,22±0,01	0,32±0,21
Hígado	18,3±1,25	17,54±1,15	1,02±0,33	6,97±0,86	0,27±0,09
Riñón	6,57±0,57	6,44±0,41	0,87±0,27	3,78±0,24	0,76±0,31
Músculo	1,87±0,34	1,51±0,9	0,56±0,25	0,7±0,31	0,87±0,51
Piel	2,11±0,16	1,46±0,14	0,43±0,13	1,27±0,85	0,17±0,09
Tumor	2,19±1,01	9,54±8,59	9,22±2,3	53,09±11,45	0,62±0,53
Bazo	4,95±0,9	5,91±0,88	2,01±0,5	1,88±0,59	1,34±0,53

Tabla 14. Relaciones de tumor a sangre +/- SEM.

Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo I
10,8±7,1	13,6±12,5	131,3±40,7	240,8±49,4	4,6±3,6

EJEMPLO 13. Producción del Fab anti-EGFR1 en *E. coli*

Optimización del péptido señal para la secreción periplásmica del Fab anti-EGFR1

La estrategia de expresión para el Fab anti-EGFR1 estaba dirigida al periplasma, donde pueden formarse puentes disulfuro estables.

El conjunto de vectores comerciales pDD441-SSKT (promotor T5, selección de kanamicina) se usó para la optimización del péptido señal. Se usaron los siguientes péptidos señal: i) MalE (proteína de unión a maltosa), ii) pelB (pectato liasa), iii) ompA (proteína de membrana externa A), iv) phoA (fosfatasa alcalina bacteriana) y v) gIII (glicoproteína de envoltura de PRV). Los vectores pGF115 - pGF119 se construyeron mediante el uso de secuencias de ADN sintéticas, amplificación por PCR con polimerasa de alta fidelidad y ensamblaje continuo de Gibson como herramientas de rutina. Además, se construyó el vector pGF150 con péptido señal stII (enterotoxina II estable al calor) para la cadena pesada y ligera de acuerdo con Carter y otros, 1992: High level *E. coli* expression and production of bivalent humanized antibody fragment, Biotechnology (N Y), 10(2) 163-7. El vector pGF150 era dicistrónico y tenía el promotor T7 para la expresión. El casete de expresión para el Fab anti-EGFR1 era dicistrónico con un sitio interno de unión al ribosoma entre la cadena pesada y la ligera. La configuración del vector de expresión general para la optimización del péptido señal se ejemplifica en la Figura 5. Las combinaciones de péptidos señal en los vectores pGF115 - pGF119 se enumeran en la Tabla 15.

Tabla 15. Combinaciones de péptidos señal en los vectores pGF115 - pGF119.

Vector	Péptido señal de la cadena pesada	Péptido señal de la cadena ligera
pGF115	>gIII MKKLLFAIPLVVPFYSHS (SEQ ID NO: 16)	>ompA MKKTAIAIAVALAGFATVAQA (SEQ ID NO: 17)
pGF116	>malE MKIKTGARILALSALTTMMFSASALA (SEQ ID NO: 18)	>ompA MKKTAIAIAVALAGFATVAQA (SEQ ID NO: 17)
pGF117	>phoA MKQSTIALALLPLLFTPVTKA (SEQ ID NO: 19)	>ompA MKKTAIAIAVALAGFATVAQA (SEQ ID NO: 17)
pGF118	>pelB MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 20)	>ompA MKKTAIAIAVALAGFATVAQA (SEQ ID NO: 17)
pGF119	>ompA MKKTAIAIAVALAGFATVAQA (SEQ ID NO: 17)	>pelB MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 20)
pGF150	>stII MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYA (SEQ ID NO: 21)	>stII MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYA (SEQ ID NO: 21)

Las células *E. coli* W3110 (colección de microbiología ATCC) electrocompetentes se transformaron con los vectores pGF115 - pGF119 con Biorad GenePulser, pulsado con el programa Ec2 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las transformaciones se sembraron en placas con LB + agar + kanamicina 25 mg/L y se cultivaron durante toda la noche a +37 ˚C.

Las colonias individuales se sometieron a selección de la expresión de acuerdo con el protocolo estándar. En el día 1, se inocularon precultivos durante toda la noche en 5 mL de LB líquido suplementado con kanamicina con una concentración final de 20 mg/L, se cultivaron con agitación a 220 rpm, +37 ºC. En el día 2, 200 µL de precultivo o/n se volvieron a inocular en 10 mL de LB líquido + kanamicina 10 mg/L. El cultivo continuó con agitación 220 rpm, +37 °C, hasta que la OD_{600} alcanzó el nivel 0,6 – 0,9. La producción del Fab se indujo con IPTG, a una concentración final de 500 µM. El cultivo continuó con agitación 220 rpm, +20 °C, durante toda la noche. Se recolectaron muestras de 1 mL de

los puntos de tiempo post-inducción 4 horas y o/n. Las células se cosecharon por centrifugación 8000 x G 10 min, se desechó el sobrenadante, el sedimento se suspendió a 100 µl de TE 10 x pH 7,5 (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM). Las muestras se sometieron a agitación en vortex vigorosamente 1 hora a temperatura ambiente, se centrifugaron a 16 000 x G 10 minutos y el sobrenadante se recolectó en un tubo Eppendorf nuevo como un extracto periplásmico.

Los extractos periplásmicos se analizaron posteriormente mediante transferencia Western. Se mezclaron 100 µl de extracto con 20 µl de tampón de carga reductor o no reductor. Se cargaron 20 µl de mezcla en gel Precise Tris-Glicina SDS-Page 4-20 % (Thermo Scientific). El gel se corrió en tampón de corrida Laemmli 1 x, 200 V ~ 45 min y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia Tris-Glicina, 350 mA ~ 45 min. Se usó el sistema BioRad Mini-protean para SDS-Page y para la transferencia. La membrana transferida se bloqueó con BSA al 1 % en PBS. La detección se realizó con IgG antihumana (específica del Fab) con conjugado de peroxidasa (Sigma Aldrich; cat. núm. A0293) y sustrato Luminata Forte Western HRP (Millipore; cat. núm. WBLUF0500). La reacción de quimioluminiscencia se detectó con el analizador Fujifilm Luminescent Image LAS4000.

De acuerdo con los análisis de transferencia Western de varios cultivos de expresión, los vectores y pGF119 pGF115 parecían ser mejor que los demás. Sin embargo, la cantidad del Fab producida en el periplasma se mantuvo en el nivel de 0,3 – 0,8 mg/L en estos experimentos iniciales. La combinación usada en el vector pGF119 (péptido señal ompA para HC y péptido señal pelB para LC) se seleccionó para la continuación.

El vector pGF150 con el promotor T7 y la secuencia señal stII para el direccionamiento periplásmico de la cadena pesada y de la cadena ligera del Fab anti-EGFR1 se transformó en la cepa BL21(De3). En comparación con otros, parecía al menos tan bueno como pelB para la cadena ligera y ompA para la cadena pesada, como se usó en el vector pGF119.

Optimización del promotor para la expresión del Fab

En las evaluaciones preliminares se usaron tres promotores diferentes; T5 inducible por IPTG, T7 inducible por IPTG y Rham inducible por ramnosa. Las secuencias promotoras se originaron a partir de los vectores comerciales pET-15b, pD441 y pD881. Se usaron péptidos señal ompA para HC y pelB para LC. Los casetes de expresión se construyeron de manera dicistrónica, sitio de unión al ribosoma interno *taa*GGATCCGAATTC**AAGGAGATAAAAA***atg* (SEQ ID NO: 22) entre la cadena pesada y la ligera en cada vector. Los códigos de los vectores y los promotores se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Optimización del sistema promotor para la expresión del Fab; códigos de los vectores y los promotores usados.

Vector	**promotor**
pGF119	T5
pGF121	T7
pGF132	Rham

pGF119 y pGF132 se electroporaron en *E. coli* cepa W3110 como se describió anteriormente. Las células *E. coli* BL21(De3), químicamente competentes (New England Biolabs), se transformaron con el vector pGF121 con el promotor T7 de acuerdo con el protocolo de choque térmico proporcionado por el proveedor. Se realizaron cultivos de expresión, preparación de muestras y análisis de extractos periplásmicos como se describió anteriormente. Se realizó la primera comparación entre las cepas W3110 pGF119 y BL21(De3) pGF121. Los extractos periplásmicos se hicieron en paralelo con tampón 10XTE y con tampón de desoxicolato al 0,05 %.

Como se ejemplificó en la Figura 6, el promotor T7 fue ligeramente mejor que el promotor T5, aunque la diferencia no fue muy notable. Los experimentos repetidos con las cepas W3110 pGF119 y BL21(De3) pGF121 revelaron de todos modos que los cultivos de expresión con BL21(De3) pGF121 eran más estables y reproducibles que con W3110 pGF119. Se lograron tasas de crecimiento más rápidas y mayores densidades celulares con BL21(De3) pGF121 que con W3110 pGF119 (datos no mostrados).

La segunda etapa en la selección del promotor fue analizar los niveles de expresión preliminares de cultivos a pequeña escala con W3110 pGF132 (promotor inducible por ramnosa). Una de las ventajas del promotor inducido por ramnosa es que el nivel de expresión puede ajustarse variando la concentración de ramnosa. Con algunas proteínas de interés, el nivel de expresión más bajo ha conducido realmente a títulos globales más altos debido al plegamiento y ensamblaje correcto de la proteína diana y a una mayor densidad celular de la cepa de producción. Como resultado de lo anterior, la inducción se realizó con concentraciones crecientes de ramnosa en cultivos paralelos de 10 mL de LB líquido (0, 0,25 mM, 1 mM, 4 mM y 8 mM). Se usaron tres temperaturas diferentes después de la inducción; +20 ˚C, +28 ˚C y +37 ˚C. Se cosecharon muestras de 1 mL en el punto de tiempo de 4 horas después de la inducción. El muestreo, la extracción periplásmica y el análisis se realizaron como se describió en el ejemplo 1.

Como se muestra en la Figura 7, el nivel de expresión con el promotor inducible por ramnosa permaneció por debajo del nivel alcanzado con BL21(De3) pGF121 (promotor T7). La regulación del promotor con concentraciones crecientes de

ramnosa fue más funcional a +20 °C. De cualquier manera, los títulos más altos con el sistema ramnosa se lograron a +28 °C.

En base a los experimentos repetidos descritos anteriormente, el sistema promotor BL21(De3) y T7 se seleccionaron como una plataforma básica para la producción del Fab anti-EGFR1 en *E. coli*.

Optimización de codones del Fab anti-EGFR1 para la expresión en células de *E. coli*

Se evaluaron tres secuencias HC/LC con diferentes patrones de optimización de codones para *E. coli* y una secuencia HC/LC optimizada originalmente para células CHO. Los vectores se construyeron como se describió para pGF119, de manera dicistrónica y el promotor T5 que conduce la expresión. El huésped de expresión fue *E. coli* W3110. Se realizaron cultivos a pequeña escala, muestreo y análisis de extractos periplásmicos como se describió anteriormente. La secuencia en el vector pGF119 se seleccionó como nivel de referencia. El patrón de optimización de codones tuvo un efecto drástico en el nivel de expresión (Tabla 17). Las secuencias de *E. coli* versión 2 (pGF128) y células CHO optimizadas (pGF126) no funcionaron en la cepa huésped W3110, solo se detectaron trazas del Fab de los cultivos de expresión mediante transferencia Western. El nivel de expresión alcanzado con *E. coli* versión 3 (pGF129) fue significativamente mejor, pero aún similar a los niveles de referencia. Debido a que la mayoría de los vectores ya estaban hechos con *E. coli* versión 1 (pGF119) y debido a que no se realizaron mejoras en comparación con la referencia mediante el cambio del patrón de optimización de codones, se seleccionaron para usar las secuencias de *E. coli* versión 1 del vector pGF119 (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11).

Tabla 17. Evaluación de las secuencias codificantes del Fab anti-EGFR1 con diferentes patrones de optimización de codones. Vector codificante y resultados.

Vector	**Patrón de optimización de codones**	**Nivel de expresión**
pGF119	*E. coli*, versión 1	referencia
pGF128	*E. coli*, versión 2	expresión baja o nula
pGF129	*E. coli*, versión 3	similar a la referencia
pGF126	Célula CHO	expresión baja o nula

Comparación de la configuración dicistrónica con la configuración dual vector promotor

En la configuración del vector dicistrónico, la secuencia espaciadora entre la cadena pesada y la ligera, que incluye el sitio de unión al ribosoma, es relativamente corta, solo 25 nucleótidos en el pGF119. Para expandir este espacio entre la cadena pesada y la ligera, se construyeron los vectores pGF120 y pGF131, en los que ambas cadenas se expresaron bajo el control de los promotores T5 o T7 separados, respectivamente. Los vectores se construyeron mediante el uso de las secuencias existentes en el vector dicistrónico pGF121. Una vez completado, el pGF120 se electroporó en la cepa W3110 y las células *E. coli,* químicamente competentes BL21(De3) y Lemo21(De3), se transformaron con el pGF131. Se realizaron evaluaciones de la expresión a pequeña escala como anteriormente y se hizo una comparación entre vectores promotores dicistrónicos y duales (pGF119 vs pGF120; pGF121 vs pGF131).

Como se demostró en la Figura 8, el promotor dual T5 fue claramente más eficiente para la producción del Fab anti-EGFR1 que la configuración dicistrónica. Con el promotor T7, la diferencia no era tan clara, pero se notó que había una mayor cantidad de cadena Fab no ensamblada presentada con un sistema de promotor dual que con una configuración dicistrónica. La siguiente etapa de optimización planeada fue aplicar plásmidos auxiliares de chaperonas a la cepa de expresión para promover el plegamiento y ensamblaje correcto. La configuración del promotor dual con el promotor T7 (vector pGF131) se seleccionó para la continuación.

Construcción de plásmidos auxiliares de chaperonas

Para mejorar la expresión del Fab, se seleccionaron las chaperonas periplásmicas y citoplasmáticas para la expresión conjunta con el vector pGF131. Como un vector principal para plásmidos auxiliares de chaperonas, se seleccionó pCDF-1b (Novagen). pCDF-1b tiene promotor T7, operador lac, origen de replicación derivado de CloDF13 y resistencia a antibióticos estreptomicina/espectinomicina. Es compatible para la expresión conjunta con vectores pET, y por esa razón es adecuado para expresarse junto con pGF133 que tiene una cadena principal pET-15b.

Las secuencias de chaperona se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de *E. coli* con PCR y polimerasa de fusión de alta fidelidad (Thermo Scientific). Los fragmentos amplificados se clonaron en el esqueleto de pCDF-1b mediante el uso de la digestión/ligación tradicional de clonación y el ensamblaje continuo de Gibson. La configuración de los plásmidos auxiliares de chaperonas se describe con más detalles en las tablas 18-20. 5 – 7.

Tabla 18. Estrategia de clonación de los plásmidos auxiliares de chaperonas pGF134, pGF135, pGF137, pGF138.

vector	descripción	cebadores	vector	inserto	clonación
pGF134	Chaperona periplásmica SKP de E. coli	GP1113 GP1114	pCDF-1b digerido con NcoI/NotI	Producto de PCR digerido con NcoI/NotI	Restricción y ligación
pGF135	Chaperonas periplásmicas SKP y FkpA de E. coli	GP1115 GP1116	pGF134 digerido con XhoI/NotI	Producto de PCR digerido con XhoI/NotI	Restricción y ligación
pGF137	Chaperonas citoplasmáticas DnaK/DnaJ de E. coli	GP1119 GP1120	pCDF-1b digerido con NcoI/NotI	Producto de PCR no digerido	Ensamblaje de Gibson
pGF138	Chaperonas citoplasmáticas DnaK/DnaJ GrpE de E. coli	GP1147 GP1148	pGF137 digerido con XhoI	Producto de PCR no digerido	Ensamblaje de Gibson

Tabla 19. Secuencias de cebadores usadas para la construcción de los plásmidos auxiliares de chaperona.

GP1113	CGGGATCCAAGAAGGAGATATACCATGGCAAAAAAGTGGTTATTAGCTGC (SEQ ID NO: 23)
GP1114	ATAATGCGGCCGCATTATTTAACCTGTTTCAGTAC (SEQ ID NO: 24)
GP1115	ATAATGCGGCCGCAAGAAGGAGATATACCATGGCAAAATCACTGTTTAAAGTAACG (SEQ ID NO: 25)
GP1116	ATAATCTCGAGATTATTTTTTAGCAGAATCTGC (SEQ ID NO: 26)
GP1147	TGACCCGCTAATGCGGCCGCACTGAGTGCTTCCCTTGAAACCCTGAAACTGATC (SEQ ID NO: 27)
GP1148	GGTTTCTTTACCAGACTCAAACGGCCCGGCATTCGCATGCAGGGCCGTGAATTATTACG (SEQ ID NO: 28)

Tabla 20. Chaperonas usadas.

chaperona	número de acceso de uniprot
SKP	B7MBF9
FkpA	H9UXM6
DnaK	B7M9S6
DnaJ	C6EB39
GrpE	C8U980

Coexpresión del Fab anti-EGFR1 con plásmidos auxiliares

Las células BL21(De3) y Lemo21(De3) químicamente competentes se transformaron con el vector pGF131 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron pocos clones y se verificó la expresión del Fab anti-EGFR1 mediante cultivos de expresión preliminares, como se describió anteriormente. Se seleccionaron los mejores clones como fondo para la expresión conjunta con plásmidos auxiliares de chaperona.

Las células electrocompetentes BL21(De3) pGF131 y Lemo21(De3) pGF131 se construyeron como sigue. Se cultivaron 5 mL de precultivo o/n en LB líquido suplementado con kanamicina 20 mg/L. El día 2, se volvió a inocular 1 mL de precultivo en 50 mL de LB líquido con kanamicina 20 mg/L. El cultivo continuó a +37 °C 220 rpm ~ 3 horas, hasta que la OD_{600} alcanzó el nivel 0,5. Las células se cosecharon por centrifugación, 10 min 8000 x g y se suspendieron en 10 mL de glicerol al 10 % enfriado con hielo. Se repitió la cosecha por centrifugación, seguida de suspensión en 5 mL de glicerol al 10 % enfriado en hielo. Las células se dividieron en alícuotas de 10 x 500 ul y se almacenaron a -80 ºC.

Los plásmidos auxiliares de chaperona pGF134 y pGF135 se electroporaron en las cepas BL21(De3) y Lemo21(De3) con BioRad Gene Pulser, programa Ec2. La mezcla se sembró en placas de LB + km + stre después de un precultivo corto a +37 °C y las placas se cultivaron a +37 °C durante toda la noche. Los cultivos de expresión preliminares se hicieron como anteriormente.

Como se ejemplificó en la Figura 9, la chaperona SKP tiene un efecto claramente beneficioso sobre la producción, pero la diferencia con la cepa de fondo que alberga solo el plásmido de expresión pGF131 no fue notable. De cualquier manera, los clones con plásmido auxiliar de chaperona tendieron a crecer más rápido y alcanzar mayores densidades celulares. Los cultivos con plásmido auxiliar de chaperona pGF134, además, fueron más reproducibles y estables. No hubo diferencias entre los plásmidos auxiliares de chaperonas periplásmicos pGF4134 (chaperona SKP) y pGF135 (chaperonas SKP y FkpA). La expresión de las chaperonas citoplasmáticos DnaK/J GrpE del plásmido auxiliar pGF138 no mejoró adicionalmente el nivel de expresión. Por esa razón las cepas de Lemo21(De3) pGF131 pGF134 y BL21(De3) pGF131 pGF134 se seleccionaron para la continuación y para el desarrollo del proceso de fermentación.

Anti-EGFR de cadena única

El vector de expresión pGF155 para el ScFv anti-EGFR1 con secuencia señal ompA (SEQ ID NO: 13) se construyó y se amplificó por PCR con polimerasa de alta fidelidad y ensamblaje de Gibson en el esqueleto pET-15b. En la construcción, los polinucleótidos codificantes de la región variable de la cadena ligera y de la región variable de la

cadena pesada se separaron mediante la secuencia de enlace/espaciadora G4S (SEQ ID NO: 29) que codifica la secuencia enlazadora de 15 mer establecida en la SEQ ID NO: 30.

La cepa de fondo BL21(De3) se transformó con el vector pGF155 solo o en combinación con plásmidos auxiliares de chaperona, y los niveles de expresión se evaluaron en base a cultivos preliminares de 10 mL.

Producción del Fab anti-EGFR1 en la cepa de *E. coli* cultivada con fermentador (BL21[DE3]pGF131pGF134); cultivo suplementado con extracto de levadura.

Inoculación

Se inocularon varias (5-8 colonias) colonias de *E. coli* (BL21[DE3]pGF131pGF134) de la placa de agar LB en 5 mL de medio líquido LB suplementado con kanamicina (25 mg/L) y estreptomicina (30 mg/L). El inóculo (1er inóculo) se incubó a +37 °C, 220 rpm, durante 5 horas. Se usó 1 mL de 1er inóculo para inocular 100 mL de medio de cultivo de inóculo (abajo) suplementado con kanamicina (25 mg/L) y estreptomicina (30 mg/L) en un frasco de agitación de 500 mL (2do inóculo). El 2do inóculo se incubó a +37 °C, 220 rpm, <16 horas. Se transfirieron 10 mL de segundo inóculo en 100 mL de medio de cultivo Inóculo (abajo) suplementado con kanamicina (25 mg/L) y estreptomicina (30 mg/L) en un frasco de agitación de 500 mL (3er inóculo). El 3er inóculo se incubó a +37 °C, 220 rpm, hasta alcanzar la OD_{600} ~ 2,0 y este inóculo se usó para inocular 900 mL de medio de cultivo por Lotes de Fermentador (abajo) suplementado con kanamicina (25 mg/L) y estreptomicina (30 mg/L) en el recipiente de cultivo de fermentador (2 L) que resultó en un volumen final de 1000 mL y un valor de OD_{600} de 0,2.

Tabla 21. Componentes del medio de cultivo de inóculo (elementos metálicos traza[TME] de $FeCl_3$ x 6 H_2O to $MgSO_4$ x 7 H_2O).

Reactivo	Mw (g/mol)	mg/L	c (mmol/L)
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	177,99	8600	48,317
K_2HPO_4	174,2	3000	17,222
NH_4Cl	53,49	1000	18,695
NaCl	58,44	500	8,556
$FeCl_3$ x 6 H_2O	270,33	66	0,245
H_3BO_3	61,83	3	0,049
$MnCl_2$ x 2 H_2O	161,87	12	0,076
EDTA x 2 H_2O	372,24	8,4	0,023
$CuCl_2$ x 2 H_2O	170,48	1,5	0,009
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	429,89	2,5	0,006
$CoCl_2$ x 6 H_2O	237,93	2,5	0,011
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	287,54	10	0,036
Glucosa	180,16	10000	55,506
$MgSO_4$ x 7 H_2O	246,47	600	2,434

Tabla 22. Medio de Cultivo por Lotes de Fermentador (elementos metálicos traza[TME] de $FeCl_3$ x 6 H_2O to $MgSO_4$ x 7 H_2O).

Reactivo	Mw (g/mol)	mg/l	c (mmol/l)
K_2HPO_4	174,2	16600	95,293
$(NH_4)_2HPO_4$	132,07	4000	30,287
Ácido cítrico x 1 H_2O	210,14	2297	10,931
$FeCl_3$ x 6 H_2O	270,33	83	0,306
H_3BO_3	61,83	3,8	0,061
$MnCl_2$ x 2 H_2O	161,87	15	0,095
EDTA x 2 H_2O	372,24	10,5	0,028
$CuCl_2$ x 2 H_2O	170,48	1,9	0,011
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	429,89	3,1	0,007
$CoCl_2$ x 6 H_2O	237,93	3,1	0,013
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	287,54	13	0,046
Glucosa	180,16	25000	138,766
$MgSO_4$ x 7 H_2O	246,47	1500	6,086

Fase de fermentación por lotes

Después de inocular el recipiente de cultivo de fermentador, se establecieron los siguientes parámetros mediante el uso de la unidad de control digital Biostat®B Plus:

-temperatura +37 °C

-pH 6,8 (12,5 % NH3, H3PO4 15 %)

-pO2 (modo en cascada) > 25 %

-Tasa de agitación 15 % - 75 % (=300 rpm – 1500 rpm)

-Flujo de gas (aire) 13 % - 50 % (= 0,4 L – 1,5 L)

En el punto de tiempo ~ 8,5 horas de la fase del lote de fermentación, el valor de DOT (Tensión de oxígeno disuelto) alcanzó su punto máximo bruscamente, lo que redujo la velocidad de agitación y el flujo de gas. Esto indicó el agotamiento de la glucosa presente en el medio de cultivo en lotes (25 g/L) y el final de la fase de fermentación por lote. Se alcanzó el valor de OD_{600} 31 durante la fase de fermentación por lote.

Fase de alimentación por lotes de fermentación

Se bombeó FS (solución de alimentación) 1.1 (Glc 67 %, $MgSO_4$ 2 %) en el recipiente de cultivo del fermentador durante 6 horas 20 min, 0,24 mL/min. Durante esta fase del lote alimentado FS 1.1, se alcanzó el valor OD600 70.

Se bombeó FS 1.2 (Glc 50 %, $MgSO_4$ 1,5 %, 7,4 g/100 mL de extracto de levadura, 15 veces la concentración de TME[elementos metálicos traza] en comparación con el medio de cultivo por lotes de fermentador, 0,32 g/L de tiamina) en el recipiente de cultivo de fermentador durante 7 horas, 0,24 mL/min. Se alcanzó el valor OD_{600} 134. En este punto, la velocidad de bombeo se redujo a 0,13 mL/min durante 11 horas 40 min. El valor de OD_{600} no aumentó de 134. Además, se realizó otra corrida de fermentador sin suplementar con extracto de levadura y esta corrida de fermentador resultó en aproximadamente 20 mg/L del Fab anti-EGFR1 como se estimó con el análisis de transferencia Western como se muestra más abajo.

Durante la fase de alimentación en lote, se siguió la concentración de glucosa en el cultivo en suspensión mediante el uso de barras Keto-diabur-test 5000 (Roche, Cat #: 10647705187) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Inducción de síntesis de proteínas

Antes de la inducción de la síntesis de proteínas con IPTG, la temperatura de cultivo se redujo de +37 °C a +20 °C. La inducción de la síntesis de proteínas con IPTG (concentración final de IPTG 1 mM) se realizó a un valor de OD600 de 86. La inducción de la síntesis de proteínas se realizó durante 16 horas.

Recolección de las muestras durante la ronda de fermentación

Se recolectaron muestras para análisis por transferencia Western (muestra de pellet de 2 X 1 mL y muestra de sobrenadante de 2 X 1 mL) en diferentes puntos de tiempo. Se tomaron muestras previas a la inducción justo antes de la inducción de la síntesis de proteínas con IPTG. Se recolectó otro conjunto de muestras a las 4 horas del punto de tiempo de inducción. El último conjunto de muestras se recolectó en el punto de tiempo de inducción de 16 horas antes de la cosecha del cultivo. Las células se centrifugaron en las muestras (+4 °C, 5000 X g, 15 min) y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron mediante el uso del método de transferencia Western.

Cosecha de células

La suspensión de cultivo de fermentación se recolectó en tubos de centrífuga SLA 3000 (Sorvall RC6) mediante el uso de una bomba Watson Marlow 504U 056.3762.00, y los tubos de centrífuga se equilibraron. Las células se centrifugaron (+4 °C, 5000 X g, 60 min) y se desechó el sobrenadante. Los pellet celulares se almacenaron a -20 °C.

Análisis de transferencia Western del Fab anti-EGFR1 expresado en periplasma

Las muestras de pellets que representan 1 mL de la suspensión del cultivo de fermentación se suspendieron en 1 mL de 10 x TE pH 7,5 (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM). Las muestras se agitaron vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugaron a +4 °C, 12 000 x g, 60 min y los sobrenadantes se recolectaron como extractos periplásmicos.

Los extractos periplásmicos se analizaron adicionalmente con transferencia Western. Se mezclaron 100 µL de extracto con 25 µL de tampón de carga no reductor. Se cargaron 12,5 µl de mezcla en gel de SDS-Page de Tris-Glicina Precise al 4-20 % (Thermo Scientific). El gel se corrió en tampón de ejecución Laemmli 1 x 200 V ~ 45 min y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia Tris-Glicina, 350 mA ~ 1,5 horas. Se usó el sistema BioRad Mini-protean para SDS-Page y para la transferencia. La membrana transferida se bloqueó con BSA al 1 % en PBS. La detección se realizó con IgG antihumana (específica del Fab) con conjugado de peroxidasa (Sigma Aldrich; cat. núm. A0293) y sustrato Luminata Forte Western HRP (Millipore; cat. núm. WBLUF0500). La reacción de quimioluminiscencia se detectó con el analizador Fujifilm Luminescent Image LAS4000.

Se mezclaron 10 µl de cada muestra de sobrenadante de cultivo con 2,5 µl de tampón de carga no reductor y estas muestras se procesaron en gel SDS-PAGE y se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa como se describió anteriormente para las muestras de extracto periplásmico. Los resultados se muestran en la Figura 10.

Purificación del Fab

El tampón del extracto periplásmico filtrado se intercambió a MES 50 mM pH 6 mediante el uso de un filtro centrífugo Amicon Ultra 10K antes de la primera etapa de purificación mediante una columna de intercambio catiónico de 5 mL (HiTrap SP FF, GE Healthcare). La fase móvil A era MES 50 mM pH 6 y la fase móvil B era MES 50 mM pH 6 + NaCl 500 mM. La muestra se filtró a través de una membrana de 1,2 µm antes de la corrida. Primero, se inyectó el 10 % de la muestra en la columna a una velocidad de flujo de 2,5 mL/min durante 5 minutos, después de lo cual la velocidad de flujo se cambió a 5 mL/min. La columna se corrió con 57,5 mL de fase A, y después se aplicó un gradiente lineal desde 0 % B a 100 % B sobre 35 mL. Se recolectaron fracciones de 2,5 mL y se agruparon las fracciones A5-A9. El resto de la muestra se corrió en dos ejecuciones separadas como se describió anteriormente y las fracciones A5-A10 se agruparon (Figura 11). Se usó el Fab anti-EGFR1 digerido con papaína como control.

Las fracciones agrupadas (A5-A10) se inyectaron en la columna de proteína L (1 mL) sin cambiar el tampón. La proteína L se corrió a una velocidad de flujo de 0,2 mL/min durante la inyección de la muestra y 1 mL/min durante el lavado y la elución. La fase móvil A era PBS y B citrato de Na 0,1 M pH 3. La muestra se eluyó con 100 % de B. La proteína eluyó con un pico agudo (Figura 12) y las fracciones A5-A7 se agruparon y se neutralizaron con Tris-HCl 2 M pH 9. Después de las dos etapas de purificación, se estimó que el rendimiento del Fab era de aproximadamente 44 mg/L. Se sometió otro lote solo para la purificación por proteína L y esto produjo aproximadamente 72 mg/L de la fracción Fab. Se usó el Fab anti-EGFR1 digerido con papaína como control.

Las fracciones agrupadas se analizaron en SDS-PAGE. 24 µl de cada una de estas tres muestras agrupadas de corridas cromatográficas con la columna de proteína L, se mezclaron con 6 µl de tampón de carga reductora y se corrieron en gel SDS-PAGE. El gel se tiñó con tinción a base de Coomassie (Figura 13).

EJEMPLO 14. Unión del Fab anti-EGFR1 y el Fab anti-EGFR1 BSH-dextrano al EGFR1

El anti-EGFR1 producido en células CHO purificado con proteína A se digirió con papaína, se purificó con columnas de Proteína NAb A Plus Spin y se trató con Endo F2 recombinante (*Elizabethkingia meningosepticum* (producida en *E. coli*, Calbiochem) que escinde oligosacáridos biantenarios y con alto contenido en manosa dejando un GlcNAc unido a asparagina de manera que se obtiene fragmentos Fab no glicosilados. Se añadieron 100 mU de la enzima a aproximadamente 1 mg del Fab anti-EGFR1 y se incubó durante toda la noche a +37 ºC en NaAc 50 mM pH 4,5.

100 µg del Fab anti-EGFR1 y 100 µg del Fab anti-EGFR1 BSH-dextrano se marcaron con Cy3 mediante el uso de Amersham Cy3 monorreactivo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se prepararon soluciones de 0,5 mg/mL en tampón citrato/fosfato pH 7 para usarse en la impresión de microarreglos.

Se imprimió un arreglo de seis moléculas diferentes (HER2, EGFR1 humano, CD64, CD16a, HSA e IgG anti-dextrano) en portaobjetos de microarreglos activados-(NHS) sobre la amina reactiva N-hidroxisuccinimida (cuatro puntos paralelos para cada molécula). El conjugado del Fab anti-EGFR1 BSH-dextrano marcado con Cy3 y el Fab anti-EGFR1 se incubaron en pocillos separados del portaobjetos en ocho concentraciones que varían de 0,4 nM a -900 nM. La unión no específica se eliminó mediante el uso de 10x dextrano BSH no conjugado. Después del lavado del portaobjetos, se detectó la señal de fluorescencia mediante el uso de un escáner láser. Las intensidades medias y las desviaciones estándar para cada punto de concentración se calcularon a partir de cuatro puntos de datos paralelos. Los valores de K_d se determinaron mediante el ajuste de los datos a la isoterma de Langmuir:

$$F = (F_{max}[p])/([p]+K_d)$$

donde F=intensidad de fluorescencia, F_{max}=intensidad máxima en la saturación, [p]= concentración de la molécula marcada con Cy3 y K_d=constante de disociación.

El conjugado Anti-EGFR1 Fab BSH-dextrano se une al EGFR1 con una constante de disociación de aproximadamente K_d = 97 nM. El Fab no conjugado tiene aproximadamente 2 veces mayor afinidad en comparación con el anti-EGFR1 Fab BSH dextrano al EGFR1 (Figura 14). La unión del Fab anti-EGFR1 BSH-dextrano o el Fab no conjugado a HER2, CD64, CD16a, HSA o IgG anti-dextrano estaban por debajo de los límites de detección.

Es obvio para una persona experta en la técnica que con el avance de la tecnología, la idea básica de la invención puede implementarse de varias maneras.

Listado de secuencias

<110> Tenboron Oy
<120> Conjugados
<130> P-WO90874M
<150> FI20155114
<151> 2015-02-20
<150> FI20145552
<151> 2014-06-13
<160> 30
<170> BiSSAP 1.3
<210> 1
<211> 1210
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Receptor de EGF, humano NP_005219.2
<400> 1

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

290 295 300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420 425 430
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465 470 475 480
Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
485 490 495
Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
500 505 510
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
515 520 525
Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
530 535 540
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560
Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620
Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625 630 635 640
Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
645 650 655
Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
660 665 670
Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
675 680 685
Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
690 695 700
Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705 710 715 720
Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
725 730 735
Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
740 745 750
Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755 760 765
Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
770 775 780
Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815
Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845
Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860
Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865 870 875 880
Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
885 890 895
Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900 905 910
Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
915 920 925
Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
930 935 940
Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
945 950 955 960
Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
965 970 975
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
980 985 990
Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe
1010 1015 1020
Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala
1025 1030 1035 1040
Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln
1045 1050 1055
Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp
1060 1065 1070
Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro
1075 1080 1085
Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser
1090 1095 1100
Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser
1105 1110 1115 1120
Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro
1125 1130 1135
Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp
1140 1145 1150
Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp
1155 1160 1165
Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn
1170 1175 1180
Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val
1185 1190 1195 1200
Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 2
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cadena pesada, cetuximab, INN7906H, de IMGT

<400> 2
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

```
1               5                   10                  15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
            20                  25                  30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
        35                  40                  45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
    50                  55                  60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65                  70                  75                  80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
Lys
```

<210> 3

<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cadena ligera, cetuximab, INN7906L, de IMGT
<400> 3

```
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65                  70                  75                  80
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 4
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> nimotuzumab_HC
<400> 4

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

165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Pro Gly Lys
450
<210> 5

<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> nimotuzumab_LC
<400> 5

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

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195                 200                 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 6
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Fab de cadena pesada
<400> 6

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His
225
<210> 7
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> F(ab')2 de cadena pesada
<400> 7
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235

<210> 8
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> anti-EGFR1_LC_variable_DNA
<400> 8

gatattctgc tgacccagtc accggttatt ctgagcgtta gtccgggtga acgtgttagc 60

tttagctgtc gtgcaagcca gagcattggc accaatattc attggtatca gcagcgtacc 120

aatggtagtc cgcgtctgct gatcaaatat gcaagcgaaa gcattagcgg tattccgagc 180

cgttttagcg gttctggtag cggcaccgat tttaccctga gtattaatag cgttgaaagc 240

gaagatatcg ccgattatta ctgccagcaa aataacaatt ggccgaccac ctttggtgca 300

ggtacaaaac tggaactgaa ataa 324

<210> 9
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> anti-EGFR1_HC_variable_DNA

<400> 9
caggtgcagc tgaaacagag cggtccgggt ctggttcagc cgagccagag cctgagcatt 60

acctgtaccg ttagcggttt tagcctgacc aattatggtg ttcattgggt tcgtcagagt 120

ccgggtaaag gtctggaatg gctgggtgtt atttggagcg gtggtaatac cgattataac 180

accccgttta ccagccgtct gagcatcaat aaagataata gcaaaagcca ggtgttcttt 240

aaaatgaata gcctgcagag caatgatacc gccatctatt attgtgcacg tgccctgaca 300

tattatgatt atgaatttgc atattgggga cagggcaccc tggttaccgt tagtgcc 357

<210> 10
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> ADN de cadena ligera del Fab anti-EGFR1, optimizado por codón para E. coli
<400> 10
gatattctgc tgacccagag tccggttatt ctgagcgtta gtccgggtga acgtgttagc 60

tttagctgtc gtgcaagcca gagcattggc accaatattc attggtatca gcagcgtacc 120

aatggtagtc cgcgtctgct gatcaaatat gcaagcgaaa gcattagcgg tattccgagc 180

cgttttagcg gtagcggtag tggcaccgat tttaccctga gcattaatag cgttgaaagc 240

gaagatatcg ccgattatta ctgccagcag aacaataatt ggccgaccac ctttggtgca 300

ggtacaaaac tggaactgaa acgtaccgtt gcagcaccga gcgtttttat ctttccgcct 360

agtgatgaac agctgaaaag cggcaccgca agcgttgttt gtctgctgaa taacttttat 420

ccgcgtgaag caaaagttca gtggaaagtt gataatgcac tgcagagcgg taatagccaa 480

gaaagcgtta ccgaacagga tagcaaagat agcacctata gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagtaaag cagattatga aaaacacaaa gtgtatgcct gcgaagttac ccatcagggt 600

ctgagcagtc cggtgaccaa aagctttaat cgtggtgaat gttaa 645

<210> 11
<211> 678
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> ADN de cadena pesada del Fab anti-EGFR1, optimizado por codón para E. coli
<400> 11

caggtgcagc tgaagcagtc cggccctggc ctggtgcagc cttcccagtc cctgtccatc 60

acctgtaccg tgtccggctt ctccctgacc aactacggcg tgcactgggt gcgacagtcc 120

cccggcaagg gcctggaatg gctgggagtg atttggagcg gcggcaacac cgactacaac 180

acccccttca cctcccggct gtccatcaac aaggacaact ccaagtccca ggtgttcttc 240

aagatgaact ccctgcagtc caacgacacc gccatctact actgcgccag agccctgacc 300

tactatgact acgagttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgacagt gtccgccgct 360

tccaccaagg gcccctccgt gttccctctg gccccctcca gcaagtccac ctctggcggc 420

accgctgccc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aactctggcg ccctgacctc cggcgtgcac accttccctg ccgtgctgca gtcctccggc 540

ctgtactccc tgtcctccgt ggtgaccgtg ccctccagct ctctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac accaaggtgg acaagcgggt ggaacccaag 660

tcctgcgaca agacccac 678

<210> 12
<211> 726
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> anti-EGFR1_scFV_DNA
<400> 12

caggtgcagc tgaaacagag cggtccgggt ctggttcagc cgagccagag cctgagcatt 60

acctgtaccg ttagcggttt tagcctgacc aattatggtg ttcattgggt tcgtcagagt 120

ccgggtaaag gtctggaatg gctgggtgtt atttggagcg gtggtaatac cgattataac 180

accccgttta ccagccgtct gagcatcaat aaagataata gcaaaagcca ggtgttcttt 240

aaaatgaata gcctgcagag caatgatacc gccatctatt attgtgcacg tgccctgaca 300

tattatgatt atgaatttgc atattgggga cagggcaccc tggttaccgt tagtgccggt 360

ggtggtggta gcggtggtgg cggttcaggt ggcggtggtt cagatattct gctgacccag 420

tcaccggtta ttctgagcgt tagtccgggt gaacgtgtta gctttagctg tcgtgcaagc 480

cagagcattg gcaccaatat tcattggtat cagcagcgta ccaatggtag tccgcgtctg 540

ctgatcaaat atgcaagcga aagcattagc ggtattccga gccgttttag cggttctggt 600

agcggcaccg attttaccct gagtattaat agcgttgaaa gcgaagatat cgccgattat 660

tactgccagc aaaataacaa ttggccgacc acctttggtg caggtacaaa actggaactg 720

aaataa 726

<210> 13
<211> 792
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> anti-EGFR1_scFV_DNA_with_ompA
<400> 13

```
atgaaatacc tgctgccgac cgcagcagcg ggtctgctgc tgctggcagc acagcctgca      60

atggcacagg tgcagctgaa acagagcggt ccgggtctgg ttcagccgag ccagagcctg     120

agcattacct gtaccgttag cggttttagc ctgaccaatt atggtgttca ttgggttcgt     180

cagagtccgg gtaaaggtct ggaatggctg ggtgttattt ggagcggtgg taataccgat     240

tataacaccc cgtttaccag ccgtctgagc atcaataaag ataatagcaa aagccaggtg     300

ttctttaaaa tgaatagcct gcagagcaat gataccgcca tctattattg tgcacgtgcc     360

ctgacatatt atgattatga atttgcatat tggggacagg gcaccctggt taccgttagt     420

gccggtggtg gtggtagcgg tggtggcggt tcaggtggcg gtggttcaga tattctgctg     480

acccagtcac cggttattct gagcgttagt ccgggtgaac gtgttagctt tagctgtcgt     540

gcaagccaga gcattggcac caatattcat tggtatcagc agcgtaccaa tggtagtccg     600

cgtctgctga tcaaatatgc aagcgaaagc attagcggta ttccgagccg ttttagcggt     660

tctggtagcg gcaccgattt taccctgagt attaatagcg ttgaaagcga agatatcgcc     720

gattattact gccagcaaaa taacaattgg ccgaccacct ttggtgcagg tacaaaactg     780

gaactgaaat aa                                                         792
```

<210> 14
<211> 241
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> anti-EGFR1_scFV
<400> 14

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile
130 135 140
Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser
145 150 155 160
Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly
165 170 175
Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile
180 185 190
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser
195 200 205
Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln
210 215 220
Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

225 230 235 240
Lys
<210> 15
<211> 263
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> anti-EGFR1_scFV_with_ompA
<400> 15

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

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> gIII
<400> 16
Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
1 5 10 15
His Ser

<210> 17
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> ompA
<400> 17

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala
20
<210> 18
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> malE
<400> 18
Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15
Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala
20 25
<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> phoA
<400> 19
Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15
Pro Val Thr Lys Ala
20
<210> 20
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> pelB
<400> 20
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala
20
<210> 21
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> stII

<400> 21
Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15
Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala
20
<210> 22
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> sitio de unión al ribosoma interno
<400> 22
taaggatccg aattcaagga gataaaaaat g 31
<210> 23
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores para la construcción de GP1113
<400> 23
cgggatccaa gaaggagata taccatggca aaaaagtggt tattagctgc 50
<210> 24
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores para la construcción de GP1114
<400> 24
ataatgcggc cgcattattt aacctgtttc agtac 35
<210> 25
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores para la construcción de GP1115
<400> 25
ataatgcggc cgcaagaagg agatatacca tggcaaaatc actgtttaaa gtaacg 56
<210> 26
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores para la construcción de GP1116

<400> 26
ataatctcga gattattttt tagcagaatc tgc 33
<210> 27
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores para la construcción de GP1147
<400> 27
tgacccgcta atgcggccgc actgagtgct tcccttgaaa ccctgaaact gatc 54
<210> 28
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores para la construcción de GP1148
<400> 28
ggtttcttta ccagactcaa acggcccggc attcgcatgc agggccgtga attattacg 59
<210> 29
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> G4S_enlazador/espaciador_DNA
<400> 29
ggtggtggtg gtagcggtgg tggcggttca ggtggcggtg gttca 45
<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> G4S_enlazador/espaciador
<400> 30
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, y al menos un derivado del dextrano, en donde
el derivado del dextrano comprende al menos una unidad D-glucopiranosilo, en donde al menos un carbono seleccionado del carbono 2, 3 o 4 de la al menos una unidad D-glucopiranosilo se sustituye por un sustituyente de la fórmula

$$-O-(CH_2)_n-S-B_{12}H_{11}^{2-}$$

en donde n está en el rango de 3 a 10; y
el derivado del dextrano se une al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, a través de un enlace formado por una reacción entre al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano y un grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

2. El conjugado de conformidad con la reivindicación 1, en donde el grupo amino del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, es el grupo amino de un residuo de lisina del anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

3. El conjugado de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el conjugado comprende, además, al menos una molécula de trazabilidad unida al derivado del dextrano o al anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este.

4. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde el derivado del dextrano comprende al menos un grupo aldehído formado por escisión oxidativa de una unidad D-glucopiranosilo del derivado del dextrano que está protegido.

5. El conjugado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, que se obtiene mediante un método que comprende las etapas de:
a) alquenilar al menos un grupo hidroxilo del dextrano para obtener dextrano alquenilado;
b) hacer reaccionar borocaptato de sodio (BSH) con el dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) para obtener el BSH-dextrano;
c) escindir oxidativamente al menos un residuo D-glucopiranosilo del BSH-dextrano de manera que se formen grupos aldehído;
d) hacer reaccionar el BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c) con un anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, para obtener un conjugado.

6. El conjugado de conformidad con la reivindicación 5, en donde el dextrano se alquenila en la etapa a) mediante el uso de un agente alquenilante, en donde el agente alquenilante tiene una estructura de acuerdo con la fórmula

$$X-(CH_2)_mCH=CH_2$$

en donde m está en el rango de 1 a 8, y X es Br, Cl, o I.

7. El conjugado de conformidad con la reivindicación 5 o 6, en donde al menos un carbono seleccionado del carbono 2, 3 o 4 de al menos una unidad D-glucopiranosilo del dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) se sustituye por un sustituyente de la fórmula

$$-O-(CH_2)_mCH=CH_2,$$

en donde m está en el rango de 1 a 8.

8. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, en donde el BSH se hace reaccionar con el dextrano alquenilado que se obtiene de la etapa a) en presencia de un iniciador radical seleccionado del grupo que consiste en persulfato de amonio, persulfato de potasio y luz UV, en la etapa b).

9. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 - 8, en donde el al menos un residuo de D-glucopiranosilo del BSH-dextrano se escinde oxidativamente en la etapa c) mediante el uso de un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en periodato de sodio, ácido periódico y acetato de plomo (IV).

10. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 - 9, en donde el método comprende, además, la etapa de hacer reaccionar el BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c), o el conjugado que se obtiene de la etapa d), con una molécula de trazabilidad.

11. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 - 10, en donde el método comprende, además, la etapa e) de proteger los grupos aldehído sin reaccionar del BSH-dextrano escindido oxidativamente que se obtiene de la etapa c), o el conjugado que se obtiene de la etapa d).

12. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 - 11, en donde el BSH-dextrano escindido oxidativamente se hace reaccionar con el anticuerpo anti-EGFR1 o un fragmento de unión al EGFR1 de este, mediante la incubación del BSH-dextrano escindido oxidativamente y el anticuerpo anti-EGFR1, o un fragmento de unión al EGFR1 de este, a temperatura ambiente en un tampón fosfato acuoso que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, en la etapa d).

13. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12.

14. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12 o la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 13 para usar como un medicamento.

15. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12 o la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 13 para usar en el tratamiento del cáncer, tal como un cáncer de cabeza y cuello.

16. El conjugado o la composición farmacéutica para usar de conformidad con la reivindicación 14, en donde el medicamento es para el tratamiento intratumoral y/o intravenoso del cáncer de cabeza y cuello mediante la terapia de captura de neutrones de boro.

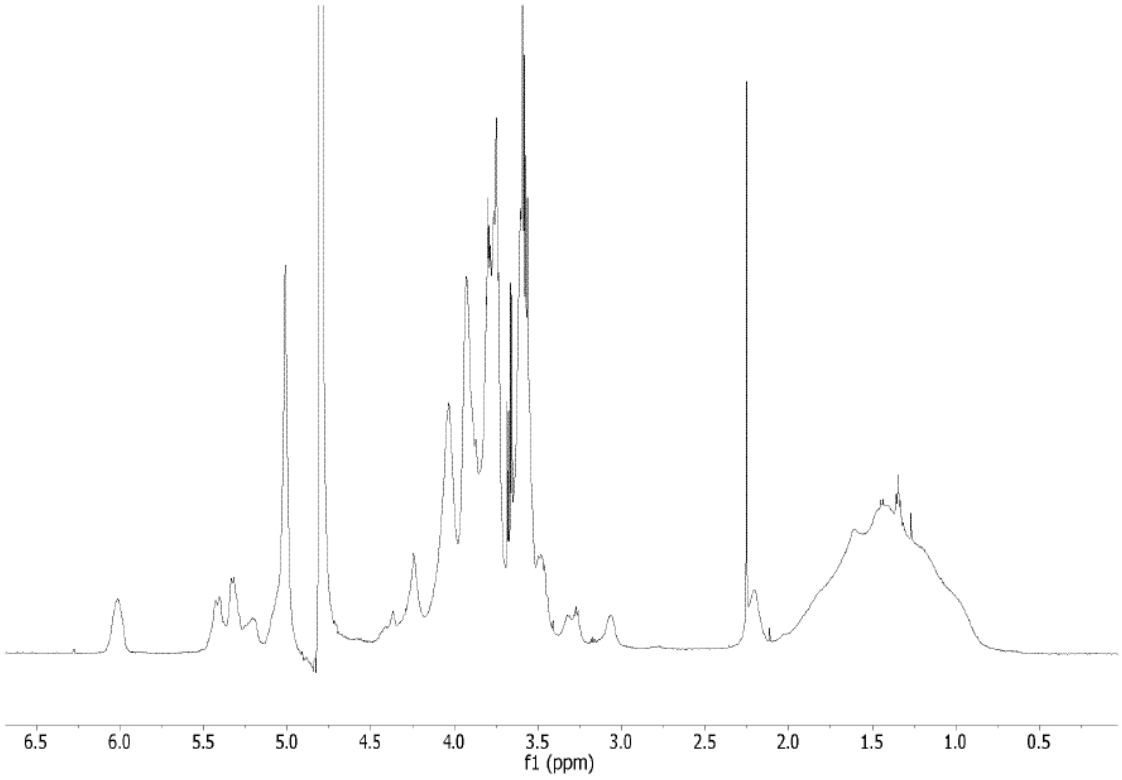


Fig. 1

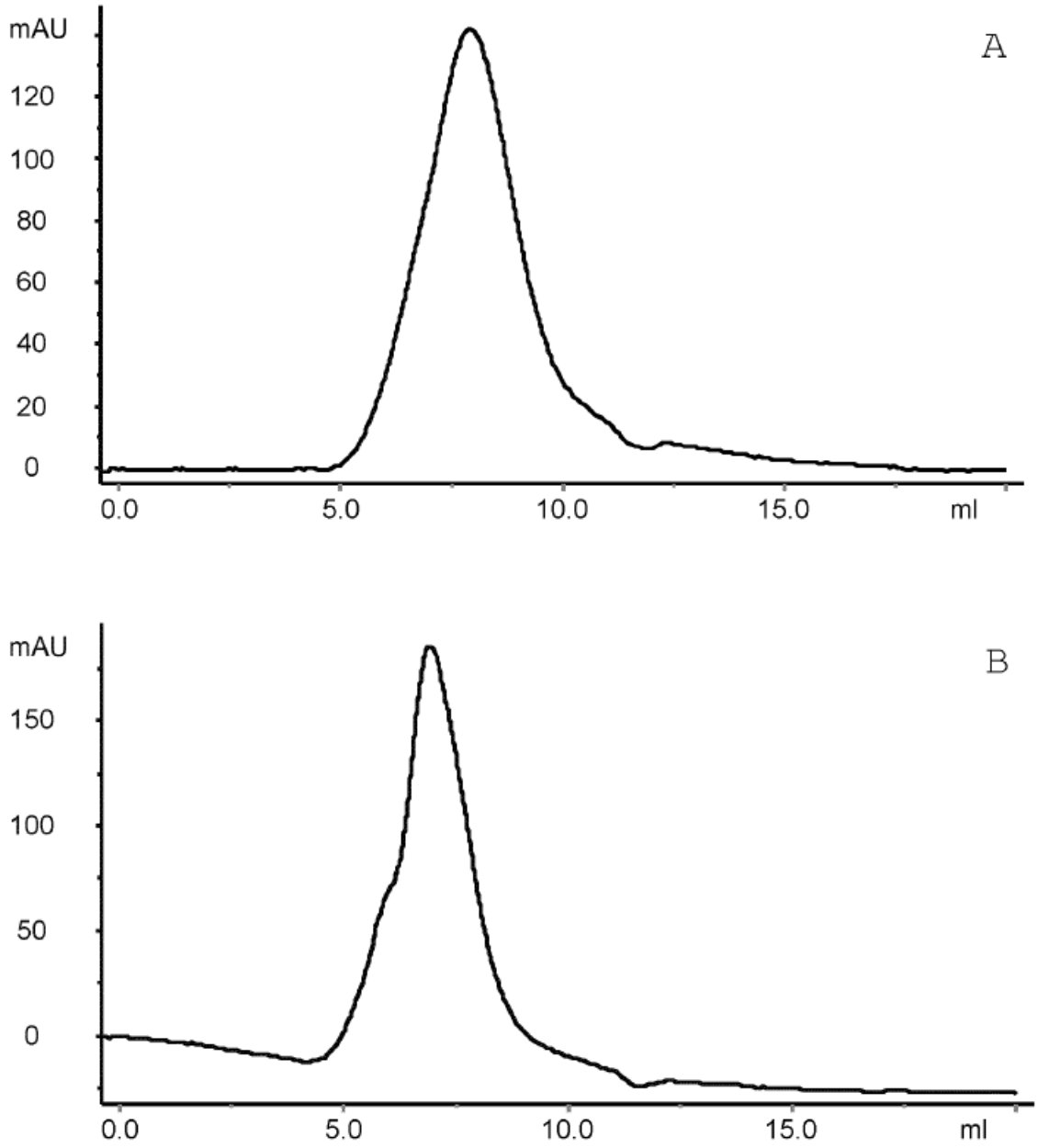

mAU
120
100
80
60
40
20
0
A
0.0
5.0
10.0
15.0
ml
mAU
150
100
50
0
B
0.0
5.0
10.0
15.0
ml

Fig. 2

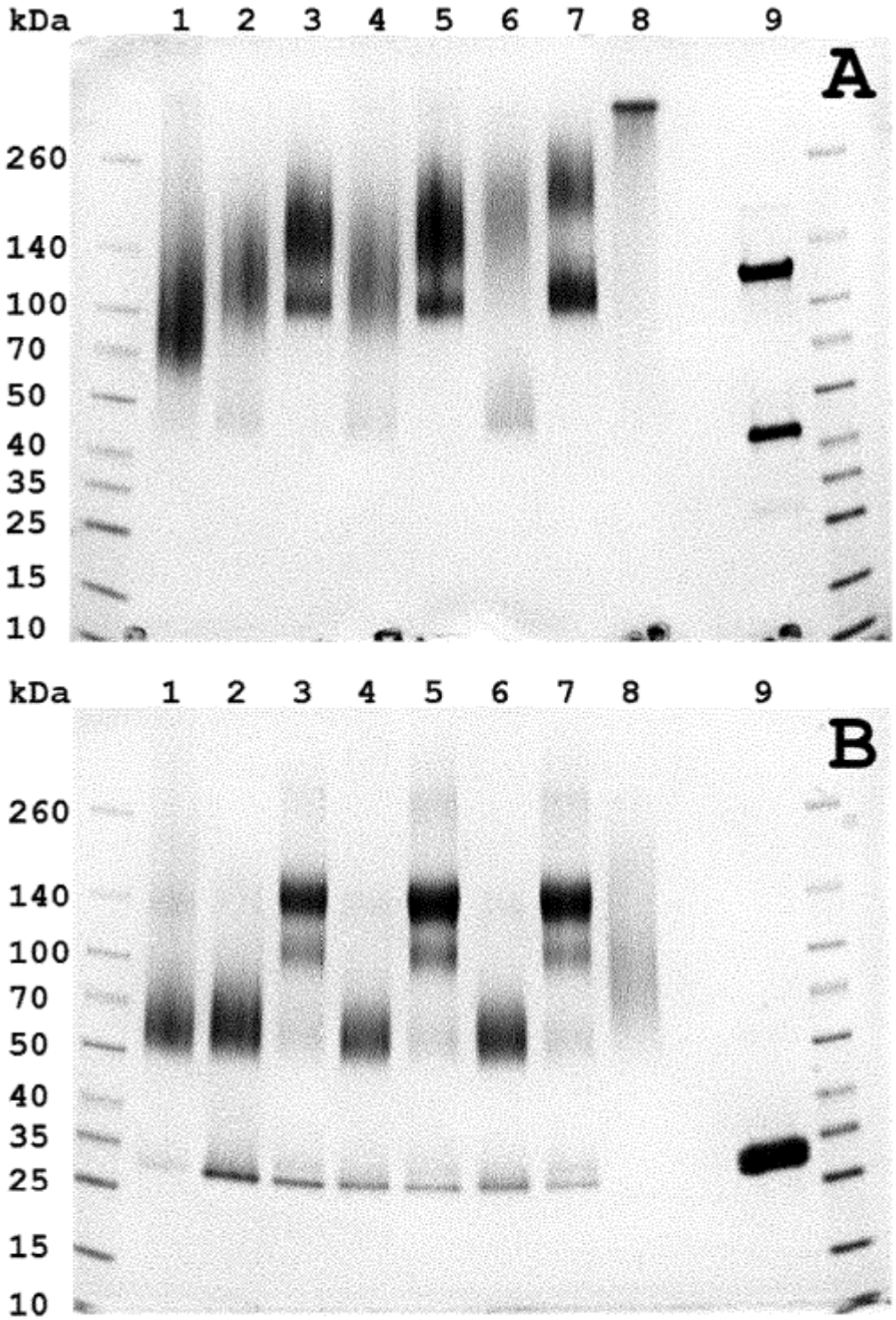

kDa
1 2 3 4 5 6 7 8 9
A
260
140
100
70
50
40
35
25
15
10
kDa
1 2 3 4 5 6 7 8 9
B
260
140
100
70
50
40
35
25
15
10

Fig. 3

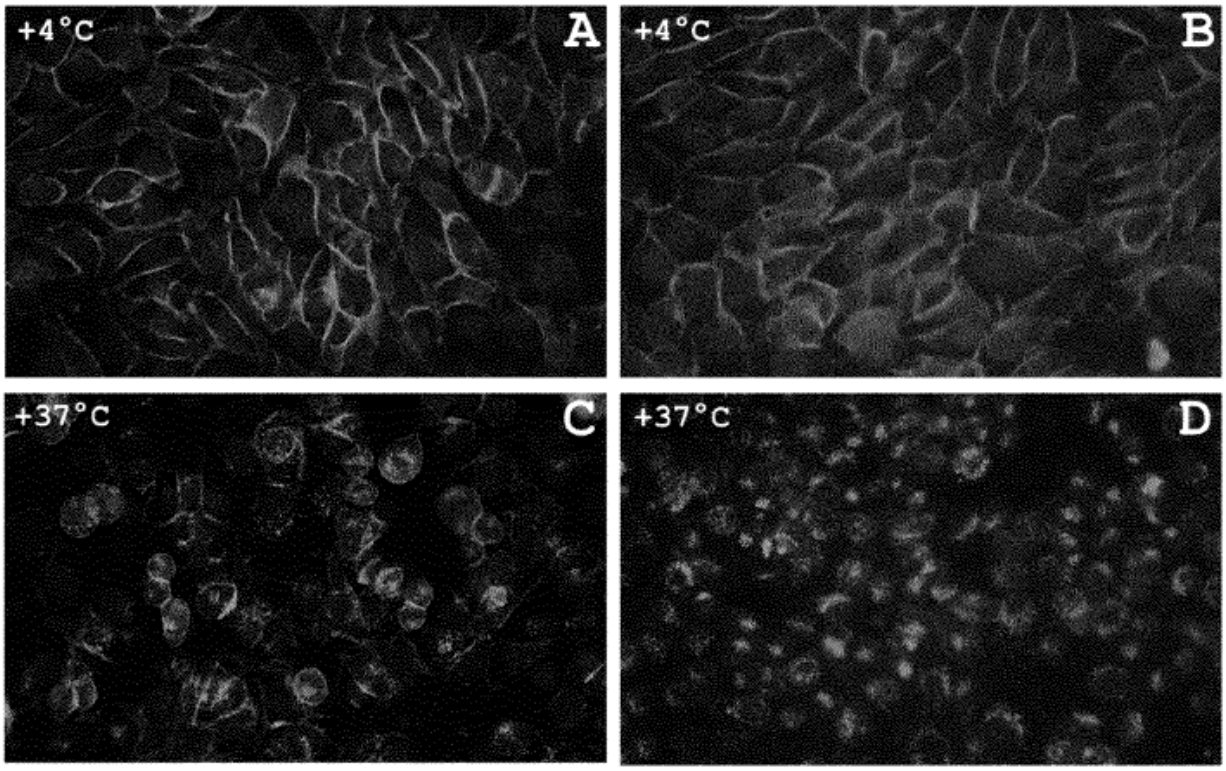


Fig. 4

CGAAAATAATAAAGGGAAAATCAGTTTTTGATATCAAAATTATACATGTCAACGATAATACAAAATATAATAC

Promotor T5

AAACTATAAGATGTTATCAGTATTTATTATGCATTTAGAATAAATTTTGTGTCGCCCTT**AATTGTGAGCGGAT**

AACAATTACGAGCTTCATGCACAGTGAAATCATGAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAAT

RBS

ATGTGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTTAAGGAG

Péptido señal *CetFab HC*

ATAAAAA***ATGAAAAAACTGCTGTTCGCGATTCCGCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTGCAGCTG***

stop BamHI EcoRI RBS *Péptido señal*

AAACAGAGCGG...TAAAACCCATTAAGGATCCGAATTCAAGGAGATAAAAA***ATGAAAAAGACAGCTATCGCG***

CetFab LC

ATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGATATTCTGCTGACCCAG...

Fig. 5

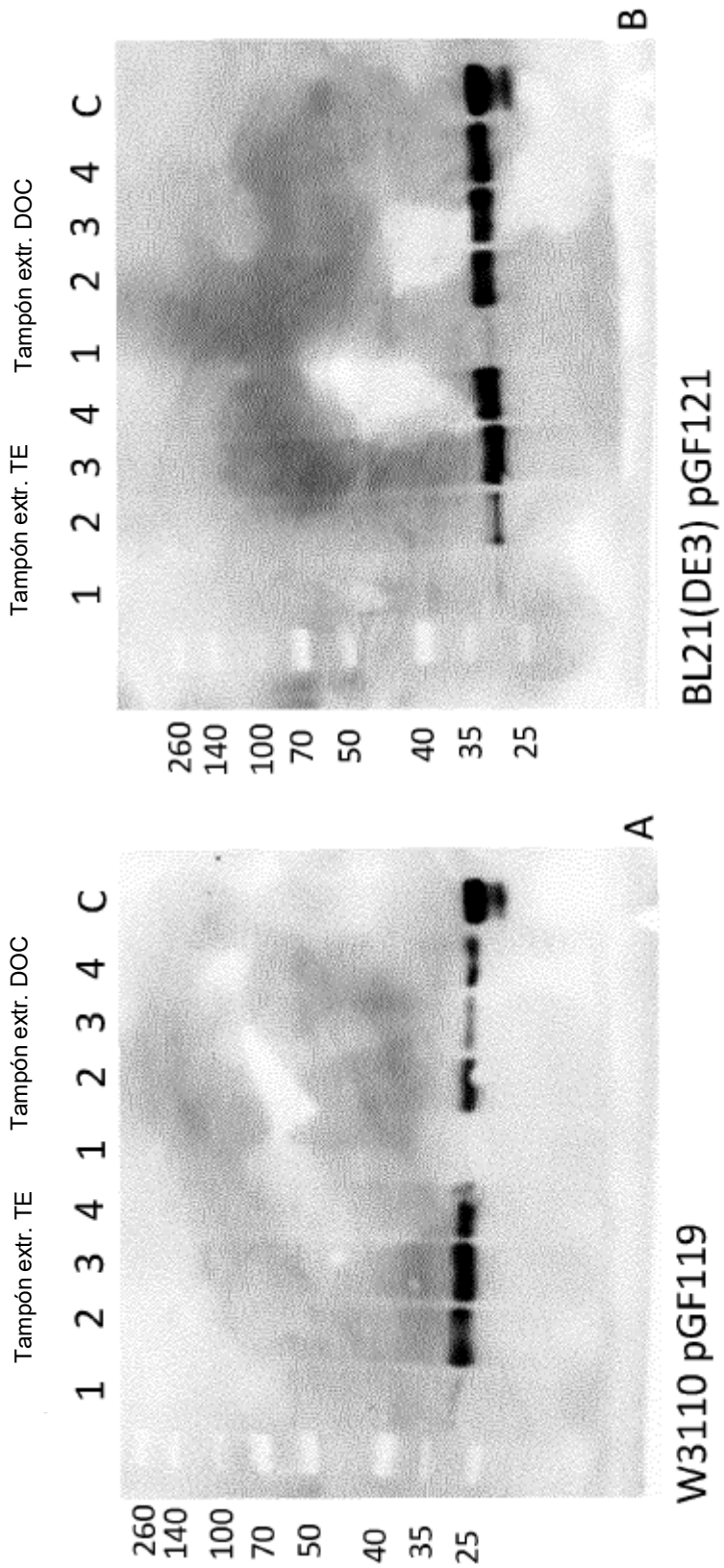

Tampón extr. TE
Tampón extr. DOC
1 2 3 4 1 2 3 4 C
260
140
100
70
50
40
35
25
A
W3110 pGF119
Tampón extr. TE
Tampón extr. DOC
1 2 3 4 1 2 3 4 C
260
140
100
70
50
40
35
25
B
BL21(DE3) pGF121

Fig. 6

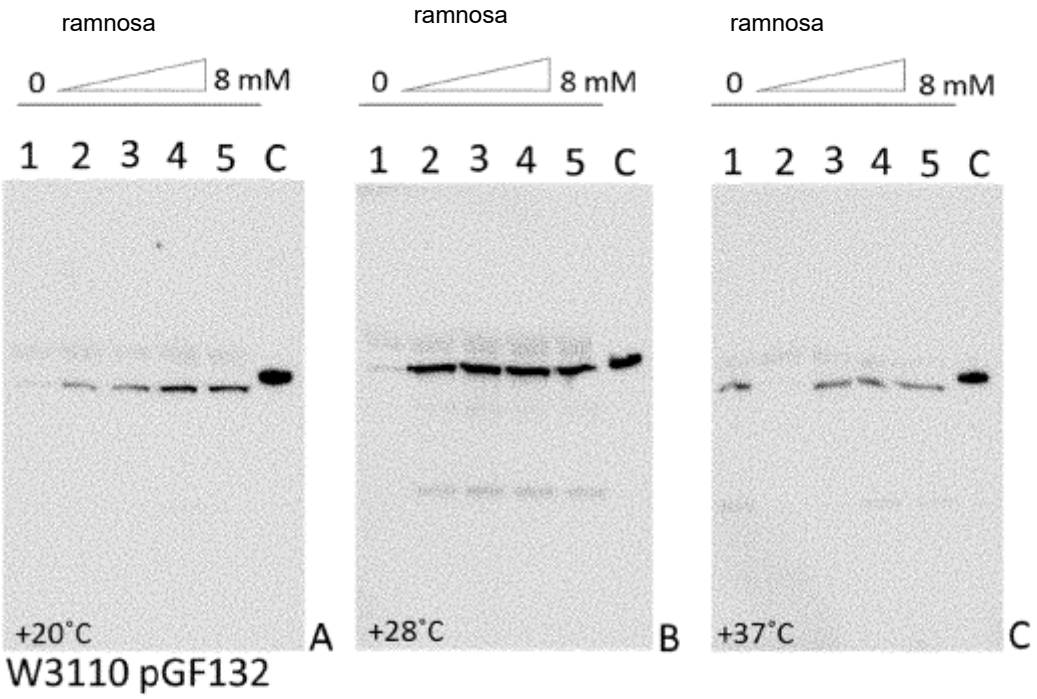

ramnosa
0
8 mM
1 2 3 4 5 C
+20°C
A
ramnosa
0
8 mM
1 2 3 4 5 C
+28°C
B
ramnosa
0
8 mM
1 2 3 4 5 C
+37°C
C
W3110 pGF132

Fig. 7

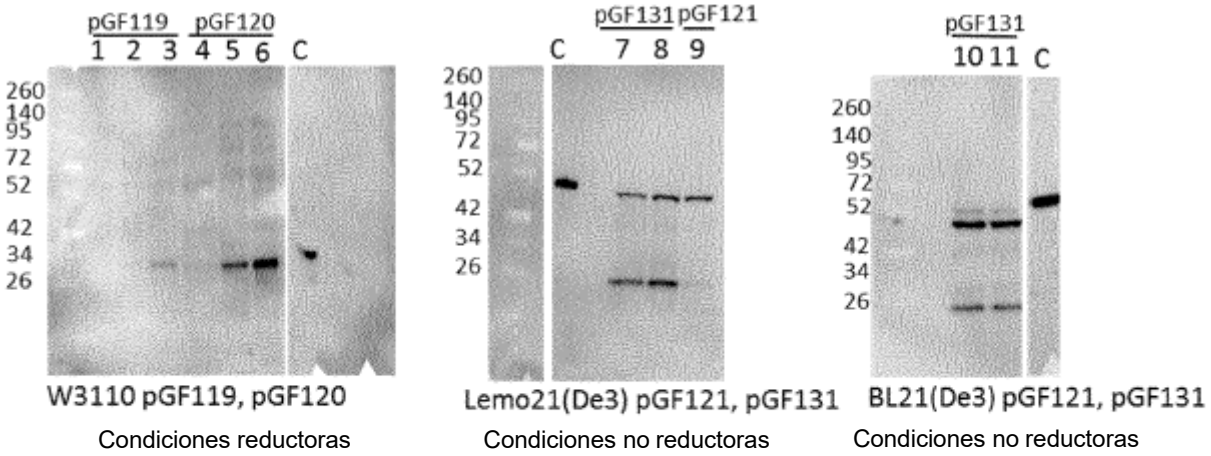

pGF119
pGF120
1 2 3 4 5 6 C
260
140
95
72
52
42
34
26
W3110 pGF119, pGF120
Condiciones reductoras
pGF131
pGF121
C 7 8 9
260
140
95
72
52
42
34
26
Lemo21(De3) pGF121, pGF131
Condiciones no reductoras
pGF131
10 11 C
260
140
95
72
52
42
34
26
BL21(De3) pGF121, pGF131
Condiciones no reductoras

Fig. 8

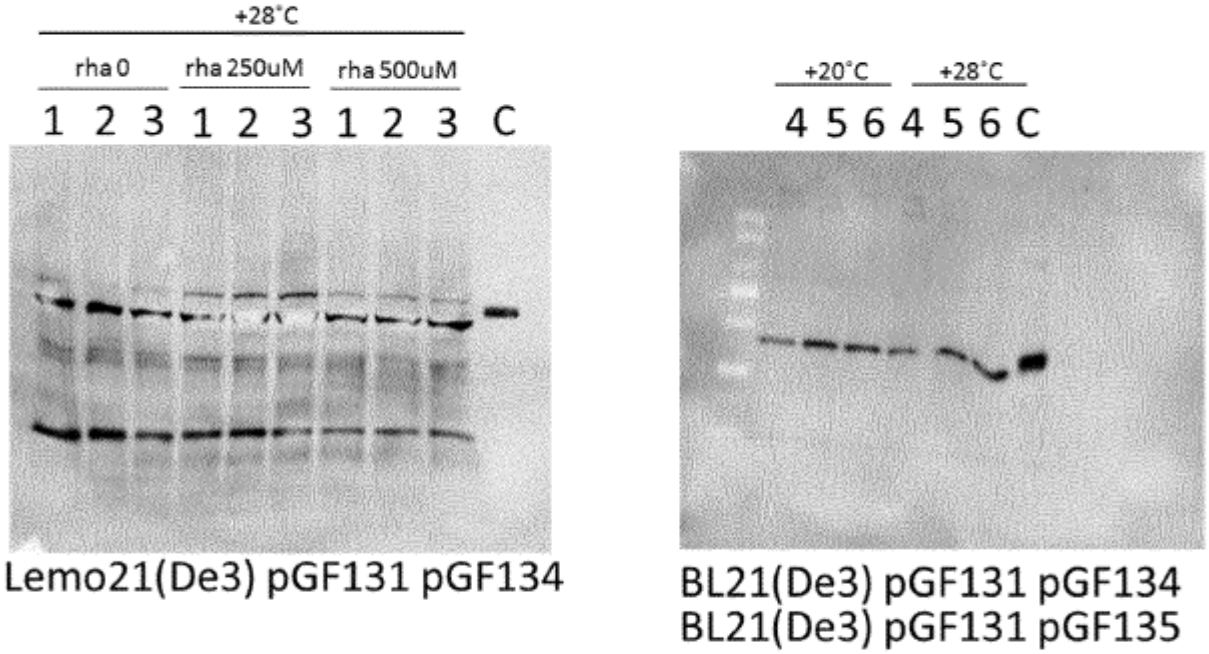

+28°C
rha 0
rha 250uM
rha 500uM
1 2 3 1 2 3 1 2 3 C
Lemo21(De3) pGF131 pGF134
+20°C
+28°C
4 5 6 4 5 6 C
BL21(De3) pGF131 pGF134
BL21(De3) pGF131 pGF135

Fig. 9

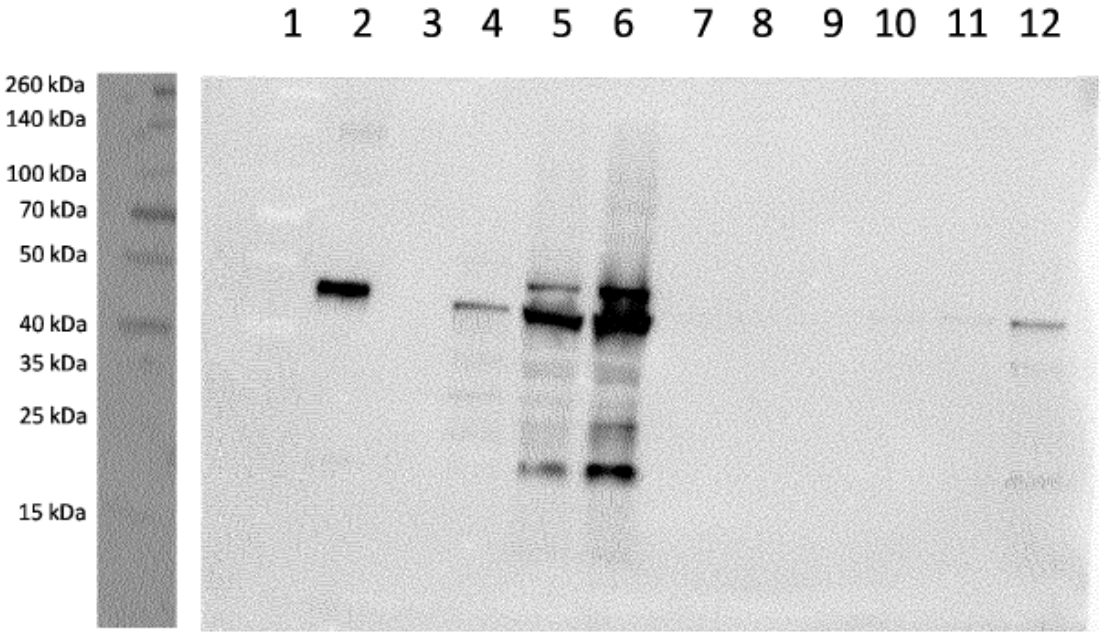

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
260 kDa
140 kDa
100 kDa
70 kDa
50 kDa
40 kDa
35 kDa
25 kDa
15 kDa

Fig. 10

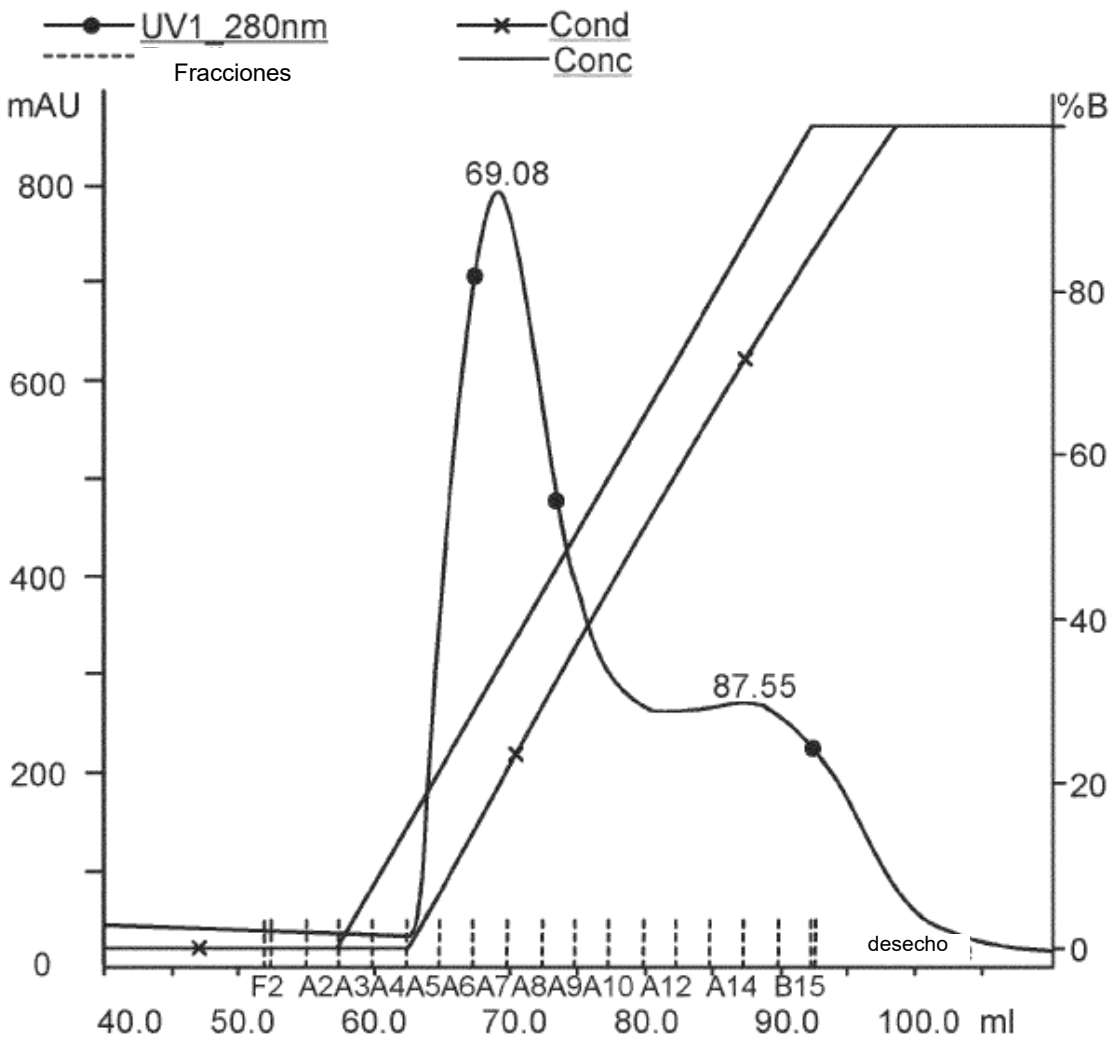

UV1_280nm
Fracciones
Cond
Conc
mAU
%B
800
600
400
200
0
80
60
40
20
0
69.08
87.55
desecho
F2 A2A3A4A5A6A7A8A9A10 A12 A14 B15
40.0 50.0 60.0 70.0 80.0 90.0 100.0 ml

Fig. 11

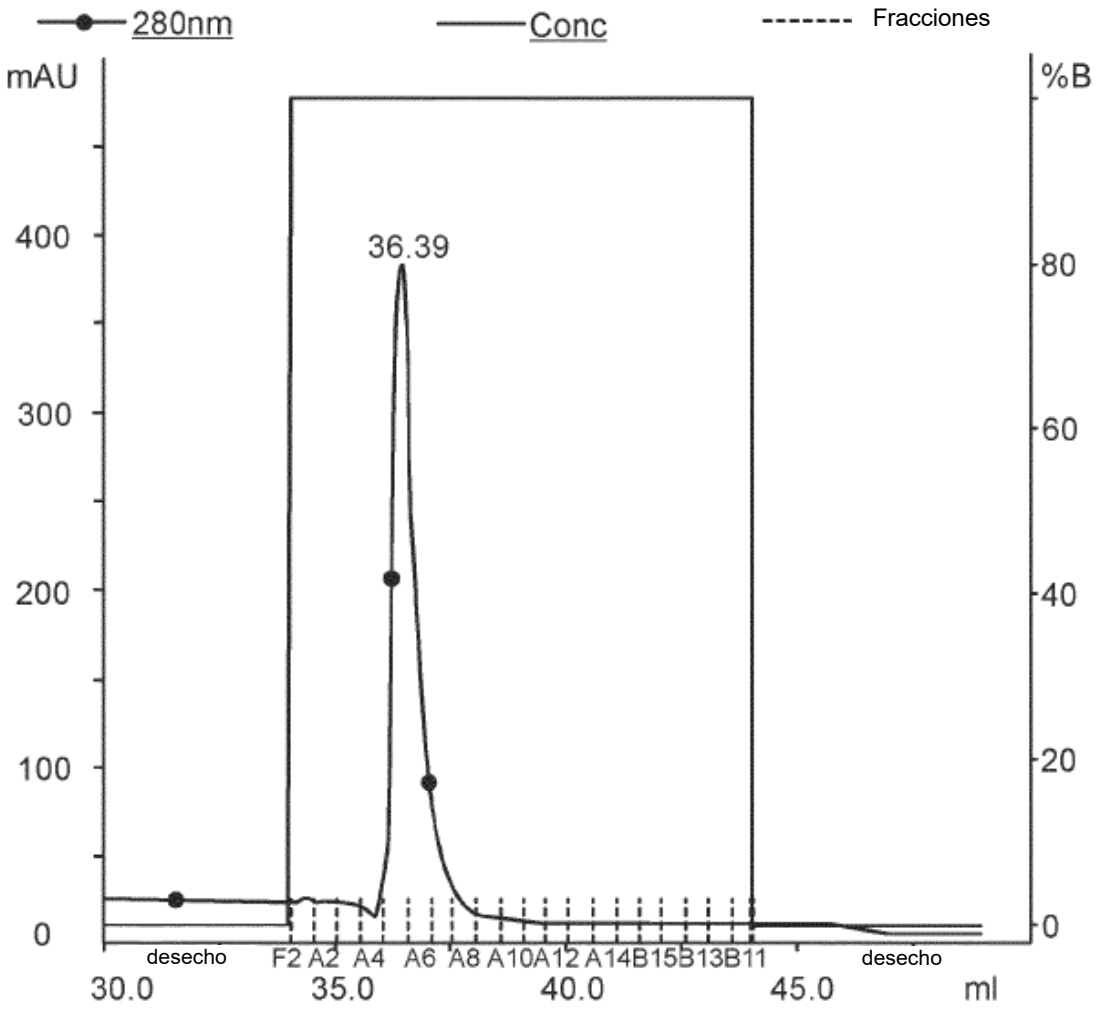

280nm
Conc
Fracciones
mAU
%B
400
300
200
100
0
80
60
40
20
0
36.39
desecho
F2 A2 A4 A6 A8 A10A12 A14B15B13B11
desecho
30.0
35.0
40.0
45.0
ml

Fig. 12

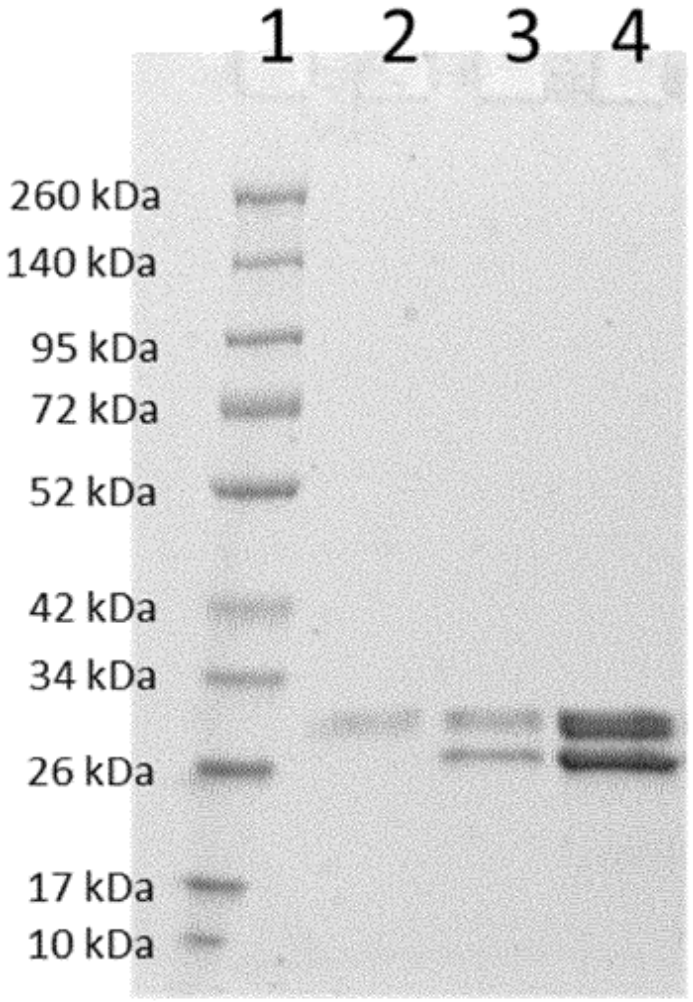

1
2
3
4
260 kDa
140 kDa
95 kDa
72 kDa
52 kDa
42 kDa
34 kDa
26 kDa
17 kDa
10 kDa

Fig. 13

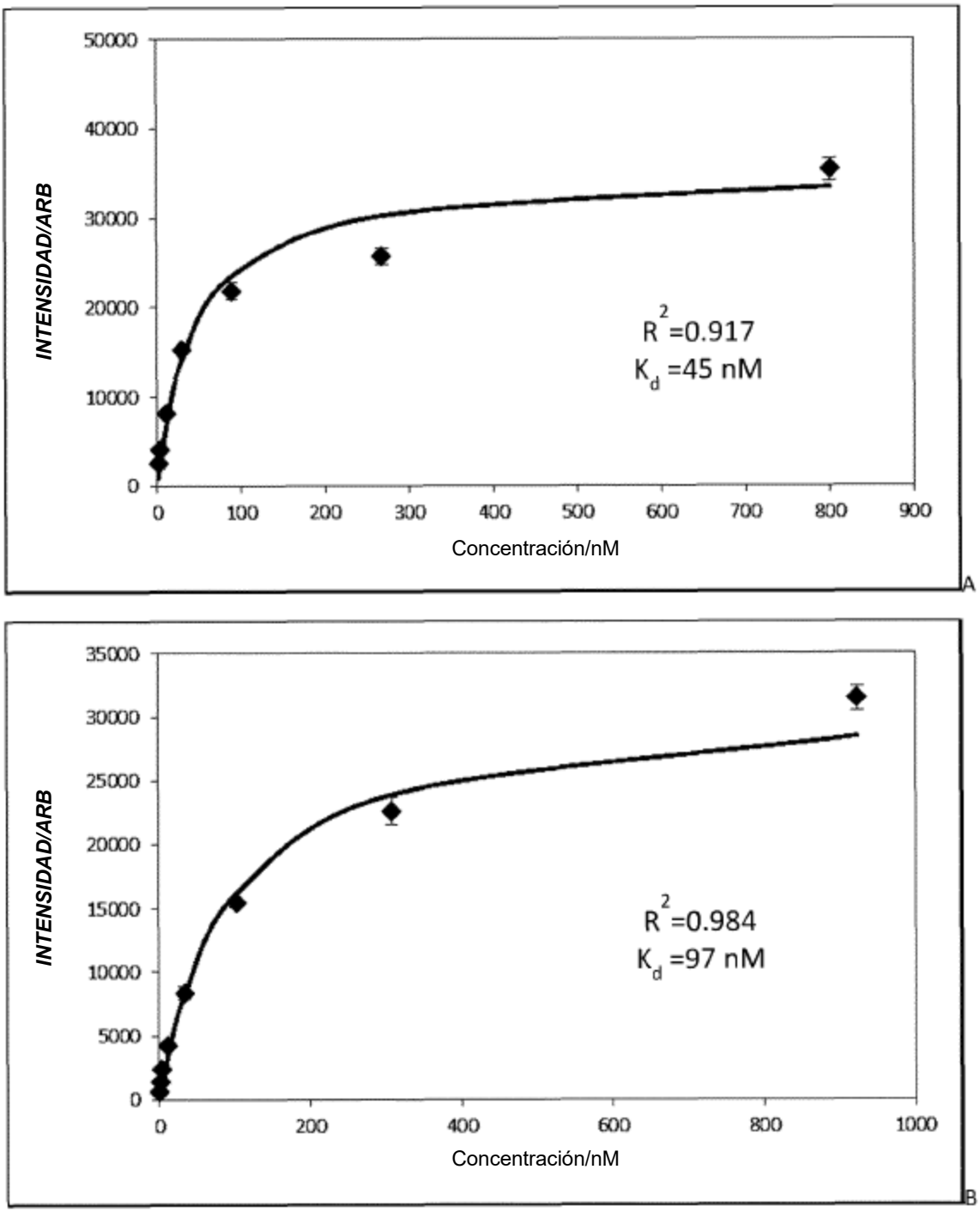

INTENSIDAD/ARB
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Concentración/nM
R2=0.917
Kd =45 nM
A
INTENSIDAD/ARB
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
200
400
600
800
1000
Concentración/nM
R2=0.984
Kd =97 nM
B

Fig. 14