(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 804 826**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2015 PCT/US2015/050131**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16044234**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2015 E 15841946 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3110447**

(54) Título: **Anticuerpo anti-EGFR y usos del mismo**

(30) Prioridad:

16.09.2014 US 201462051126 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2021

(73) Titular/es:

SYNERMORE BIOLOGICS CO., LTD. (100.0%)
6F-6, No. 5, Aly. 22, Ln. 513, Ruiguang Road,
Neihu District
Taipei 11492, TW

(72) Inventor/es:

TSAO, ERIC

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-EGFR y usos del mismo

Campo de la invención

Esta divulgación se refiere generalmente a los usos terapéuticos de un anticuerpo anti-EGFR. En particular, la presente divulgación se refiere a métodos y composiciones que comprenden un anticuerpo anti-EGFR para el tratamiento de cánceres que expresan EGFR.

Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está compuesto por un dominio de unión a ligando extracelular, un segmento transmembrana y un dominio de tirosina quinasa intracelular. Tras la unión de un ligando como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante α (TGFα), el EGFR forma homo o heterodímeros con los otros miembros de la familia ErbB, dando como resultado la autofosforilación del dominio intracelular y la activación de las vías de señalización cadena abajo, incluyendo la vía de la MAP quinasa inducida por Ras, la vía de PI3-quinasa y la vía de JAK/STAT. Esto puede indicar proliferación de células cancerosas, inhibición de apoptosis y activación de la invasión y estimular la neovascularización inducida por tumor. Los cánceres humanos que expresan EGFR a menudo se tratan con un anticuerpo específico de EGFR que inhibe la señalización del receptor y la proliferación de células tumorales, como el mAb anti-EGFR aprobado, cetuximab (Erbitux®).

El mecanismo directo de acción del cetuximab es el bloqueo de la unión de ligando-receptor y, por tanto, la inhibición de la activación mediada por ligando de la tirosina quinasa de EGFR. Como resultado de este bloqueo de EGFR, una variedad de procesos regulados por las vías de señalización de EGFR en células tumorales o células estromales en el microentorno tumoral se interrumpen (Fan Z, *et al.* 1994; Abanell J, *et al.* 2001; Prewett M, *et al.* 1996; Huang SM, *et al.* 1999; Fan Z, *et al.* 1993a; Fan Z, *et al.* 1993b). Es probable que otros mecanismos, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la internalización del receptor, también desempeñen un papel importante (Kawaguchi Y, *et al.* 1996; Kimura H, *et al.* 2007). ADCC depende de las interacciones entre el FcγR celular y el anticuerpo monoclonal, que desencadena respuestas inmunológicas innatas que involucran linfocitos citolíticos naturales, monocitos, macrófagos, linfocitos T activados y granulocitos. La internalización del receptor hacia abajo regula el número de receptores de superficie celular disponibles y, por tanto, podría influir en la activación de EGFR.

Beck (2011) mAbs, vol.3, n.º 2, 107-110 informa que en algunas áreas de EE. UU. se ha informado de una alta prevalencia de reacciones de hipersensibilidad al cetuximab y que se demostró que los anticuerpos IgE responsables de la reacción son específicos de galactosa-α-1,3 -galactosa cuando la molécula se produce en la línea celular SP2/0 murina. US2014/0178415 se refiere a derivados de conector farmacológico maitansinoides que pueden unirse a una unidad de unión a antígeno, y fármacos maitansinoides unidos a una unidad de unión a antígeno, para administración dirigida a tejidos enfermos. US2014/0178415 describe que pueden usarse unidades de unión a antígeno que tienen una especificidad a un antígeno tumoral (por ejemplo, EGFR), y en este se describen secuencias de cadena ligera y pesada de un anticuerpo dirigido a EGFR.

Las reacciones de hipersensibilidad son un efecto secundario frecuente de cetuximab y pueden resultar mortales para los receptores. La presente divulgación proporciona terapias alternativas dirigidas por EGFR útiles para individuos que tienen sensibilidades al cetuximab que impiden su uso adicional. En particular, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-EGFR que tiene la misma especificidad y eficacia que cetuximab, pero con modificaciones que lo hacen menos inmunorreactivo y más estable que el cetuximab. El anticuerpo es útil solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de cánceres que expresan EGFR.

Sumario

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 2. En algunos casos, el anticuerpo comprende ácido N-acetilneuramínico (NANA) y carece de galactosa-α-1,3-galactosa.

El anticuerpo puede conjugarse con un marcador detectable. En algunos casos, el marcador detectable puede comprender un radionúclido. En algunos casos, el marcador detectable comprende una etiqueta fluorescente.

El anticuerpo puede conjugarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales. El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden comprender un agente quimioterapéutico.

El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina,

colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 2 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición puede comprender además un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una célula de ovario de hámster chino (CHO) que comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 2. En algunos casos, los ácidos nucleicos están presentes en un vector replicable separado del genoma de la célula CHO. En algunos casos, los ácidos nucleicos están integrados de manera estable en el genoma de la célula CHO.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 2.

El método puede comprender además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib.

El anticuerpo puede conjugarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, el uno o más agentes terapéuticos adicionales comprenden un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib.

En algunos casos, el sujeto tiene niveles elevados de IgE anti-cetuximab en comparación con una muestra de control negativo. En algunos casos, el sujeto tiene niveles elevados de IgE anti-galactosa-α-1,3-galactosa en comparación con una muestra de control negativo.

En algunos casos, el método puede comprender además determinar si el sujeto es hipersensible al cetuximab o está predispuesto a tener una reacción de hipersensibilidad al cetuximab. En algunos casos, la determinación comprende medir la presencia de IgE anti-cetuximab o anti-galactosa-α-1,3-galactosa en una muestra de suero del sujeto, en donde un nivel elevado de IgE anti-cetuximab o anti-galactosa-α-1,3-galactosa en comparación con una muestra de control negativo indica que el sujeto es hipersensible al cetuximab o está predispuesto a tener una reacción de

hipersensibilidad al cetuximab. En algunos casos, la medición comprende el uso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 2, que comprende poner en contacto una célula de ovario de hámster chino (CHO) con ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos presentada en la Tabla 2. En algunos casos, los ácidos nucleicos están integrados de manera estable en el genoma de la célula CHO.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] un anticuerpo producido en una célula CHO, en donde el anticuerpo comprende NANA y carece de galactosa-α-1,3-galactosa, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la reivindicación 1, y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la reivindicación 1, y en donde el anticuerpo comprende NANA en el sitio de N-glicano Asn88 de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada;
[2] el anticuerpo de [1], en donde el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable, opcionalmente en donde el marcador detectable comprende un radionúclido o comprende una etiqueta fluorescente;
[3] el anticuerpo de [1], en donde el anticuerpo se conjuga con uno o más agentes terapéuticos adicionales;
[4] el anticuerpo de [3], en donde el uno o más agentes terapéuticos adicionales comprenden un agente quimioterapéutico y en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib;
[5] una composición que comprende el anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [4] y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable;
[6] la composición de [5], que comprende además un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib;
[7] una célula CHO que comprende ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de [1];
[8] una célula CHO según [7], en donde: (i) los ácidos nucleicos están presentes en un vector replicable separado del genoma de la célula CHO; o (ii) los ácidos nucleicos están integrados de manera estable en el genoma de la célula CHO;
[9] un método para producir un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada presentadas en [1], comprendiendo el método expresar el anticuerpo en una célula CHO según [7] u [8], y opcionalmente en donde el método comprende además aislar y purificar el anticuerpo y/o incorporar el anticuerpo en una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable;
[10] el anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [4], o de [9], para uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite.
[11] el anticuerpo para el uso según [10], en donde el método comprende además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib;
[12] el anticuerpo para el uso según [10], en donde el anticuerpo se conjuga con uno o más agentes terapéuticos

adicionales;
[13] el anticuerpo para el uso según [12], en donde el uno o más agentes terapéuticos adicionales comprenden un agente quimioterapéutico y en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, agente de direccionamiento a tirosina quinasa, complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib;
[14] el anticuerpo para el uso según uno cualquiera de [10] a [13], en donde:

(i) el sujeto tiene niveles elevados de IgE anti-cetuximab en comparación con una muestra de control negativo;
(ii) el sujeto tiene niveles elevados de IgE anti-galactosa-α-1,3-galactosa en comparación con una muestra de control negativo; o
(iii) el sujeto es hipersensible al cetuximab o está predispuesto a tener una reacción de hipersensibilidad al cetuximab.

[15] el anticuerpo para uso según uno cualquiera de [10] a [14], en donde el método para tratar el cáncer comprende administrar el anticuerpo en un régimen de tratamiento de dosificación repetida.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras incluidas en este documento representan realizaciones ejemplares no limitantes de la tecnología descrita en este documento y se proporcionan para ayudar al lector a comprender la divulgación.

Figuras 1A-B son gráficos que muestran inhibición de fosforilación inducida por TGF de EGFR por LR004 y Erbitux® en las líneas celulares tumorales A549 y FaDu.

Figura 2 es un gráfico que muestra ADCC el efecto de LR004 y Erbitux® en las células FaDu de carcinoma hipofaríngeo.

Figuras 3A-C son gráficos que muestran la especificidad de unión de LR004 y Erbitux® como se muestra mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Figura 4 es un gráfico que muestra la unión de LR004 y Erbitux® a EGFR soluble como se muestra por ELISA.

Figura 5 es un gráfico que muestra la unión de LR004 o Erbitux® a EGFR de superficie celular en líneas celulares tumorales.

Figuras 6A-C son gráficos que muestran la inhibición de la unión a LR004 marcado con FITC en líneas celulares que expresan EGFR con Erbitux®.

Figura 7 es un gráfico que muestra la inhibición de la unión a Erbitux® marcado con FITC por LR004 (LR-004) en células cancerosas MDA-MB-468.

Figuras 8A-D son gráficos que muestran el efecto de LR004 o Erbitux® en el crecimiento *in vitro* de líneas celulares tumorales. Las líneas celulares evaluadas incluyeron A) células de carcinoma de mama MDA-MB-468, B) línea celular de cáncer de colon LoVo, C) línea de carcinoma hipofaríngeo FaDu y D) células de carcinoma epidermoide A431. La inhibición del crecimiento *in vitro* por LR004 y Erbitux® se determinó mediante ensayos CCK-8 (A y B) o ATPLite (C y D).

Figura 9 es un gráfico que muestra el efecto de dosis elevadas de LR004 o Erbitux® en el crecimiento tumoral de GEO en ratones atímicos BALB/c. Los datos representan el promedio del total de ratones para cada grupo; *barras,* DT. (N = 5/grupo).

Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto de la respuesta a la dosis de LR004 en el crecimiento tumoral de GEO en ratones atímicos BALB/c *in vivo.* Los datos representan el promedio del total de ratones para cada grupo; *barras,* DT. (N = 8/grupo).

Figura 11 es un gráfico que muestra el perfil de concentración-tiempo para LR004 y Erbitux® después de administración IV a monos cinomolgos (18 mg/kg).

Figura 12 es un gráfico que muestra las concentraciones séricas de LR004 después de dosificación IV en monos cinomolgos.

Figura 13 es un gráfico que muestra las concentraciones séricas de LR004 en monos cinomolgos después de administración IV de 18 mg/kg los días 1, 21, 28 y 35.

Figuras 14A-B son gráficos que muestran modificaciones con ácido siálico de LR004 y Erbitux® determinadas por RP-HPLC.

Figura 15 es un gráfico que muestra los niveles de Neu5Gc (ácido N-glicolilneuramínico (NGNA)) con LR004 y Erbitux® determinados por ELISA.

Figuras 16A-B son gráficos que muestran la termoestabilidad de LR004 y Erbitux® determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Descripción detallada de la invención

I. GENERAL

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones que comprenden un anticuerpo específico de EGFR útil para tratar cánceres que expresan EGFR. Se debe observar que ciertos aspectos, modos, realizaciones, variaciones y características de la tecnología desvelada en este documento se describen a continuación en diversos niveles de detalle para proporcionar una tecnología de comprensión sustancial.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen generalmente el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta tecnología. Como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" "uno" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contenido indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares. Generalmente, la nomenclatura y los procedimientos de laboratorio que se utilizan en el presente documento, en cultivo celular, genética molecular, química orgánica, química analítica y química de ácidos nucleicos e hibridación descritas a continuación son las bien conocidas y comúnmente empleadas en la técnica. Para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos se utilizan técnicas estándar. Para síntesis químicas y análisis químicos se utilizan técnicas estándar, o modificaciones de las mismas.

A continuación, se proporcionan las definiciones de determinados términos tal y como se utilizan en esta memoria descriptiva. Las definiciones de otros términos pueden encontrarse en el Illustrated Dictionary of Immunology, 2a Edición (Cruse, J.M. y Lewis, R.E., Eds., Boca Ratón, FL: CRC Press, 1995).

Como se usa en el presente documento, el término "sinergia" o "sinérgico" se refiere a un efecto que surge entre dos o más agentes, entidades, factores o sustancias que producen un efecto mayor que la suma de sus efectos individuales. La sinergia entre agentes biológicamente activos, como el anticuerpo LR004 y un agente quimioterapéutico puede determinarse mediante el coeficiente de interacción farmacológica *(es decir,* CDI) (véase *p. ej.,* Cao SS, et al, Potentiation of antimetabolite antitumor activity in vivo by dipyridamole and amphotericin B. Cancer Chemother Pharmacol 1989; 24: 181-186). En algunos casos, CDI se calcula como sigue: CDI = AB/A3B. Según la quimioluminiscencia de cada grupo, AB es la relación de los grupos de combinación respecto al grupo de control; A o B es la relación del grupo de agente único respecto al grupo de control. La combinación farmacológica es sinérgica cuando el valor de CDI es inferior a 1. Al determinar una interacción sinérgica entre dos o más componentes, en algunos casos, el intervalo óptimo para el efecto y el intervalo de dosis absoluto de cada componente para el efecto puede medirse mediante la administración de los componentes en diferentes intervalos de relación p/p y/o diferentes dosis a pacientes que necesitan tratamiento. La observación de sinergia en una especie puede predecir el efecto en otras especies, y los resultados de dichos estudios pueden usarse para predecir la dosis eficaz.

Como se usa en el presente documento, el término "sinergia significativa" o "efecto sinérgico significativo" se refiere a un efecto que surge entre dos o más agentes, entidades, factores o sustancias que estadísticamente producen un efecto significativamente mayor que la suma de sus efectos individuales. A modo de ejemplo, aunque sin limitación, una combinación farmacológica es significativamente sinérgica cuando el valor de CDI es inferior a 0,7.

Como se usa en el presente documento, el término "aditivo" se refiere a un efecto que surge entre dos o más agentes, entidades, factores o sustancias que producen un efecto igual a la suma de sus efectos individuales.

Como se usa en el presente documento, el término "antergia" o "antagonista" se refiere a un efecto que surge entre dos o más agentes, entidades, factores o sustancias que producen un efecto menor que la suma de sus efectos individuales. A modo de ejemplo, aunque sin limitación, una combinación farmacológica es aditiva cuando el valor de CDI es superior a 1.

Como se usa en el presente documento, el término "EGFR" se refiere al receptor de superficie celular para miembros

de la familia de ligandos de proteínas extracelulares del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El receptor es miembro de cuatro receptores relacionados con tirosina quinasas (RTK): EGFR (ErbB-1), FIER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3), y Her 4 (ErbB-4). Como se conoce bien en la técnica, la activación mutacional de EGFR puede conducir a señalización independiente de ligando, promoción de proliferación y crecimiento celular, y desarrollo de varios tipos de cáncer.

Como se usa en el presente documento, la administración de un agente o fármaco a un sujeto incluye autoadministración y administración por otro. También debe observarse que los diversos modos de tratamiento o prevención de afecciones médicas como se describe pretenden significar "sustancial", que incluye tratamiento o prevención total pero también inferior al total, y en donde se logra algún resultado biológico o médicamente relevante.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" incluye aminoácidos naturales y aminoácidos sintéticos, así como análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, *p. ej.,* hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácido se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, *es decir,* un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *p. ej.,* homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Aminoácidos miméticos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido natural. Los aminoácidos se pueden citar en el presente documento bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras, o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, asimismo, se pueden citar por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa un polipéptido que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une y reconoce específicamente un antígeno, *p. ej.,* EGFR. El uso del término anticuerpo está destinado a incluir anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos completos de cadena sencilla y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multiespecíficos siempre que exhiban la actividad o función biológica deseada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido relacionado con anticuerpo" significa fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos monocatenarios, que pueden comprender la región(regiones) variable sola o en combinación, con todos o parte de los siguientes elementos polipeptídicos: región bisagra, dominios CH_1, CH_2 y CH_3 de una molécula de anticuerpo. En la divulgación también está incluida cualquier combinación de región(regiones) variable y región bisagra, dominios CH_1, CH_2 y CH_3. Las moléculas de anticuerpo de la tecnología actual incluyen, *p. ej.,* pero no se limitan a, Fab, Fab' y $F(ab')_2$, Fd, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio V_L o V_H. Los ejemplos incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y CH_1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH_1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo grupo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward, et al., Nature 341: 544-546, 1989), que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Como tales "fragmentos de anticuerpo" pueden comprender una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Las moléculas de anticuerpo de cadena sencilla pueden comprender un polímero con varias moléculas individuales, por ejemplo, dímero, trímero u otros polímeros.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra biológica" significa material de muestra derivado en contacto con células vivas. La expresión "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Las muestras biológicas de la tecnología actual incluyen, *p. ej.,* pero no se limitan a, sangre completa, plasma, semen, saliva, lágrimas, orina, material fecal, sudor, bucal, piel, líquido cefalorraquídeo y cabello. Las muestras biológicas también pueden obtenerse de biopsias de órganos internos o de cánceres.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo injertado con CDR" significa un anticuerpo en donde al menos una CDR de un anticuerpo "aceptor" se reemplaza por un "injerto" de CDR de un anticuerpo "dador" que posee una especificidad de antígeno deseable.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en donde la región constante Fc de un anticuerpo monoclonal de una especie *(p. ej.,* una región constante Fc de ratón) se reemplaza, utilizando técnicas de ADN recombinante, con una región constante Fc de un anticuerpo de otra especie *(p. ej.,* una región constante de Fc humano). Véase, en general, Robinson, et al., PCT/US86/02269 (publicado como WO

87/02671); Akira, *et al.,* Solicitud de Patente Europea 184.187; Taniguchi, Solicitud de Patente Europea 171.496; Morrison, *et al.,* Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger, et al., WO 86/01533; Cabilly, et al. Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; Cabilly, *et al.,* Solicitud de Patente Europea 125.023; Better, et al., Science 240: 1041-1043, 1988; Liu, et al., Proc Natl Acad Sci USA 84: 3439-3443, 1987; Liu, et al., J Immunol 139: 3521-3526, 1987; Sun, et al., Proc Natl Acad Sci USA 84: 214-218, 1987; Nishimura, et al., Cancer Res 47: 999-1005, 1987; Wood, et al., Nature 314: 446-449, 1885; y Shaw, et al., J Natl Cancer Inst 80: 1553-1559, 1988.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ventana de comparación" significa un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en 20 a 600 aminoácidos o nucleótidos, por lo general, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en donde una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de manera óptima.

Como se usa en el presente documento, la expresión "FR consenso" significa una región de anticuerpo marco (FR) en una secuencia consenso de inmunoglobulina. Las regiones FR de un anticuerpo no entran en contacto con el antígeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) más frecuentes en una familia de secuencias relacionadas (véase *p. ej.,* Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). Es decir, en una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se da con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se dan con la misma frecuencia por igual, se puede incluir cualquiera de ellos en la secuencia consenso.

Como se usa en el presente documento, el término "en contacto" cuando se aplica a una célula o tejido se refiere al proceso por el cual un anticuerpo EGFR de la tecnología actual, composición de anticuerpo, agente o resto citotóxico, un gen, secuencia proteica y/o antisentido, se administra a una célula dianan o se coloca en proximidad directa con la célula diana. Esta administración puede ser *in vitro* o *in vivo* y puede implicar el uso de un sistema de vector recombinante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "resto citotóxico" significa un resto que inhibe el crecimiento celular o favorece la muerte celular cuando se encuentra cerca o es absorbido por una célula. Los restos citotóxicos adecuados en este sentido incluyen agentes radiactivos o isótopos (radionúclidos), agentes quimiotóxicos como inductores de diferenciación, inhibidores y fármacos quimiotóxicos pequeños, proteínas de toxina y derivados de las mismas, así como secuencias de nucleótidos (o su secuencia antisentido). Por lo tanto, el resto citotóxico puede ser, a modo de ejemplo no limitante, un agente quimioterápico, una toxina fotoactivada o un agente radiactivo.

Como se usa en el presente documento, el término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H V_L). Al usar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos de manera más completa en, *p. ej.,* el documento EP 404.097; WO 93/11161; y 30 Hollinger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 90: 6444-6448 (1993).

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" de una composición, es una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, *p. ej.,* una cantidad que da como resultado la prevención de, o una disminución de, los síntomas asociados con una enfermedad que se está tratando, *p. ej.,* las enfermedades asociadas con el polipéptido diana. La cantidad de una composición de la presente tecnología administrada al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como la salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. También dependerá del grado, gravedad y tipo de enfermedad. El experto en la materia podrá determinar dosis adecuadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones de la presente tecnología también pueden administrarse en combinación entre sí, o con uno o más compuestos terapéuticos adicionales.

Como se usa en el presente documento, "expresión" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: transcripción del gen en ARNm precursor; empalme y otro procesamiento del ARNm precursor para producir ARNm maduro; estabilidad del ARNm; traducción del ARNm maduro en proteína (incluyendo uso de codones y disponibilidad de ARNt); y glicosilación y/u otras modificaciones del producto de traducción, si fuera necesario para una expresión y función adecuadas.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" significa un segmento de ADN que contiene toda la información para la biosíntesis regulada de un producto de ARN, incluyendo promotores, exones, intrones y otras regiones no traducidas que controlan la expresión.

Como se usa en el presente documento, el término "genotipo" significa una secuencia de 5' a 3' sin fases de pares de

nucleótidos que se encuentran en uno o más sitios polimórficos o mutantes en un locus en un par de cromosomas homólogos en un individuo. Como se usa en el presente documento, el genotipo incluye un genotipo completo y/o un subgenotipo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo de secuencia humana" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si estuvieran presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos de secuencia humana de la presente tecnología pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio*in vitro* o por mutación somática *in vivo).* Dichos anticuerpos pueden generarse en animales transgénicos no humanos, p. ej., como se describe en las PublicacionesPCT N.os WO 01/14424 y WO 00/37504. Sin embargo, la expresión "anticuerpo de secuencia humana", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas (p. ej., anticuerpos humanizados).

Como se usa en el presente documento, el término formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en donde los restos de la región hipervariable del receptor se reemplazan por los restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo tal como afinidad de unión. Generalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en donde todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la unión afinidad. El número de estas sustituciones de aminoácidos en el FR típicamente no es superior a 6 en la cadena H, y en la cadena L, no superior a 3. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986); Reichmann, et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. *Op.* Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

En un caso, la presente divulgación contempla modificaciones de aminoácidos del anticuerpo EGFR de la presente tecnología. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo EGFR pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del sitio de unión a EGFR. Puede efectuarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para obtener el anticuerpo de interés, siempre que el anticuerpo obtenido tenga las propiedades deseadas, p. ej., actividad biológica. La modificación también incluye el cambio del patrón de glicosilación de la proteína. Un método útil para identificar ubicaciones preferentes para mutagénesis se llama "mutagénesis de barrido de alanina" como lo describen Cunningham y Wells en Science, 244:1081-1085 (1989). El anticuerpo mutado después se analiza para la actividad deseada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en V_L y alrededor de 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en V_H (Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en V_L y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) en V_H (Chothia y LeskJ. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

Como se usa en el presente documento, los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", cuando se usan en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácido o nucleótido que son iguales *(es decir,* aproximadamente 60 % de identidad, preferentemente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad en una región específica *(p.ej,* secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en este documento o secuencia de aminoácidos de un anticuerpo descrito en este documento), cuando se compara y se alinea para obtener la correspondencia máxima respecto a una ventana de comparación o región designada) tal como se mide utilizando los algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predeterminados que se describen a continuación, o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., sitio web de NCBI). Se dice que tales secuencias son "sustancialmente idénticas". Este término también se refiere o puede aplicarse, al complemento de una secuencia de prueba. El término también incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta huecos y similares. En algunos casos, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud;

adicionalmente o de manera alternativa, en algunos casos, la identidad existe respecto a una región que tiene 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Un polipéptido "aislado" o "purificado" o una parte biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otros polipéptidos contaminantes de la fuente celular o tisular de la que se deriva el polipéptido, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, un anticuerpo EGFR aislado es uno sustancialmente libre de material celular u otros polipéptidos contaminantes de la fuente celular o tisular de la que se deriva el anticuerpo. Tales polipéptidos contaminantes pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos, que pueden interferir o no con la actividad biológica del anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inducir la muerte celular" o "capaz de inducir la muerte celular" se refiere a la capacidad de un agente para hacer que una célula viable se vuelva inviable. En algunas realizaciones, el anticuerpo LR004 induce la muerte celular en células cancerosas *in vitro* o *in vivo.* La muerte celular y la viabilidad celular pueden determinarse mediante varios métodos en la técnica, como el ensayo de exclusión de azul de tripano y otros ensayos de viabilidad celular. En la presente tecnología, la muerte celular se refiere a "apoptosis", también conocida como "muerte celular programada", que se indica mediante activación de caspasa, unión de anexina V a la superficie celular, fragmentación de ADN, pérdida de volumen celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (cuerpos apoptóticos). La apoptosis puede medirse utilizando métodos conocidos en la técnica, incluyendo, entre otros, detección de tinción de anexina V, fragmentación de ADN o activación de caspasa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo intacto" significa un anticuerpo que tiene al menos dos polipéptidos de cadena pesada (H) y dos polipéptidos de cadena ligera (L) interconectados por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH_1, CH_2 y CH_3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está comprendida por un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR_1, CDR_1, FR_2, CDR_2, FR_3, CDR_3, FR_4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del clásico sistema del complemento.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir,* los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, al contrario de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán según la presente tecnología pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, et al., Nature 256:495 (1975) o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago utilizando las técnicas descritas en Clackson, et al., Nature 352:624-628 (1991) y Marks, et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "afección médica" incluye, pero no se limita a, cualquier afección o enfermedad manifestada como uno o más síntomas físicos y/o psicológicos para los cuales es deseable el tratamiento y/oprevención, e incluye enfermedades y otros trastornos identificados previamente y recientemente.

Como se usa en el presente documento, el término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, *p. ej.,* se unen a, estimulan el bloqueo parcialmente o totalmente, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan negativamente la actividad de una molécula diana. Los activadores son agentes que, *p. ej.,* se unen a, estimulan, incrementan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan positivamente la actividad de una molécula diana. En algunos casos, la molécula diana es un receptor de EGFR. Los moduladores incluyen versiones genéticamente modificadas de un ligando natural para la molécula diana, así como ligandos naturales y sintéticos, antagonistas, agonistas, pequeñas moléculas químicas y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo neutralizante" significa una molécula de anticuerpo que puede eliminar o reducir significativamente al menos una (1) función biológica de una molécula diana. En algunos casos, la molécula diana es un receptor de EGFR.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, compuestos antibacterianos y antifúngicos, compuestos isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica.

Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para significar un polímero que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, *es decir,* isósteros peptídicos. El polipéptido se refiere a cadenas cortas, habitualmente denominadas péptidos, glicopéptidos u oligómeros, y a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas por procesos naturales, tales como el procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una amplia bibliografía de investigación. En un caso particular, el polipéptido contiene secuencias polipeptídicas de un receptor de EGFR.

Como se usa en el presente documento, el término "recombinante" cuando se usa con referencia, *p. ej.,* a una célula, o un ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que el material se deriva de una célula así modificada. Por tanto, *p. ej.,* las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que de otra forma se expresarían de forma anómala, expresados en baja cantidad, o no expresados en absoluto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "epítopo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG *(p.ej,* IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG para aumentar la semivida sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "anticuerpos de cadena simple" o "Fv de cadena simple (scFv)" se refieren a una molécula de fusión de anticuerpos de los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H. Aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite hacerse como una cadena de proteína única en donde las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv). *Véase, p. ej.,* Bird, et al., Science 242: 423-426, 1988; y Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 85: 5879-5883, 1988). Dichos anticuerpos de cadena sencilla se incluyen por referencia al término fragmentos de "anticuerpo", y pueden prepararse mediante técnicas recombinantes o escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula pequeña" significa una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kDa y más preferentemente menos de aproximadamente 2 kDa. Las moléculas pequeñas pueden ser, *p. ej.,* ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, glicopéptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos, lipopolisacáridos, combinaciones de estas u otras moléculas orgánicas o inorgánicas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unión específica" de un receptor y ligando significa el contacto entre un receptor y un ligando que tiene una afinidad de unión de al menos 10^{-6} M. En algunos casos, los ligandos se unen con afinidades de al menos aproximadamente 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. En algunos casos, el receptor y el ligando son EGFR y un anticuerpo EGFR. En algunos casos, el anticuerpo EGFR es el anticuerpo LR004.

Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones estrictas de hibridación" significa condiciones bajo las cuales una sonda hibridará con su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero a ninguna otra secuencia. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias distintas. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una ampliaría para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tij ssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica definida, pH y concentración nucleica) en donde el 50 % de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, en T_m, 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones estrictas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizadores como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación estrictas ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50 %, 5x SSC y SDS al 1 %, incubación a 42 °C, o, 5x SSC, SDS al 1 %, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1 % a 65 °C.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, tal

como un ser humano, pero también puede ser otro mamífero, *p. ej.,* animales domésticos (p. ej., perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio *(p.ej,* mono, ratas, ratones, conejos, cobayas y similares).

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustitución de aminoácidos" se refiere a la alteración de un aminoácido dentro de un péptido a un aminoácido diferente. Como se conoce en la técnica, las sustituciones de aminoácidos pueden ser "conservativas" o "no conservativas" dependiendo de sus efectos en la actividad biológica del péptido. Las llamadas "sustituciones conservadoras" se muestran a continuación en la Tabla con el título "sustituciones preferentes".

TABLA 1: Sustituciones de aminoácidos		
Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gin	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula diana" significa cualquier célula en un sujeto *(por ejemplo, un* humano o animal) a la que se puede dirigir el anticuerpo EGFR de la tecnología actual.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" significa un compuesto que, cuando está presente en una cantidad eficaz, produce un efecto terapéutico deseado en un sujeto que lo necesita.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refieren al tratamiento terapéutico. Un sujeto es "tratado" con éxito por un cáncer en donde las células cancerosas que expresan EGFR donde, después de recibir una cantidad terapéutica de anticuerpo EGFR, el sujeto muestra una reducción observable y/o medible en o ausencia de uno o más signos y síntomas de cáncer, como, incluyendo, pero sin limitarse a, una reducción del número de células cancerosas presentes en el individuo; una reducción del tamaño tumoral, el peso, volumen o número, inhibición del crecimiento tumoral y/o metástasis, un aumento de la duración de la remisión, reducción o alivio del dolor, una reducción de morbilidad y mortalidad; un aumento del peso corporal o una mejora general de la calidad de vida. "Prevención" o "prevenir" una enfermedad o afección se refiere a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o disminuir (reducir) la afección o trastorno patológico dirigido.

Como se usa en el presente documento, el término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente de la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través del intervalo de aminoácidos de los dominios variables. Al contrario, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominadas regiones flanqueantes (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de mucha variabilidad denominadas "regiones hipervariables" que son, cada una, de 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden, cada uno, cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, como participación del anticuerpo ADCC.

II. ANTICUERPO Y CONJUGADOS DE ANTICUERPO LR004

LR004 es un anticuerpo monoclonal quimérico, recombinante, de humano/ratón que se une específicamente a la parte N-terminal de un receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR). EGFR es miembro del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) o familia ErbB, también conocido como receptor de tirosina quinasa tipo 1 o ErbB 1/HER1. Los otros miembros de la familia incluyen ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). La señalización de EGFR en células tumorales es responsable de regular una red diversa de funciones celulares que influyen en el crecimiento neoplásico, incluyendo proliferación, supervivencia, reparación de daños, adhesión, migración y neovascularización. EGFR se expresa a varios niveles en varios cánceres humanos de origen epitelial. Los tumores epiteliales que comúnmente expresan EGFR incluyen vejiga, mama, cuello del útero, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, pancreático y prostático. La regulación errónea de EGFR, a través de sobreexpresión o mutación, conduce a una actividad constitutiva o una disminución de la regulación negativa del receptor y puede causar una transformación maligna de la célula. Los efectos oncogénicos de EGFR incluyen inicio de la síntesis de ADN, crecimiento celular mejorado, invasión y metástasis.

LR004 es una versión mejorada de cetuximab, que tiene los mismos mecanismos de acción, incluyendo bloqueo de la unión al ligando EGFR que conduce a la inhibición de los efectos posteriores, como inhibición de la señalización intracelular, inhibición de la progresión del ciclo celular, inducción de apoptosis e inhibición de la reparación del ADN, angiogénesis, motilidad de células tumorales, invasión y metástasis. Los estudios que demuestran la inhibición de LR004 de la fosforilación de EGFR inducida por TGF, estimulación de ADCC y efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* se presentan a continuación. Es menos probable que LR004 induzca reacciones de hipersensibilidad que cetuximab debido a las diferencias en la modificación de carbohidratos postraduccional, y es útil para el tratamiento de sujetos que no pueden continuar el tratamiento con cetuximab debido a estos efectos secundarios.

La secuencia de aminoácidos de LR004 se modificó a partir de la secuencia de cetuximab publicada en el Drug Bank (Número de Acceso: DB00002). Una comparación de las secuencias de LR004 y cetuximab disponible comercialmente se realizó mediante análisis LC-MS/MS. Aunque la secuencia Fab de LR004 es idéntica a la de cetuximab, la secuencia Fc difiere en 5 aminoácidos, mostrada en negrita en la Tabla 2. LR004 tiene una repetición Pro-Lys-Ser en los restos 222 a 224 de la cadena pesada, mientras que cetuximab no contiene la repetición. Los restos de CH3 Aspartato361 y Leucina363 están presentes en LR004. Por el contrario, CH3 Glutamato361 y Metionina363 se encuentran en cetuximab. Estas diferencias representan diferentes alotipos de Fc de lgG1 de LR004 (G1m1, 17) y cetuximab (G1m3). Ambos alotipos son comunes entre los anticuerpos monoclonales aprobados. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada son idénticas a las del cetuximab.

Los pesos moleculares teóricos de las cadenas ligera y pesada de LR004 son 23718 Da (LC alquilado) y 53037 Da (HC alquilado, G0F/G0F), respectivamente. El LR004 funcional consta de cuatro cadenas polipeptídicas y un peso molecular aparente de ≈200 KDa por SDS-PAGE no reducido. La característica para LR004 es una multitud de bandas detectables por IEF entre las bandas marcadoras de pI 7,0 y 8,6, representando diferentes isoformas de carga de LR004.

El anticuerpo LR004 comprende dos diferencias en la estructura del carbohidrato en comparación con cetuximab, debido a aspectos de su producción. Aunque cetuximab se expresa en células SP2/0, LR004 se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO). Como resultado, el ácido siálico del LR004 es el ácido N-acetilneuramínico (NANA) a diferencia del ácido N-glicolil-neuramínico (NGNA) en cetuximab. NANA se considera más humano que NGNA. También, aunque cetuximab contiene un alto nivel de galactosa-α-1,3-galactosa (Galα1,3Gal), un potente inmunógeno de oligosacáridos, l carbohidratoLR004 no contiene una cantidad detectable de dicha estructura del carbohidrato. La expresión en células CHO le da a LR004 un perfil de glicano que es notablemente mucho menos inmunorreactivo que el de cetuximab. Con estas dos modificaciones, LR004 es un producto más seguro que cetuximab, pero tiene el mismo mecanismo de acción y eficacia. Como se muestra a continuación, LR004 también demuestra una semivida sérica más larga que cetuximab en regímenes de tratamiento de dosis repetidas, y una mayor termoestabilidad.

La secuencia de aminoácidos de LR004 se proporciona en la Tabla 2. La cadena ligera contiene 214 aminoácidos y la cadena pesada contiene 452 aminoácidos. La secuencia de la cadena ligera es idéntica a la del cetuximab. En la tabla 2, la posición de los enlaces disulfuro se muestra como líneas rectas conectadas y dos sitios ocupados de N-glicano en la cadena pesada están subrayados, uno dentro del marco 3 de la región variable (Fv) en Asn^{88} con una gama de azúcares, incluyendo ácido siálico, ácido N-acetil neuramínico (NANA) y el otro dentro del dominio CH2 en Asn^{302}. En la cadena pesada hay un piroglutamato N-terminal. Las propiedades fisicoquímicas y biológicas del anticuerpo LR004 se resumen en la Tabla 3.

Como se describe en los ejemplos incluidos en este documento, LR004 se une específicamente al EGFR humano e inhibe el crecimiento y la señalización de células tumorales que expresan EGFR. Los estudios *in vitro* demuestran los efectos de LR004 en la fosforilación de EGFR y en ADCC en células de carcinoma hipofaríngeo (FaDu). Las evaluaciones farmacodinámicas descritas incluyen ELISA y estudios de afinidad de unión basados en SPR, estudio de especificidad de unión a ELISA, así como evaluación de citometría de flujo de la unión de LR004 a células tumorales intactas *in vitro.* La actividad antitumoral también se muestra *in vitro* en líneas celulares de cáncer humano e *in vivo* en estudios de xenoinjerto de ratón con tumores de células GEO de cáncer de colon humano. Los estudios de eficacia *in vivo* adicionales demostrarán aún más la eficacia de LR004 en comparación con cetuximab.

LR004 es útil para el tratamiento de cánceres que expresan EGFR, administrado solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En particular, LR004 es útil para tratar pacientes con hipersensibilidad al cetuximab que impide la continuación del tratamiento con cetuximab.

Tabla 2: Secuencia de Aminoácidos de LR004

Cadena ligera de LR004 (cadena L)

1 Asp-Ile-Leu-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Val-Ile-Leu-Ser-Val-Ser-Pro-Gly-Glu-Arg-Val-Ser-Phe-Ser-Cys^{23}-Arg-Ala

26 Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Thr-Asn-Ile-His-Trp-Tyr-Gln-Gln-Arg-Thr-Asn-Gly-Ser-Pro-Arg-Leu-Leu-Ile-Lys-Tyr

51 Ala-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser-Gly-Ile-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Ser-Ile

76 Asn-Ser-Val-Glu-Ser-Glu-Asp-Ile-Ala-Asp-Tyr-Tyr-Cys^{88}-Gln-Gln-Asn-Asn-Asn-Trp-Pro-Thr-Thr-Phe-Gly-Ala

101 Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Leu-Lys-Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Ser-Asp-Glu-Gln-Leu

126 Lys-Ser-Gly-Thr-Ala-Ser-Val-Val-Cys^{134}-Leu-Leu-Asn-Asn-Phe-Tyr-Pro-Arg-Glu-Ala-Lys-Val-Gln-Trp-Lys-Val

151 Asp-Asn-Ala-Leu-Gln-Ser-Gly-Asn-Ser-Gln-Glu-Ser-Val-Thr-Glu-Gln-Asp-Ser-Lys-Asp-Ser-Thr-Tyr-Ser-Leu

176 Ser-Ser-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-Lys-Ala-Asp-Tyr-Glu-Lys-His-Lys-Val-Tyr-Ala-Cys^{194}-Glu-Val-Thr-His-Gln-Gly

201 Leu-Ser-Ser-Pro-Val-Thr-Lys-Ser-Phe-Asn-Arg-Gly-Glu-Cys^{214}

(continuación)

Tabla 2: Secuencia de Aminoácidos de LR004

Cadena pesada de LR004 (cadena H)

1 Gln-Val-Gln-Leu-Lys-Gln-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-Gln-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Ile-Thr-Cys[22]-Thr-Val-Ser

26 Gly-Phe-Ser-Leu-Thr-Asn-Tyr-Gly-Val-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-Leu-Glu-Trp-Leu-Gly-Val

51 Ile-Trp-Ser-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Thr-Pro-Phe-Thr-Ser-Arg-Leu-Ser-Ile-Asn-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys

76 Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Lys-Met-Asn-Ser-Leu-Gln-Ser-Asn[88]-Asp-Thr-Ala-Ile-Tyr-Tyr-Cys[95]-Ala-Arg-Ala-Leu-Thr

101 Tyr-Tyr-Asp-Tyr-Glu-Phe-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ala-Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro

126 Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Ala-Pro-Ser-Ser-Lys-Ser-Thr-Ser-Gly-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gly-Cys[146]-Leu-Val-Lys-Asp

151 Tyr-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Thr-Val-Ser-Trp-Asn-Ser-Gly-Ala-Leu-Thr-Ser-Gly-Val-His-Thr-Phe-Pro-Ala-Val

176 Leu-Gln-Ser-Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Val-Val-Thr-Val-Pro-Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Thr-Gln-Thr-Tyr

201 Ile-Cys[202]-Asn-Val-Asn-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Arg-Val-Glu-Pro-Lys-Ser-**Pro-Lys-Ser**[224]-Cys[225]

226 Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys[231]-Pro-Pro-Cys[234]-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro

251 Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys[266]-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp

276 Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln

301 Tyr-Asn[302]-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys

326 Cys[326]-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu

351 Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-**Asp**[361]-Glu-**Leu**[363]-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys[372]-Leu-Val-Lys

376 Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro

401 Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly

426 Asn-Val-Phe-Ser-Cys[430]-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Pro

451 Gly-Lys

Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas y biológicas de LR004

Propiedad	Método analítico	Resultado
Peso molecular	Espectrometría de masas	LC: 23718 Da (alquilado) HC: 53037 Da (G0F/G0F alquilado)
Secuencia N-terminal	Degradación de Edman	[a] HC: (Q)VQLKQSGPGLVQPS LC: DILLTQSPVILSVSP
Estructuras de Glicoforma	Waters Q-TOF	G0F/G0F, G0F/G1F GIF/GIF, G1F/G2F, G1F/G1F-SA[b]' G1F/G2F-SA[b,]
Punto de fusión	DSC	88,84 °C[c]
pI	IEF	7,0-8,6
Coeficiente de Extinción UV	Ecuación de ritmo	1,652 ml/mg cm
ELISA de Unión a Antígeno	ELISA	Unión a EGFR
Inhibición del Crecimiento de Células Tumorales Positivas para EGFR	Cultivo celular	Inhibición del crecimiento de células MDA-MB 468

[a] Después de tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa
[b] SA: Ácido siálico, Ácido N-acetilneuramínico (NANA)
[c] El punto de fusión de Erbitux® es 85,28 °C en el mismo tampón de formulación (NaCl 100 mM, glicina 100 mM, polisorbato 80 al 0,01 %, ácido cítrico 10 mM, pH 5,5 a una concentración de 20 mg 6 10 mg/ml)

IEF: enfoque isoeléctrico

pI: punto isoeléctrico
UV: ultravioleta
ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
DSC: calorimetría diferencial de barrido

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo para el tratamiento de cánceres que expresan EGFR, y composiciones que lo comprenden. En algunos casos, el anticuerpo es LR004. En algunos casos, el anticuerpo está LR004 conjugado con un agente adicional. En algunos casos, el agente adicional comprende un marcador detectable o un agente terapéutico. En algunos casos, el marcador detectable incluye, pero no se limita a, un marcador fluorescente o un marcador radiactivo. En algunos casos, el agente terapéutico comprende un agente

quimioterapéutico, como un agente terapéutico para el cáncer.

En general, los restos terapéuticos pueden conjugarse con el anticuerpo LR004 mediante cualquier técnica adecuada, con la consideración apropiada de la necesidad de estabilidad farmacocinética y una toxicidad general reducida para el sujeto. Un agente terapéutico, citotóxico, o de marcado/formación de imágenes (*es decir,* un "moiety") puede acoplarse al anticuerpo directa o indirectamente (por ejemplo, *mediante* un grupo conector). Una reacción directa entre un resto y el anticuerpo LR004 es posible cuando cada uno posee un grupo funcional capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, como un grupo amino o sulfhidrilo, puede reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente *(p. ej.,* un haluro). Como alternativa, puede usarse un grupo conector químico adecuado. Un grupo conector puede funcionar como un espaciador para distanciar el anticuerpo LR004 de un resto para evitar interferencias con las capacidades de unión. Un grupo conector también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un resto o el anticuerpo LR004, y así aumentar la eficacia del acoplamiento. Un aumento de la reactividad química también puede facilitar el uso de restos o grupos funcionales en restos, que de lo contrario no sería posible.

Las químicas de enlace adecuadas incluyen conectores de maleimidilo y enlaces de haluro de alquilo (que reaccionan con un sulfhidrilo en el resto del anticuerpo) y enlaces de succinimidilo (que reaccionan con una amina primaria en el resto de anticuerpo). Varios grupos de amina primaria y sulfhidrilo están presentes en las inmunoglobulinas, y pueden diseñarse grupos adicionales en moléculas de inmunoglobulinas recombinantes. Para los expertos en la materia será evidente que una variedad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo- como hetero-funcionales (como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, III.), pueden usarse como grupo conector. El acoplamiento puede verse afectado, *p. ej.,* mediante grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o restos de carbohidratos oxidados (véase, p. ej., Pat. N.° 4.671.958).

Como método de acoplamiento alternativo, un resto al anticuerpo LR004 puede acoplarse mediante un grupo de carbohidratos oxidados en un sitio de glicosilación, como se describe en las patentes de EE.UU. N.^{os} 5.057.313 y 5.156.840. Otro método alternativo para acoplar el anticuerpo LR004 a un resto es mediante el uso de un par de unión no covalente, como estreptavidina/biotina o avidina/biotina. En estas realizaciones, un miembro del par está acoplado covalentemente al anticuerpo LR004 y el otro miembro del par de unión está acoplado covalentemente al resto.

Cuando un resto citotóxico o terapéutico es más potente cuando está libre de la parte de anticuerpo LR004 de los inmunoconjugados de la tecnología actual, puede ser deseable usar un grupo conector que sea escindible durante o tras la internalización en una célula, o que sea escindible gradualmente con el tiempo en el entorno extracelular. Se han descrito varios grupos enlazadores escindibles diferentes. Los ejemplos de la liberación intracelular de un resto citotóxico de estos grupos conectores incluyen, *p. ej.,* pero no se limitan a, escisión por reducción de un enlace disulfuro *(p. ej.,* patente de EE.UU. N.º 4.489.710), por irradiación de un enlace fotolábil *(p. ej.,* patente de EE.UU. N.º 4.625.014), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivatizadas *(p. ej.,* patente de EE.UU. N.º 4.638.045), por hidrólisis mediada por complemento de suero *(p. ej.,* patente de EE.UU. N.º 4.671.958), e hidrólisis catalizada con ácido *(p. ej.,* patente de EE.UU. N.º 4.569.789).

En una realización, el anticuerpo LR004 está acoplado a más de un agente terapéutico, fracción citotóxica y/o de formación de imágenes. Al poli-derivatizar el anticuerpo LR004, pueden implementarse simultáneamente varias estrategias citotóxicas, el anticuerpo LR004 puede hacerse útil como agente de contraste para varias técnicas de visualización, o un anticuerpo terapéutico puede marcarse para seguimiento mediante una técnica de visualización. En una realización, múltiples moléculas de un resto citotóxico se acoplan a un anticuerpo LR004. En una realización, el anticuerpo LR004 está acoplado a una mezcla de al menos dos restos seleccionados del grupo que consiste en: un resto citotóxico; resto terapéutico; y resto de marcado/formación de imágenes. Es decir, más de un tipo de resto puede acoplarse a un anticuerpo LR004. Por ejemplo, un resto terapéutico, como un polinucleótido o secuencia antisentido, puede conjugarse con el anticuerpo LR004 junto con un resto quimiotóxico o radiotóxico, para aumentar la eficacia de la terapia quimio- o radiotóxica, además de reducir la dosis requerida necesaria para obtener el efecto terapéutico deseado. Independientemente de la realización particular, dos inmunoconjugados con más de un resto pueden prepararse de varias maneras. Por ejemplo, más de un resto puede acoplarse directamente al anticuerpo LR004, o conectores que proporcionan múltiples sitios para la unión *(p. ej.,* pueden usarse dendrímeros). Como alternativa, puede usarse un vehículo con la capacidad de contener más de un resto citotóxico.

Como se explicó anteriormente, el anticuerpo LR004 puede soportar el resto(s) de varias maneras, incluyendo enlaces covalentes ya sea directamente o *mediante* un grupo conector y asociaciones no covalentes. En una realización, el anticuerpo se combina con vehículos de encapsulación. Esto es especialmente útil en realizaciones terapéuticas quimiotóxicas, ya que pueden permitir que las composiciones terapéuticas liberen gradualmente el resto quimiotóxico del anticuerpo LR004 a lo largo del tiempo mientras lo concentran cerca de las células diana.

En una realización, el anticuerpo LR004 está acoplado con un resto citotóxico que es un radionúclido. Los radionúclidos preferentes para uso como restos citotóxicos son radionúclidos que son adecuados para administración farmacológica. Dichos radionúclidos incluyen ^{121}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{90}Y, ^{211}At, ^{67}Cu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{212}Pb, y ^{212}Bi. Los isótopos de yodo y astatina son los radionúclidos más preferentes para uso en las composiciones terapéuticas de la tecnología actual, ya que se ha acumulado una gran cantidad de bibliografía sobre su uso. ^{131}I es particularmente preferente, al igual que otros

núclidos emisores de radiación β, que tienen un alcance eficaz de varios milímetros. ^{123}1, ^{125}I, ^{131}I, o ^{211}At pueden conjugarse con el anticuerpo LR004 para usar en las composiciones y métodos que utilizan cualquiera de varios reactivos de conjugación conocidos, incluyendo yodógeno, 3- [^{211}At]astatobenzoato de N-succinimidilo, 3-[^{131}I]yodobenzoato de N-succinimidilo (SIB), y, 5- [^{131}I]yodob-3-piridinacarboxilato de N-succinimidilo (SIPC). Cualquier isótopo de yodo puede utilizarse en los reactivos de yodo mencionados. Otros radionúclidos pueden conjugarse con el anticuerpo LR004 mediante agentes de quelación adecuados conocidos por los expertos en las técnicas de medicina nuclear.

En una realización, el anticuerpo LR004 está acoplado con un resto quimiotóxico. Los agentes quimiotóxicos incluyen, pero no se limitan a, fármacos de molécula pequeña como metotrexato y análogos de pirimidina y purina. Los inductores de diferenciación de quimiotoxina incluyen ésteres de forbol y ácido butírico. Los restos quimiotóxicos se pueden conjugar directamente con el anticuerpo LR004. En una realización, el anticuerpo LR004 está acoplado a un resto citotóxico *mediante* un conector químico. En otra realización, un resto se encapsula en un vehículo, que, a su vez, está acoplado al anticuerpo LR004.

En una realización, el anticuerpo LR004 está acoplado con un resto de toxina proteica. Las proteínas de toxina preferentes para uso cçomo restos citotóxicos, incluyen, *p. ej.,* pero no se limitan a, antibióticos de *Actinomycetes* o *Streptomyces,* duocarmicina, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina didne, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Las proteínas de toxina preferentes para uso como restos citotóxicos incluyen además ricina, abrina, toxina diftérica, toxina colérica, gelonina, exotoxina de Pseudomonas, toxina de Shigella, proteína antiviral de hierba carmín y otras proteínas de toxina conocidas en las técnicas de bioquímica medicinal. Como estos agentes de toxina pueden provocar respuestas inmunitarias indeseables en el sujeto, especialmente si se inyectan por vía intravascular, es preferente encapsularlos en un vehículo para acoplamiento al anticuerpo LR004.

En una realización, el anticuerpo LR004 se combina con una toxina enzimáticamente activa. La toxina enzimáticamente activa puede ser de origen bacteriano o vegetal, o un fragmento enzimáticamente activo ("cadena A") de dicha toxina. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos útiles en la presente tecnología son la cadena de difteria A, fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, sarcina alfa, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina. Los conjugados del anticuerpo LR004 con restos citotóxicos se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales. Ejemplos de tales reactivos son SPDP, IT, derivados bifuncionales de imidoésteres como HC1 de adipimidato de dimetilo, ésteres activos como suberato de disuccinimidilo, aldehídos como glutaraldehído, compuestos de bis-azido como bis(p-azidobenzoilhexanodiamina, derivados de bis-diazonio como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina, diisocianatos como 2,6-diisocianato de tolileno y compuestos de flúor bis-activos como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno. La parte de lisis de una toxina puede unirse al fragmento Fab del anticuerpo LR004.

En una realización, el anticuerpo LR004 está acoplado con un resto terapéutico. Un resto terapéutico incluye, *p. ej.,* pero no se limita a, anti-metabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), doxorrubicina (adriamicina), cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida hidroxiurea o ricina A, y agentes anti-mitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Las técnicas para conjugar tal resto terapéutico con el anticuerpo LR004 son bien conocidas, véase, p. ej., Arnon, et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld, et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom, et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2a Ed.), Robinson, et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera, et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin, et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe, et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

En una realización, el anticuerpo LR004 está acoplado con un resto marcador, *es decir,* grupo detectable. El marcador particular o grupo detectable conjugado con el anticuerpo LR004 no es un aspecto crítico de la tecnología actual, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichos marcadores detectables se han desarrollado bien en el campo de los inmunoensayos y la formación de imágenes, en general, la mayoría de las

etiquetas útiles en tales métodos puede aplicarse a la tecnología actual. Por tanto, una etiqueta es cualquier composición detectable por espectroscopía, fotoquímicos, actividades bioquímicas, inmunoquímicas, eléctricas, medios ópticos o químicos. Las etiquetas útiles incluyen perlas magnéticas (*p. ej.,* Dynabeads™), tintes fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores *(p. ej.,* ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{125}I, ^{121}I, ^{112}In, ^{99}mTc), otros agentes de formación de imágenes como microburbujas (para imágenes por ultrasonidos), ^{18}F, ^{11}C, ^{15}O, (para tomografía por emisión de positrones), ^{99m}TC, ^{111}In (para tomografía de emisión de fotón único), enzimas *(p. ej.,* peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras utilizadas comúnmente en un ELISA), y etiquetas calorimétricas como perlas de oro coloidal o vidrio coloreado o plástico *(p. ej.,* poliestireno, polipropileno, látex, y similares). Las patentes que describen el uso de tales etiquetas incluyen las patentes de EE.UU. N.^{os} 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Véase también Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.).

El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente deseado de un ensayo según métodos bien conocidos en la técnica. Como se indicó anteriormente, puede utilizarse una amplia variedad de etiquetas, con la elección de la etiqueta según la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación con el compuesto, requisitos de estabilidad, instrumentación disponible y disposiciones de eliminación.

Las etiquetas no radiactivas a menudo se adhieren por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando *(p. ej.,* biotina) se une covalentemente a la molécula. El ligando después se une a una molécula anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina) que se detecta inherentemente o se une covalentemente a un sistema de señal, como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Pueden usarse varios ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, *p. ej.,* biotina, tiroxina y cortisol, puede usarse junto con anti-ligandos, naturales, marcados. Como alternativa, cualquier compuesto hapténico o antigénico puede usarse en combinación con el anticuerpo LR004.

Las moléculas también pueden conjugarse directamente a compuestos generadores de señales, *p. ej.,* por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como etiquetas serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas u oxidorreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes útiles como restos de marcado, incluyen, pero no se limitan a, *p. ej.,* fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona y similares. Los compuestos quimioluminiscentes útiles como restos de marcado, incluyen, pero no se limitan a, *p. ej.,* luciferina y 2,3-dihidroftalazinadionas, p. ej., luminol. Para una revisión de varios sistemas de marcado o producción de señales que pueden usarse, *véase,* Pat. de EE. UU. N.° 4.391.904.

Los medios de detección de etiquetas son bien conocidos por los expertos en la materia. Por tanto, por ejemplo, cuando la etiqueta es una etiqueta radiactiva, los medios para detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Cuando la etiqueta es una etiqueta fluorescente, puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz adecuada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse visualmente, mediante una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos como dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Igualmente, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, las etiquetas colorimétricas simples pueden detectarse simplemente observando el color asociado con la etiqueta. Por tanto, en varios ensayos con tira reactiva, el oro conjugado a menudo aparece rosado, mientras que varias perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

III. PREPARACIÓN DE LR004

LR004 es un anticuerpo monoclonal quimérico, recombinante, humano/ratón recombinante que se une específicamente a la parte N-terminal de un EGFR humano. La secuencia de las cadenas pesadas y ligeras LR004 se proporciona en la Tabla 2. Como se discutió anteriormente, la secuencia se modificó a partir de la secuencia de cetuximab publicada en el Drug Bank (Número de Acceso: DB00002), que incorpora cinco cambios de aminoácidos.

El anticuerpo LR004 puede producirse en células CHO usando métodos conocidos en la técnica. La producción del anticuerpo en estas células da como resultado dos diferencias en la estructura del carbohidrato en comparación con cetuximab, que se produce en células SP2/0. En particular, el ácido siálico del LR004 es el ácido N-acetilneuramínico (NANA) a diferencia del ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) en cetuximab. NANA se considera más humano que NGNA. También, aunque cetuximab contiene un alto nivel de galactosa-α-1,3-galactosa, que es un potente inmunógeno de oligosacáridos, LR004 no contiene una cantidad detectable de dicha estructura del carbohidrato. El perfil de glicano de LR004 es mucho menos inmunorreactivo que el de cetuximab, haciendo que sea más seguro para administración a sujetos humanos. También, debido a estas secuencias y diferencias postraduccionales, LR004 demuestra una semivida sérica más larga que cetuximab en regímenes de tratamiento de dosis repetidas y una mayor termoestabilidad.

El anticuerpo recombinante LR004 puede expresarse en células CHO usando métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el anticuerpo se expresa usando un vector de expresión de mamífero introducido en las células CHO del hospedador. En algunas realizaciones, el anticuerpo se expresa a partir de secuencias recombinantes integradas de manera estable en el genoma de la célula CHO del hospedador.

Las construcciones de polinucleótidos recombinantes que codifican el anticuerpo LR004 incluirán típicamente una secuencia de control de expresión unida operativamente a las secuencias codificantes del anticuerpo. Como tal, otro aspecto de la presente tecnología incluye vectores que contienen una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo LR004. Lerner, et al., han descrito métodos para producir diversas poblaciones de vectores, Pat. de EE.UU. N.º 6.291.160; 6.680.192.

Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo LR004 de la presente tecnología puede expresarse en células CHO usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión en mamíferos incluyen, pero no se limitan a, pCDM8 (Seed,. Nature 329: 840, 1987) y pMT2PC (Kaufman,, et al., EMBO J. 6: 187-195, 1987). Por ejemplo, los promotores usados comúnmente derivan de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus, y virus simio 40. Para sistemas de expresión adecuados para células eucariotas útiles para expresión del anticuerpo LR004. *Véase, p. ej.,* Capítulos 16 y 17 de Sambrook, et al., "MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula CHO en donde se ha introducido un vector de expresión de mamífero que comprende secuencias codificantes de LR004. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes de LR004 están presentes en un vector replicable separado del genoma de la célula CHO. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes de LR004 están integradas de manera estable en el genoma de la célula CHO.

Una vez expresados, el anticuerpo LR004 puede aislarse y purificarse usando métodos conocidos en la técnica. La actividad biológica del anticuerpo puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento. Por ejemplo, la actividad biológica del anticuerpo puede determinarse *in vitro* evaluando la especificidad de unión del anticuerpo para EGFR, la capacidad del anticuerpo para inhibir la fosforilación de EGFR *in vitro* o *in vivo,* y evaluar el efecto del anticuerpo sobre la proliferación de células tumorales *in vitro* o en modelos animales.

IV. MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para tratar cánceres que expresan EGFR que comprenden administrar el anticuerpo LR004 a un sujeto que lo necesita, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, el uno o más agentes terapéuticos comprende, una proteína o péptido, como, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas,* o toxina de difteria; una proteína como factor de necrosis tumoral o interferón alfa; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, *p. ej.,* linfoquinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

En algunos casos, el agente terapéutico comprende un agente quimioterapéutico, incluyendo, pero sin limitarse a, alcaloides de la vinca, agentes que interrumpen la formación de microtúbulos (como colchicinas y sus derivados), agentes antiangiogénicos, anticuerpos terapéuticos, agentes dirigidos a EGFR, agente de direccionamiento de tirosina quinasa (como inhibidores de tirosina quinasa), complejos de metales de transición, inhibidores de proteosoma, antimetabolitos (como análogos de nucleósidos), agentes alquilantes, agentes a base de platino, antibióticos de antraciclina, inhibidores de topoisomerasa, macrólidos, retinoides (como ácidos all-trans retinoicos o sus derivados); geldanamicina o un derivado de la misma (como 17-AAG), y otros agentes quimioterapéuticos estándar bien reconocidos en la técnica.

En algunos casos, el agente quimioterapéutico incluye uno o más de adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos (por ejemplo, taxol, paclitaxel y derivados del mismo, taxotere y derivados del mismo, y similares), topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, erlotinib, Erbitux®, derivados de los mismos, agentes quimioterapéuticos conocidos en la técnica, y similares. En algunos casos, el agente quimioterapéutico es una composición que comprende nanopartículas que comprenden un derivado de tiocolchicina y una proteína vehículo (como albúmina).

En algunos casos, el agente quimioterapéutico es un agente antineoplásico que incluye, pero no se limita a, carboplatino, Navelbine® (vinorelbina), antraciclina (Doxil®), lapatinib (GW57016), Herceptin®, gemcitabina (Gemzar®), capecitabina (Xeloda®), Alimta®, cisplatino, 5-fluorouracilo (5-Fu), epirrubicina, ciclofosfamida, Avastin®, Velcade®, *etc.*

En este documento la referencia a un agente quimioterapéutico se aplica al agente quimioterapéutico o sus derivados y, en consecuencia, la presente tecnología incluye cualquiera de estos casos (agente; agente o derivado(s)). Los "derivados" o "análogos" de un agente quimioterapéutico u otro resto químico incluyen, pero no se limitan a,

compuestos que son estructuralmente similares al agente o resto quimioterapéutico o están en la misma clase química general que el agente o resto quimioterapéutico. En algunos casos, el derivado o análogo del agente o resto quimioterapéutico conserva propiedades químicas y/o físicas similares (incluyendo, por ejemplo, funcionalidad) del agente o resto quimioterapéutico.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer que comprende determinar si un sujeto es hipersensible al cetuximab o está predispuesto a tener una reacción de hipersensibilidad al cetuximab. En algunos casos, el método comprende determinar si IgE anti-cetuximab está presente en el suero del sujeto. En algunos casos, el método comprende determinar si IgE anti-galactosa-α-1,3-galactosa (Galα1,3Gal) está presente en el suero del sujeto. En algunos casos, IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal se mide mediante ELISA. En algunos casos, IgE anti-cetuximab o la IgE anti-Galα1,3Gal se mide usando un ensayo de radioalergosorción. En algunos casos, IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal se mide con ImmunoCAP®.

La detección de IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal mediante ELISA puede realizarse utilizando protocolos conocidos en la técnica, como los descritos en Plum, et al., J. Biol. Chem. 286(50):43103-43111 (2011); Mariotte, et al., mAbs 3(4):396-401 (2011); y Chung, et al., N. Engl. J. Med. 358(11): 1109-1117 (2008). Por ejemplo, Galα1,3Gal o el propio cetuximab pueden usarse como reactivo de recubrimiento para proporcionar determinantes inmovilizados para unión a IgE. IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal unida a los determinantes inmovilizados pueden detectarse usando anticuerpos secundarios específicos de IgE y medios apropiados para desarrollar y/o cuantificar el marcador.

Las muestras de pacientes pueden compararse con controles positivos y negativos preparados usando sueros apropiados y/o reactivos bioquímicos. Por ejemplo, los controles negativos pueden prepararse utilizando sueros de sujetos que se sabe que carecen de hipersensibilidad a cetuximab, con controles positivos preparados con sueros de sujetos con hipersensibilidad conocida a cetuximab. La definición y la clasificación de la hipersensibilidad al cetuximab pueden basarse en los síntomas enumerados en National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, versión 3.11,16, que proporciona las características de una reacción de grado 1 como enrojecimiento transitorio o erupción cutánea con fiebre de menos de 38 °C (100,4 °F); los de una reacción de grado 2 como erupción o enrojecimiento, urticaria y disnea con o sin fiebre de más de 38 °C; los de grado 3 como erupción cutánea, disnea e hipotensión; y los de grado 4 como anafilaxis.

Como se conoce en la técnica, los sujetos que tienen IgE anti-cetuximab en suero o IgE anti-Galα1,3Gal tienen una mayor incidencia de hipersensibilidad severa al cetuximab que los que no tienen IgE. En consecuencia, el nivel de IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal de un sujeto puede servir como indicador de si el sujeto ha tenido o está predispuesto a tener una hipersensibilidad severa al cetuximab, y si el sujeto es candidato para el tratamiento con cetuximab. Un nivel de IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal mayor que los controles negativos indica que un sujeto tiene un riesgo elevado de hipersensibilidad a cetuximab en comparación con los sujetos que no tienen un nivel de IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3 Gal más alto que los controles negativos.

En algunos casos, un sujeto con mayor riesgo de hipersensibilidad a cetuximab tiene niveles séricos de IgE anti-cetuximab o anti-Galα1,3Gal IgE de al menos aproximadamente 1 a al menos aproximadamente 99 por ciento más que un sujeto que no tiene un mayor riesgo de hipersensibilidad a cetuximab. En algunos casos, el sujeto tiene niveles de IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal al menos aproximadamente 1, 2, 3, *4,* 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99 por ciento más que un sujeto que no ha aumentado riesgo de hipersensibilidad al cetuximab.

En algunos casos, un sujeto con mayor riesgo de hipersensibilidad al cetuximab tiene niveles séricos de IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal de al menos aproximadamente 1 a al menos aproximadamente 100 veces superior. En algunos casos, el sujeto tiene niveles de IgE anti-cetuximab o IgE anti-Galα1,3Gal al menos aproximadamente 1,2, 3, 4, 5, 6, 7,8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99 veces mayor que un sujeto que no tiene un mayor riesgo de hipersensibilidad a cetuximab.

El anticuerpo LR004 puede incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración al sujeto que lo necesite para el tratamiento de cánceres que expresan EGFR. Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden el anticuerpo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una forma adecuada para una vía de administración particular. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas para administrar las composiciones de anticuerpos (véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 18th ed., 1990). Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en total cumplimiento con todas las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos.

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable", y variaciones gramaticales de las mismas, que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales pueden administrarse a un sujeto o sobre él sin producir efectos fisiológicos indeseables en un grado que prohibiría la administración de la composición. Por ejemplo, "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que generalmente es segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario, así como para uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en caso de una composición en aerosol, gaseosos. "Sales y ésteres farmacéuticamente aceptables" significa sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes en el anticuerpo pueden reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, *p. ej.,* sodio y potasio, magnesio, calcio, y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas tales como bases de amina, *p. ej.,* etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares. Dichas sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos *(p. ej.,* ácidos clorhídrico e bromhídrico) y ácidos orgánicos *(p. ej.,* ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y ácidos alcano y arenosulfónicos tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfoniloxi y fosfonoxi presentes en el anticuerpo, *p. ej.,* ésteres de alquilo C_{1-6}.

Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina sérica humana al 5 %. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. El uso de tales medios y compuestos para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o compuesto convencional sea incompatible con el anticuerpo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente tecnología están formuladas para ser compatibles con la vía de administración prevista, como, por ejemplo, vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intradérmica, transdérmica, rectal, intracraneal, intraperitoneal, intranasal; intramuscular o administración respiratoria.

En algunos casos, las formulaciones se administran localmente, directamente en un tejido afectado. En algunos casos, las formulaciones se administran por vía sistémica. En algunos casos, las formulaciones se administran como un bolo. En algunos casos, las formulaciones se administran para un suministro de liberación prolongada.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea puede incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; compuestos antibacterianos como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; compuestos quelantes como ácido etilendiamintetraacético (EDTA); tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y compuestos para ajuste de la tonicidad como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (en los casos donde sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición ha de ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, *p. ej.,* agua, etanol, poliol *(p. ej.,* glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, *p. ej.,* mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos compuestos antibacterianos y antifúngicos, *p. ej.,* parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir compuestos isotónicos, *p. ej.,* azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un compuesto retardante de la absorción, *p. ej.,* monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el anticuerpo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el anticuerpo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente estéril del mismo. Los agentes de la presente tecnología

pueden administrarse en forma de inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del principio activo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden atraparse en cápsulas de gelatina o compactarse formando comprimidos. Para fines de administración terapéutica oral, el anticuerpo LR004 o el conjugado de anticuerpos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un transportador fluido para su uso como enjuague bucal, en donde el compuesto en el transportador líquido se aplica por vía oral se usa como enjuague y se expectora o ingiere. Pueden incluirse compuestos de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un compuesto desintegrante como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente, tal como dióxido de silicio coloidal; un compuesto edulcorante como sacarosa o sacarina; o un compuesto aromatizante como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para administración por inhalación, el anticuerpo se administrar en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, *p. ej.,* un gas, tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes adecuados para la barrera que va a permearse. Dichos agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, *p. ej.,* para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para administración transdérmica, el anticuerpo se formula en ungüentos, bálsamos, geles o cremas, como se conoce en general en la técnica.

El anticuerpo también puede prepararse como composiciones farmacéuticas en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

El anticuerpo puede prepararse con vehículos que protegerán al anticuerpo contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Biodegradable, se pueden usar polímeros biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para preparar dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la materia, *p. ej.,* como se describe en la patente de EE.UU. N.° 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de anticuerpo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidad de dosificación de la presente tecnología está dictada por y depende directamente de las características únicas del anticuerpo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de combinar el anticuerpo para el tratamiento de un sujeto.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente tecnología pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto mediante, *p. ej.,* inyección intravenosa, administración local (véase, p. ej., Pat. de EE.UU. N.º 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase, p. ej., Chen,, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está incrustado el vehículo de administración génica. Como alternativa, cuando el vector completo de administración génica puede producirse intacto a partir de células recombinantes, *p. ej.,* vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para formación de imágenes tumorales *in vivo* que comprende administrar a un sujeto una cantidad de anticuerpo LR004 conjugado a un marcador detectable adecuado para detección por rayos X, RMN o ESR. Para rayos X, las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos como bario o cesio, que emiten radiaciones detectables. Los marcadores adecuados para RMN y ESR incluyen aquellos con un giro característico detectable, como deuterio, que puede incorporarse o conjugarse con el anticuerpo usando métodos conocidos en la técnica.

El anticuerpo LR004 que se ha marcado con un resto de imagen detectable apropiado, como un radioisótopo (p. ej., ^{131}I, ^{112}In, ^{99}mTc), una sustancia radiopaca o un material detectable por resonancia magnética nuclear, se introduce (por ejemplo, parenteralmente, subcutáneamente o intraperitonealmente) en el sujeto. En la técnica se entenderá que el tamaño del sujeto y el sistema de formación imágenes utilizados determinarán la cantidad de fracción de imagen necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto radioisotópico, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada normalmente variará de aproximadamente 5 y 20 milicuries de "mTc. El anticuerpo LR004 marcado se acumulará preferentemente en la ubicación de las células que contienen el polipéptido diana específico. Por ejemplo, la formación de imágenes tumorales *in vivo* se describe en S. W. Burchiel, et al., Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer 13 (1982).

El anticuerpo LR004 de la presente tecnología es útil para el tratamiento de cánceres que expresan EGFR, y en particular, para el tratamiento de cánceres que expresan EGFR en sujetos que no pueden seguir el tratamiento con cetuximab. Las composiciones y los métodos de la presente tecnología son útiles para tratar todos los cánceres para los que la inhibición de EGFR es útil, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de vejiga, mama, cuello del útero, colon, colorrectal, cabeza y cuello, riñón, pulmón, pancreático y próstata.

Cuando se usa *in vivo* para terapia, el anticuerpo LR004 se administra al sujeto en cantidades eficaces *(es decir,* cantidades que tienen el efecto terapéutico deseado). La dosis y el régimen de dosificación dependerán del grado de enfermedad que expresa EGFR presente en el individuo y de las características de la enfermedad particular en cuestión. En algunos casos, el anticuerpo se administra repetidamente en el transcurso de días, semanas, meses o años hasta que se obtenga el grado de tratamiento deseado.

En algunos casos, el anticuerpo LR004 se administra junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, el anticuerpo y los agentes terapéuticos adicionales muestran un efecto sinérgico para el tratamiento de un cáncer que expresa EGFR. Es decir, la combinación de anticuerpo y agente terapéutico produce un efecto mayor que el efecto aditivo con respecto a, por ejemplo, favorecer la regresión tumoral o suprimir el crecimiento tumoral. En algunos casos, el efecto sinérgico permite la administración de una dosis más baja del anticuerpo y uno o más agentes adicionales de lla que sería eficaz si se usaran solos.

Típicamente, una cantidad explicar de las composiciones de la tecnología actual, suficiente para lograr un efecto terapéutico o profiláctico, varía de aproximadamente 0,000001 mg por kilogramo de peso corporal al día a aproximadamente 10.000 mg por kilogramo de peso corporal al día. En algunos casos, los intervalos de dosificación son de aproximadamente 0,0001 mg por kilogramo de peso corporal al día a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día. En algunos casos, las composiciones se administran en un intervalo de dosificación de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, o de aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg al día. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal al día, o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg al día. En algunos casos, una dosis única de anticuerpos varía entre 0,1-10.000 microgramos por kg de peso corporal. En algunos casos, las concentraciones de anticuerpo en un vehículo varían de 0,2 a 2000 microgramos por mililitro administrado. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique midiendo los niveles de anticuerpos en sangre en el sujeto.

En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpos en plasma, de 1-1000 mg/ml y en algunos métodos 25-300 mg/ml. Como alternativa, una formulación puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían según la semivida del anticuerpo en el sujeto.

En algunos casos, una cantidad eficaz de anticuerpo LR004 proporcionará un beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial al sujeto. La toxicidad del anticuerpo puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, *p. ej.,* determinando la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) o la DL_{100} (la dosis letal para el 100 % de la población). La relación de dosis entre efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación que no sea tóxico para uso en humanos. La dosificación del anticuerpo descrito en el presente documento se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación las puede elegir el médico individual en vista de la condición del sujeto. *Véase, p. ej.,* Fingl, *et al*., En: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Capítulo 1 (1975).

Dentro del alcance de la presente tecnología también hay kits que comprenden el anticuerpo LR004 para uso en el tratamiento de cánceres que expresan EGFR. El kit puede contener una formulación del anticuerpo adecuada para una vía de administración particular y opcionalmente un medio para administrar la formulación envasada en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para administrar el anticuerpo LR004.

El kit puede comprender una formulación de anticuerpo LR004 junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales o un marcador detectable.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las realizaciones preferentes de la presente tecnología. Estos ejemplos no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la tecnología actual, según se define por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1. Inhibición de la Fosforilación de EGFR

Los ensayos de fosforilación y el análisis ELISA posterior se realizaron utilizando la línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano y la línea celular FaDu de carcinoma hipofaríngeo. Las células fueron estimuladas con 750 ng/ml de TGF en presencia de diferentes concentraciones de LR004 o Erbitux® durante 1 hora en hielo. Después de la estimulación, las células se lavaron con PBS y se lisaron con tampón de lisis celular para su posterior análisis ELISA. La fosforilación de los receptores EGF EGFR\HER2\HER3 se determinó sondeando con un mAb pTyr-4G10 conjugado con HRP y se detectó mediante ELISA.

Los resultados de estos análisis *in vitro* demostraron que tanto LR004 como Erbitux® pudieron inhibir la fosforilación de EGFR en la misma medida en todas las concentraciones probadas en ambas líneas celulares tumorales A549 y FaDu (Figura 1).

Ejemplo 2. Citotoxicidad mediada por células dependiente de LR004

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo de acción importante de los anticuerpos monoclonales terapéuticos contra tumores. El objeto de este estudio fue determinar si LR004 y Erbitux® podrían mediar ADCC contra células tumorales *in vitro.*

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes sanos y se usaron como células efectoras. La línea celular de carcinoma hipofaríngeo, FaDu, se usó como células diana. Las células FaDu se colocaron en placas en formato de 96 pocillos a $5x10^3$ células/pocillo. Se añadió LR004 a diversas concentraciones (0,01-10.000 ng/ml) por triplicado a los pocillos individuales y se añadieron células efectoras a una proporción de efector: células diana de 30:1 y se incubó a 37 °C durante 4 horas, y ADCC se examinó usando el ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96.

Los resultados se muestran en la Figura 2. LR004 indujo una actividad ADCC significativa contra las células FaDu de carcinoma hipofaríngeo. En la proporción de efector: dianade 30:1 y concentración de LR004 de 100 ng/ml, ADCC alcanzó el mayor porcentaje de citotoxicidad antitumoral. Los porcentajes de actividades de ADCC por PBMC de donantes sanos fueron similares en respuesta a LR004 y Erbitux® en todas las concentraciones (0,01 - 10.000 ng/ml) examinadas tanto en la muestra de control de referencia LR004 (LR004-201307001) como en el volumen de la solución (LR004-034-201304002). Además, hubo una dependencia de la dosis en ADCC mediada por LR004 contra células tumorales FaDu, confirmando un mecanismo de acción antitumoral similar de LR004 y Erbitux®.

Los estudios farmacológicos primarios realizados con LR004 incluyen estudios de unión en un sistema libre de células con EGFR humano soluble y células que expresan EGFR, estudios de actividad antitumoral *in vitro* utilizando líneas celulares de cáncer EGFR-positivas, y actividad antitumoral *in vivo* en modelos de xenoinjerto de tumor humano EGFR-positivo.

Ejemplo 3. Especificidad de Unión a LR004 y Afinidad

A. Unión al receptor inmovilizado medido por ELISA

La especificidad de unión a LR004 se evaluó *in vitro* por ELISA. EGFR, HER2 y HER3 purificados fueron recubiertos en microplacas y después se bloquearon. El material de referencia LR004 (LR004-RS-201307001), tres lotes de solución en volumen de LR004 (LR004-034-201304002, LR004-034-201304004, LR004-034-201305005), así como Erbitux® y el control de anticuerpo no relacionado hIgG1, se diluyeron individualmente a 2000, 400, 80, 16, 3.2, 0,64 y 0,128 ng/mlL y se añadieron a pocillos que contenían los antígenos inmovilizados. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y se lavaron. La unión de LR004 o Erbitux® con antígenos inmovilizados se detectó con anticuerpo secundario marcado con HRP y sustrato TMB.

Como se muestra en la Figura 3, tanto LR004 como Erbitux® se unieron solo al antígeno EGFR, y no a los antígenos HER2 o HER3, sugiriendo una alta especificidad para la diana de EGFR prevista. LR004 exhibió una afinidad de unión casi idéntica por EGFR a la de Erbitux®.

B. Unión a EGFR soluble medido por BIAcore

La afinidad de unión de LR004 a sEGFR se determinó por resonancia de plasmones superficiales (SPR) y ELISA y se comparó con la de Erbitux®. En el ensayo SPR, LR004 o Erbitux® se inmovilizaron en un chip sensor de CM5 BIAcore, Las proteínas no reticuladas se eliminaron y los sitios sin reaccionar se bloquearon. La proteína sEGFR humana recombinante purificada a concentraciones de 8, 16, 32, 64 y 128 nM fluyó continuamente sobre la superficie del sensor. La superficie del chip entre series se regeneró con Glicina-HCl 10 mM (pH 2,5).

En el ELISA, sEGFR se inmovilizó nuevamente en los pocillos de la microplaca. LR004 o Erbitux® se diluyeron y se añadieron a los pocillos recubiertos con sEGFR. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, la placa se lavó. La unión de LR004 o Erbitux® a sEGFR inmovilizado se detectó con anticuerpos monoclonales Fc anti-humanos marcados con HRP y sustrato TMB. La densidad óptica (DO) de cada pocillo se determinó a una longitud de onda de 450 nm. Usando esta metodología, se presentan valores de Kd de 3,23 y 3,5 nM para LR004 y Erbitux®, respectivamente (Figura 4 y Tabla 4).

Usando resonancia de plasmones superficiales (SPR/BIAcore), se descubrió que sEGFR se unía al LR004 inmovilizado con un valor de Kd de 2,80 nM, similar al observado para la unión del Erbitux® (Kd = 3,88 nM) (véase Tabla 4 a continuación).

Tabla 4 Afinidades de unión de LR004 y Erbitux® a EGFR humano

Método	**Forma del receptor**	**LR004**	**Erbitux®**
		K_d (nM)	
SPR (BIAcore)	receptor soluble	2,80	3,88
		CE_{50} (ng/ml)	
ELISA	Receptor inmovilizado	3,23	3,50

C. Unión de los EGFR de superficie celular Medido por Citometría de Flujo

La unión de LR004 a los receptores de EGF de superficie celular se evaluó mediante citometría de flujo en nueve líneas celulares tumorales con diferentes niveles de expresión de EGFR. Como comparador para estos experimentos se usó Erbitux® disponible comercialmente. La concentración celular se ajustó a 2 x 10^6 células/ml y el ensayo de unión se realizó con 1 x 10^5 células. A las células se añadieron dos concentraciones diferentes (200 ng/ml y 1000 ng/ml) de LR004 o Erbitux® y se incubaron conjuntamente a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con IgG anti-humana de cabra conjugada con RPE a 4 °C. Las células se lavaron y resuspendieron en 250 ml de PBS para análisis de citometría de flujo. La media geométrica (media G) de la intensidad de fluorescencia se registró y se usó para el análisis de datos.

Como se muestra en la Figura 5, la unión de LR004 al receptor de EGF se detectó en nueve líneas celulares tumorales diferentes con niveles variables de expresión de EGFR, incluyendo la línea celular MKN28 de cáncer gástrico, línea celular A431 de carcinoma epidermoide, línea celular FaDu de carcinoma hipofaríngeo, línea celular COLO205 de adenocarcinoma colorrectal, línea celular AsPC-1 de adenocarcinoma de páncreas, líneas celulares HepG2 y 7402 de carcinoma hepatocelular, líneas celulares MDA-MB-468 y MCF-7 de carcinoma de mama. La unión más notable se observó en MDA-MB-468 células de carcinoma de mama y en la línea de carcinoma epidermoide A431. La actividad de unión de LR004 a EGFR fue similar a la de Erbitux® en todas las líneas celulares tumorales examinadas, sugiriendo que los dos anticuerpos pueden compartir el dominio de estructura similar en el sitio de unión de EGFR.

Posteriormente las líneas celulares MDA-MB-468, FaDu y A431 de alta expresión de EGFR se utilizaron como células diana para el estudio de unión a LR004. En los primeros experimentos, LR004 se marcó con FITC y se usó Erbitux® sin marcar como ligando de competición. En una segunda serie de experimentos, Erbitux® se marcó de manera similar con FITC y LR004 se usó como ligando de competición. En cada caso, las concentraciones celulares se ajustaron a 2 x 10^6 células/ml y los ensayos de unión se realizaron en 1 x 10^5 células. Se mezclaron volúmenes iguales de LR004 conjugado con FITC con diferentes concentraciones de Erbitux® o mAb de lgG1 humana (80, 16, 3.2, 0,64, 0,128 y 0 mg/ml) y se añadieron a las células diana de alta expresión de EGFR. Después de incubación durante 1 h en hielo, las células se lavaron con PBS frío que contenía BSA al 0,2 %. Las células se lavaron y resuspendieron en 250 ml de PBS para análisis de citometría de flujo.

Como se muestra en la Figura 6, se demostró que Erbitux® compite con LR004 por la unión a líneas celulares que expresan EGFR. La unión de LR004 al receptor de EGF de la superficie celular diana fue derogada por Erbitux® de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con dosis altas (20 mg/ml) bloqueó casi por completo la unión de LR004 conjugado con FITC. Por el contrario, los mAbs de control (lgG1 humana) no pudieron bloquear la unión de LR004 con los receptores de EGF, sugiriendo que LR004 puede reconocer el epítopo de unión a ligando similar de los receptores de EGF con Erbitux®. Los valores de CI_{50} calculados para la inhibición de la unión a LR004 por Erbitux® se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 Inhibición de LR004 marcado con FITC por Erbitux® en tres líneas celulares de cáncer

Estirpe celular	**CI_{20} (mg/ml)**	**CI_{50} (mg/ml)**	**CI_{80} (mg/ml)**

FaDu	0,04	0,12	0,40
A431	0,19	0,61	1,91
MDA-MB-468	0,17	0,44	1,15

Usando un enfoque diferente, MDA-MB-468 se seleccionó como la línea celular diana para la inhibición de la unión con Erbitux® marcado por LR004. Los ensayos de unión se realizaron en 1 x 10^5 células tumorales. Erbitux® conjugado con FITC se mezcló con diferentes concentraciones de LR004 o mAb de lgG1 humana (80, 16, 3,2, 0,64, 0,128 y 0 mg/ml) y se añadió a las células MDA-MB-468. Después de incubación durante 1 h en hielo, las células se lavaron con PBS frío que contenía BSA al 0,2 %. Las células se resuspendieron y analizaron por análisis de citometría de flujo.

Como se muestra en la Figura 7, se demostró que LR004 compite con Erbitux® por la unión de MDA-MB-468. La unión de Erbitux® a los receptores de EGF de la superficie celular diana fue derogada por LR004 de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con dosis altas (20 mg/ml) bloqueó casi por completo LR004 conjugado con FITC a los receptores. Por el contrario, los mAbs de control (lgG1 humana) no pudieron bloquear la unión de LR004 con los receptores de EGF. Los resultados en este estudio fueron comparables a los observados en los experimentos anteriores con LR004 marcado, sugiriendo que LR004 y Erbitux® reconocen el mismo epítopo de unión a ligando del receptor EGF.

Ejemplo 4. Actividad antitumoral *in vitro de LR004*

La actividad antitumoral de LR004 también se examinó directamente *in vitro.* Cuatro líneas celulares de cáncer humano, incluyendo células de cáncer de mama MDA-MB-468, células de cáncer de colon LoVo, células de carcinoma hipofaríngeo FaDu y células de carcinoma epidermoide A431, se probaron en este estudio.

En el primer estudio se utilizaron MDA-MB-468 y LoVo. Cada línea celular (5.000 células) se incubó durante la noche. El sobrenadante de cultivo de las líneas celulares tumorales se descartó y se añadieron diferentes concentraciones de LR004 o Erbitux®. Después de incubación durante 48 horas a 37 °C, se añadieron 20 ml de sustrato mixto CCK-8 a cada pocillo y se incubaron durante 3 horas a 37 °C. La DO450nm se determinó usando un lector de microplacas.

En otro experimento, FaDu y A431 (5.000 células) se incubaron con diferentes concentraciones de LR004 o Erbitux® en una placa de fondo plano de 96 pocillos por triplicado. Después de incubación durante 96 horas a 37 °C, se añadió sustrato a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos en la oscuridad. Las RLU (unidades de quimioluminiscencia relativa) se determinaron utilizando un método de quimioluminiscencia. La relación de inhibición (RI) se calculó de la siguiente manera: RI (%) = [valor RLU de las células no tratadas - valor RLU de las células tratadas]/(valor RLU de las células no tratadas)

Los resultados se muestran en la Figura 8. MDA-MB-468 fue la línea celular más sensible a los anticuerpos en las cuatro líneas celulares seleccionadas y la reacción de A431 y FaDu fue más débil. Ambos anticuerpos pudieron inhibir la proliferación de cada célula en la misma medida, sugiriendo que LR004 tiene una actividad antitumoral *in vitro* similar contra Erbitux®.

Ejemplo 5. Actividad antitumoral *in vivo* de LR004

Para estudios de xenoinjerto tumoral humano con LR004 y Erbitux® se usaron ratones atímicos BALB/c. Un pequeño grupo de cinco ratones se usó para establecer ratones portadores de tumores. Aunque la línea celular GEO de cáncer de colon humano y la línea celular A549 de cáncer de pulmón humano se utilizaron para el desarrollo del modelo de xenoinjerto, aquí solo se presentan resultados con la línea GEO. Las células tumorales se inyectaron s.c. en el costado posterior derecho de ratones atímicos. Cuando los tumores habían alcanzado un volumen de 400-600 mm^3, se seleccionaron ratones portadores de tumor con tumor y estado de salud buenos. Los tumores se extrajeron y se cortaron en pequeños trozos de 2-3 mm3 de tamaño y se inocularon s.c. en el costado posterior derecho de los ratones atímicos. Cuando los volúmenes tumorales crecieron hasta 100-300 mm^3, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de dosis de control, baja, media y elevada de LR004 o Erbitux® a 10 ratones/grupo. Los ratones fueron dosificados i.v., dos veces por semana. Las dimensiones del tumor se midieron dos veces por semana con calibradores, y el peso del tumor se midió después de la eutanasia y la tasa de inhibición del peso del tumor se calculó para cada grupo. Los resultados se consideran negativos si la tasa fuera ≤ 60 % y positivos si fuera > 60 %.

Figura 10 muestra el efecto antitumoral *in vivo* de dosis elevadas (100-200 mg/kg de LR004) y 100 mg/kg de Erbitux® en xenoinjerto de carcinoma de colon humano GEO establecido. Los ratones fueron dosificados dos veces por semana durante tres semanas.

En el siguiente experimento, se realizó una respuesta a la dosis con LR004 y como control se usó nuevamente una dosis elevada de Erbitux®. En este experimento, los ratones recibieron inyecciones de 100 mg/kg/dosis de Erbitux® o 25, 50 o 100 mg/kg/dosis de LR004, dos veces por semana durante cuatro semanas. Cada grupo consistió en 8 ratones.

Los resultados se muestran en la Figura 10. LR004 y Erbitux® redujeron significativamente el volumen tumoral en ambos estudios. El segundo experimento se repitió nuevamente con resultados muy similares y supresión tumoral completa con todas las dosis de LR004 y Erbitux®. No hubo diferencias significativas entre los dos anticuerpos o entre las diferentes dosis de LR004 utilizadas en estos experimentos.

Ejemplo 6. Farmacodinámica de LR004

Además de estos estudios farmacológicos iniciales *in vitro* e *in vivo* completados, la eficacia de LR004 contra varios tipos de tumores diversos que expresan EGRF diferentes, incluyendo adenocarcinoma colorrectal SW948, carcinoma epidermoide A431 y líneas tumorales MDA-MB-468 de carcinoma de mama, se evaluará como se muestra en la Tabla 6 y la Tabla 7.

Tabla 6 Tipos de tumores que expresan EGFR evaluados en el modelo de xenoinjerto de ratón *In vivo*

• Cáncer de colon GEO	• Adenocarcinoma colorrectal SW948
• Carcinoma epidermoide A431	• Carcinoma de mama MDA-MB-468

Los estudios con líneas tumorales GEO, SW948 y A4331 se realizarán en ratones atímicos BALB/c y (los tumores MDA-MB-468 se evaluarán en ratones NOD SCID). Inicialmente se desarrollarán tumores sólidos *in vivo* en pequeños grupos de ratones atímicos BALB/c. Cuando los tumores crecen hasta 400-600 mm^3, los tumores se extirparán y cortarán en pequeños trozos de 2-3 mm^3, y se inocularán s.c. en grupos de ratones pequeños. Cuando los tumores crecen hasta 100-300 mm^3, los ratones se clasificarán aleatoriamente y los ratones serán dosificados i.v. dos veces por semana durante 4 semanas con vehículo, Erbitux® (dosis TBD) o una dosis baja, media o elevada de LR004. Los ratones se observarán hasta 4 semanas después del implante de células tumorales y el volumen tumoral se medirá y calculará. El peso tumoral se medirá después del sacrificio terminal y la tasa o efecto de inhibición se calculará para cada grupo de tratamiento en relación con el control. Los resultados se considerarán negativos si la tasa es <60 %, y se considerarán positivos si es >60 %. A continuación, se presenta el diseño general de los estudios principales con estas líneas celulares.

Tabla 7 Estudios farmacodinámicos de xenoinjerto tumoral *In vivo* con LR004

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen de tratamiento	Numero de machos
1	Vehículo	0	Dos veces a la semana durante 4 semanas	10
2	Erbitux®	TBD		10
3	LR004	TBD (bajo)		10
4	LR004	TBD (medio)		10
5	LR004	TBD (alto)		10

Cada estudio de 50 ratones con estos cuatro tipos de tumor se repetirá una vez para N = 2 para cada tipo de tumor. Antes de cada estudio principal con grupos de 10 machos, se realizará un estudio piloto más pequeño con LR004 y Erbitux® utilizando grupos de 5 ratones machos, y una dosis baja y elevada de LR004 y una dosis eficaz conocida de Erbitux®. Los resultados de estos estudios de eficacia definitivos se utilizarán para determinar el intervalo de dosis para estudios posteriores de seguridad de dosis repetidas de LR004.

Ejemplo 7: Farmacología

A. Farmacocinética de LR004 en monos Cinomolgos

Un estudio farmacocinético (PK) piloto se realizó en pequeños grupos de monos Cinomolgos machos como se muestra en la Tabla 8. Dos monos macho fueron dosificados con 18 mg/kg de LR004 como una infusión IV de 1 hora. Un segundo grupo de dos monos se dosificó de manera similar con 18 mg/kg de Erbitux® como se describe a continuación en la Tabla 8. Las muestras de sangre se recogieron en los momentos indicados hasta 24 días (577 h) después de la dosis, y las muestras de suero se prepararon y analizaron para determinar la concentración de LR004 o Erbitux® mediante un ELISA validado como se describió anteriormente.

Tabla 8 Estudio farmacocinético piloto de LR004 y Erbitux® en monos

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg)	Administración de Dosis	Puntos temporales de muestreo de sangre (h)	Numero de machos
1	LR004	18,0	Infusión IV durante 60 minutos	Predosis, 0,33, 0,67, 1, 2, 3, 5, 9, 13, 25, 49, 97, 145, 193, 241, 289, 337, 385, 433, 481, 529, 577	2
2	Erbitux®	18,0			2

La cinética de LR004 y Erbitux® fue casi idéntica después de la infusión IV de dosis única a 18 mg/ml en monos Cinomolgos macho. Los valores de $C_{máx}$ variaron entre 403-423 para Erbitux® y LR004, respectivamente, con una $T_{máx}$ de 1 h correspondiendo al final de la infusión de 1 h. Las exposiciones, según lo evaluado por los niveles de AUC

fueron prácticamente idénticas (30-32 mg h/l). Los valores de semivida también fueron muy similares y fueron de 133-137 h para Erbitux® y LR004, respectivamente. Como se muestra en la Figura 11 y la Tabla 9, LR004 exhibió una cinética coherente con las ya establecidas para el producto comercializado Erbitux®.

Tabla 9 Parámetros farmacocinéticos de LR004 y Erbitux® después de 1 h IV Infusión

Parámetro	Erbitux®	LR004
$C_{máx}$(ng·ml^{-1})	403,24	423,82
$T_{máx}$ (h)	1,00	1,00
$AUC_{(0-\infty)}$ (mg·h·l^{-1})	30,45	31,91
MRT[a] (h)	126,50	123,97
CL (ml·h^{-1}·kg^{-1})	0,64	0,56
Vd (ml·kg^{-1})	121,11	109,97
$t_{1/2}$ (h)	133,14	137,08
[a] MRT: Tiempo medio de permanencia (horas)		

B. Farmacocinética de LR004 en monos con dosificación IV única y repetida

Grupos de seis monos Cinomolgos por sexo se trataron con una dosis única de 18 mg/kg de Erbitux® o dosis IV repetidas de Erbitux® los días 1, 21, 28 y 35, o dosis únicas de LR004 de 6, 18 o 54 mg/kg o dosis IV repetidas de 18 mg/kg de LR004 los días 1, 21 y 35 como se muestra en la Tabla 10. Se recogieron muestras de sangre y se prepararon muestras de suero de cada animal antes de la dosificación y a las 0,33, 0,67 1, 2, 3, 5, 9, 13, 25, 49, 97, 145, 193, 241 horas (10 días) para monos dosificados a 6 mg/kg, hasta 18 días después de la dosificación con 18 mg/kg, hasta 28 días para dosificación a 54 mg/ kg. Para los monos dosificados repetidamente con LR004 o Erbitux® a 18 mg/kg, se recogieron muestras de sangre durante un máximo de 22 días (529 horas) después de la dosis final el día 35, como se presenta en la Tabla 10. Las muestras de suero se analizaron para determinar las concentraciones de LR004 o Erbitux® utilizando un método ELISA validado.

Tabla 10 Diseño del estudio PK/TK de dosis IV única y repetida de LR004 y Erbitux® en **Monos Cinomolgos**

Grupo	Tratamiento	Nivel de Dosis (mg/kg)	Régimen de Dosis	Puntos temporales de extracción de sangre (h) (después de dosis final)	Número de monos por sexo
1	Erbitux®	18	Dosis única	0-432 h	3
2	Erbitux®	18	Días 1, 21, 28, 35	0-529 h	3
3	LR004	6	Dosis única	0-240 h	3
4	LR004	18	Dosis única	0-432 h	3
5	LR004	18	Días 1, 21, 28, 35	0-529 h	3
6	LR004	54	Dosis única	0-672 h	3

Después de la administración de la dosis única IV de LR004 a monos Cinomolgos machos y hembras a 6, 18 o 54 mg/kg, se observó una exposición sérica dependiente de la dosis y una cinética sérica de primer orden para este anticuerpo (Figura 12). La concentración sérica máxima ($C_{máx}$) varió entre 148 mg/ml y 992 mg/ml para los niveles de dosis de 6 y 54 mg/kg, respectivamente. El $T_{máx}$ observado fue de aproximadamente 1 hora en los tres niveles de dosis, y la semivida de LR004 determinada en este experimento aumentó con la dosis y varió de 51 h a 6 mg/kg a 98 h a 18 mg/kg a 116 horas a 54 mg/kg (Tabla 11). La exposición general, según lo determinado por los valores de AUC fue, sin embargo, relativamente proporcional a la dosis y la eliminación fue relativamente coherente y varió de 0,7-0,8 ml/h kg. Estos parámetros observados para el nivel de dosis de 18 mg/kg fueron coherentes con los determinados para Erbitux® a este mismo nivel de dosis en monos Cinomolgos.

Tabla 11 Parámetros farmacocinéticos para administración de dosis única IV de LR004 a monos Cinomolgos

Parámetros	6 mg/kg		18 mg/kg		54 mg/kg	
	Media	DT[a]	Media	DT	Media	DT
$C_{máx}$(mg·ml^{-1})	148,27 6	25,31	352,71 6	40,4	992,196	42,7
$T_{máx}$(h)	1,006	0	1,00 6	0	1,176	0,41
$AUC_{(0-\infty)}$(mg·h·l^{-1})	7119,726	1362,6	25191,70 6	4574	72902,56 6	16371,12
b MRT(h)[b]	60,356	4,19	102,89 6	9,68	126,03 6	23,73
CL(ml·h^{-1}·kg^{-1})	0,856	0,17	0,71 6	0,12	0,786	0,22
Vd(ml·kg^{-1})	61,976	9,75	99,206	9,81	124,72 6	9,49
Parámetros	**6 mg/kg**		**18 mg/kg**		**54 mg/kg**	
$t_{1/2}$(h)	51,16 6	8,06	98,51 6	13,59	116,44 6	25,3
[a]DT: Desviación estándar [b]MRT: Tiempo medio de permanencia (horas)						

Con la administración repetida de LR004 y Erbitux® a 18 mg/kg (4 dosis los días 1, 21, 28 y 35), ambos anticuerpos mostraron una cinética coherente y no mostraron una acumulación significativa con el tiempo, a pesar de los niveles séricos máximos ligeramente más altos (para LR004) inmediatamente después de la dosis los días 21, 28 y 35 (Figura 13).

Estos niveles séricos no fueron apreciablemente diferentes de los observados después de la administración intravenosa de 18 mg/kg de Erbitux®. La comparación de la cinética de ambos compuestos después de la 1ª dosis mostró solo un volumen de distribución ligeramente superior (V_D) para LR004 en relación con Erbitux® y Cmáx y $AUC_{(0-\infty)}$ ligeramente inferiores. Sin embargo, hacia la 4ª dosis, $C_{máx}$ y los valores de AUC fueron comparables entre los dos productos, aunque LR004 mostró un V_D mucho más alto y una semivida más larga en comparación con Erbitux® después de la 4ª dosis. Los parámetros farmacocinéticos para la primera y la última (4ª) dosis de LR004 o Erbitux® en este estudio se presentan en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12 Parámetros PK para LR004 y Erbitux® para la Primera y Última (4ª) Dosis IV a 18 mg/kg en Monos Cinomolgos

Parámetros	Primera dosificación		Última (4ª) dosificación	
	LR004	Erbitux®	LR004	Erbitux®
$C_{máx}$(mg·ml^{-1})	352,71	455,21	428,00	435,09
$T_{máx}$ (h)	1,00	1,00	1,00	1,17
$AUC_{(0-\infty)}$(mg·h·l^{-1})	25191,70	29738,36	32636,20	28908,05
a MRT(h)	102,89	99,90	109,39	82,91
CL (ml·h^{-1}·kg^{-1})	0,71	0,60	0,74	0,74
Vd (ml·kg^{-1})	99,20	80,80	92,01	59,10
$t_{1/2}$ (h)	98,51	93,92	110,91	70,17
[a] MRT: Tiempo medio de permanencia (horas)				

Ejemplo 8: Estructura de carbohidratos de LR004 A. Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa

La hidrólisis ácida de LR004 y Erbitux® se realizó utilizando ácido acético al 11,5 % (v/v) y se incubó a 80 °C durante 60 minutos. Los patrones de ácido siálico se prepararon en H_2O Milli Q de una solución madre que contenía 0,619 mg/ml de NANA y 0,651 mg/ml de NGNA. Las reacciones de marcado de DMB (diclorhidrato de 4,5-metilendioxi-1,2-fenilendiamina) se realizaron por triplicado para cada muestra. Las reacciones de marcado se realizaron a 55 °C durante 3 h combinando 10 o 40 ml (0,3-0,6 mg, dependiendo de la concentración de proteína) de proteína hidrolizada con ácido con 200 ml de solución de marcado DMB (DMB 7 mM, ácido acético 1,4 M, beta-mercaptoetanol 0,75 M y ditionito sódico 18 mM). Las reacciones se interrumpieron con alícuotas de 50 ml en 1 ml de H_2O Milli Q y agitación vorticial. Dependiendo de la concentración proteica, se inyectaron 25-100 ml (3-9 ng) para el análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC).

RP-HPLC se realizó usando la columna de HPLC Xbridge, 3,0 mm x 100 mm, 3,5 mm con un filtro pre-columna de 0,5 mm. El detector de fluorescencia se configuró para excitación a 373 nm y emisión a 448 nm. La temperatura de la columna era de 30 °C, y el muestreador automático se ajustó a 4 °C. La fase móvil A era 7 % de metanol/93 % de H_2O MilliQ (v/v) y B era 7 % de metanol/50 % de acetonitrilo/43 % de H_2O MilliQ, y la velocidad de flujo fue de 0,4 ml/min con el gradiente que se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13 Gradiente de RP-HPLC para análisis de ácido siálico LR004

Tiempo (minutos)	% de B
0	9
3	9

(continuación)

Tiempo (minutos)	% de B
6	12
12	15
20	40
23	100
24	100
25	9
30	9

Los resultados se muestran en la Figura 14. Figura 14A muestra los picos estándar de NGNA y NANA que migran a menos de 6 y más de 6 minutos, respectivamente. Figura 14B muestra la migración del ácido siálico derivado de LR004 a más de 6 minutos, correspondiente a NANA. En cambio, el ácido siálico derivado de Erbitux® migra en menos de 6 minutos, correspondiente a NGNA.

B. Detección con ELISA de Neu5Gc (ácido N-glicolilneuramínico (NGNA))

Erbitux® y LR004 se diluyeron a 100 **m**g/ml y se añadieron a las placas de microtitulación a 2,5, 5,5 y 10 **m**g/pocillo. Las placas se revistieron durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con PBST y se bloquearon con 200 **m**l de PBST al 0,5 % a temperatura ambiente durante 1 h. Los pocillos se incubaron con control de isotipo de IgY anti-Neu5Gc o IgY de pollo a 1:1000 a temperatura ambiente durante 2 h, se lavaron cinco veces con PBST y se incubaron con IgY-Fc-HRP de burro anti-pollo a 1:1000 a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, Los pocillos se desarrollaron con un sustrato TMB y se interrumpieron añadiendo H_2SO_4 al 10 %. La absorbancia se midió a 450 nm.

Tabla 14 Niveles de Neu5Gc de LR004 y Erbitux® determinados por ELISA (DO450 nm)

Anticuerpo	Erbitux			LR004		
	10 mg	5 mg	2,5 mg	10 mg	5 mg	2,5 mg
IgY anti-Neu5Gc	1,538	1,460	1,376	0,442	0,398	0,426
IgY de control	0,824	0,772	0,697	0,738	0,654	0,679

Los resultados se muestran en la Tabla 14 y la Figura 15. Las muestras de Erbitux® mostraron niveles de Neu5Gc 1,87-1,97 veces mayores que los controles negativos. En cambio, LR004 mostró niveles de Neu5Gc comparables a los controles negativos.

Ejemplo 9: Termoestabilidad de LR004

La termoestabilidad de LR004 se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC). LR004 y Erbitux® se prepararon en tampón de formulación (NaCl 100 mM, glicina 100 mM, polisorbato 80 al 0,01 %, ácido cítrico 10 mM, pH 5,5) a una concentración de 5 mg/ml. La DSC se realizó en un SII Seiko -DSC utilizando protocolos convencionales. Todas las muestras se desgasificaron durante 5 minutos antes del análisis. La celda de referencia se cargó con el tampón de formulación. La muestra se calentó de 4 °C a 100 °C a una tasa de 60 °C/h.

Los resultados se muestran en la Figura 16. La Figura 16A muestra que LR004 tiene un punto de fusión de 88,84 °C. La Figura 16B muestra que Erbitux® tiene un punto de fusión de 85,28 °C. En consecuencia, LR004 tiene un mayor grado de termoestabilidad que Erbutix®.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo producido en una célula de ovario de hámster chino (CHO), en donde el anticuerpo comprende ácido N-acetilneuramínico (NANA) y carece de galactosa-α-1,3-galactosa, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos:

```
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
```

y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

```
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 Pro Lys Ser
    210                 215                 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
        275                 280                 285
```

```
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
    290                 295                 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305                 310                 315                 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
                325                 330                 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            340                 345                 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
        355                 360                 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    370                 375                 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            420                 425                 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Pro Gly Lys
    450
```

y en donde el anticuerpo comprende NANA en el sitio N-glicano Asn88 de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable, opcionalmente en donde el marcador detectable comprende un radionúclido o comprende una marca fluorescente.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se conjuga con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el uno o más agentes terapéuticos adicionales comprenden un agente quimioterapéutico y en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib.

5. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. La composición de la reivindicación 5, que comprende además un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo

que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib.

7. Una célula de ovario de hámster chino (CHO) que comprende ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de la reivindicación 1.

8. Una célula CHO según la reivindicación 7, en donde: (i) los ácidos nucleicos están presentes en un vector replicable separado del genoma de la célula CHO; o (ii) los ácidos nucleicos están integrados de manera estable en el genoma de la célula CHO.

9. Un método para producir un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada presentadas en la reivindicación 1, comprendiendo el método expresar el anticuerpo en una célula CHO según la reivindicación 7 u 8, y opcionalmente en donde el método comprende además aislar y purificar el anticuerpo y/o incorporar el anticuerpo en una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de la reivindicación 9, para uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite.

11. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 10, en donde el método comprende además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib.

12. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 10, en donde el anticuerpo se conjuga con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

13. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 12, en donde el uno o más agentes terapéuticos adicionales comprenden un agente quimioterapéutico y en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, un agente alterador de microtúbulos, un agente antiangiogénico, un anticuerpo terapéutico, un agente de direccionamiento a EGFR, un agente de direccionamiento a tirosina quinasa, un complejo de metal de transición, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito, un agente alquilante, un agente a base de platino, un antibiótico antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, un macrólido, un retinoide, geldanamicina o un derivado de la misma, adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, taxanos y derivados de los mismos, topetecán, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, piposulfán, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecán, HKP, ortataxel, gemcitabina, oxaliplatino, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, lapatinib, sorafenib, y erlotinib.

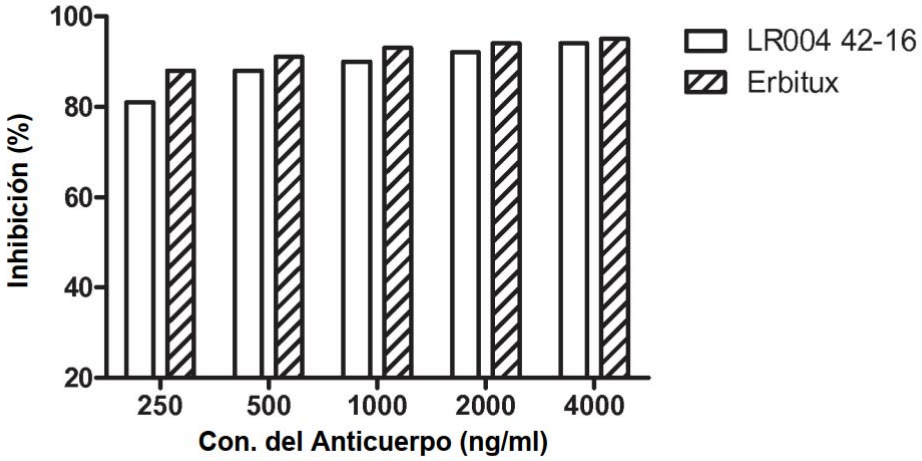
14. El anticuerpo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde:

(i) el sujeto tiene niveles elevados de IgE anti-cetuximab en comparación con una muestra de control negativo;
(ii) el sujeto tiene niveles elevados de IgE anti-galactosa-α-1,3-galactosa en comparación con una muestra de control negativo;o
(iii) el sujeto es hipersensible al cetuximab o está predispuesto a tener una reacción de hipersensibilidad al cetuximab.

15. El anticuerpo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde el método para tratar el cáncer comprende administrar el anticuerpo en un régimen de tratamiento de dosificación repetida.

FIG. 1

A) Inhibición de EGFR fosforilado en A549



B) Inhibición de EGFR fosforilado en FaDu

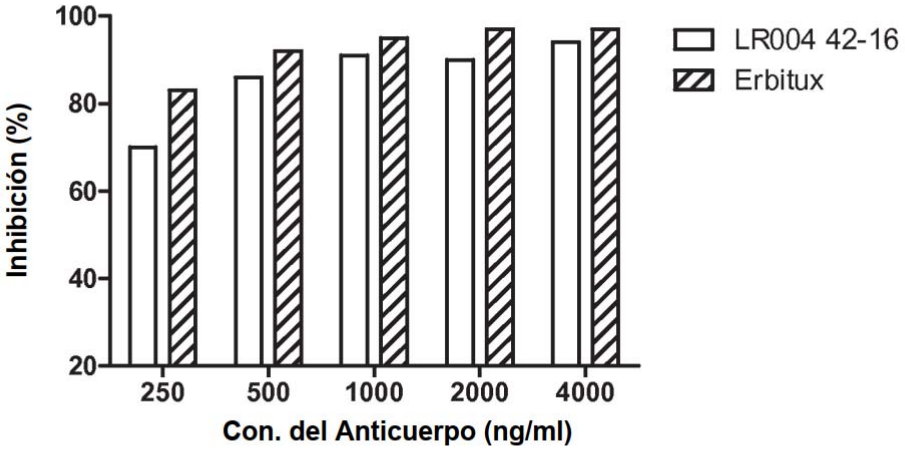


FIG. 2

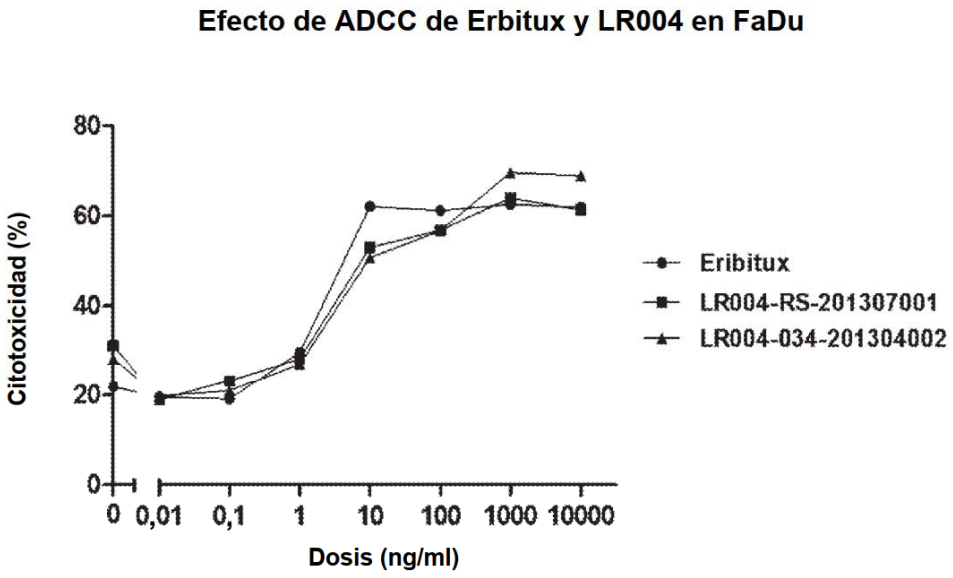

Efecto de ADCC de Erbitux y LR004 en FaDu
Citotoxicidad (%)
80
60
40
20
0
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
Dosis (ng/ml)
Eribitux
LR004-RS-201307001
LR004-034-201304002

FIG. 3

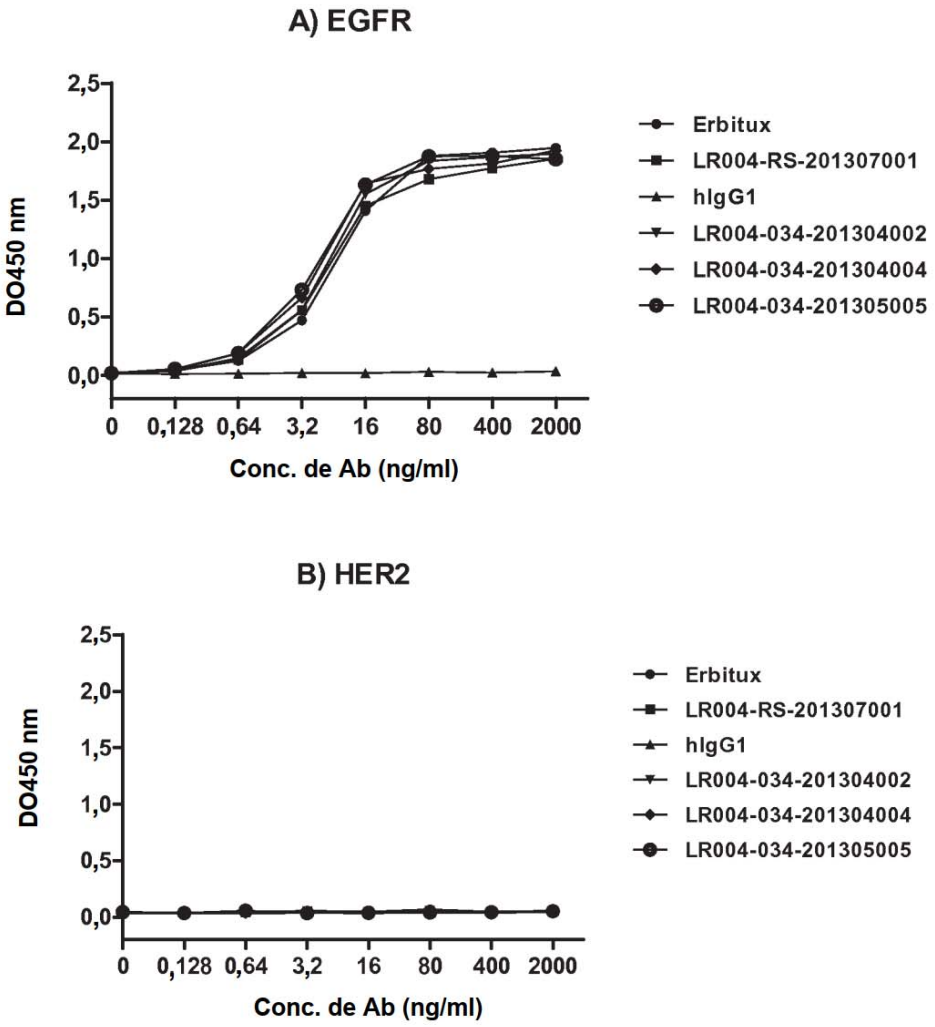

A) EGFR
DO450 nm
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
0,128
0,64
3,2
16
80
400
2000
Conc. de Ab (ng/ml)
Erbitux
LR004-RS-201307001
hIgG1
LR004-034-201304002
LR004-034-201304004
LR004-034-201305005
B) HER2
DO450 nm
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
0,128
0,64
3,2
16
80
400
2000
Conc. de Ab (ng/ml)
Erbitux
LR004-RS-201307001
hIgG1
LR004-034-201304002
LR004-034-201304004
LR004-034-201305005

FIG. 3 (cont.)

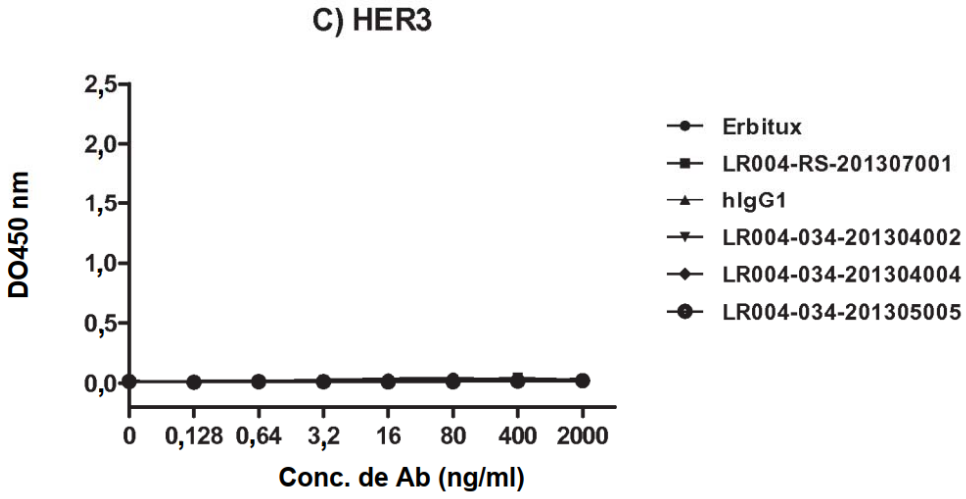

C) HER3
DO450 nm
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
0,128
0,64
3,2
16
80
400
2000
Conc. de Ab (ng/ml)
Erbitux
LR004-RS-201307001
hIgG1
LR004-034-201304002
LR004-034-201304004
LR004-034-201305005

FIG. 4

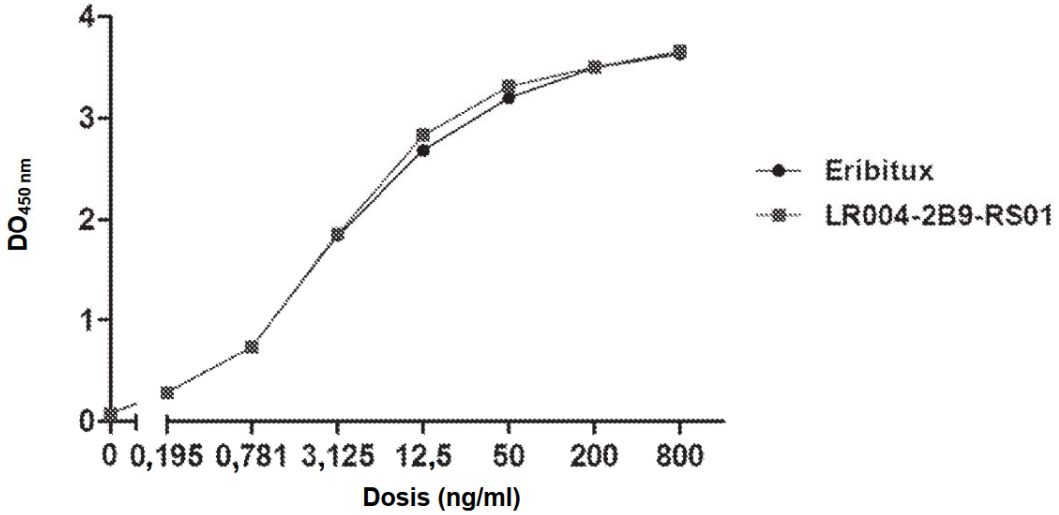

4
3
2
1
0
DO450 nm
0 0,195 0,781 3,125 12,5 50 200 800
Dosis (ng/ml)
Eribitux
LR004-2B9-RS01

FIG. 5

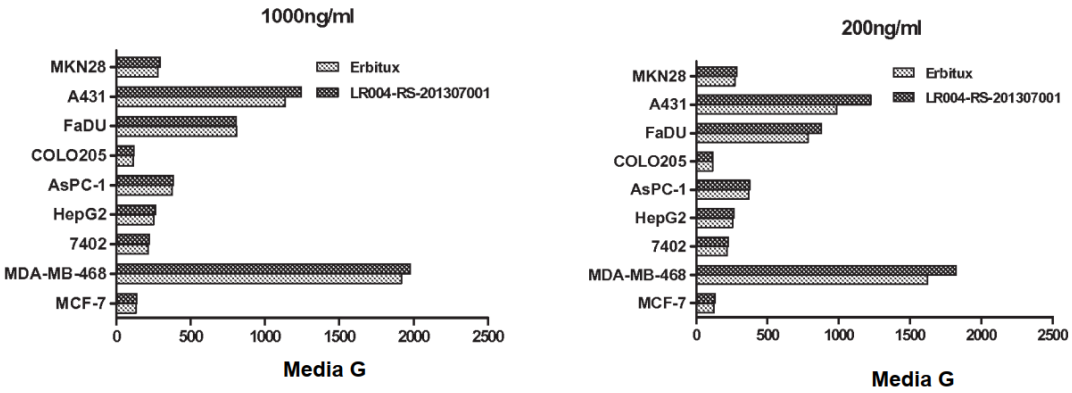

1000ng/ml
MKN28
A431
FaDU
COLO205
AsPC-1
HepG2
7402
MDA-MB-468
MCF-7
Erbitux
LR004-RS-201307001
0
500
1000
1500
2000
2500
Media G
200ng/ml
MKN28
A431
FaDU
COLO205
AsPC-1
HepG2
7402
MDA-MB-468
MCF-7
Erbitux
LR004-RS-201307001
0
500
1000
1500
2000
2500
Media G

FIG. 6

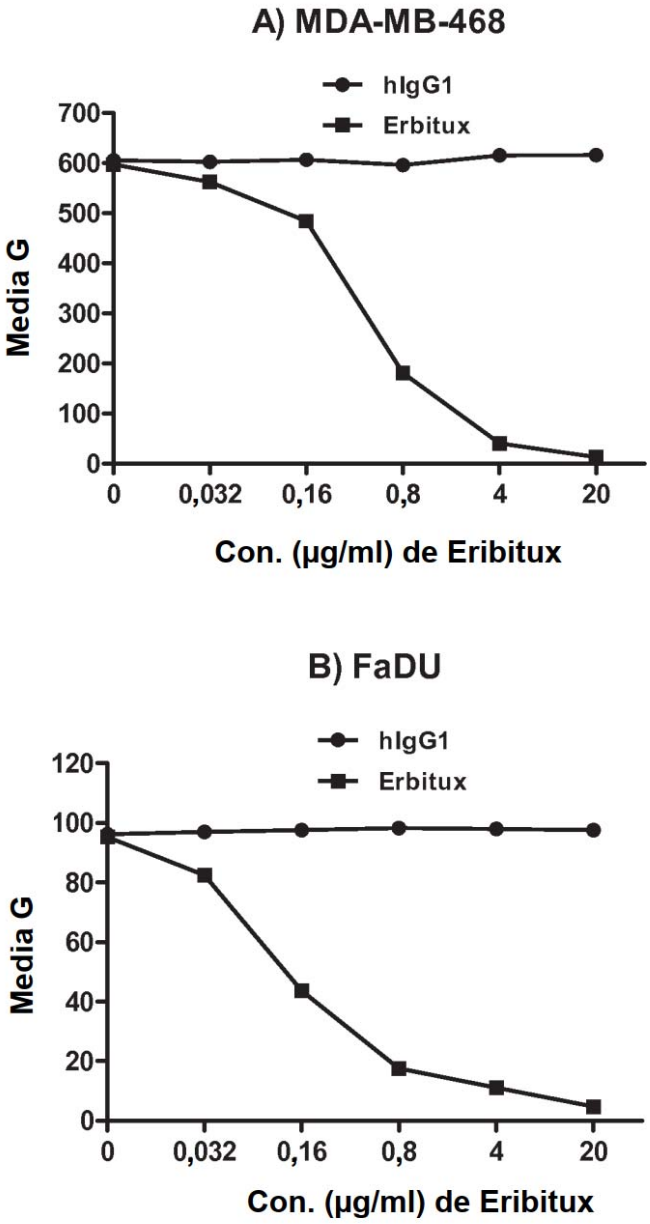

A) MDA-MB-468
hIgG1
Erbitux
Media G
700
600
500
400
300
200
100
0
0
0,032
0,16
0,8
4
20
Con. (µg/ml) de Eribitux
B) FaDU
hIgG1
Erbitux
Media G
120
100
80
60
40
20
0
0
0,032
0,16
0,8
4
20
Con. (µg/ml) de Eribitux

FIG. 6 (cont.)

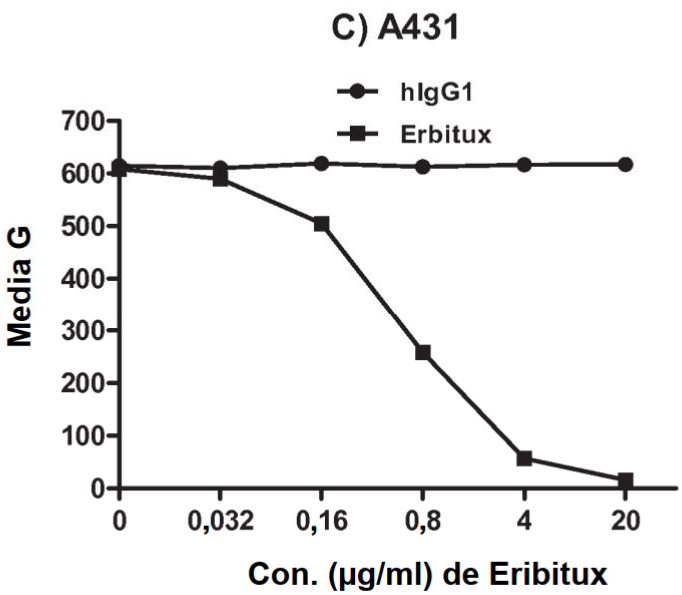

C) A431
hIgG1
Erbitux
Media G
700
600
500
400
300
200
100
0
0
0,032
0,16
0,8
4
20
Con. (µg/ml) de Eribitux

FIG. 7

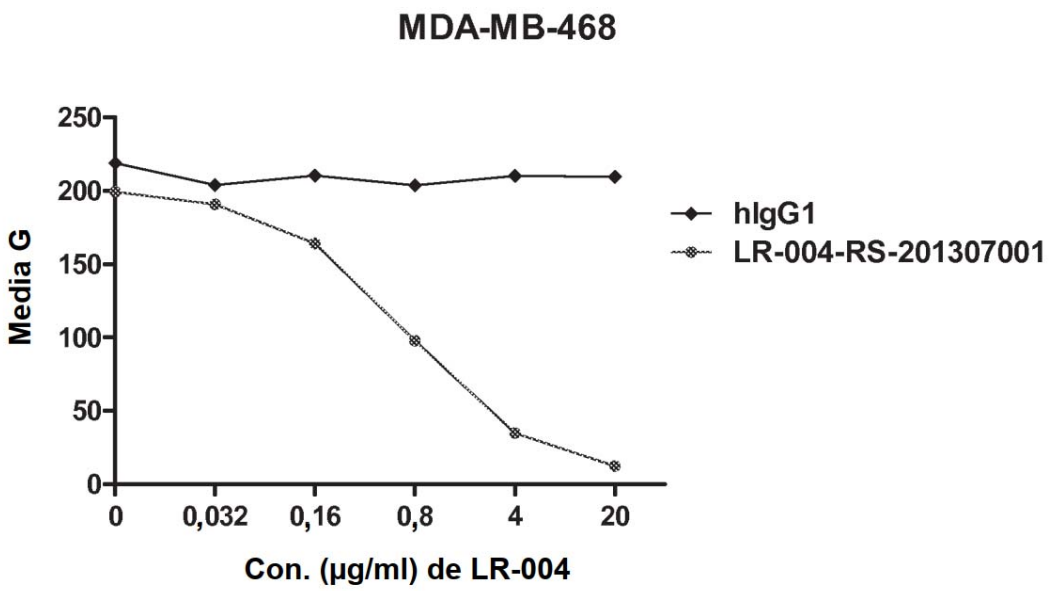

MDA-MB-468
Media G
250
200
150
100
50
0
0
0,032
0,16
0,8
4
20
Con. (µg/ml) de LR-004
hIgG1
LR-004-RS-201307001

FIG. 8

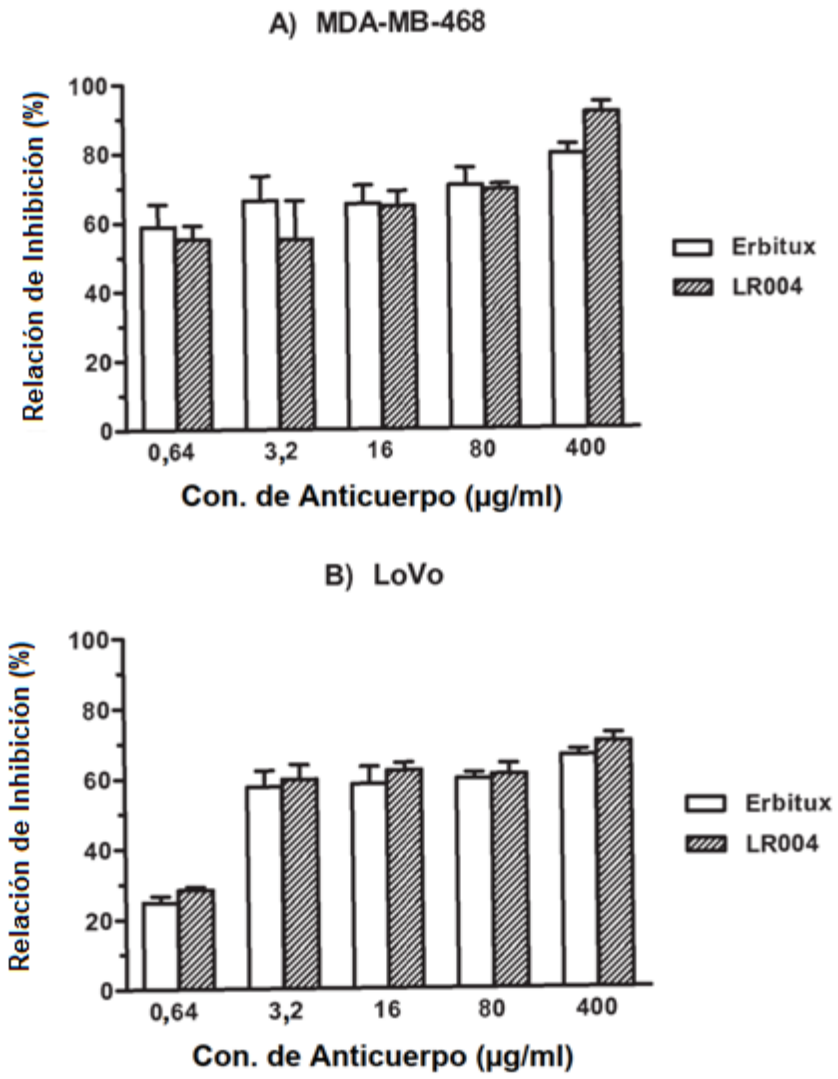
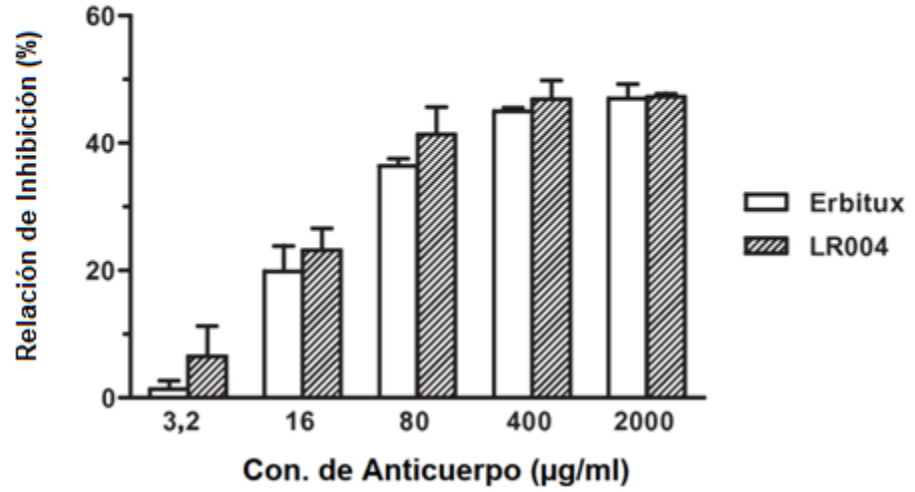

A) MDA-MB-468
Relación de Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
0,64
3,2
16
80
400
Con. de Anticuerpo (µg/ml)
Erbitux
LR004
B) LoVo
Relación de Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
0,64
3,2
16
80
400
Con. de Anticuerpo (µg/ml)
Erbitux
LR004

FIG. 8 (cont.)

C) FaDu



D) A431

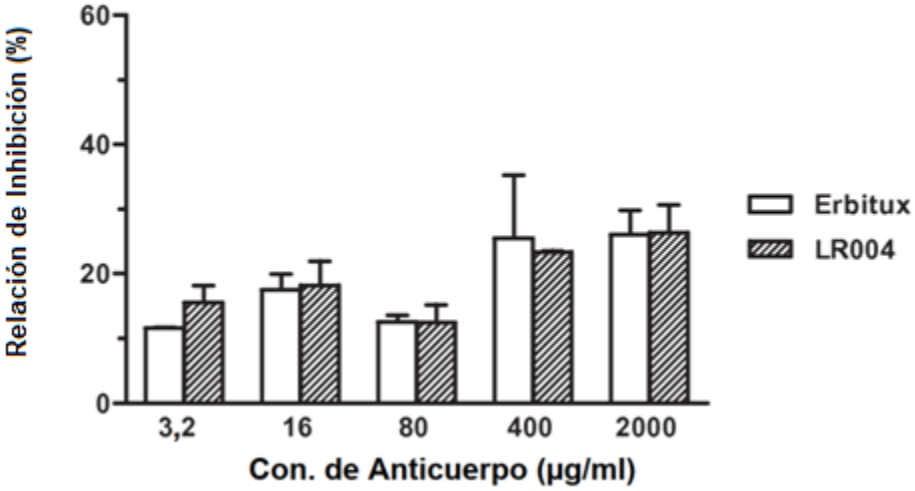


FIG. 9

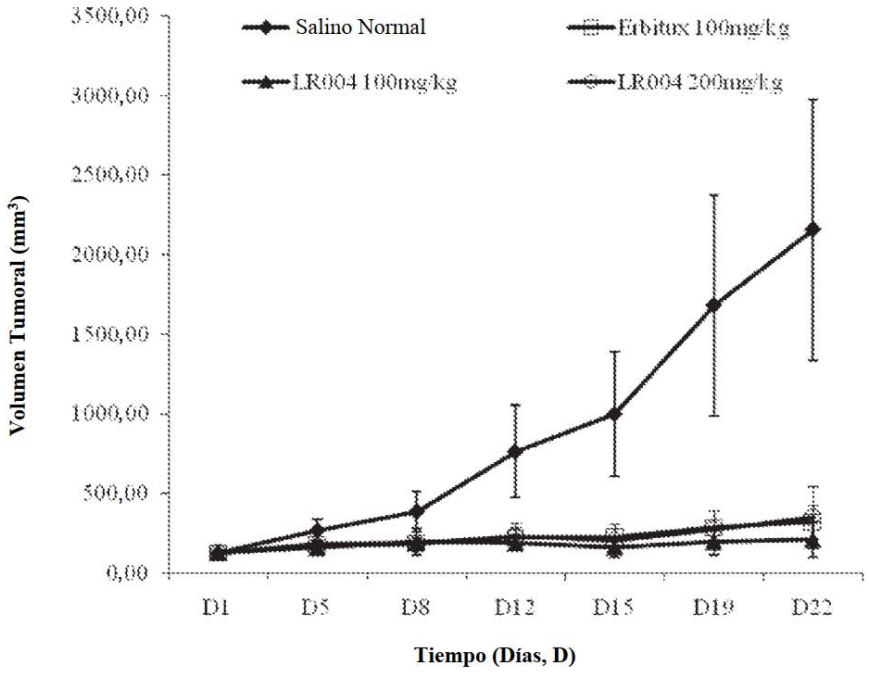

3500,00
3000,00
2500,00
2000,00
1500,00
1000,00
500,00
0,00
Volumen Tumoral (mm3)
Salino Normal
Erbitux 100mg/kg
LR004 100mg/kg
LR004 200mg/kg
D1
D5
D8
D12
D15
D19
D22
Tiempo (Días, D)

FIG. 10

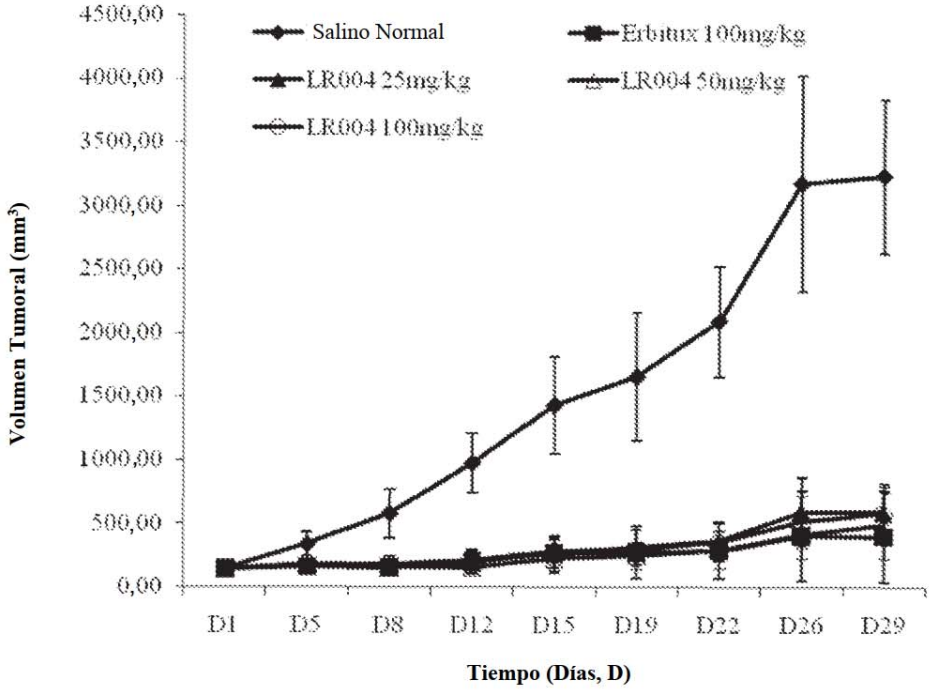

4500,00
4000,00
3500,00
3000,00
2500,00
2000,00
1500,00
1000,00
500,00
0,00
Volumen Tumoral (mm³)
Salino Normal
Erbitux 100mg/kg
LR004 25mg/kg
LR004 50mg/kg
LR004 100mg/kg
D1
D5
D8
D12
D15
D19
D22
D26
D29
Tiempo (Días, D)

FIG. 11

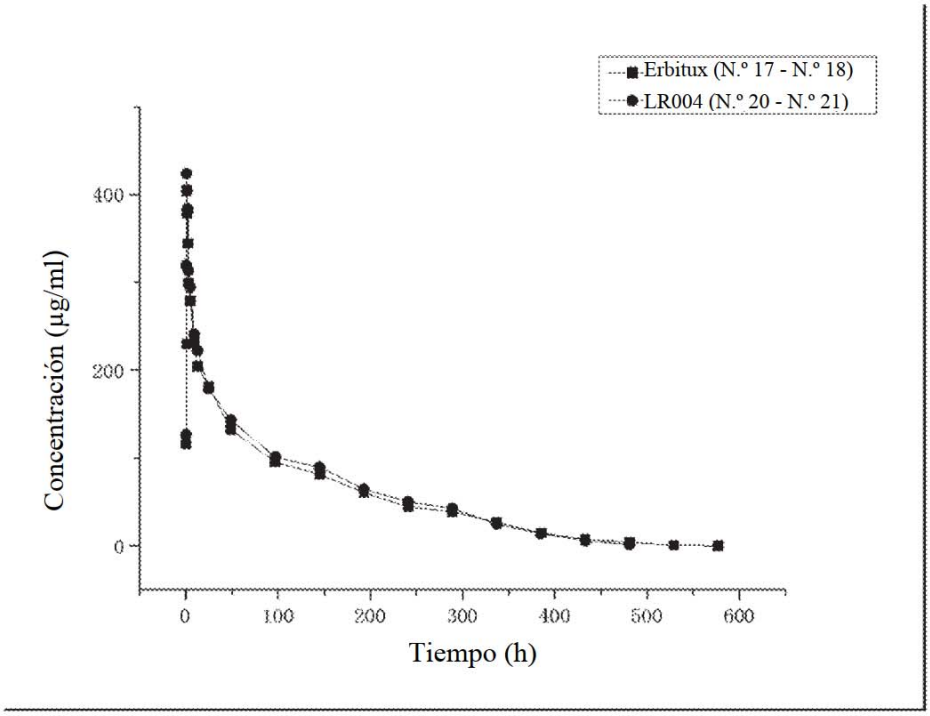

Erbitux (N.º 17 - N.º 18)
LR004 (N.º 20 - N.º 21)
Concentración (µg/ml)
400
200
0
0
100
200
300
400
500
600
Tiempo (h)

FIG. 12

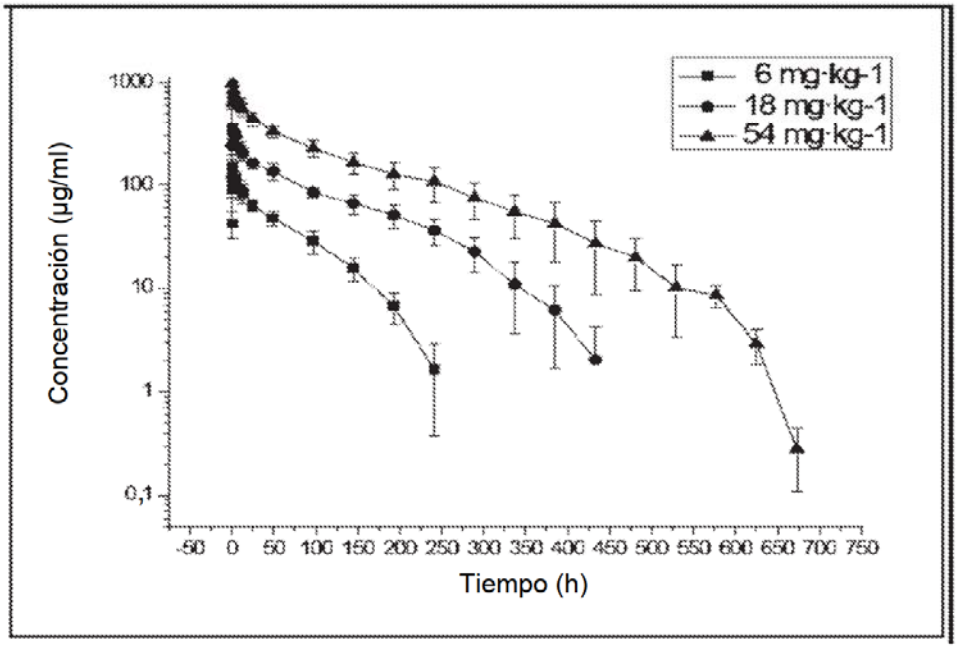
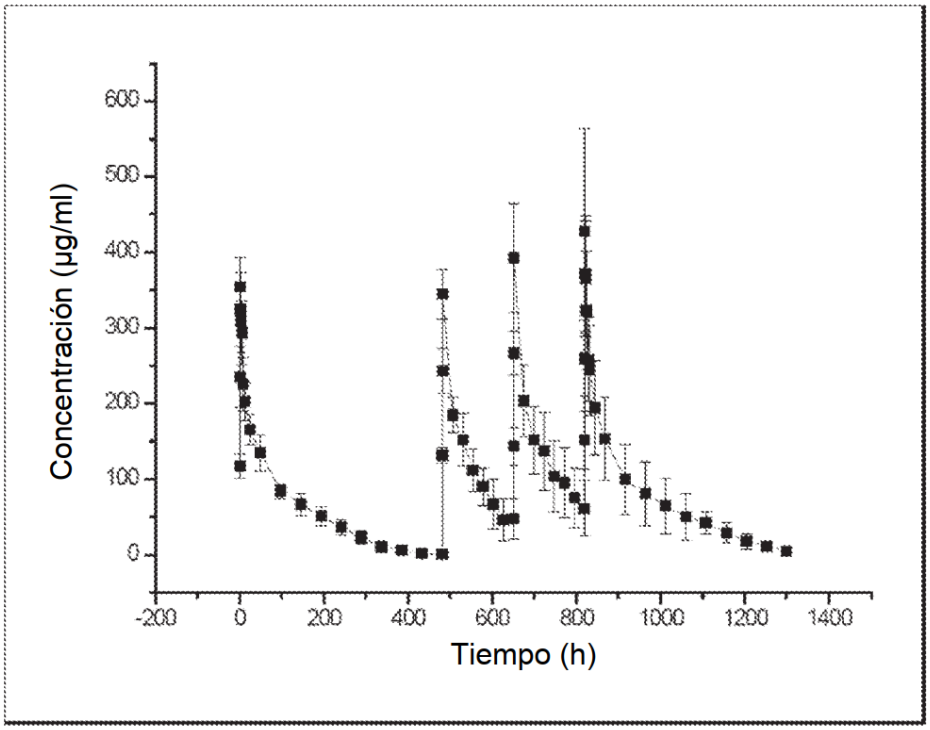

6 mg·kg-1
18 mg·kg-1
54 mg·kg-1
Concentración (µg/ml)
1000
100
10
1
0,1
-50 0 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750
Tiempo (h)

FIG. 13


Concentración (µg/ml)
600
500
400
300
200
100
0
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Tiempo (h)

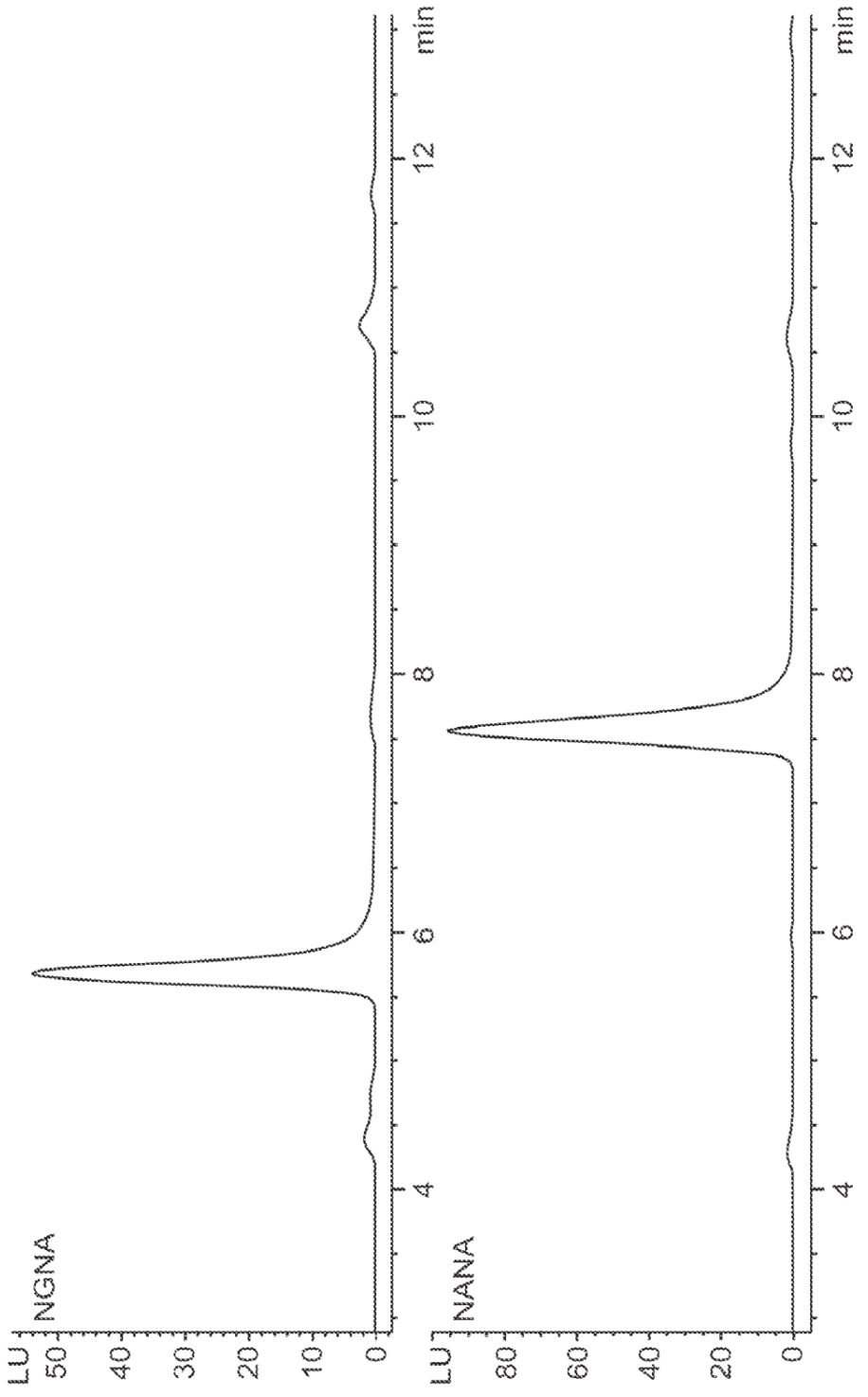

LU
NGNA
50
40
30
20
10
0
4
6
8
10
12
min
LU
NANA
80
60
40
20
0
4
6
8
10
12
min

FIG. 14A

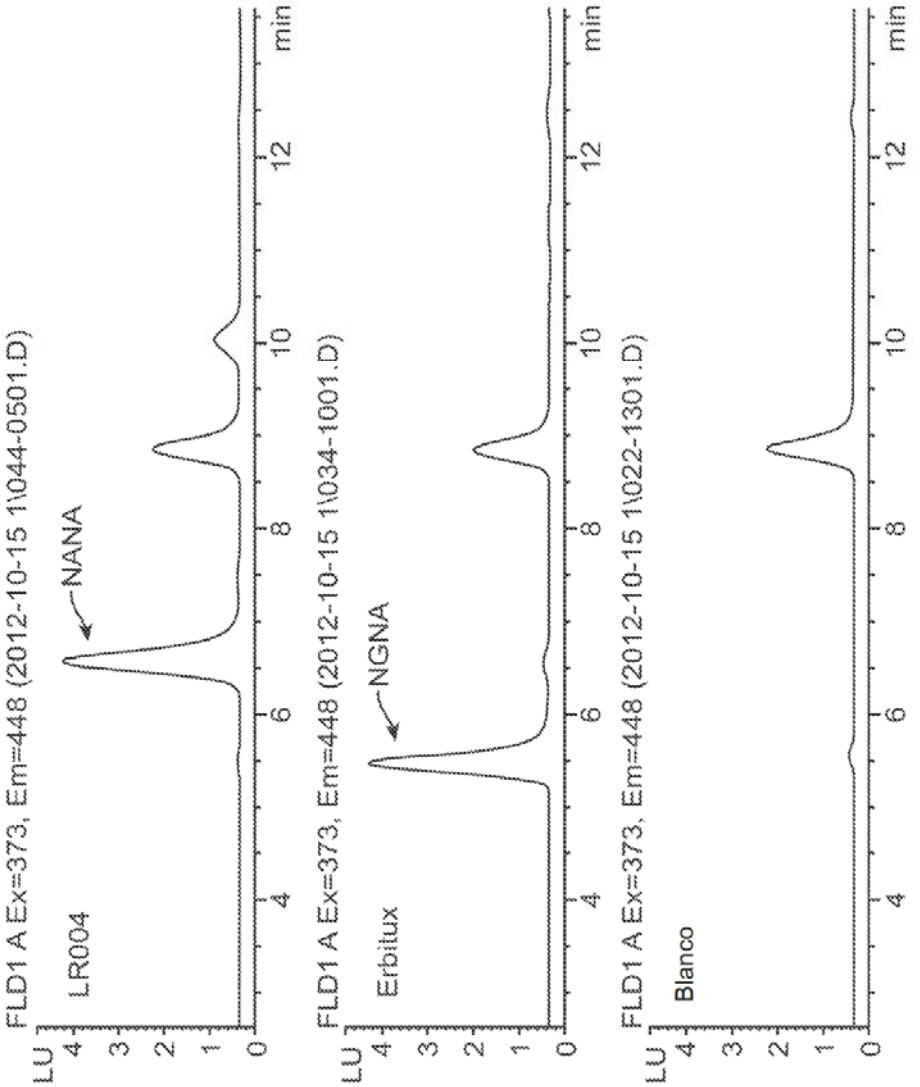
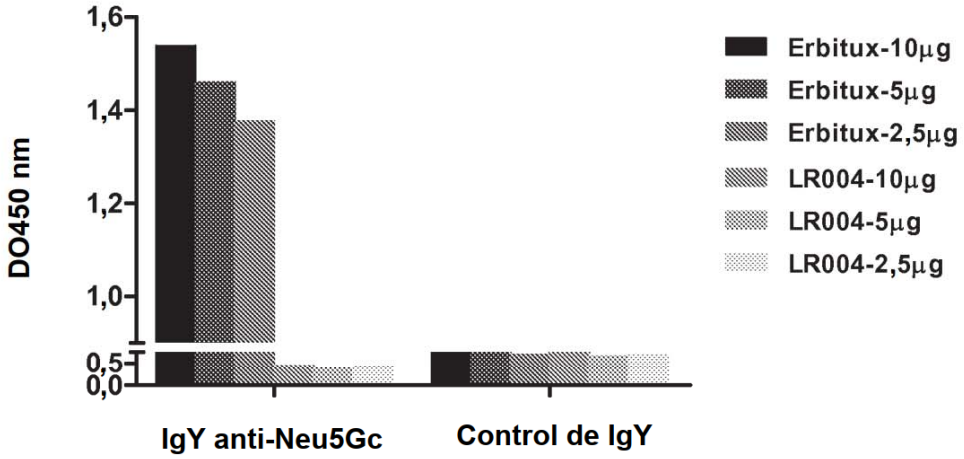

FLD1 A Ex=373, Em=448 (2012-10-15 1\044-0501.D)
LU
LR004
NANA
min
FLD1 A Ex=373, Em=448 (2012-10-15 1\034-1001.D)
LU
Erbitux
NGNA
min
FLD1 A Ex=373, Em=448 (2012-10-15 1\022-1301.D)
LU
Blanco
min

FIG. 14B

FIG. 15


DO450 nm
1,6
1,4
1,2
1,0
0,5
0,0
IgY anti-Neu5Gc
Control de IgY
Erbitux-10µg
Erbitux-5µg
Erbitux-2,5µg
LR004-10µg
LR004-5µg
LR004-2,5µg

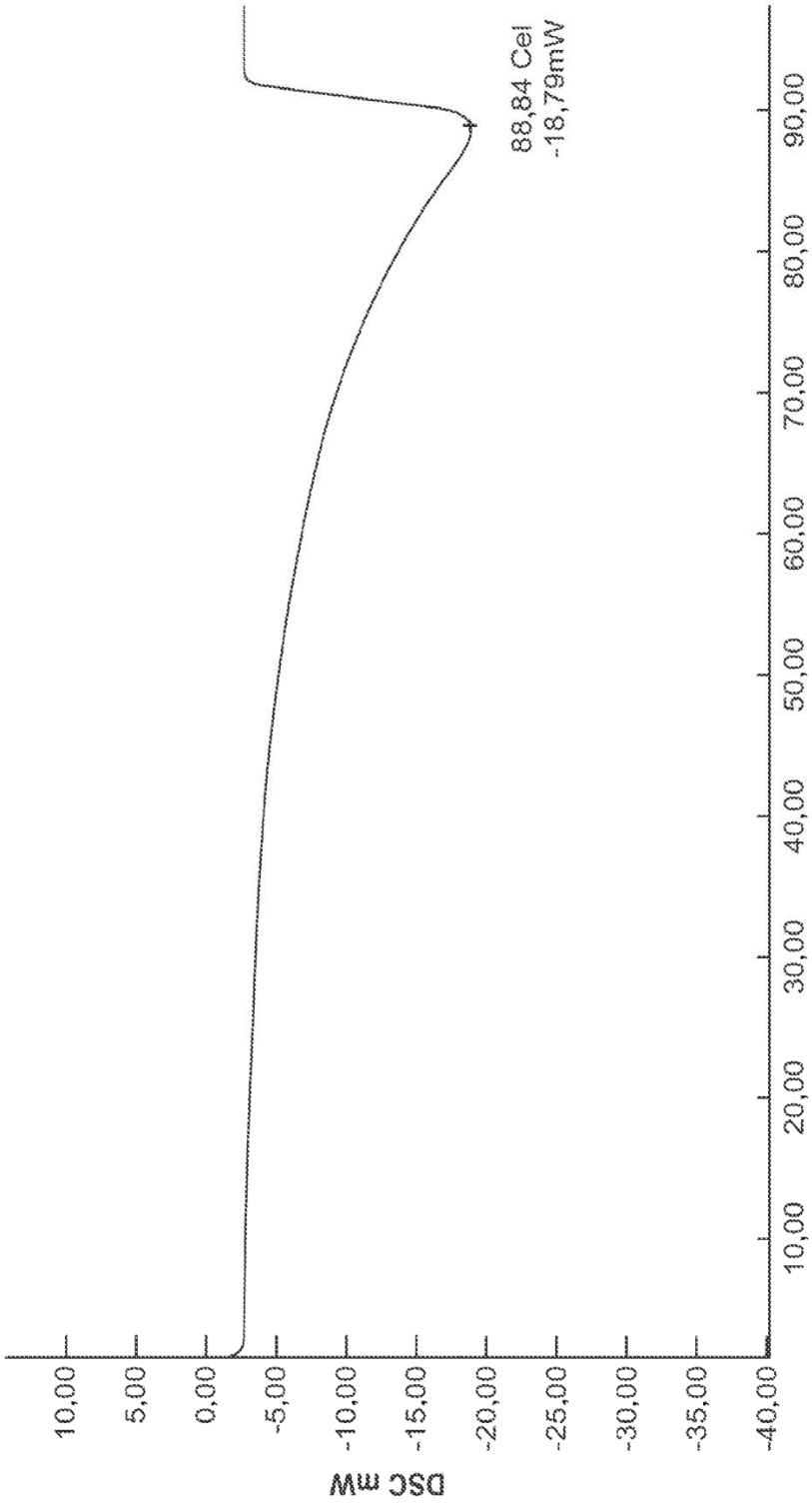

88,84 Cel
-18,79mW
DSC mW
10,00
5,00
0,00
-5,00
-10,00
-15,00
-20,00
-25,00
-30,00
-35,00
-40,00
10,00
20,00
30,00
40,00
50,00
60,00
70,00
80,00
90,00
Temp Cel

FIG. 16A

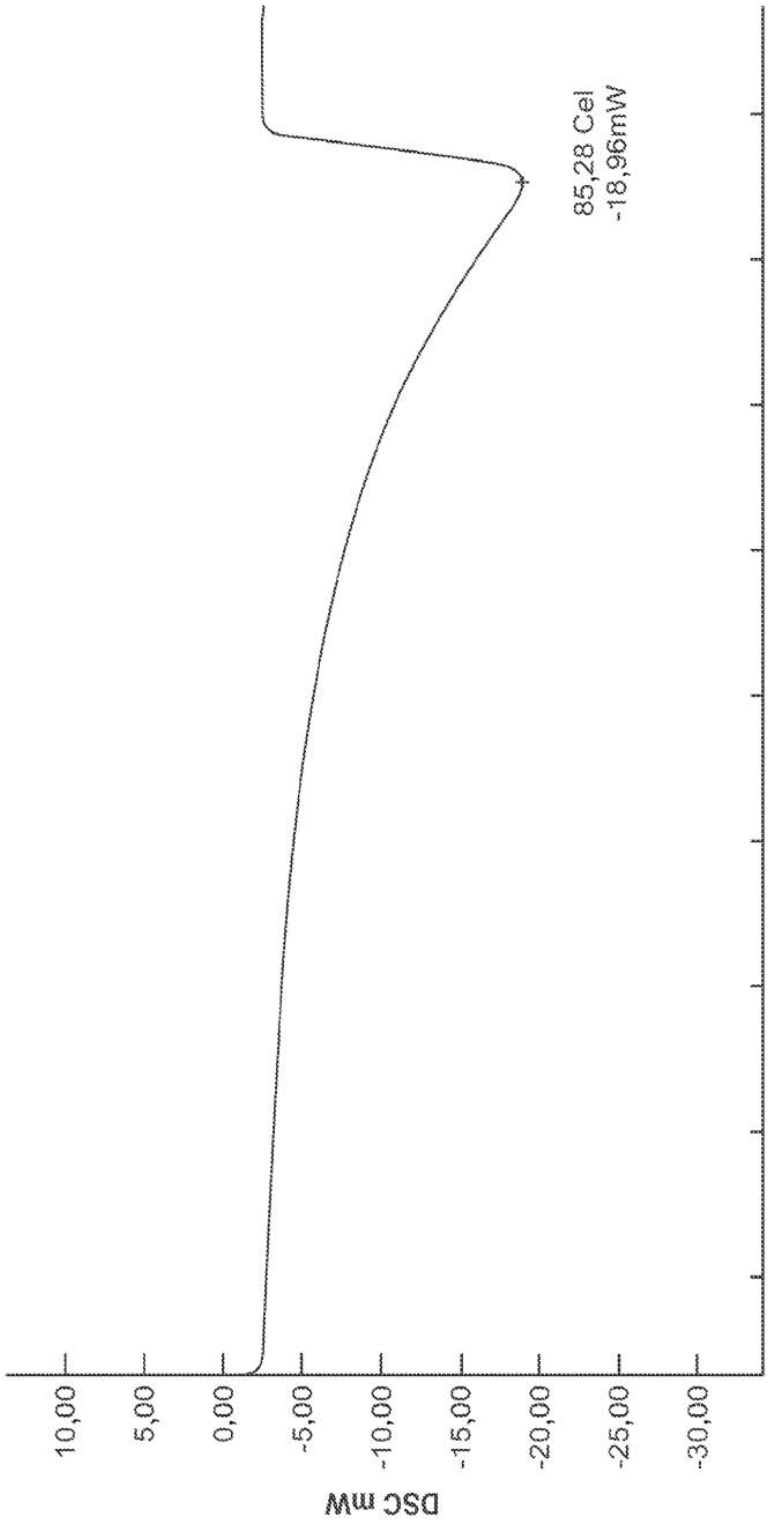

85,28 Cel
-18,96mW
DSC mW
10,00
5,00
0,00
-5,00
-10,00
-15,00
-20,00
-25,00
-30,00
10,00
20,00
30,00
40,00
50,00
60,00
70,00
80,00
90,00
Temp Cel

FIG. 16B