

BT

Organización CSA Ltda



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT
SOLICITUD

DVN
OK

PATENTE DE INVENCION

07-90225

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO "MOLECULAS DE UNION A ANTIGENO QUE SE ENLAZAN A EGFR, VECTORES QUE LAS CODIFICAN Y USOS DE LAS MISMAS"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/28

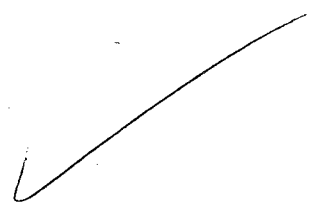
71. SOLICITANTE GLYCART BIOTECHNOLOGY AG

DOMICILIO Zurich, Suiza

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTA, D.C. 6 OCT 2007

(FORMA P 10)



PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-090225- -00000-0000

Fecha: 2007-09-03 16:20:05 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 367

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

07-Sep-2007

1

SOLICITUD DE:

- ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: **GLYCART BIOTECHNOLOGY AG**

Dirección: Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren
Zurich, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Zurich, Suiza.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

4

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **UMAÑA, Pablo y MÖSSNER, Ekkehard.**

Dirección: Freistrasse 159, CH-8032 Zurich y c/o Glycart Biotechnology Ag.
Wagistrasse 18 Schlieren, CH-8952 Zurich.

Nacionalidad o Domicilio: Suiza.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/000238

Fecha: 07/02/06

Publicación Internacional No. WO2006/082515 A3

Fecha: 10/08/06

6

Título (54) **MOLECULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE SE ENLAZAN A EGFR, VECTORES QUE LAS CODIFICAN Y USOS DE LAS MISMAS**

7

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

07-02-05

(31) Número de Solicitud

60/650,115

9

Comprobante de Pago No. 07-55,007

Fecha: 6 de Julio de 2007

10

LANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (resumen, descripción, listado de secuencias, reivindicaciones y dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Opinión escrita de la autoridad de la búsqueda internacional con su traducción.

11 FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA

C.C. 39.690.713 Usaquén

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 55,007
FECHA : JULIO 6 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-090225- -00000-0000

Fecha: 2007-09-03 16:20:05 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 367

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55092738	06/07/2007	4,820,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 03-09-07				(51) Int Cl: C07K 16/28 (71) Solicitante(s) GLYCART BIOTECHNOLOGY AG (72) Inventor(es) UMAÑA, Pablo y MÖSSNER, Ekkehard.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) País	(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
	60/650,115	07-02-05	US		
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-09-07 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 07-02-06 No. de solicitud PCT/IB2006/000238				(87) Publicación internacional Fecha: 10-08-2006 N° publicación: WO 2006/082515 A3	
(54) Título: MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE SE ENLAZAN A EGFR, VECTORES QUE LAS CODIFICAN Y USOS DE LAS MISMAS					

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un polinucleótido aislado que comprende

(a) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, y SEC ID NO:124; y

(b) a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, y SEC ID NO:126; y

(c) SEC ID NO:108.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 1975.043PC02	PARA FUTURAS ACCIONES ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/IB2006/000238	Fecha de registro internacional (dia/mes/año) 07/02/2006	Fecha de Prioridad (Primera) (dia/mes/año)

Solicitante
GLYCART BIOTECHNOLOGY AG

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 7 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó,

☐ la traducción de la solicitud internacional en _____, el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para el propósito de la búsqueda internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótido y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver casilla I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Recuadro II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Recuadro III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. la figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo sugirió la Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo sugirió la autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-

b. ☒ Ninguna de las figuras se publicara en el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.

PCT/IB2006/000238

Casilla No. I Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida(s) (continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
- ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
- ☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró.
- ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
- ☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/IB2006/000238

A. CLASIFICACION DE MATERIA
INV. C07K16/28

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

C07K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, Dato WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 2004/065540 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH]; UMANA PABLO [CH]; BRUENKER PETER [CH];) 5 de agosto de 2004 (2004-08-05) parágrafo [0001] parágrafo [0008] figura 23 parágrafo [0110] parágrafo [0113] parágrafo [0171] parágrafo [0210] parágrafo [0246] parágrafo [0268] parágrafo [0346] reivindicaciones 64, 246 ----- ---/---	1-244

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

° Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

16 de marzo de 2007

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

05/04/2007

Nombre y dirección de correo de ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Rankin, Robert

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/IB2006/000238

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 95/20045 A (CANCER RES INST ROYAL [GB]; DEAN CHRISTOPHER [GB]; MODJTAHEDI HELMOUT) 27 de julio de 1995 (1995-07-27) citado en la solicitud página 1, línea 13- página 2, línea 5 página 3, línea 36-línea 56 página 8, línea 32-línea 42 reivindicaciones; ejemplos	1-244
X	----- MODJTAHEDI H ET AL: "ENSAYO EN FASE I Y LOCALIZACIÓN DE TUMORES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-EGFR I CR62 EN CANCER DE CABEZA, CUELLO O PULMÓN" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 2, 1996, páginas 228-235, XP008036744 ISSN: 0007-0920 documento completo	1-244

INFORMACIÓN ADICIONAL QUE CONTINUA DE PCT/ISA/ 210

Continuación de la Casilla II.1

Aunque las reivindicaciones 100-110, 150, 200-217, 242, 243 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano, la búsqueda ha sido llevada a cabo y se basa en los supuestos efectos de la composición.

Aunque la reivindicación 111 está dirigida a un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano, la búsqueda se ha llevada a cabo y se basa en los supuestos efectos de la composición.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/IB2006/000238

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Ver INFORMACIÓN ADICIONAL hoja PCT/ISA/210

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones No.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla No. III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
información sobre miembros familias de patentes 31/12/2005

Solicitud Internacional No.
PCT/IB2006/000238

WO 2004065540	A	05-08-2004	AU	2004205802	A1	05-08-2004
			CA	2513797	A1	05-08-2004
			EP	1587921	A2	26-10-2005
			JP	2006516893	T	13-07-2006
			KR	20050095867	A	04-10-2005
			MX	PA05007781	A	30-09-2005
WO 9520045	A	27-07-1995	AU	691865	B2	28-05-1998
			AU	1460195	A	08-08-1995
			CA	2180834	A1	27-07-1995
			EP	0737251	A1	16-10-1996
			JP	9510605	T	28-10-1997

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 1975.043PC02	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2006/000238	International filing date (day/month/year) 07/02/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year)
Applicant GLYCART BIOTECHNOLOGY AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2006/000238

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in electronic form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/000238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/065540 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH]; UMANA PABLO [CH]; BRUENKER PETER [CH];) 5 August 2004 (2004-08-05) paragraph [0001] paragraph [0008] figure 23 paragraph [0110] paragraph [0113] paragraph [0171] paragraph [0210] paragraph [0246] paragraph [0268] paragraph [0346] claims 64,246 ----- -/--	1-244

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2007

Date of mailing of the international search report

05/04/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rankin, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/000238

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/20045 A (CANCER RES INST ROYAL [GB]; DEAN CHRISTOPHER [GB]; MODJTAHEDI HELMOUT) 27 July 1995 (1995-07-27) cited in the application page 1, line 13 - page 2, line 5 page 3, line 36 - line 56 page 8, line 32 - line 42 claims; examples	1-244
X	MODJTAHEDI H ET AL: "PHASE I TRIAL AND TUMOUR LOCALISATION OF THE ANTI-EGFR MONOCLONAL ANTIBODY ICR62 IN HEAD AND NECK OR LUNG CANCER" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 2, 1996, pages 228-235, XP008036744 ISSN: 0007-0920 the whole document	1-244

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 100-110, 150, 200-217, 242, 243 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

Although claim 111 is directed to a diagnostic method practised on the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2006/000238

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2006/000238

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004065540	A	05-08-2004	AU 2004205802 A1	05-08-2004
			CA 2513797 A1	05-08-2004
			EP 1587921 A2	26-10-2005
			JP 2006516893 T	13-07-2006
			KR 20050095867 A	04-10-2005
			MX PA05007781 A	30-09-2005
WO 9520045	A	27-07-1995	AU 691865 B2	28-05-1998
			AU 1460195 A	08-08-1995
			CA 2180834 A1	27-07-1995
			EP 0737251 A1	16-10-1996
			JP 9510605 T	28-10-1997

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

10 de Agosto de 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2006/082515 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/IB2006/000238

(22) Fecha de Registro Internacional: 7 de Febrero de 2006
(07.02.2006)

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación: INGLES

(30) Información de Prioridad:
60/650,115 7 de Febrero de 2005 (07.02.2005) US

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección nacional requerida): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección regional requerida): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiatica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaración bajo la Regla 4.17:

- en cuanto a la facultad del solicitante para aplicar y obtener una patente (Regla 4.17 (ii))
- en cuanto a la facultad del solicitante de reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17 (iii))

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de modificaciones.

(88) Fecha publicación del Reporte de Búsqueda Internacional:

14 de Junio de 2007

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE SE ENLAZAN A EGFR, VECTORES QUE LAS CODIFICAN Y USOS DE LAS MISMAS

(57) Resumen: La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes que incluyen anticuerpos quiméricos primatizados o humanizados específicos para EGFR humano. Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, que codifican dichas ABMs, y a los vectores y células hospederas que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico. La invención se refiere además a métodos para producir las ABMs de la invención, y a los métodos de uso de estas ABMs en el tratamiento de la enfermedad. Además, la presente invención se refiere a ABMs con glicosilación modificada que tiene propiedades terapéuticas mejoradas, que incluyen anticuerpos con unión al receptor Fc incrementado y función efectora incrementada.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 August 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/082515 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number:
PCT/IB2006/000238

(22) International Filing Date: 7 February 2006 (07.02.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/650,115 7 February 2005 (07.02.2005) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))

(71) Applicant (for all designated States except US): GLY-
CART BIOTECHNOLOGY AG [CH/CH]; Wagistrasse
18 Schlieren, CH-8952 Zurich (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): UMANA, Pablo
[CR/CH]; Freistrasse 159, CH-8032 Zurich (CH). MOSS-
NER, Ekkehard [DE/CH]; C/o Glycart Biotechnology
Ag, Wagistrasse 18 Schlieren, CH-8952 Zurich (CH).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,

(88) Date of publication of the international search report:
14 June 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTIGEN BINDING MOLECULES THAT BIND EGFR, VECTORS ENCODING SAME, AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to antigen binding molecules (ABMs). In particular embodiments, the present in-
vention relates to recombinant monoclonal antibodies, including chimeric, primatized or humanized antibodies specific for human
EGFR. In addition, the present invention relates to nucleic acid molecules encoding such ABMs, and vectors and host cells compris-
ing such nucleic acid molecules. The invention further relates to methods for producing the ABMs of the invention, and to methods
of using these ABMs in treatment of disease. In addition, the present invention relates to ABMs with modified glycosylation having
improved therapeutic properties, including antibodies with increased Fc receptor binding and increased effector function.

WO 2006/082515 A3

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente 1975.043PC02	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416																									
Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/00238	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 07.02.2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 07.02.2005																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. C07K16/00																										
Solicitante GlycART Biotechnology AG																										
1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>7</u> hojas, incluyendo esta carátula. 3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden: a. ☐ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de _____ hojas, como sigue: ☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) _____, que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).																										
4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table border="0"> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. I</td> <td>Bases del Reporte</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación.</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table>			☒	Casilla No. I	Bases del Reporte	☐	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación.	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases del Reporte																								
☐	Casilla No. II	Prioridad																								
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.																								
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																								
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación.																								
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																								
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Fecha de presentación de la demanda 2006-09-07	Fecha de terminación de este reporte 01.08.2007																									
Nombre y dirección de correo de la IPEA European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx. 523656 epmu d Fax. +49 89 2399-4465	Funcionario autorizado Rankin, Robert Teléfono No. +49 89 2399-0																									

Forma PCT/IPEA/409 (portada) (Abril 2005)

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD

Solicitud internacional No.
PCT/IB2006/000238

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte se basó en:

- ☒ La solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó.
- ☐ Una traducción de la solicitud internacional al, que es el lenguaje de una traducción entregada para propósitos de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3. y 23.1 (b)).
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4(a))
 - ☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 (a) y/o 55.3(a)).

2. Respecto a los elementos* de la solicitud internacional este Reporte se basó en (hojas reemplazadas que has sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):

Descripción, páginas

1-141 como se presentaron originalmente

Listado de secuencias parte de la descripción, páginas

1-46 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, números

1-244 como se presentaron originalmente

Dibujos, hojas

1/29-29/29 como se presentaron originalmente

☐ la listado de secuencia y/o alguna tabla(s) - Ver Casilla Suplementaria relacionada al Listado de Secuencia

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ listado de secuencia (especificar)
- ☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (especificar)

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la casilla suplementaria (regla 70.2©)..

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ secuencia que enumera (especificar)
- ☐ algunas tabla(s) relatando secuencia numerada (especificar)

*si el Item 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

Casilla No. III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las cuestiones de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (ser no obvia) o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas respecto a:

☐ toda la solicitud internacional

☒ las reivindicaciones Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (por razones de aplicabilidad industrial) y 1-243

(parcialmente)

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (por razones de aplicabilidad industrial) y 1-243 (parcialmente) se relaciona con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especificar*):

ver hoja adicional

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*).

☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (por razones de aplicabilidad industrial) y 1-243 (parcialmente)

☐ Una opinión no puede ser dada sin la lista de secuencias; el solicitante no lo hizo en el tiempo límite prescrito:

☐ Proporciona una lista de secuencias que cumpla con el estándar provisto por el anexo C de las instrucciones administrativas, y dicha lista no estaba disponible para la autoridad de búsqueda internacional en una forma o manera no aceptable para esto.

☐ Proporciona una lista de secuencias en forma electrónica que cumpla con el estándar provisto por el anexo C de las instrucciones administrativas y dicha lista no estaba disponible para la autoridad de búsqueda internacional en una forma o manera no aceptable para esto.

☐ Paga el costo por el requerimiento de una lista de secuencias en respuesta a la invitación bajo las reglas 13ter.1(a) o (b)

☐ Una opinión valida no puede ser formada sin las tablas relacionadas a la lista de secuencias; el solicitante no proporcionó, en el tiempo prescrito, dichas tablas en forma electrónica que cumple con los requerimientos provistos por el anexo C-bis de las instrucciones administrativas y dicha lista no estaba disponible para la autoridad de búsqueda internacional en una forma o manera no aceptable para esto.

☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver la hoja separada para más detalles

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si : Reivindicaciones	<u>1-244</u>
	No: Reivindicaciones	
Nivel Inventivo (IS)	Si : Reivindicaciones	
	No: Reivindicaciones	<u>1-244</u>
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si : Reivindicaciones	<u>1-99, 112-149, 151-199, 218-241, 244</u>
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada

Re Item III

No establecimiento de opinión respecto a novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial

Las reivindicaciones 100-111, 150, 200-217, 242, 243 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).

Comentarios respecto a claridad y materia objeto buscada y examinada

Al presente conjunto de reivindicaciones le falta precisión (Artículo 6 PCT). La contribución a la técnica, tal como está, no es considerada completamente aparente de un total de 244 reivindicaciones. Esto no es ayudado por el hecho de que hay 58 reivindicaciones independientes dentro de la solicitud, 16 de las cuales tratan con ácidos nucleicos y 13 de las cuales se refieren a péptidos o proteínas ligantes antígenas.

Debido al número excesivamente grande de reivindicaciones independientes y reivindicaciones en general, la ISA pudo haber rechazado llevar a cabo una búsqueda (ver Lineamientos del PCT, 9.30) y por consiguiente no se hubiese dado una opinión, pero para acelerar los procedimientos, se dará una opinión relacionada con la materia objeto que parece estar cubierta por las 244 reivindicaciones y la cual está sustentada por la descripción.

La búsqueda fue restringida a anticuerpos monoclonales contra EGFR. Se prestó atención en más detalle a los anticuerpos monoclonales humanizados contra este antígeno (por ejemplo el MAb ICR62) así como a otras características aparentes de las reivindicaciones y de la descripción, es decir, anticuerpos que tienen receptores Fc con actividad mejorada y/o patrones de glicosilación alterados. El examen se llevará a cabo en esta luz.

Re Item V

Afirmación razonada respecto a novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 100-111, 150, 200-217, 242, 243 sobre la pregunta de si son aplicables industrialmente, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones en cuanto al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo,

el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Documentos citados

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 2004/065540 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH]; UMANA PABLO [CH]; BRUENKER PETER [CH]; 5 de agosto de 2004 (2004-08-05)
- D2: WO 95/20045 A (CANCER RES INST ROYAL [GB]; DEAN CHRISTOPHER [GB]; MODJTAHEDI HELMOUT) 27 de julio de 1995 (1995-07-27) citado en la solicitud
- D3: MODJTAHEDI H ET AL: "ENSAYO EN FASE I Y LOCALIZACIÓN DE TUMORES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-EGFR I CR62 EN CANCER DE CABEZA, CUELLO O PULMÓN" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 2, 1996, páginas 228-235, XP008036744 ISSN: 0007-0920

Artículo 33(2) PCT

La materia objeto de las reivindicaciones 1-244 parece ser novedosa.

Artículo 33(3) PCT

La materia objeto de las reivindicaciones 1-244 no se considera inventiva.

Se considera que la técnica anterior más cercana es D1 que revela anticuerpos anti EGFR humanizados que tienen glicosilación del receptor Fc alterado que permite mayor actividad mediada por Fc.

El anticuerpo de D1 se deriva de C225 y es para usarse en terapia y diagnóstico (cf.).

La diferencia entre la reivindicación 1 y la materia objeto de D1 es que los ácidos nucleicos que codifican al anticuerpo de la reivindicación 1 codifican fragmentos del anticuerpo ICR62 de las ratas.

No hay ningún efecto técnico aparente que surja de la diferencia.

Por lo tanto, se considera que los problemas que hay que resolver son proporcionar un anticuerpo anti EGFR alterno para tratar la misma modificación que se revela en D1.

La materia objeto de la reivindicación 1 soluciona este problema pero no puede considerarse inventiva

puesto que el anticuerpo alterno proporcionado por la solicitud actual ya era bien conocido en la fecha de prioridad de la solicitud, ver por ejemplo los resúmenes de D2 y D3. Como tal, la persona versada hubiese visto la selección del anticuerpo ICR62 para la humanización y modificación del receptor Fc por ser una escogencia obvia. Las secuencias mencionadas en todas las reivindicaciones no parecen tener ningún efecto técnico sorprendente asociado con ellas y como tal, la materia objeto de la reivindicación 1 no puede considerarse inventiva (Artículo 33(3) PCT).

El mismo razonamiento aplica a las otras reivindicaciones independientes de la solicitud que tampoco se consideran inventivas.

Las reivindicaciones dependientes no contienen ninguna característica, que, en combinación con cualquiera de las reivindicaciones independientes, hiciera inventiva a una nueva reivindicación independiente.

Comentarios adicionales

Se previene al solicitante sobre la entrada en la fase regional; es probable que surjan objeciones relacionadas con la falta de unidad de invención. D1 muestra que los anticuerpos humanizados contra EGFR son conocidos y como resultado, las secuencias enumeradas en las reivindicaciones como se formularon actualmente no hubiesen tenido un concepto común novedoso que las uniera.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 1975.043PC02	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416	
International application No. PCT/IB2006/000238	International filing date (day/month/year) 07.02.2006	Priority date (day/month/year) 07.02.2005
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/00		
Applicant GlycArt Biotechnology AG		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 2006-09-07	Date of completion of this report 01.08.2007	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Rankin, Robert Telephone No. +49 89 2399-0 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2006/000238

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-141 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-46 as originally filed

Claims, Numbers

1-244 as originally filed

Drawings, Sheets

1/29-29/29 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2006/000238

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (for reasons of industrial applicability) and 1-243 (partially)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (for reasons of industrial applicability) and 1-243 (partially) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (for reasons of industrial applicability) and 1-243 (partially)
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b) and 13*ter*.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-244</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-244</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-99, 112-149, 151-199, 218-241, 244</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 100-111, 150, 200-217, 242, 243 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT)

Remarks regarding clarity and searched and examined subject matter

The present set of claims lacks conciseness (Article 6 PCT). The contribution to the art, such as it is, is not rendered completely apparent from the total of 244 claims. This is not aided by the fact that there are 58 independent claims within the application, 16 of which deal with nucleic acids and 13 of which refer to peptides or antigen binding proteins.

Due to the excessively large number of independent claims and claims in general, the ISA could have refused to carry out a search (see PCT Guidelines, 9.30) and consequently no opinion would have been given, but in order to expedite proceedings, an opinion will be given regarding subject matter which appears to be covered by the 244 claims and which is supported by the description.

The search was restricted to monoclonal antibodies against EGFR. Attention was paid in more detail to humanized monoclonal antibodies against this antigen (for example the MAb ICR62) as well as to other features apparent from the claims and description, namely antibodies which have Fc receptors with enhanced activity and/or altered glycosylation patterns. The examination shall be carried out in this light.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

For the assessment of the present claims 100-111, 150, 200-217, 242, 243 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist within the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however,

the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2004/065540 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH]; UMANA PABLO [CH]; BRUENKER PETER [CH];) 5 August 2004 (2004-08-05)
D2: WO 95/20045 A (CANCER RES INST ROYAL [GB]; DEAN CHRISTOPHER [GB]; MODJTAHEDI HELMOUT) 27 July 1995 (1995-07-27) cited in the application
D3: MODJTAHEDI H ET AL: "PHASE I TRIAL AND TUMOUR LOCALISATION OF THE ANTI-EGFR MONOCLONAL ANTIBODY ICR62 IN HEAD AND NECK OR LUNG CANCER" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 2, 1996, pages 228-235, XP008036744 ISSN: 0007-0920

Article 33(2) PCT

The subject matter of claims 1-244 appear to be novel.

Article 33(3) PCT

The subject matter of claims 1-244 is not considered inventive.

The closest prior art is considered to be D1 which discloses humanized anti EGFR antibodies having altered Fc receptor glycosylation allowing greater Fc mediated activity. The antibody of D1 is derived from C225 and is destined to be used in therapy and diagnosis (cf.).

The difference between claim 1 and the subject matter of D1 is that the antibody-encoding nucleic acids of claim 1 encode fragments of the rat antibody ICR62

There is no apparent technical effect arising from the difference.

The problems to be solved is therefore considered as being to provide an alternate anti EGFR antibody to be treated to the same modification as disclosed in D1

The subject matter of claim 1 solves this problem but cannot be considered inventive as

the alternate antibody provided by the current application was already well known at the priority date of the application, see for example the abstracts of D2 and D3. As such, the skilled person would have viewed the selection of antibody ICR62 for humanization and Fc receptor modification as being an obvious choice. The sequences mentioned throughout the claims do not appear to have any surprising technical effects associated with them and as such, the subject matter of claim 1 cannot be considered inventive (Article 33(3) PCT).

The same reasoning applies to the other independent claims of the application which are also not considered inventive.

The dependent claims do not contain any features, which, in combination with any of the independent claims, would render a new independent claim inventive.

Additional Comments

The applicant is forewarned upon entry into the regional phase, objections related to a lack of unity of invention are likely to arise. D1 shows that humanized antibodies against EGFR are known and as a result, the sequences listed in the claims as presently formulated would have no novel common concept linking them.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220		PCT OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)																									
		Fecha de correo (<i>día/mes/año</i>) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)																									
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación																									
Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/000238	Fecha de registro internacional (<i>día/mes/año</i>) 07.02.2006	Fecha de prioridad (<i>día/mes/año</i>) 07.02.2005																									
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. C07K16/28																											
Solicitante GLYCART BIOTECHNOLOGY AG																											
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table><tr><td>☒</td><td>Casilla No. I</td><td>Bases de la opinión</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. III</td><td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. IV</td><td>Falta de unidad de invención</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. V</td><td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VIII</td><td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td></tr></table> 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.				☒	Casilla No. I	Bases de la opinión	☒	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases de la opinión																									
☒	Casilla No. II	Prioridad																									
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																									
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																									
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación																									
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																									
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																									
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																									
Nombre y dirección de correo de la ISA European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465		Fecha de finalización de esta opinión ver forma PCT/ISA/210	Funcionario Autorizado Rankin, Robert Teléfono No.+49 89 2399-2659																								

Casilla No. I Bases de la opinión

1. Respecto al **idioma**, esta opinión se ha establecido con base en:
☒ La solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó
☐ Una traducción de la solicitud internacional al, que es el lenguaje de una traducción entregada para propósitos de la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
 - a. tipo de material:
☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:
☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:
☒ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ La validez de la prioridad reivindicada no se ha considerado porque la Autoridad de la Búsqueda Internacional no tiene en su poder una copia de la solicitud anterior cuya prioridad ha sido reivindicada o, donde se requerida, una traducción de la solicitud anterior. Esta opinión sin embargo se ha establecido sobre el supuesto de que la fecha relevante (Reglas 43bis.1 y 64.1) es la fecha de la prioridad reivindicada.
2. ☐ Se ha establecido esta opinión como si no se hubiese reivindicado ninguna prioridad debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de prioridad es inválida (Reglas 43bis.1 y 64.1). Por consiguiente, para los fines de esta opinión, se considera que la fecha de registro internacional indicada anteriormente es la fecha relevante.
3. Observaciones adicionales, si es necesario:

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (para razones de aplicabilidad industrial) y 1-243 (parcialmente)

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (para razones de aplicabilidad industrial) y 1-243 (parcialmente) se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa (*especificar*).

☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para la solicitud completa o para dichas reivindicaciones Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (para razones de aplicabilidad industrial) y 1-243 (parcialmente)

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:

☐ presentó una lista de secuencias en papel cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ presentó una lista de secuencias en formato electrónico cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ pagó los derechos de presentación tardía requeridos para la presentación de una lista de secuencias en respuesta a una invitación bajo las Reglas 13ter.1(a) o (b).

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no presentó dichas tablas en formato electrónico cumpliendo con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas, y dichas tablas no estaban disponibles a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ las tablas relacionadas con la lista de secuencias nucleótidas y/o amino ácidas, si están en formato electrónico únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver la Casilla Suplementaria para más detalles

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDA DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/IB2006/000238

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones	<u>1-244</u>
	No: Reivindicaciones	
Nivel inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones	
	No: Reivindicaciones	<u>1-244</u>
Aplicabilidad industrial (IA)	Si: Reivindicaciones	<u>1-99, 112-149, 151-199, 218-241, 244</u>
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Re Item III

No establecimiento de opinión respecto a novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial

Las reivindicaciones 100-111, 150, 200-217, 242, 243 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).

Comentarios respecto a claridad y materia objeto buscada y examinada

Al presente conjunto de reivindicaciones le falta precisión (Artículo 6 PCT). La contribución a la técnica, tal como está, no es considerada completamente aparente de un total de 244 reivindicaciones. Esto no es ayudado por el hecho de que hay 58 reivindicaciones independientes dentro de la solicitud, 16 de las cuales tratan con ácidos nucleicos y 13 de las cuales se refieren a péptidos o proteínas ligantes antígenas.

Debido al número excesivamente grande de reivindicaciones independientes y reivindicaciones en general, la ISA pudo haber rechazado llevar a cabo una búsqueda (ver Lineamientos del PCT, 9.30) y por consiguiente no se hubiese dado una opinión, pero para acelerar los procedimientos, se dará una opinión relacionada con la materia objeto que parece estar cubierta por las 244 reivindicaciones y la cual está sustentada por la descripción.

La búsqueda fue restringida a anticuerpos monoclonales contra EGFR. Se prestó atención en más detalle a los anticuerpos monoclonales humanizados contra este antígeno (por ejemplo el MAb ICR62) así como a otras características aparentes de las reivindicaciones y de la descripción, es decir, anticuerpos que tienen receptores Fc con actividad mejorada y/o patrones de glicosilación alterados. El examen se llevará a cabo en esta luz.

Re Item V

Afirmación razonada respecto a novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 100-111, 150, 200-217, 242, 243 sobre la pregunta de si son aplicables industrialmente, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones en cuanto al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo,

el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Documentos citados

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 2004/065540 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH]; UMANA PABLO [CH]; BRUENKER PETER [CH]; 5 de agosto de 2004 (2004-08-05)
- D2: WO 95/20045 A (CANCER RES INST ROYAL [GB]; DEAN CHRISTOPHER [GB]; MODJTAHEDI HELMOUT) 27 de julio de 1995 (1995-07-27) citado en la solicitud
- D3: MODJTAHEDI H ET AL: "ENSAYO EN FASE I Y LOCALIZACIÓN DE TUMORES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-EGFR I CR62 EN CANCER DE CABEZA, CUELLO O PULMÓN" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 2, 1996, páginas 228-235, XP008036744 ISSN: 0007-0920

Artículo 33(2) PCT

La materia objeto de las reivindicaciones 1-244 parece ser novedosa.

Artículo 33(3) PCT

La materia objeto de las reivindicaciones 1-244 no se considera inventiva.

Se considera que la técnica anterior más cercana es D1 que revela anticuerpos anti EGFR humanizados que tienen glicosilación del receptor Fc alterado que permite mayor actividad mediada por Fc.

El anticuerpo de D1 se deriva de C225 y es para usarse en terapia y diagnóstico (cf.).

La diferencia entre la reivindicación 1 y la materia objeto de D1 es que los ácidos nucleicos que codifican al anticuerpo de la reivindicación 1 codifican fragmentos del anticuerpo ICR62 de las ratas.

No hay ningún efecto técnico aparente que surja de la diferencia.

Por lo tanto, se considera que los problemas que hay que resolver son proporcionar un anticuerpo anti EGFR alterno para tratar la misma modificación que se revela en D1.

La materia objeto de la reivindicación 1 soluciona este problema pero no puede considerarse inventiva

puesto que el anticuerpo alterno proporcionado por la solicitud actual ya era bien conocido en la fecha de prioridad de la solicitud, ver por ejemplo los resúmenes de D2 y D3. Como tal, la persona versada hubiese visto la selección del anticuerpo ICR62 para la humanización y modificación del receptor Fc por ser una escogencia obvia. Las secuencias mencionadas en todas las reivindicaciones no parecen tener ningún efecto técnico sorprendente asociado con ellas y como tal, la materia objeto de la reivindicación 1 no puede considerarse inventiva (Artículo 33(3) PCT).

El mismo razonamiento aplica a las otras reivindicaciones independientes de la solicitud que tampoco se consideran inventivas.

Las reivindicaciones dependientes no contienen ninguna característica, que, en combinación con cualquiera de las reivindicaciones independientes, hiciera inventiva a una nueva reivindicación independiente.

Comentarios adicionales

Se previene al solicitante sobre la entrada en la fase regional; es probable que surjan objeciones relacionadas con la falta de unidad de invención. D1 muestra que los anticuerpos humanizados contra EGFR son conocidos y como resultado, las secuencias enumeradas en las reivindicaciones como se formularon actualmente no hubiesen tenido un concepto común novedoso que las uniera.

Se informa que los trabajos citados de la literatura que no es de patentes tal como documentos científicos o técnicos o semejantes pueden estar sujetos a protección de propiedad intelectual y/o otra protección de trabajos escritos según sea apropiado con base en las leyes pertinentes. Los textos de propiedad intelectual no pueden ser copiados o usados en otras publicaciones electrónicas o impresas o redistribuidos sin el permiso expreso del propietario de la propiedad intelectual.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/IB2006/000238

International filing date (day/month/year)
07.02.2006

Priority date (day/month/year)
07.02.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28

Applicant
GLYCART BIOTECHNOLOGY AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Rankin, Robert

Telephone No. +49 89 2399-2659



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2006/000238

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2006/000238

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (for reasons of industrial applicability) and 1-243 (partially)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (for reasons of industrial applicability) and 1-243 (partially) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 100-111, 150, 200-217, 242, 243 (for reasons of industrial applicability) and 1-243 (partially)
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/B2006/000238

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-244</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-244</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-99, 112-149, 151-199, 218-241, 244</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 100-111, 150, 200-217, 242, 243 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT)

Remarks regarding clarity and searched and examined subject matter

The present set of claims lacks conciseness (Article 6 PCT). The contribution to the art, such as it is, is not rendered completely apparent from the total of 244 claims. This is not aided by the fact that there are 58 independent claims within the application, 16 of which deal with nucleic acids and 13 of which refer to peptides or antigen binding proteins.

Due to the excessively large number of independent claims and claims in general, the ISA could have refused to carry out a search (see PCT Guidelines, 9.30) and consequently no opinion would have been given, but in order to expedite proceedings, an opinion will be given regarding subject matter which appears to be covered by the 244 claims and which is supported by the description.

The search was restricted to monoclonal antibodies against EGFR. Attention was paid in more detail to humanized monoclonal antibodies against this antigen (for example the MAb ICR62) as well as to other features apparent from the claims and description, namely antibodies which have Fc receptors with enhanced activity and/or altered glycosylation patterns. The examination shall be carried out in this light.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

For the assessment of the present claims 100-111, 150, 200-217, 242, 243 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist within the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however,

the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2004/065540 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH]; UMANA PABLO [CH]; BRUENKER PETER [CH];) 5 August 2004 (2004-08-05)
D2: WO 95/20045 A (CANCER RES INST ROYAL [GB]; DEAN CHRISTOPHER [GB]; MODJTAHEDI HELMOUT) 27 July 1995 (1995-07-27) cited in the application
D3: MODJTAHEDI H ET AL: "PHASE I TRIAL AND TUMOUR LOCALISATION OF THE ANTI-EGFR MONOCLONAL ANTIBODY ICR62 IN HEAD AND NECK OR LUNG CANCER" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 2, 1996, pages 228-235, XP008036744 ISSN: 0007-0920

Article 33(2) PCT

The subject matter of claims 1-244 appear to be novel.

Article 33(3) PCT

The subject matter of claims 1-244 is not considered inventive.

The closest prior art is considered to be D1 which discloses humanized anti EGFR antibodies having altered Fc receptor glycosylation allowing greater Fc mediated activity. The antibody of D1 is derived from C225 and is destined to be used in therapy and diagnosis (cf.).

The difference between claim 1 and the subject matter of D1 is that the antibody-encoding nucleic acids of claim 1 encode fragments of the rat antibody ICR62

There is no apparent technical effect arising from the difference.

The problems to be solved is therefore considered as being to provide an alternate anti EGFR antibody to be treated to the same modification as disclosed in D1

The subject matter of claim 1 solves this problem but cannot be considered inventive as

the alternate antibody provided by the current application was already well known at the priority date of the application, see for example the abstracts of D2 and D3. As such, the skilled person would have viewed the selection of antibody ICR62 for humanization and Fc receptor modification as being an obvious choice. The sequences mentioned throughout the claims do not appear to have any surprising technical effects associated with them and as such, the subject matter of claim 1 cannot be considered inventive (Article 33(3) PCT).

The same reasoning applies to the other independent claims of the application which are also not considered inventive.

The dependent claims do not contain any features, which, in combination with any of the independent claims, would render a new independent claim inventive.

Additional Comments

The applicant is forewarned upon entry into the regional phase, objections related to a lack of unity of invention are likely to arise. D1 shows that humanized antibodies against EGFR are known and as a result, the sequences listed in the claims as presently formulated would have no novel common concept linking them.

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE SE ENLAZAN A EGFR,
VECTORES QUE LAS CODIFICAN Y USOS DE LAS MISMAS

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes que incluyen anticuerpos quiméricos primatizados o humanizados específicos para EGFR humano. Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, que codifican dichas ABMs, y a los vectores y células hospederas que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico. La invención se refiere además a métodos para producir las ABMs de la invención, y a los métodos de uso de estas ABMs en el tratamiento de la enfermedad. Además, la presente invención se refiere a ABMs con glicosilación modificada que tiene propiedades terapéuticas mejoradas, que incluyen anticuerpos con unión al receptor Fc incrementado y función efectora incrementada.

MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE SE ENLAZAN A EGFR,
VECTORES QUE LAS CODIFICAN Y USOS DE LAS MISMAS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados que son específicos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR). Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican dichas ABMs, y vectores y células hospederas que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico. La invención se refiere además a métodos para producir las ABMs de la invención y a los métodos de uso de estas ABMs en el tratamiento de la enfermedad. Además, la presente invención se refiere a ABMs con glicosilación modificada que tiene propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con unión al receptor Fc incrementado y función efectora incrementada.

Arte Previo

Anticuerpos EGFR y anti-EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1, y denominado aquí "EGFR") es un receptor de transmembrana de 170 kDa codificado por el proto-oncogen *c-erbB*, y exhibe actividad tirosin quinasa intrínseca (Modjtahedi et al., *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996); Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). La base de datos SwissProt, entrada P00533 provee la secuencia de EGFR. Existen también isoformas y variantes de EGFR (por ejemplo transcripciones de ARN alternativas, versiones truncadas, polimorfismos, etc.) incluyendo pero sin limitarse a los que

213.896
mgm/msara/
elr/fap/
hsd/pps

se han identificado en la base de datos Swissprot, números de entrada P00533-1, P00533-2, P00533-3 y P00533-4. Se sabe que el EGFR une ligandos que incluyen el factor de crecimiento epidérmico (RGF), el factor- α de crecimiento transformante (TGF- α), anfirregulina, EGF de unión a heparina (hb-EGF), betacelulina y epirregulina (Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002); Mendelsohn and Baselga, *Oncogene* 19:6550-6565 (2000)). El EGFR regula numerosos procesos celulares a través de las vías de transducción de señal intermediadas por tirosin quinasa, que incluyen pero que no están limitadas a la activación de las vías de transducción de señal que controlan la proliferación de células, diferenciación, supervivencia celular, apoptosis, angiogénesis, mitogénesis y metástasis (Atalay *et al.*, *Ann. Oncology* 14:1346-1363 (2003); Tsao and Herbst, *Signal* 4:4-9 (2003); Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi *et al.*, *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)).

La sobreexpresión de EGFR ha sido mencionada en numerosas enfermedades malignas humanas, incluyendo cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata y riñón. (Atalay *et al.*, *Ann. Oncology* 14:1346-1363 (2003); Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi *et al.*, *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)). En muchas de estas condiciones, la sobreexpresión de EGFR está correlacionada o está asociada con una prognosis baja de los pacientes. (Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi *et al.*, *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)). El EGFR está también expresado en las células de los tejidos normales, particularmente los tejidos epiteliales de la piel, hígado y tracto gastrointestinal, aunque generalmente a niveles más bajos que los de las células malignas (Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)).

Los anticuerpos monoclonales no conjugados (mAbs) pueden ser medicamentos útiles para el tratamiento del cáncer, tal como ha sido demostrado

por la aprobación de la U.S. Food and Drug Administration de Trastuzumab (Herceptin™; Genentech Inc.) para el tratamiento del cáncer de mama avanzado (Grillo-Lopez, A.-J., *et al.*, *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)), Rituximab (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, y Genentech Inc., San Francisco, CA), para el tratamiento del linfoma no Hodgkiniano de bajo grado o folicular, de célula B CD20 positiva, (Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst), para el tratamiento de leucemia mieloide aguda con recidiva y (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de célula B. El éxito de estos productos se basa no sólo en su eficacia, sino también en sus sobresalientes perfiles de seguridad (Grillo-Lopez, A.J., *et al.*, *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)). A pesar de los logros de estos fármacos, existe corrientemente un gran interés en obtener una actividad de anticuerpo específica superior a la que se permite típicamente para la terapia mAb no conjugada.

Los resultados de una variedad de estudios sugieren que los mecanismos que dependen del receptor Fc contribuyen sustancialmente a la acción de los anticuerpos citotóxicos contra los tumores e indican que un anticuerpo óptico contra tumores se uniría preferiblemente a los receptores de Fc de activación y mínimamente al par inhibidor FcγRIIB. (Clynes, R. A., *et al.*, *Nature Medicine* 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A.M., y Ravetch, J. V., *J. Exp. Med.* 195(12):1653-1659 (Junio de 2002). Los resultados de por lo menos un estudio sugieren que el polimorfismo en el receptor FcγRIIIa, en particular, está fuertemente asociado a la eficacia de la terapia con anticuerpos. (Cartron, G., *et al.*, *Blood* 99(3):754-757 (Febrero de 2002)). Ese estudio mostró que los pacientes homocigóticos para FcγRIIIa tienen una mejor respuesta para el Rituximab que los pacientes heterocigóticos. Los autores llegaron a la conclusión de que esta respuesta

superior era debida a una mejor unión in vivo del anticuerpo al Fc γ RIIIa, que como resultado proporciona mejor actividad de ADCC contra células de linfoma. (Cartron, G., *et al.*, *Blood* 99(3):754-757 (Febrero de 2002)).

Se conocen varias estrategias para llegar al EGFR y bloquear las vías de señalización de EGFR. Los inhibidores de tirosin quinasa de moléculas pequeñas tales como gefitinib, erlotinib, y CI-1033 bloquean la autofosforilación de EGFR en la región de tirosin quinasa intracelular, inhibiendo de este modo los eventos de señalización cadena abajo (Tsao and Herbst, *Signal* 4: 4-9 (2003)). Los anticuerpos monoclonales, por otra parte, llegan a la porción extracelular de EGFR, lo cual da como resultado el bloqueo de la unión al ligando y de este modo inhiben los eventos cadena abajo tal como la proliferación de células (Tsao and Herbst, *Signal* 4: 4-9 (2003)).

Se han generado varios anticuerpos monoclonales murinos que logran dicho bloqueo in vitro y que han sido evaluados por su capacidad para afectar el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjertos en ratones (Masui, *et al.*, *Cancer Res.* 46:5592-5598 (1986); Masui, *et al.*, *Cancer Res.* 44:1002-1007 (1984); Goldstein, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 1: 1311-1318 (1995)). Por ejemplo, EMD 55900 (EMD Pharmaceuticals) es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR murino que fue creado contra la línea A431 de la célula de carcinoma epidérmico humano y que fue sometido a prueba en estudios clínicos en pacientes con carcinoma avanzado de células escamosas de la laringe o de la hipofaringe (Bier *et al.*, *Eur. Arch. Otolaryngol.* 252:433-9 (1995)). Además, los anticuerpos ICR16, ICR62 e ICR80 monoclonales de rata, que se unen al dominio extracelular de EGFR, han demostrado que son eficaces para inhibir la unión de EGF y TGF- α al receptor. (Modjtahedi *et al.*, *Int. J. Cancer* 75:310-316 (1998)). El anticuerpo monoclonal murino 425 es otro MAb que fue creado contra la línea de células de carcinoma A431 humana y que se halló que se unía a un epítipo del polipéptido en el

dominio externo del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. (Murthy *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 252(2):549-560 (1987). Un problema potencial con el uso de anticuerpos murinos en los tratamientos terapéuticos es que los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el hospedero humano como una proteína extraña; por lo tanto, las inyecciones repetidas de dichos anticuerpos extraños pueden conducir a la inducción de respuestas inmunitarias que conducen a reacciones de hipersensibilidad perjudiciales. Para anticuerpos monoclonales de base murina, ésto es denominado a menudo respuesta de Anticuerpo Anti-Ratón Humano, o respuesta "HAMA", o una respuesta de Anticuerpo Anti-Rata Humana, o respuesta "HARA". Adicionalmente, estos anticuerpos "extraños" pueden ser atacados por el sistema inmunitario del hospedero de modo que estos son efectivamente neutralizados antes de que puedan alcanzar su objetivo. Además, los anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo anticuerpos monoclonales murinos) carecen típicamente de funcionalidad efectora humana, es decir, son incapaces, entre otras cosas, de mediar en la lisis que depende de complemento o lisar células objetivo humanas a través de la toxicidad celular que depende de los anticuerpos o por fagocitosis mediada por el receptor Fc.

Se han desarrollado anticuerpos quiméricos que comprenden porciones de anticuerpos de dos o más especies diferentes (por ejemplo ratón y humanos) como alternativa para anticuerpos "conjugados". Por ejemplo, la Patente Estadounidense N° 5.891.996 (Mateo de Acosta del Rio *et al.*) revela un anticuerpo quimérico de humano/ratón R3 dirigido contra EGFR y la Patente Estadounidense N° 5.558.864 revela la generación de las formas quiméricas y humanizadas del anti-EGFR murino MAb 425. Además, IMC-C225 (Erbix®; ImClone) es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR de ratón/humano quimérico (basado en el anticuerpo monoclonal M225 de ratón que da como resultado

respuestas HAMA en pruebas clínicas humanas) que de acuerdo a lo informado ha demostrado eficacia antitumoral en varios modelos de xenoinjerto humano. (Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). La eficacia de IMC-225 ha sido atribuida a varios mecanismos que incluyen la inhibición de eventos celulares regulados por las vías de señalización de EGFR y posiblemente por la actividad de toxicidad celular dependiente de anticuerpo incrementada (ADCC) (Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). La IMC-C225 se usó también en pruebas clínicas incluyendo la combinación con radioterapia y quimioterapia (Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). Recientemente, Abgenix, Inc. (Fremont, CA) desarrolló ABX-EGF para terapia de cáncer. ABX-EGF es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR completamente humano. (Yang *et al.*, *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 38: 17-23 (2001)).

Glicosilación de Anticuerpos

El componente de oligosacárido puede afectar significativamente propiedades relevantes para la eficacia de una glicoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, la resistencia al ataque de proteasa, interacciones con el sistema inmunitario, farmacocinética y actividad biológica específica. Estas propiedades pueden depender no solamente de la presencia o ausencia sino también de las estructuras específicas de los oligosacáridos. Pueden efectuarse algunas generalizaciones entre la estructura de los oligosacáridos y la función de la glicoproteína. Por ejemplo, ciertas estructuras de oligosacáridos median la depuración rápida de la glicoproteína de la corriente sanguínea a través de interacciones con proteínas de unión específica a los carbohidratos, mientras que otras pueden unirse mediante anticuerpos y desencadenar reacciones inmunitarias indeseables. (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

Las células de mamífero son los hospederos preferidos para la producción de glicoproteínas terapéuticas debido a su capacidad para glicosilar proteínas en

la forma más compatible para aplicación humana. (Cumming *et al.*, *Glycobiology* 1:115-30 (1991); Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)). Las bacterias muy raramente glicosilan las proteínas y tal como otros tipos de hospederos comunes tales como levaduras, hongos cadenasos, insectos y células de plantas proveen patrones de glicosilación asociados con una rápida depuración de la corriente sanguínea, interacciones inmunitarias indeseables y en algunos casos específicos, actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, se han usado más comúnmente células de ovario de hámster chino (CHO) durante las dos últimas décadas. Además de proporcionar patrones de glicosilación apropiados, estas células permiten una generación coherente de líneas celulares clonales altamente productivas, genéticamente estables. Estas pueden ser cultivadas hasta altas densidades en biorreactores simples usando medios libres de suero, y pueden permitir el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células de animales comúnmente usadas incluyen células de riñón de hámster bebé (BHK), células de mieloma NS0- y SP2/0-ratón. Más recientemente, la producción de animales transgénicos ha sido también ensayada. (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, donde cada isótopo posee una disposición distinta de estructuras de carbohidrato ligadas a N, las cuales afectan en forma variada la unión de las proteínas, la secreción o su actividad funcional. (Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). La estructura del carbohidrato ligado a N adherido varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento y puede incluir un alto contenido de manosa, múltiples ramificaciones así como también oligosacáridos complejos biantenarios. (Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). Típicamente existe un proceso heterogéneo de las

estructuras nucleares de oligosacáridos unidas a un sitio de glicosilación particular de modo que incluso los anticuerpos monoclonales existen como glicoformas múltiples. Asimismo, se demostró que las diferencias principales en la glicosilación ocurren entre líneas celulares e incluso se observan diferencias menores para la línea celular determinada cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo. (Lifely, M. R. *et al.*, *Glycobiology* 5(8):813-22 (1995)).

Una forma de obtener grandes aumentos de potencia y mantener a mismo tiempo un proceso de producción simple y evitar potencialmente efectos secundarios significativos indeseables, es el de mejorar las funciones efectoras naturales mediadas por células, de los anticuerpos monoclonales mediante la manipulación por ingeniería genética de su componente oligosacárido tal como ha sido descrito en Umaña, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999) y Patente Estadounidense N° 6.602.684, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los anticuerpos de tipo IgG1, que son los anticuerpos más comúnmente usados en inmunoterapia de cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación ligado a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, que forman extensos contactos con la estructura polipeptídica, y su presencia es esencial para que el anticuerpo actúe como intermediario en las funciones efectoras tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Lifely, M. R., *et al.*, *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., *et al.*, *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. and Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

Umaña *et al.* mostró previamente que la hiperexpresión en las células de ovario de hámster chino (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), que es una glicotransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, aumenta significativamente la actividad de ADCC in vitro de un

anticuerpo monoclonal quimérico anti-neuroblastoma (chCE7) producida por las células CHO manipuladas por ingeniería genética. (Ver Umaña, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999); y la Publicación Internacional N° WO 99/54342, cuyos contenidos se incorporan aquí en su totalidad como referencia). El anticuerpo chCE7 pertenece a una amplia clase de mAbs no conjugados que tienen una elevada afinidad y especificidad tumoral, pero que tienen demasiada baja potencia para ser clínicamente útiles cuando se producen en líneas de células industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umaña, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Ese estudio fue el primero que mostró que podían obtenerse grandes cantidades de actividad de ADCC mediante la manipulación genética de las células producidas por anticuerpos, para expresar GnTIII, que conduce también a la obtención de un aumento de la proporción de la región constante asociada a (Fc), oligosacáridos bisectados incluyendo oligosacáridos bisectados no fucosilados, por arriba de los niveles que se encuentran en los anticuerpos naturales.

Sigue existiendo la necesidad de criterios terapéuticos mejorados dirigidos a EGFR para el tratamiento de desórdenes de proliferación de células en primates, incluyendo pero sin limitarlo a seres humanos, donde dichos desórdenes se caracterizan por la expresión de EGFR, particularmente una expresión anormal (por ejemplo hiperexpresión) incluyendo, pero sin limitar a cánceres de la vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata y riñón.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

El reconocimiento del tremendo potencial terapéutico de las moléculas de unión al antígeno (ABMs) que tienen la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata (por ejemplo se unen al mismo epitopo) y que han sido glicomanipuladas para mejorar la afinidad de unión y función efectora del receptor

Fc, los presentes inventores desarrollaron un método para producir dichos ABMs. Entre otras cosas, este método involucra producir anticuerpos quiméricos recombinantes o fragmentos quiméricos de los mismos. La eficacia de estos ABMs es adicionalmente mejorada por la manipulación del perfil de glicosilación de la región Fc del anticuerpo.

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

En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No:2; SEC ID No:4; SEC ID No:6; SEC ID No:8; SEC ID No:10; SEC ID No:12; SEC ID No:14; SEC ID No:16; SEC ID No:18; SEC ID No:20; SEC ID No:22; SEC ID No:24; SEC ID No:26; SEC ID No:28; SEC ID No:30; SEC ID No:32; SEC ID No:34; SEC ID No:36; SEC ID No:38; SEC ID No:40 y SEC ID No:120. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que

comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No:44; SEC ID No:46; SEC ID No:50 y SEC ID No:52. En una realización, dichos polinucleótidos codifican polipéptidos de fusión.

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

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

No:37; SEC ID No:39 y SEC ID No:121. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No:3; SEC ID No:5; SEC ID No:7; SEC ID No:9; SEC ID No:11; SEC ID No:13; SEC ID No:15; SEC ID No:17; SEC ID No:19; SEC ID No:21; SEC ID No:23; SEC ID No:25; SEC ID No:27; SEC ID No:29; SEC ID No:31; SEC ID No:33; SEC ID No:35; SEC ID No:37; SEC ID No:39 y SEC ID No:121; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc del anticuerpo, o una fragmento de la misma, de una especie distinta de rata.

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

La invención está también dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región VH del anticuerpo ICR62 o variantes funcionales del mismo, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un

fragmento de la misma, de una especie distinta de rata. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región VL del anticuerpo ICR62 o variantes funcionales del mismo, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región CL del anticuerpo, o una fragmento de la misma, de una especie distinta de rata.

La invención se dirige además a un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriormente, y a una célula hospedera que comprende tal vector de expresión. En un aspecto preferido, la invención está dirigida a una célula hospedera que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriormente.

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

La invención está también dirigida a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEC ID No:1 o una variante de la misma. La

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

En otro aspecto, la invención está dirigida a un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo ICR62 y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo y una molécula de unión al antígeno que comprende tal polipéptido. En una realización, la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo es quimérico. En otra realización preferida, el anticuerpo es humanizado o primatizado.

En otro aspecto, la invención está dirigida a un ABM que es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para la unión con EGFR y que es quimérico. En una realización, el ABM es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización adicional, el ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:1; SEC ID No:3; SEC ID No:5; SEC ID

No:7; SEC ID No:9; SEC ID No:11; SEC ID No:13; SEC ID No:15; SEC ID No:17; SEC ID No:19; SEC ID No:21; SEC ID No:23; SEC ID No:25; SEC ID No:27; SEC ID No:29; SEC ID No:31; SEC ID No:33; SEC ID No:35; SEC ID No:37; SEC ID No:39; y SEC ID No:121. En otra realización, el ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:43; SEC ID No:45; y SEC ID No:51. En una realización adicional, el ABM es un anticuerpo recombinante que está primatizado. En una realización adicional, el ABM es un anticuerpo recombinante que está humanizado. En una realización adicional, el ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región Fc humana. En una realización adicional, cualquiera de los ABMs comentados anteriormente pueden estar conjugados con una porción tal como una toxina o un radiomarcador.

La invención está además relacionada con un ABM de la presente invención donde dicho ABM tiene oligosacáridos modificados. En una realización, los oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida en comparación con los oligosacáridos no modificados. En otras realizaciones, los oligosacáridos modificados son híbridos o complejos. En una realización adicional, el ABM tiene una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados o oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc de dicha molécula. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados son híbridos. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados son complejos. En una realización, al menos el 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados o no fucosilados bisectados. En realizaciones más preferidas, por lo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% o más de los oligosacáridos son no fucosilados o no fucosilados bisectados.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica cualquiera

de los ABMs comentados anteriormente, y a los vectores de expresión y células que comprenden dicho polinucleótido.

La invención se refiere además a un método para producir un ABM que es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para la unión al EGFR y donde dicho ABM es quimérico; dicho método comprende: (a) cultivar una célula hospedera que comprende un polinucleótido que codifica un ABM de la presente invención en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicho ABM; y (b) recuperar dicho ABM del cultivo resultante.

En otro aspecto, la invención está relacionada con una composición farmacéutica que comprende el ABM de la invención. Se contempla que la composición farmacéutica puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable, un adyuvante o una combinación de los mismos.

En un aspecto adicional, la invención está relacionada con un método para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la expresión de EGFR (por ejemplo anormal o hiperexpresión de EGFR). El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del ABM de la presente invención a un sujeto, preferentemente a un sujeto mamífero, y más preferentemente a un ser humano que lo necesite. En una realización preferida, la enfermedad se trata mediante la administración de un ABM que es un anticuerpo quimérico (por ejemplo humanizado), o un fragmento quimérico de un anticuerpo. En una realización, el ABM se administra en una cantidad de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15,0 mg/kg. En otra realización, el ABM se administra en una cantidad de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 12,0 mg/kg. En otra realización, el ABM se administra en una cantidad de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg. En otra realización, el ABM se administra en una cantidad de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 12,0 mg/kg. En otra

realización, el ABM se administra en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 1,5, en aproximadamente 4,5 y aproximadamente 12,0 mg/kg.

En un aspecto más, la invención se relaciona con una célula hospedera manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII en un cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de la ABM producida por la célula hospedera, donde la ABM es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para la unión al EGFR y donde la ABM es quimérica. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión. En otra realización, la ABM producida por la célula hospedera es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es humanizado. En una realización más, el ABM comprende una región equivalente a la región Fc de una IgG humano.

La invención está también dirigida a un polinucleótido aislado que comprende por lo menos una región (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) determinante de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferiblemente, dichos polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula de unión al antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata, o variantes o formas truncadas del mismo que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de las tres regiones determinantes de complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable entera de la cadena ligera

o pesada de un anticuerpo quimérico (por ejemplo, humanizado). La invención está además dirigida a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

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

La célula hospedera de la presente invención puede seleccionarse del grupo que incluye, pero que no está limitada a una célula HEK293-EBNA una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma de ratón P3X63, una célula PR, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma. En una realización, la célula hospedera de la invención comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VL del anticuerpo ICR62 de

rata o variantes del mismo y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana. En otra realización la célula hospedera de la invención comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VH del anticuerpo ICR62 de rata o variantes del mismo y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

En un aspecto adicional, la invención está dirigida a una célula hospedera que produce una ABN que exhibe una afinidad incrementada de unión al receptor Fc y/o una función efectora incrementada como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, el aumento de la afinidad de unión es para un receptor Fc, particularmente FcγRIIIA. La función efectora contemplada aquí puede seleccionarse del grupo que incluye, pero que no está limitada a, aumento de la citotoxicidad celular intermediada por Fc; aumento de la unión a las células NK; aumento de la unión a macrófagos; aumento de la unión poliformonucleares; aumento de la unión a monolitos; aumento de la señalización directa inductora de apoptosis; aumento de la maduración de células dendríticas; y aumento del cebado de célula T.

En una realización adicional, la célula hospedera de la presente invención comprende por lo menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII que está ligado operativamente a un elemento promotor constitutivo.

En otro aspecto la invención está dirigida a un método para producir una ABM en una célula hospedera, que comprende: (a) cultivar una célula hospedera manipulada para expresar por lo menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de dicha ABM y que permiten la modificación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicha ABM; y (b) aislar dicha ABM; donde dicha ABM

es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para la unión con EGFR y donde dicha ABM es quimérica (por ejemplo humanizada). En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión, preferiblemente uno que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización Golgi de un polipéptido Golgi heterólogo seleccionado del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII"), el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII"), y el dominio de localización de una fucosiltransferasa del núcleo $\alpha 1-6$. Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es de manosidasa II o GnTI.

En un aspecto más la invención está dirigida a un método para modificar el perfil de glicosilación de un ABM anti-EGFR producido por una célula hospedera que comprende introducir dentro la célula hospedera, por lo menos un ácido nucleico o un vector de expresión de la invención. En una realización la ABM es un anticuerpo de un fragmento del mismo; preferiblemente comprende la región Fc de una IgG. Alternativamente, el polipéptido es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de un IgG.

En un aspecto la invención está relacionada con un anticuerpo quimérico recombinante o con un fragmento del mismo, capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para la unión a EGFR y que tiene fucosilación reducida.

En otro aspecto, la presente está dirigida a un método para modificar la glicosilación del anticuerpo recombinante o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención mediante el uso de un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo. En una realización los polipéptidos de fusión de la invención comprenden el dominio catalítico de GnTIII. En otra realización, el dominio de localización Golgi está seleccionado del grupo que consiste en el

dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de GnTI, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de una fucosiltransferasa de núcleo α 1-6. Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es de manosidasa II o GnTI.

En una realización, el método de la invención está dirigido a la producción de un anticuerpo recombinante, quimérico, o un fragmento del mismo, con oligosacáridos modificados donde dichos oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida en comparación con los oligosacáridos no modificados. De acuerdo con la presente invención estos oligosacáridos modificados pueden ser híbridos o complejos. En otra realización el método de la invención está dirigido a la producción de un anticuerpo recombinante, quimérico (por ejemplo humanizado) o un fragmento del mismo que tiene una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc de dicho polipéptido. En una realización, los oligosacáridos bisectados no fucosilados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados son complejos. En una realización adicional el método de la invención está dirigido a la producción de un anticuerpo quimérico recombinante o un fragmento del mismo que tiene por lo menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido que están bisectados, no fucosilados. En una realización preferida, por lo menos el 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido que están bisectados, no fucosilados. En otra realización preferida, por lo menos el 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido están bisectados, no fucosilados.

En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un anticuerpo recombinante, quimérico o a un fragmento del mismo, que exhibe un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y/o un aumento de la función efectora como

resultado de la modificación de sus oligosacárido. En una realización, el aumento de afinidad de unión es para un receptor activador de Fc. En una realización más el receptor Fc es el receptor activador Fc y particularmente el receptor FcγRIIIA. La función efectora contemplada aquí puede seleccionarse del grupo que incluye, pero que no está limitado a un aumento de la citotoxicidad celular intermediada por Fc; aumento de la unión a la células NK; aumento de la unión a macrófagos; aumento de la unión a células polimorfonucleares; aumento de la unión monolitos; aumento de señalización directa que induce apoptosis; aumento de maduración de células dendríticas; y aumento de cebado de células T.

En otro aspecto, la invención está dirigida a un fragmento de anticuerpo recombinante, quimérico (por ejemplo humanizado), que tiene la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata y que contiene la región Fc, que está manipulada genéticamente para tener una función efectora incrementada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

En otro aspecto la presente invención está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: 1; SEC ID No:3; SEC ID No:5; SEC ID No:7; SEC ID No:9; SEC ID No:11; SEC ID No:13; SEC ID No:15; SEC ID No:17; SEC ID No:19; SEC ID No:21; SEC ID No:23; SEC ID No:25; SEC ID No:27; SEC ID No:29; SEC ID No:31; SEC ID No:33; SEC ID No:35; SEC ID No:37; SEC ID No:39; y SEC ID No:121, y una región equivalente a la región Fc de un a inmunoglobulina y que está manipulada para tener una función efectora incrementada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

En otro aspecto la presente invención está dirigida a una proteína de fusión que incluye a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID No: 43, SEC ID No: 45; SEC ID No:49; y SEC ID No:51 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y manipulada para

tener una función efectora incrementada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

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

En un aspecto más, la invención está dirigida a un método para dirigir *in vivo* o *in vitro* células que expresan el EGFR. En una realización, la presente invención está dirigida a un método para dirigir células que expresan EGFR en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una ABM de la invención.

En un aspecto más, la presente invención está dirigida a un método para detectar *in vivo* o *in vitro* la presencia de EGFR en una muestra, por ejemplo para diagnosticar un desorden relacionado con la expresión de EGFR. En una realización, la detección se lleva a cabo mediante el contacto de una muestra que debe ser ensayada, opcionalmente con una muestra de control, con un ABM de la presente invención bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el ABM y EGFR. La formación del complejo es luego detectada (por ejemplo mediante ELISA u otros métodos conocidos en la técnica). Cuando se usa una muestra de control con la muestra de ensayo, cualquier diferencia

estadísticamente significativa en la formación de los complejos ABM-EGFR cuando se comparan las muestras de ensayo y de control, es indicativa de la presencia de EGFR en la muestra de ensayo.

La invención está además dirigida a un método para el tratamiento de un desorden relacionado con la expresión EGFR en particular un desorden de proliferación de células donde se expresa el EGFR, y más particularmente donde el EGFR está expresado anormalmente (por ejemplo hiperexpresado), incluyendo cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo recombinante, quimérico (por ejemplo humanizado) o un fragmento del mismo producido por cualquiera de los métodos de la presente invención, a un sujeto humano que lo necesite

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

La FIGURA 2 muestra la actividad de unión de los anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones I-HHC, I-HHA y I-HLA de la región variable de cadena pesada y construcciones I-KA y I-KB de construcciones de región variable de cadenas ligeras humanizadas, apareadas en varias configuraciones.

La FIGURA 3 muestra la actividad de unión de los anticuerpos ICR62 humanizados que comprende las construcciones I-HLB, I-HLC y I-HLA de región

variable de cadena pesada y las regiones I-KA y I-KC de construcciones de región variable de cadena ligera humanizada apareadas en varias configuraciones.

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

La FIGURA 5 muestra la actividad de unión de los anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden las construcciones de la región variable de cadena pesada y la construcción I-KC de región variable de cadena ligera humanizada en comparación con el anticuerpo ICR62 de rata-humano quimérico.

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

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

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

La FIGURA 9 muestra una comparación de la citotoxicidad celular intermediada por anticuerpos (ADCC) para varias glicoformas del anticuerpo ICR62 quimérico así como también para la variante I-HLA4 humanizada. "G2" se

refiere a la glicomanipulación del anticuerpo mediante la Ho-expresión con GnTIII y ManII. "WT" se refiere a los anticuerpos que no han sido sometidos a glicomanipulación. Las construcciones de cadena pesada humanizada se aparearon con la construcción de cadena ligera I-KC.

La FIGURA 10 muestra una comparación ADCC para la forma no glicomanipulada (WT) y la glicoforma G2 (es decir, glicomanipulada con mediante la co-expresión con GnTIII y ManII) de las construcciones I-HHB y I-HLA7 de la anticuerpo ICR62 humanizado. Los mismos anticuerpos fueron aplicados a dos líneas de células objetivo diferentes: en el Panel A se usó la línea de célula objetivo LN229; en el Panel, se usó la línea de la célula A431. Las construcciones de cadena pesada humanizadas se aparearon con la construcción de cadena ligera I-KC.

La FIGURA 11A y 11B muestra una comparación de ADCC para las formas no glicomanipuladas (WT) y la glicoformas G2 de ICR62 quimérico, y las construcciones IHHB y I-HLA7 de anticuerpo de ICR62 humanizado. Se usó la línea celular objetivo A431. Las construcciones de cadena pesada humanizadas se aparearon con la construcción de cadena ligera I-KC.

La FIGURA 12 muestra una comparación de ADCC a las 72 horas para la glicoformas G2 de ICR62 quimérico, y las construcciones I-HHB y I-HLA7 de anticuerpos ICR62 humanizados. Las construcciones de cadena pesada humanizada se aparearon con las construcción de cadena ligera I-KC.

LA FIGURA 13 muestra una alineación de secuencia de aminoácido de las construcciones de región variable de cadena pesada ICR62 humanizadas y en comparación con la secuencias ICR62 de rata. Los puntos representan la identidad de los residuos aminoácidos en una posición determinada dentro de una construcción determinada.

La FIGURA 14 muestra un ensayo de unión FCgamaRIIIa-Fc usando células CHO que exhiben FCgamaRIIIa humana recombinante. Un anticuerpo IgG1 anti-EGFR humanizado IHHB/KC glicomanipulado, se comparó con un anticuerpo no-glicomanipulado (WT).

La FIGURA 15 muestra un perfil de oligosacárido MALD/TOF-MS para el anticuerpo IgG1 anti-EGFR humanizado glicomanipulado, I-HHB/KC. La glicomanipulación lograda por la hiperexpresión en la células productoras de anticuerpo de genes que codifican enzimas con actividades GnTIII y Golgi Manosidasa II, que proporcionan más de 70% de oligosacáridos ligados a Fc-Asn297-no fucosilados.

La FIGURA 16 muestra un perfil de precisión anti-EGFR (n=6 replicas a través del rango de calibración) para la determinación de anti-EGFR en una matriz de suero de mono al 1% (CMS255/31/33 suero de mono provisto por HLS).

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

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

La FIGURA 19 muestra concentraciones de suero de suero anti-EGFR en el día 1 de una administración intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cynomolgus hembra.

La FIGURA 20 muestra la relación entre las áreas bajo las curva de concentración anti-EGFR en el suero - tiempo (AUC_{168}) y el nivel de dosis en el día 1 de una administración intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cynomolgus.

La FIGURA 21 muestra la concentración de suero de anti-EGFR durante una administración intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cynomolgus machos.

La FIGURA 22 muestra las concentraciones en el suero del anti-EGFR durante una administración intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cynomolgus hembras.

La FIGURA 23 muestra el perfil MALDI/TOF-MS de oligosacáridos de anticuerpo anti-EGFR Fc-manipulado (glico-manipulado) para ser usado en los estudios in vivo llevados a cabo en monos, que se describen en los Ejemplos de la presente que figuran más abajo.

La FIGURA 24 muestra la unión a EGFR que se expresa en la superficie de células de carcinoma epidermoide A431 humanas. El anticuerpo usado para el estudio de unión fue el anticuerpo anti-EGFR Fc-manipulado (construcción I-HHB) que se usó en los estudios in vivo llevados a cabo en monos, que se describen en los Ejemplos de la presente que figuran más abajo.

La FIGURA 25 muestra la unión a EGFR que se expresa en la superficie de células de riñón de mono COS-7. El anticuerpo usado fue el anticuerpo anti-EGFR (cadena pesada I-HHB; cadena ligera I-KC). A modo de referencia, se muestra la unión a células que expresan EGFR humano inferior, células de cáncer de mama MCF-7.

La FIGURA 26 muestra la unión Fc-FcgammaRIIIa usando una célula completa (células CHO manipuladas para expresar FcγRIIIa humano en su superficie). El anticuerpo usado fue el anticuerpo anti-EGFR Fc-manipulado (glicomanipulado) que se usó en los estudios in vivo llevados a cabo en monos, que se describen en los Ejemplos de la presente que figuran más abajo. Se muestra con fines comparativos la unión de un anticuerpo IgG1 control (no modificado) no Fc-manipulado.

La FIGURA 27 muestra la ADCC mediada por el anticuerpo anti-EGFR Fc-manipulado (glicomanipulado). Las células objetivo son células de carcinoma de pulmón humano A549. Se muestra con fines comparativos la actividad ADCC para la forma del anticuerpo no Fc-manipulada (no modificada).

La FIGURA 28 muestra la ADCC mediada con anticuerpo anti-EGFR Fc-manipulado (glicomanipulado). Las células objetivo son células de queratinocitos de mono cynomolgus CYNOM-K1. Se muestra con fines comparativos la actividad ADCC para la forma del anticuerpo no Fc-manipulada (no modificada).

La FIGURA 29 muestra la unión objetivo a EGFR de diversas variantes de construcciones de cadena ligera en base a la construcción I-KC apareada con la construcción I-HHD de cadena pesada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los terminals que se emplean aquí son los que son generalmente usados en la materia a menos que se definan de la manera siguiente.

Tal como se usa aquí, el terminal *anticuerpo* incluye moléculas de anticuerpo enteras incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multi-específicos (por ejemplo bi-específicos), así como también fragmentos de anticuerpos que tienen una región Fc que retienen especificidad de unión, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y que retienen especificidad de unión. Asimismo están también abarcados fragmentos que retienen especificidad de unión que incluyen pero que no están limitados a fragmentos VH, fragmentos VL, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos Fv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos (ver por ejemplo Hudson and Souriau, *Nature Med.* 9: 129-134 (2003)). Asimismo están también abarcados los anticuerpos humanizados, privatizados y quiméricos.

Tal como se usa aquí el terminal región Fc se refiere a una región C terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena IgG podrían variar muy ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana está usualmente definida para estirarse desde el residuo aminoácido en la posición Cys226 hasta el terminal carboxilo.

Tal como se usa aquí, el terminal región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina incluye variantes alélicas naturales de la región Fc de una inmunoglobulina así como también variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones adiciones o eliminaciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para intermediar las funciones efectores (tales como citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos). Por ejemplo pueden eliminarse 1 o más aminoácidos del N-terminal o C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse de acuerdo con las reglas generales que se conocen en la materia de modo que tengan un efecto mínimo sobre la actividad. Ver por ejemplo Bowie, J. U. *et al.*, *Science* 247:1306-1310 (1990).

Tal como se usa aquí, el terminal EGFR se refiere al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano (conocido también como HER-1 o Erb-B1) (Ulrich, A. *et al.*, *Nature* 309:418-425 (1984); SwissProt Accession #P00533; números de acceso secundarios: O00688, O00732, P06268, Q14225, Q92795, Q9BZS2, Q9GZX1, Q9H2C9, Q9H3C9, Q9UMD7, Q9UMD8, Q9UMG5), así como también las isoformas naturales y las variantes de las mismas. Las isoformas y variantes incluyen pero no están limitadas a la variante EGFRvIII, a productos alternativos de corte y empalme (por ejemplo tal como los identificado por SwissProt Números de Acceso #P00533-1, P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4), variantes GLN-98, ARG-266, Lys-521, ILE-674, GLY-962, y PRO-988 (Livingston, R.J. *et al.*, NIEHS-SNPs, proyecto de genoma ambiental, NIEHS ES15478, Department of Genome Sciences, Seattle, WA (2004)), y otros identificados por los números de acceso siguientes: NM_005228.3, NM_201282.1,

NM_201283.1, NM_201284.1 (REFSEC mRNAs); AF125253.1, AF277897.1, AF288738.1, AI217671.1, AK127817.1, AL598260.1, AU137334.1, AW163038.1, AW295229.1, BC057802.1, CB160831.1, K03193.1, U48722.1, U95089.1, X00588.1, X00663.1; H54484S1, H54484S3, H54484S2 (MIPS assembly); DT.453606, DT.86855651, DT.95165593, DT.97822681, DT.95165600, DT.100752430, DT.91654361, DT.92034460, DT.92446349, DT.97784849, DT.101978019, DT.418647, DT.86842167, DT.91803457, DT.92446350, DT.95153003, DT.95254161, DT.97816654, DT.87014330, DT.87079224 (DOTS Assembly).

Tal como se usa aquí, el terminal *ligando de EGFR* se refiere a un polipéptido que se une y/o activa el EGFR. El terminal incluye formas precursores unidas a membranas del ligando de EGFR, así como también formas solubles proteolíticamente procesadas del ligando de EGFR.

Tal como se usa aquí el terminal activación del ligando de EGFR se refiere a la transducción de señales (por ejemplo la causada por dominio quinasa intracelular de los residuos tirosinafosforilantes del receptor EGF, en el EGFR o un sustituto polipeptídico) intermediado por la unión del ligando de EGFR.

Tal como se usa aquí, el terminal enfermedad o desorden caracterizado por una activación o producción anormal de EGFR o de un ligando de EGFR o un desorden relacionado con la expresión de EGFR se refiere a un trastorno, que puede involucrar o no para tener la certeza de tumores malignos o cáncer, donde la activación y/o producción anormal de EGFR y/o de un ligando EGFR, ocurre en células o tejidos de un sujeto que tiene o que está predispuesto a tener la enfermedad o desorden.

Tal como se usan aquí, los terminals hiperexpresa, hiperexpresado e hiperexpresión que se usan con referencia a células que expresan EGFR, se refiere a células que tienen niveles mensurablemente más elevados de EGFR en la superficie de los mismos en comparación con una célula normal del mismo tejido. Dicha hiperexpresión puede ser causada por amplificación génica o por el

aumento de la transcripción o traducción. La expresión de EGFR (por lo tanto hiperexpresión) puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles de EGFR presentes en la superficie de una célula o en un lisado de célula mediante técnicas que son conocidas en la técnica por ejemplo a través de un ensayo de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, un ensayo de inmunoenzimas, un ELISA, por citometría de flujo, radioinmunoensayo, electroinmunotransferencia Western, unión de ligando, actividad de quinasas etc. (ver en terminales generales, CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK, Celis, J., ed., Academic Press (2d ed., 1998); CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Coligan, J.E. *et al.*, eds., John Wiley & Sons (1995-2003); *ver también*, Sumitomo *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 10: 794-801 (2004) (que describe electroinmunotransferencia Western, citometría de flujo e inmunohistoquímica) los contenidos completos de los cuales se incorporan aquí como referencia)). Alternativamente o adicionalmente, pueden medirse los niveles de moléculas de ácido nucleico que codifican EGFR en la célula por ejemplo mediante hibridación fluorescente in situ, electroinmunotransferencia Southern o técnicas de PCR. Los niveles de EGFR en células normales se compararon con los niveles de células afectadas por un desorden de proliferación de células (por ejemplo cáncer) para determinar si el EGFR estaba hiperexpresado.

Tal como se usa aquí el término molécula de unión al antígeno se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico más específicamente, una molécula de unión al antígeno que se une a EGFR es una molécula que específicamente se une a un receptor de transmembrana de 170 kDa, designado típicamente como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pero se conoce también como HER-1 o ErbB1. Mediante "que se une específicamente" se indica que la unión es selectiva para el

antígeno y que puede ser discriminada de las interacciones no deseadas o no específicas.

Tal como se usan aquí los terminals fusión y quimérico, cuando se usan con referencia a los polipéptidos tales como ABMs, se refieren a polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivados de 2 o más polipéptidos heterólogos, tales como porciones de anticuerpos de especies diferentes. Para los ABMs quiméricos, por ejemplo los componentes de unión que no son de antígeno, pueden derivar de una amplia variedad de especies incluyendo primates tales como chimpancés y seres humanos. La región constante del ABM quimérico es más preferiblemente y sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico es más preferiblemente y sustancialmente idéntica a la de un anticuerpo anti-EGFR recombinante que tiene la secuencia de amino ácido de la región variable murina. Los anticuerpos humanizados son una forma o fusión particularmente preferida o un anticuerpo quimérico.

Tal como se usa aquí, *un polipéptido que tiene actividad GnTIII* se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo (N-acetilglucosamina (GlcNAc) en un enlace β -1-4 con la manosida ligada a β del núcleo trimanosilo de oligosacáridos N-ligados. Esto incluye polipéptidos de fusión que exhiben actividad enzimático similar pero o necesariamente idéntica, a la actividad de la β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, conocida también como β 1,4-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa (EC 2.4.1.144), de acuerdo con el comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), medida en un ensayo biológico particular con o sin dependencia de dosis. En caso de que exista la dependencia de dosis, no es necesario que sea idéntica a la de GnTII, sino que debe ser sustancialmente similar a la dependencia de dosis en una actividad determinada,

en comparación con el GnTIII (es decir el polipéptido candidato exhibirá mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos, y preferiblemente no más de aproximadamente 10 veces menos actividad y aún más preferiblemente, no más de aproximadamente 3 veces menos actividad en relación al GnTIII).

Tal como se usa aquí, el terminal *variante* (o *análogo*) se refiere a un polipéptido que difiere del polipéptido específicamente mencionado de la invención por las inserciones, eliminaciones y sustituciones, de aminoácido, creadas usando por ejemplo, técnica de ADN recombinante. Las variantes de la ABMs de la presente invención incluyen moléculas de unión de antígeno quimérica, privatizadas o humanizadas donde uno o varios de los residuos aminoácidos están modificados por sustitución, adhesión y/o eliminación de tal manera que no afectan sustancialmente la afinidad de unión del antígeno (por ejemplo, EGFR). La guía para determinar cuales residuos aminoácido pueden ser reemplazados, agregados o eliminados sin anular las actividades de interés, pueden encontrarse comparando la secuencia del polipéptido particular con la de los péptidos homólogos y minimizando la cantidad de cambios de secuencia de aminoácido efectuada en las regiones de alta homología (regiones conservadas) o reemplazando aminoácidos con secuencia de consenso.

Alternativamente, las variantes recombinantes que codifican péptidos similares o los mismos polipéptidos pueden sintetizarse o seleccionarse utilizando la "redundancia" del código genético. Varias sustituciones de codones, tales como los cambios silentes que producen varios sitios de restricción, pueden ser introducidas para optimizar la clonación en un plásmido o en un vector viral o para la expresión en un sistema procariótico o eucariótico particular. Las mutaciones en la secuencia polinucleotídica pueden estar reflejadas en el polipéptido o en los dominios de otros péptidos agregados al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar las características

tales como las afinidades de unión al ligando, las afinidades de intercadena o el ritmo de degradación/renovación.

Preferiblemente, las "sustituciones" son el resultado del reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir reemplazos de aminoácido conservadora. Las sustituciones de aminoácido "Conservadoras" pueden efectuarse en base a la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano, y metionina; los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisterna, tirosina, asparagina, y glutamina: los aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina; y los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen ácidos aspártico y glutámico. Las "Inserciones" o "Eliminaciones" están preferiblemente en el rango de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos más preferiblemente 1 a 10 aminoácidos. La variación permitida puede ser determinada experimentalmente mediante inserciones, eliminaciones o sustituciones sistemáticas de aminoácidos en una molécula de polipéptido usando de ADN recombinante y ensayando las variantes recombinante resultantes para determinar la actividad.

Tal como se usa aquí, el terminal *humanizado* se usa para referirse a una molécula de unión al antígeno derivada, de una molécula de unión al antígeno no humana, por ejemplo un anticuerpo murino, que retiene, o que retiene sustancialmente las propiedades de unión al antígeno de la molécula principal pero que es menos inmunogénica en los seres humanos. Esto puede lograrse por varios métodos que incluyen (a) insertar los dominios variables no humanos enteros sobre regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertar únicamente las CDRs no humanas sobre una estructura humana y

regiones constantes con o sin retención de residuos estructurales críticos (por ejemplo, que sean importantes para retener buenas funciones de afinidad o de anticuerpo de unión al antígeno), o (c) transplantar los dominios variables no humanos enteros, pero "disimularlos" con una sección de tipo humano mediante el reemplazo de residuos superficiales. Dichos métodos pueden estar descritos en Jones et al., Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994), todos los cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Existen generalmente 3 regiones determinantes de complementariedad o CDRs, (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo, que están flanqueadas por cuatro sub-regiones estructurales (es decir, FR1, FR2, FR3, y FR4) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Una discusión de los anticuerpos humanizados puede encontrarse, entre otras, en la Patente Norteamericana No. 6.632.927, y en la Solicitud Norteamericana Publicada No. 2003/0175269, incorporándose ambas aquí como referencia en su totalidad.

De manera similar, a la que se usa aquí, el terminal *primitizados* se emplea para referirse a una molécula de unión al antígeno derivada de una molécula de unión al antígeno, que no es de primate, por ejemplo un anticuerpo murino, que retiene o retiene substancialmente las propiedades de unión al antígeno de la molécula principal pero que es menos inmunogénica en primates.

En el caso en el cual existen dos o más definiciones de un terminal que se usa y/o que es aceptado en la técnica, la definición de los mismos que se emplea aquí incluirá todos dichos significados al menos que se manifieste explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del terminal "región determinante de

complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígeno no contiguos que se encuentran dentro de la región variables tanto de los polipéptidos de cadena pesada como de cadena ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et al., U.S. Dept. of Health y Human Services, "SECuences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y by Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), que se incorporan aquí como referencia donde las definiciones incluyen la superposición o sub-grupos de residuos aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo la aplicación de cualquier definición para hacer referencia a las CDR de un anticuerpo o variantes del mismo debe estar dentro del alcance del terminal definido y usado aquí. Los residuos aminoácidos apropiados que abarcan la CDRs definidas en cualquiera de las referencias anteriormente citadas se establecen a continuación en la Tabla I como comparación. Las cantidades exactas de residuos que abarcan una CDR particular, variarán dependiendo de la secuencia y del tamaño de la CDR. Los expertos en la materia podrán determinar en forma rutinaria cuales son los residuos que comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácido de región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

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

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 está de acuerdo con las convenciones de numeración establecidas por Kabat et al. (ver a continuación).

² "AbM" se refiere a la CDRs definidas por el software de modelación de anticuerpos Oxford Molecular's "AbM".

Kabat et al. define también un sistema de numeración par secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia podrá asignar sin ambigüedades este sistema de ""numeración Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable sin basarse en ningún dato experimental más allá de la secuencia misma. Tal como se usa aquí, "Numeración Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat et al., U.S. Dept. of Health y Human Services, "SECuence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique lo contrario, la referencia a la numeración de las posiciones de los residuos aminoácidos específicos en una ABM se efectúan de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. Las secuencias del listado de secuencias (es decir, SEC ID NO:1 a SEC ID NO:127) no están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. Sin embargo tal como se manifestó previamente está dentro de la experiencia normal en la materia, determinar el esquema de

numeración Kabat de cualquier secuencia de región variable en el Listado de Secuencias en base a la numeración de las secuencias que se presentan allí.

Mediante ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que es por lo menos por ejemplo, 95% "idénticas" a una secuencia nucleotídica de referencia de la presente invención, se indica que la secuencia nucleotídica del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia nucleotídica, por lo menos 95% idéntica a una secuencia nucleotídica de referencia, hasta 5% de los nucleótidos de la secuencia de referencia pueden ser eliminados o sustituidos con otro nucleótido, o, una cantidad de nucleótidos hasta el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse dentro de la secuencia de referencia.

En la práctica, si cualquier molécula de aminoácido particular o polipéptido es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a una secuencia nucleotídica o secuencia polipeptídica de la presente invención, puede ser determinado convencionalmente usando programas de computadora conocido. Un método preferido para determinar cual es el mejor apareamiento general entre una secuencia de interrogación (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, denominada también alineación de secuencia global, puede determinarse usando el programa de computadora FASTDB en base al algoritmo de Brutlag *et al.*, *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990). En una alineación de secuencia la secuencia de interrogación y sujeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN puede compararse para convertir las U' a T'. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en identidad porcentual. Los parámetros preferidos que se usan en una alineación FASTDB de

secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuple=4, Error de mal apareamiento=1, Error de unión=30, Longitud de Grupo de Randomización=0, Resultado de corte=1, Error de brecha=5, Error de Tamaño de Brecha 0,05, Tamaño de Ventana=500 o longitud de la secuencia nucleotídica sujeto, cualquiera de ellas sea la más corta.

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de interrogación debido a eliminaciones 5' o 3', y no debido a eliminaciones internas, debe efectuarse una corrección manual en los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no cuenta las truncaciones 5' y 3' de la secuencia sujeto cuando calcula la identidad porcentual. Para la secuencia sujeto truncada en los extremos 5' o 3', en relación a la secuencia de interrogación, el porcentaje de identidad se corrige calculando la cantidad de bases de la secuencia de interrogación que están en 5' y 3' de la secuencia sujeto, que no están apareadas/alineadas, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de interrogación. Si un nucleótido está apareado/alineado se determina por los resultados de la alineación de secuencia FASTDB. Este porcentaje se extrae luego de la identidad porcentual, se calcula mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a un resultado final de identidad porcentual. Este resultado corregido es el que se usa para los propósitos de la presente invención. Únicamente las bases que están fuera de las bases 5' y 3' de las secuencias sujeto, tal como se exhiben en la alineación FASTDB, que no están apareadas/alineadas con la secuencia de interrogación, son calculadas para los propósitos de ajuste manual del resultado de identidad porcentual.

Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases se alinea con una secuencia de interrogación de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las eliminaciones ocurren en el extremo 5' de las secuencias sujeto y por lo tanto, la

alineación FASTDB no muestra un apareamiento/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 no apareadas representan el 10% de la secuencia (numeración de bases en los extremos 5' y 3' no apareadas/cantidad total de bases en la secuencia de interrogación) de manera que se extrae el 10% del resultado de identidad porcentual calculado por el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran perfectamente apareadas el porcentaje final de identidad sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia sujeto de 90 bases con una secuencia de interrogación de 100 bases. Esta vez, las eliminaciones son eliminaciones internas de manera que no hay bases en 5' o 3' de las secuencias sujeto que no estén apareadas/alineadas con la de interrogación. En este caso el porcentaje de identidad calculado para FASTDB no está manualmente corregido. Una vez más, únicamente las bases 5' y 3' de las secuencias sujeto que no están apareadas/alineadas con la secuencia de interrogación son manualmente corregidas. No se efectúa ninguna otra corrección manual para los propósitos de la presente invención.

Mediante un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es por lo menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácido de interrogación de la presente invención, se indica que la secuencia de aminoácido del polipéptido sujeto es idéntica a la secuencia de interrogación excepto que la secuencia del polipéptido sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácido por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácido de interrogación. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácido por lo menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácido de interrogación, hasta el 5% de los residuos aminoácido en la secuencia sujeto puede ser insertada, eliminada, o sustituida con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácido de referencia o en

cualquier otra parte entre aquellas posiciones terminales, interdispersadas ya sea individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la práctica, si cualquier polipéptido particular es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a un polipéptido de referencia, puede determinarse convencionalmente usando programas de computadora conocidos. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento general entre una secuencia de interrogación (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, denominada también alineación de secuencia global, puede determinarse usando el programa de computadora FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990). En una alineación de secuencias las secuencias de interrogación y sujeto son o bien ambas secuencias nucleotídicas o ambas secuencias de aminoácido. El resultado de dicha alineación de secuencia global se da en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación de aminoácido FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuple=2, Error de mal apareamiento=1, Error de unión=20, Longitud del Grupo de Randomización=0, Resultado de Corte=1, Tamaño de Ventana=longitud de secuencia, Error de Brecha=5, Error de Tamaño de Brecha=0,05, Tamaño de Ventana=500 o la longitud de la secuencia de aminoácido sujeto cualquiera sea más corta.

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de interrogación debido a eliminaciones N- o C-terminales, y no debido a eliminaciones internas, debe efectuarse una corrección manual en los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no cuenta las truncaciones N- y C-terminales de las secuencias sujeto cuando calcula la identidad de porcentaje global. Para las secuencias sujeto truncadas en los terminals N- y C-, en relación a la secuencia de interrogación, los porcentajes de identidad se corrige calculando la cantidad de

residuos de la secuencia de interrogación que son N- y C-terminales de las secuencias sujeto, que no han sido apareadas/alineadas con un residuo sujeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de interrogación. Si un residuo está apareado/alineado se determina por los resultados de la alineación de secuencia FASTDB. Este porcentaje es luego restado de la identidad porcentual, calculada mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados para llegar a un resultado final de identidad porcentual. Este resultado de identidad porcentual final es el que se usará para los propósitos de la presente invención. Únicamente los residuos de los terminals N- y C- de las secuencias sujeto, que no han sido apareados/alineados con la secuencia de interrogación, se considerarán para los propósitos de ajuste manual del resultado de identidad porcentual. Es decir, únicamente las posiciones de residuos de interrogación fuera de los residuos N y C-terminales más alejados de la secuencia sujeto.

Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos aminoácidos, es alineada con una secuencia de interrogación de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La eliminación ocurre en el terminal N de las secuencias sujeto y por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra un apareamiento/alineación de los primeros 10 residuos en el terminal N. Los 10 residuos no apareados representan el 10% de la secuencia (cantidad de residuos en los terminals N- y C- no apareados/cantidad total de residuos en la secuencia de interrogación) de modo que se resta el 10% de identidad del resultado calculado por el programa FASTDB. Si los 90 residuos remanentes están perfectamente apareados la identidad porcentual final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia sujeto de 90 residuos con una secuencia de interrogación de 100 residuos. Esta vez, las eliminaciones son eliminaciones internas de manera que no existe ningún residuo en los N- o C-terminales de la

secuencia sujeto que no esté apareado/alineado con la de interrogación. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Nuevamente, únicamente las posiciones de residuos fuera de los extremos N- y C-terminales de la secuencia sujeto, tal como se exhibe en la alineación FASTDB, que no están apareados/alineados con la secuencia de interrogación son corregidos manualmente. Ningún otra corrección manual debe efectuarse para los propósitos de la presente invención.

Tal como se usa aquí, un ácido nucleico que "*hibrida bajo condiciones rigurosas*" con una secuencia de ácido nucleico de la invención, se refiere a un polinucleótido que se hibrida en una incubación nocturna a 42°C en una solución que comprende el 50% de formamida, 5x SSC (750 mM NaCl, 75 mM de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7,6), 5x de solución de Denhardt's, 10% de sulfato de dextrano, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón fundido, desnaturalizado, seguido del lavado de los filtros en 0.1x SSC a aproximadamente 65°C.

Tal como se emplea aquí el terminal *Dominio de localización Golgi* se refiere a la secuencia de aminoácido de un polipéptido residente Golgi que es responsable del anclaje del polipéptido en la ubicación dentro del complejo Golgi. En general los dominios de localización comprenden "colas" terminales amino, de una enzima.

Tal como se emplea aquí el terminal *función efectora* se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante de secuencia de aminoácido) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos se incluyen, pero no están limitadas a, una afinidad de unión al receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP), secreción de citoquina, absorción de antígeno intermediada por inmunidad-

complejo, por células presentadoras de antígeno, regulación hacia abajo de los receptores de superficie de células, etc.

Tal como se emplean aquí, los términos *ingeniería*, *manipulación de ingeniería*, *ingeniería* y *glicosilación* se considera que incluyen cualquier manipulación del patrón de glicosilación de un polipéptido recombinante natural o un fragmento del mismo. La ingeniería de glicosilación incluye ingeniería metabólica de la maquinaria de glicosilación de una célula, que incluye manipulaciones genéticas de las vías de síntesis de los oligosacáridos para lograr una glicosilación alterada de las glicoproteínas expresadas en las células. Además, la ingeniería de glicosilación incluye los efectos de las mutaciones y del ambiente celular en la glicosilación. En una realización, la ingeniería de glicosilación es una alteración de la actividad de glicosiltransferasa. En una realización particular, la ingeniería da como resultado una actividad alterada de la glucosaminiltransferasa y/o de la actividad de fucosiltransferasa.

Tal como se usa aquí, el término *célula hospedera* cubre cualquier clase de sistema celular que pueda ser manipulado por ingeniería para generar los polipéptidos y moléculas de unión al antígeno de la presente invención. En una realización, la célula hospedera es manipulada por ingeniería genética para permitir la producción de una molécula de unión al antígeno con glicoformas modificadas. En una realización preferida, la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión. En algunas realizaciones, las células hospederas han sido adicionalmente manipuladas para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad GnTIII. Las células hospederas incluyen células cultivadas, *por ejemplo*, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células HEK293-EBNA, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de

levadura, células de insectos, y células de plantas, para nombrar unas pocas, pero también las células comprendidas dentro de un animal transgénica, una planta transgénica o un tejido de planta cultivada o de animal.

Tal como se usa aquí, el terminal *citotoxicidad celular intermediada por Fc* incluye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad celular intermediada por una proteína de fusión-Fc soluble que contiene una región Fc humana. Este es un mecanismo de inmunidad que conduce a la lisis de las "células que son objetivo de anticuerpos" mediante "células efectoras inmunitarias humanas", donde:

Las *células efectoras inmunitarias humanas* son una población de leucocitos que exhiben receptores Fc en su superficie a través de las cuales se unen a la región Fc de los anticuerpos o de las proteínas Fc-fusión y llevan a cabo funciones efectoras. Dicha población puede incluir, pero no está limitada a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células asesinas naturales (NK).

Las *células que son objetivo de anticuerpo* son células unidas por los anticuerpos o por las proteínas de Fc-fusión. Los anticuerpos o proteína de Fc-fusión se unen a las células objetivo a través de la parte N-terminal de la proteína a la región Fc.

Tal como se usa aquí, el terminal *citotoxicidad celular intermediada por Fc* incrementada se define como cualquier aumento en la cantidad de "células que son blanco del anticuerpo" que han sido lisadas en un tiempo determinado, en una concentración de anticuerpo determinada, o de proteína de Fc-fusión, en el medio que rodea las células objetivo, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular intermediada por Fc definida anteriormente y/o una reducción en la concentración de anticuerpo o en la proteína de Fc-fusión, en el medio que rodea las células objetivo, requerido para lograr la lisis de una cantidad determinada de

"células objetivo del anticuerpo", en un tiempo determinado, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular intermediada por Fc. El aumento de la citotoxicidad celular intermediada por Fc está relacionado con la citotoxicidad celular intermediada por el mismo anticuerpo, o la proteína de Fc-fusión, producida por el mismo tipo de células hospederas, usando los mismos métodos de producción estándar, purificación, formulación y almacenamiento, que son conocidos por los expertos en la materia, pero que no han sido producidos por células hospederas manipuladas por ingeniería de manera de expresar la glicosiltransferasa GnTIII mediante los métodos descritos aquí.

Por *anticuerpo que tiene citotoxicidad celular incrementada dependiente del anticuerpo (ADCC)* se indica un anticuerpo, tal como ha sido definido aquí el terminal, que tiene un aumento de ADCC determinada mediante cualquier método apropiado conocido por los expertos en la materia. Un ensayo de ADCC *in vitro* aceptado es el siguiente:

- 1) el ensayo usa células objetivo que se sabe que expresan el antígeno objetivo reconocido por la región de unión al antígeno del anticuerpo;
- 2) el ensayo usa células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs), aisladas de la sangre de un donar sano elegido al azar, como células efectoras;
- 3) el ensayo se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo siguiente:
 - i) las PBMCs son aisladas usando procedimientos de centrifugación de densidad estándar, y son suspendidas como 5×10^6 células/ml en un medio de cultivo de células RPMI;
 - ii) las células objetivo son cultivadas mediante métodos estándar para cultivo de tejidos, son cosechadas desde la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior al 90%, son lavadas en un medio de cultivo de células RPMI,

- marcadas con 100 micro-Curies de ^{51}Cr , son lavadas dos veces con un medio de cultivo de células, y resuspendidas en un medio de cultivo de células a una densidad de 105 células/ml;
- iii) 100 microlitros de la suspensión final de células objetivo anterior, son transferidas a cada pozo de una placa microevaluadora de 96 pozos;
 - iv) el anticuerpo excluido en forma seriada a partir de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en un medio de cultivo de células, y se agregan 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células objetivo en la placa microevaluadora de 96 pozos, para ensayar por triplicado varias concentraciones de anticuerpo que cubren el rango de concentración total anterior;
 - v) para controles de liberación máxima (MR), 3 pozos adicionales de la placa que contiene las células objetivo marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2% (V/V) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
 - vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pozos adicionales en la placa que contiene las células objetivo marcadas, reciben 50 microlitros de medio de cultivo de células RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
 - vii) la placa microevaluadora de 96 pozos es luego centrifugada a 50 x g durante 1 minuto y es incubada durante 1 hora a 4°C;

- viii) 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) son agregadas a cada pozo para proporcionar una relación de efector:célula objetivo de 25:1 y las placas son colocadas en una incubadora bajo una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C durante 4 horas;
- ix) el sobrenadante libre de células de cada pozo es cosechado y la radioactividad liberada experimentalmente (ER) es cuantificada usando un contador gamma;
- x) el porcentaje de lisis específica se calcula para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula $(ER - MR) / (MR - SR) \times 100$, donde ER es la radioactividad promedio cuantificada (ver punto ix anterior) para esta concentración de anticuerpo, MR es la radioactividad promedio cuantificada (ver punto ix anterior) para los controles MR (ver punto v anterior), y SR es la radioactividad promedio cuantificada (ver punto ix anterior) para los controles SR (ver punto vi anterior);

4) "ADCC incrementada" se define como un aumento en el porcentaje máximo de lisis específica observado dentro del rango de concentración de anticuerpos ensayado anteriormente, y/o una reducción de la concentración de anticuerpo requerida para lograr la mitad del porcentaje máximo de lisis específica que se observa dentro del rango de concentración de anticuerpos ensayada anteriormente. El aumento de ADCC es relativo a la ADCC, medida con el ensayo anterior, intermediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células hospederas, usando la misma producción, purificación, formulación y métodos de almacenamiento estándar que son conocidos por los expertos en la materia, pero que no ha sido producida por las células hospederas manipuladas para que hiperexpresen GnTIII.

En un aspecto, la presente invención está relacionada con moléculas de unión al antígeno que tiene la especificidad de unión de la ICR62 de rata (es decir, que se unan a sustancialmente el mismo epitopo), y al descubrimiento de que puede incrementarse cualquiera de las funciones efectoras mediante glicosilación alterada. En una realización, la molécula de unión al antígeno, es un anticuerpo quimérico. En una realización preferida la invención está dirigida a un anticuerpo quimérico, o a un fragmento del mismo, que comprende uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) de los CDRs de cualquiera de las SEC ID NOs:53-108 y/o SEC ID NOs: 122-127. Específicamente, en una realización preferida, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: SEC ID NO:54 SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, y SEC ID NO:124; (b) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, y SEC ID NO:126; y (c) SEC ID NO:108. En otra realización preferida, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:112 y SEC ID NO:114; (b) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:116 y SEC ID NO:118; y (c) SEC ID NO:119. En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión.

En otra realización, la molécula de unión al antígeno comprende el dominio V_H en el anticuerpo ICR62 de rata codificado por la SEC ID NO:1 o SEC ID NO:2, o una variante del mismo, y un polipéptido no murino. En otra realización preferida, la invención está dirigida a una molécula de unión al antígeno que

comprende el dominio V_L de anticuerpo de rata codificada por la SEC ID NO:43 o SEC ID NO:44, o una variante del mismo, y un polipéptido no murino.

En otro aspecto, la invención está dirigida a las moléculas de unión al antígeno que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) CDRs truncadas de ICR62. Dichas CDRs truncadas contendrán, como mínimo, los residuos aminoácidos determinantes de especificidad para las CDR determinadas. Mediante "residuo determinante de especificidad" se indica cualquiera residuo que está directamente involucrado en la interacción con el antígeno. En general, únicamente aproximadamente una quinta hasta una tercera parte de los residuos en una CDR determinada participa en la unión al antígeno. Los residuos determinantes de especificidad en una CDR particular pueden identificarse, por ejemplo, por computación de contactos inter-atómicos a partir de la modelación tri-dimensional y la determinación de la variabilidad de secuencias en una posición de residuo determinada de acuerdo con los métodos descritos en Padlan *et al.*, *FASEB J.* 9(1):133-139 (1995), cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Por consiguiente, la invención está también dirigida a un polinucleótido aislado que comprende por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata, o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferiblemente, dichos polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula de unión al antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata, o variantes o formas truncadas del mismo que contienen por lo menos los residuos determinantes de

especificidad para cada una de tres regiones determinantes de complementariedad. En una realización, el polinucleótido comprende por lo menos una de las CDRs que se indican en las Tablas 2-5, siguientes. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable entera de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo quimérico (por ejemplo humanizada). La invención está además dirigida a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

En otra realización, la invención está dirigida a una molécula de unión al antígeno que comprende por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata, o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula de unión al antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata, o variantes o formas truncadas del mismo que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de tres regiones determinantes de complementariedad. En una realización, la molécula de unión al antígeno comprende por lo menos una de las CDRs indicada en las Tablas 2-5, siguientes. En otro aspecto, la molécula de unión al antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada del anticuerpo. En una realización particularmente útil, la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo quimérico, por ejemplo humanizado. La invención está también dirigida a métodos para preparar dichas moléculas de unión al antígeno, y al uso de las mismas en el tratamiento de la enfermedad, particularmente desórdenes de proliferación de células donde el EGFR está expresado, particularmente donde el EGFR está anormalmente expresado (por ejemplo, hiperexpresado) en comparación con el tejido normal de un mismo tipo de célula. Dichos desórdenes incluyen pero no están limitados a

cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón. Los niveles de expresión de EGFR pueden determinarse por métodos conocidos en la técnica, y aquellos que se describen aquí (por ejemplo, a través de ensayo de inmunohistoquímica, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de inmunoenzima, ELISA, citometría de flujo, radio-inmunoensayo, electroinmunotransferencia Western, unión al ligando, actividad de quinasa, etc.).

La invención está también dirigida a un método para dirigir células *in vivo* o *in vitro* que expresen EGFR. Las células que expresan EGFR pueden ser tomadas como objetivo para propósitos terapéuticos (por ejemplo para tratar un desorden que es tratable mediante la interrupción de la señalización intermediada por EGFR, por ejemplo mediante bloqueo de la unión al ligando, o dirigiendo células que expresan EGFR para la destrucción mediante el sistema inmunitario). En una realización, la presente invención está dirigida a un método para dirigir las células que expresan EGFR en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una ABM de la invención. Las células que expresan EGFR pueden ser luego tomadas como objetivo con propósitos de diagnóstico (por ejemplo, para determinar si expresan EGFR, en forma normal o anormal). Por lo tanto la invención está también dirigida a métodos para detectar la presencia de EGFR o de una célula que expresa EGFR, *in vivo* o *in vitro*. Un método para detectar la expresión de EGFR de acuerdo con la presente invención comprende poner en contacto una muestra que debe ser testeada, opcionalmente con una muestra de control, con una ABM de la presente invención, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre ABM y EGFR. La formación del complejo es luego detectada (por ejemplo, mediante ELISA u otros métodos conocidos en la técnica). Cuando se usa una muestra de control con la muestra en ensayo, una diferencia estadísticamente significativa en la formación

de los complejos de ABM-EGFR cuando se compara con las muestras de ensayo y de control es indicativa de la presencia del EGFR en la muestra de ensayo.

TABLA 2

CDR		Secuencia de Nucleótidos	SEC ID NO
CDR1 de cadena pesada	Kabat	GACTACAAGATACAC	54
		GACTACGCCATCAGC	56
		GACTACTATATGCAC	58
		GACTACAAGATATCC	122
	Chothia	GGTTTTACATTCAGTACTGACTAC	60
		GGTTACACATTCAGTACTGACTAC	62
		GGTTATTCATTCAGTACTGACTAC	64
	AbM	GGTTTTACATTCAGTACTACAAGATACAC	66
		GGTTTTACATTCAGTACTACGCCATCAGC	68
		GGTTTTACATTCAGTACTACTATATGCAC	70
		GGTTACACATTCAGTACTACTATATGCAC	72
		GGTTATTCATTCAGTACTACAAGATACAC	74
		GGTTTCACATTCAGTACTACAAGATATCC	124
CDR2 de cadena pesada	Kabat	TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCT ACAATGAAAAGTTCAAGAGC	76
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCT ACGCACAGAAGTTCCAGGGC	78
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCT ACGCACAGAAGTTCCAGGGC	80
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCT ACGCACAGAAGTTTCAGGGC	82
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCT ACAGCCCAAGCTTCCAAGGC	84
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCT ACAACGAGAAGTTCCAAGGC	86
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAAGT	88

CDR		Secuencia de Nucleótidos	SEC ID NO
		ACGCACAGAAGTTCCAGGGC	
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACGT ACGCACAGAAGTTCCAGGGC	90
		TACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCT ACAGCCCAAGCTTCCAAGGC	126
	Chothia	AATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	92
		AACCCTAACAGCGGTTATTCTGAAC	94
		AACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	96
		AbM	TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC
GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC			100
TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC			102
TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCTGAAC			104
TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACG			106
CDR3 de cadena pesada	Kabat Chothia AbM	CTATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGAT GCC	108

TABLA 3

CDR		Secuencia de aminoácido	SEC ID NO
CDR1 de cadena pesada	Kabat	DYKIH	53
		DYAIS	55
		DYYMH	57
		DYKIS	123
	Chothia	GFTFTDY	59
		GYTFTDY	61
		GYSFTDY	63
	AbM	GFTFTDYKIH	65
		GFTFTDYAIS	67

CDR		Secuencia de aminoácido	SEC ID NO
		GFTFTDYMH	69
		GYTFTDYMH	71
		GYSFTDYKIH	73
		GFTFTDYKIS	125
CDR2 de cadena pesada	Kabat	YFNPNSGYSTYNEKFKS	75
		GINPNSGYSTYAQKFQG	77
		YFNPNSGYSTYAQKFQG	79
		WINPNSGYSTYAQKFQG	81
		WINPNSGYSTYSPSFQG	83
		WINPNSGYSTYNEKFQG	85
		YFNPNSGYSNYAQKFQG	87
		YFNPNSGYATYAQKFQG	89
		YFNPNSGYSTYSPSFQG	127
	Chothia	NPNSGYST	91
		NPNSGYSN	93
		NPNSGYAT	95
	AbM	YFNPNSGYST	97
		GINPNSGYST	99
		WINPNSGYST	101
		YFNPNSGYSN	103
		YFNPNSGYAT	105
CDR3 de cadena pesada	Kabat Chothia AbM	LSPGGYYVMDA	107

TABLA 4

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

TABLA 5

CDR	Secuencia de Nucleótidos	SEC ID NO
CDR1 de cadena ligera Kabat	AAAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAAC	112
	CGGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAAT	114
CDR2 de cadena ligera Kabat	AATACAAACAATTTGCAAACA	116
	AATACCAACAACCTTGCAAGACA	118
CDR3 de cadena ligera Kabat	TTGCAGCATAATAGTTTTCCCACG	119

Se sabe que varios mecanismos están involucrados en la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-EGFR, incluyendo el bloqueo de la unión de ligando (por ejemplo, EGF, TGF- α , *etc.*) al EGFR y la subsiguiente activación de las vías de señalización, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y la inducción de la detención del crecimiento o diferenciación terminal.

El anticuerpo monoclonal de rata ICR62 (IgG2b), fue discutido en la publicación de PCT No. WO 95/20045, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Fue dirigida al epítipo C de EGFR, y demostró que inhibía la unión al ligando, inhibía al crecimiento *in vitro* del EGFR que expresa carcinoma de células escamosas, e inducía a la regresión de xenoinjertos de tumores en ratones atímicos (WO 95/20045; Modjtahedi *et al.*, *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)). Como anticuerpo totalmente de roedores, la administración del anticuerpo monoclonal de rata ICR62 a seres humanos, dio como resultado una respuesta HARA en algunos pacientes después de incluso una sola dosis. (WO 95/20045; Modjtahedi *et al.*, *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)).

Se han descrito anticuerpos quiméricos de ratón/humano. Ver, por ejemplo, Morrison, S. L. *et al.*, *PNAS* 11:6851-6854 (Noviembre 1984); Publicación de Patente Europea No. 173494; Boulianna, G. L., *et al.*, *Nature* 312:642 (Diciembre 1984); Neubeiger, M. S. *et al.*, *Nature* 314:268 (Marzo 1985); Publicación de Patente Europea No. 125023; Tan *et al.*, *J. Immunol.* 135:8564 (Noviembre 1985); Sun, L. K. *et al.*, *Hybridoma* 5(1):517 (1986); Sahagan *et al.*, *J. Immunol.* 137:1066-1074 (1986). Ver en general, Muron, *Nature* 312:597 (Diciembre 1984); Dickson, *Genetic Engineering News* 5(3) (Marzo 1985); Marx, *Science* 229:455 (Agosto 1985); y Morrison, *Science* 229:1202-1207 (Septiembre 1985). El IMC-C225 (Erbix®), Imclone) es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra EGFR y que tiene una región variable de ratón y una región constante humana (Ver Herbst and Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)). La porción murina de IMC-225 deriva de M225, que se halló que se unía a EGFR y que inhibía la fosforilación dependiente de tirosinquinasa inducida por EGF, así como también indicó apoptosis en líneas de células tumorales que hiper-expresaban EGFR (Herbst and Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)). Sin embargo, la IM225 produjo una reacción HAMA en pacientes tratados con el anticuerpo en pruebas clínicas

en Fase I (Herbst and Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)). La IMC-225 ha sido ensayada *in vivo* y *in vitro*, y ha sido usada en combinación con terapia y quimioterapia de radiación en una cantidad de tipos de tumores, incluyendo los que están asociados con una baja prognosis (Herbst and Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)). Sin embargo, la IMC-225 ha sido asociada con toxicidades tales como reacciones alérgicas y de la piel en pacientes a los que se les administró el anticuerpo IMC-225 en pruebas clínicas (Herbst and Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)).

En una realización particularmente preferida, el ABM quimérica de la presente invención es un anticuerpo humanizado. Los métodos para humanizar anticuerpos no-humanos son conocidos en el arte. Por ejemplo, los ABMs humanizados de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con los métodos de la Patente Norteamericana No. 5.225.539 de Winter, U.S. Patente Norteamericana No. 6.180.370 de Queen *et al.*, Patente Norteamericana No. 6.632.927 de Adair *et al.*, o Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2003/0039649 de Foote, cuyo contenido completo de cada una se incorpora aquí como referencia. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos "importados", que se recogen típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización puede efectuarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente Norteamericana No. 4.816.567) donde substancialmente menos de un

dominio variable intacto ha sido substituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR han sido substituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Los anticuerpos anti-EGFR humanizados sujeto comprenderán regiones constantes de inmunoglobulina humana.

La elección de los dominios variables humanos, tanto los ligeros como los pesados, para emplearlos en la preparación de anticuerpos humanizados, es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con los que se denomina método de “mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es rastreado contra la genoteca entera de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor es luego aceptada como región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método para seleccionar una secuencia estructural humana es el de comparar la secuencia de cada subregión individual de la estructura de roedor completa (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) o alguna combinación de las subregiones individuales (por ejemplo, FR1 y FR2) contra una genoteca de secuencias de región variable humana conocidas que corresponden a las subregión estructural (por ejemplo, determinado por numeración Kabat), y elegir la secuencia humana para cada subregión o combinación que sea más próxima a la del roedor (Leung, Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2003/0040606A1, publicada el 27 de Febrero del 2003) (cuyo contenido se incorpora en forma incompleta aquí como referencia). Otro método usa una región estructural particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o

pesadas. Puede usarse la misma estructura para varios anticuerpos humanos diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)) (donde el contenido entero de cada uno de ellas se incorpora aquí como referencia).

Es además importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos inmunoglobulina tridimensionales pueden generarse usando programas de computadora con los cuales están familiarizados los expertos en la materia (por ejemplo, InsightII, Accelrys, Inc. (formerly MSI), o at <http://swissmodel.expasy.org>). Estos programas de computadora pueden ilustrar y exhibir probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencia de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del probable rol de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata es decir el análisis de residuos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, puede seleccionarse residuos FR y puede combinarse a partir del receptor y secuencias importadas de manera de lograr la característica de anticuerpo deseada tal como un aumento de la afinidad con los antígenos objetivo. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y muy substancialmente involucrados en la influencia sobre la unión del antígeno.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención comprenden una región Fc humana. En una realización específica, la región constante humana

es IgG1, tal como se indica en la SEC ID NOs 109 y 110, y tal como se indica a continuación:

Secuencia Nucleotídica IgG1 (SEC ID NO:110)

ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGG
ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

Secuencia de Aminoácido IgG1 (SEC ID NO:109)

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sin embargo, las variantes e isoformas de la región Fc humana están también abarcadas en la presente invención. Por ejemplo, las regiones Fc variantes apropiadas para ser usadas en la presente invención pueden producirse de acuerdo con los métodos que se enseñan en la Patente Norteamericana No. 6.737.056 de Presta (variantes de región Fc con función efectora alterada debida a una o más modificaciones de aminoácidos); o en las Solicitudes de Patentes

Norteamericanas Nos. 60/439.498; 60/456.041; 60/514.549; o WO 2004/063351 (las regiones Fc variantes con una afinidad de unión incrementada debido a la modificación de aminoácidos); o en la Solicitud de Patente Norteamericana No. 10/672.280 o WO 2004/099249 (variantes de Fc con unión alterada al FcγR debido a la modificación de aminoácidos), los contenidos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

En otra realización, las moléculas de unión al antígeno de la presente invención son manipuladas por ingeniería genética para tener una afinidad de unión mejorada de acuerdo con, por ejemplo, los métodos descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2004/0132066 de Balint *et al.*, cuya descripción completa se incorpora aquí como referencia.

En una realización, la molécula de unión al antígeno de la presente invención es conjugada con una porción adicional, tal como un radiomarcador o una toxina. Dichos ABMs conjugados pueden producirse mediante numerosos métodos que son bien conocidos en el arte.

Son aplicables una variedad de radionuclidos a la presente invención, y los expertos en la materia están acreditados con la capacidad de determinar rápidamente cual radionucleótido es el más apropiado bajo una variedad de circunstancias. Por ejemplo, el ¹³¹yodo es un radionuclido bien conocido usado para la inmunoterapia dirigida a un objetivo específico. Sin embargo, la utilidad clínica del ¹³¹yodo puede estar limitado por varios factores que incluyen: vida media física de ocho días; deshalogenación del anticuerpo yodado tanto en la sangre como en los sitios tumorales; y características de emisión (por ejemplo, componente gamma grande), que puede ser sub-óptima para depositar una dosis localizada en un tumor. Con el advenimiento de agentes quelantes superiores, la oportunidad de unir grupos quelantes metálicos a proteínas a aumentado las oportunidades de utilizar otros radionúclidos tales como ¹¹¹indio y a la ⁹⁰itrio. El ⁹⁰itrio provee varios beneficios para la utilización en aplicaciones radioinmunoterapéuticas: la vida media de 64 horas de ⁹⁰itrio es suficientemente prolongada para permitir la acumulación de anticuerpo en el tumor y, a diferencia por ejemplo, del ¹³¹yodo, ⁹⁰itrio es un emisor beta puro de alta energía sin ninguna irradiación gamma que acompaña su descomposición, con un rango en el tejido

de diámetros de células de 100 a 1000. Además, la cantidad mínima de radiación que penetra permite la administración externa del paciente de los anticuerpos marcados con $^{90}\text{itrio}$. Adicionalmente, la internalización del anticuerpo marcado no es necesaria para la muerte de las células, y la emisión local de la radiación ionizante debería ser letal para las células tumorales adyacentes que carecen del antígeno objetivo.

Las dosis de tratamiento únicas eficaces (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de los anticuerpos anti-EGFR marcados con $^{90}\text{itrio}$, están comprendidas dentro de un rango de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis para un tratamiento único eficaz no-ablativas de médula de anticuerpos anti-EGFR marcados con $^{131}\text{yodo}$, están en un rango comprendido entre 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Cada dosis ablativa de tratamiento único eficaz (por ejemplo, puede requerir trasplante autólogo de médula ósea) de los anticuerpos anti-EGFR marcados con $^{131}\text{yodo}$, puede estar en un rango comprendido entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferiblemente entre 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Conjuntamente con un anticuerpo anti-EGFR quimérico, debido a la vida media de circulación más prolongada frente a los anticuerpos murinos, las dosis ablativas no de médula para un tratamiento único eficaz de anticuerpos anti-EGFR quiméricos marcados con $^{131}\text{yodo}$, están en un rango comprendido entre desde aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, más preferiblemente menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios para, por ejemplo, el marcador $^{111}\text{indio}$, son típicamente inferiores a aproximadamente 5 mCi.

Con respecto a los anticuerpos anti-EGFR radiomarcados, la terapia con los mismos puede producirse también usando un tratamiento de terapia único o usando tratamientos múltiples. Debido al componente radionúclido, se prefiere que antes del tratamiento, las células progenitoras periféricas ("PSC") o de médula ósea ("BM") sean "cosechadas" en pacientes que experimentan toxicidad de médula ósea potencialmente fatal resultante de la radiación. Las BM y/o PSC son cosechadas usando técnicas convencionales y luego son purgadas y

congeladas para la posible re-infusión. Adicionalmente, se prefiere que antes del tratamiento se efectúe un estudio de dosimetría de diagnóstico usando un anticuerpo marcado de diagnóstico (por ejemplo, usando $^{111}\text{indio}$) en el paciente, un propósito de lo cual es el de asegurar que el anticuerpo terapéuticamente marcado (usando por ejemplo, $^{90}\text{itrio}$) no es que quede innecesariamente "concentrado" en ningún órgano o tejido normal.

En una realización preferida, la presente invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido en la Tabla 7 siguiente. En una realización preferida, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que se muestra en la Tabla 6 siguiente. La invención está dirigida además a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia nucleotídica mostrada en la Tabla 6 siguiente. En otra realización, la invención está dirigida a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácido de la Tabla 7. La invención abarca también un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de cualquiera de las construcciones de la Tabla 7 con substituciones de aminoácido constitutivas.

TABLA 6

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	SEC ID NO
ICR62 VH	CAGGTCAACCTACTGCAGTCTGGGGCTGCACTGGTGA AGCCTGGGGCCTCTGTGAAGTTGTCTTGCAAAGGTTCT GGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACTGGGTGAA GCAGAGTCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGGTAT TTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAATGAAAAG TTCAAGAGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCAC CGATACAGCCTATATGGAGCTTACCAGTCTGACATCTG AGGACTCTGCAACCTATTACTGTACAAGACTATCCCCA GGGGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAG CTTCAGTCACTGTCTCCTC	2
I-HHA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT CTGGATTTACATTCACTGACTACGCCATCAGCTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACGCACA GAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAA TCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	4
I-HHB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTT CTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACGCACA GAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAA TCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	6

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	SEC ID NO
I-HHC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTT CTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACTGGGTG CGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACAATGAA AAGTTCAAGAGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAAT CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTAT CCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCA AGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	8
I-HLA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCT CTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCACTGGGTG CGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGC TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACGCACA GAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCGCCGACACG TCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGA GATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	10
I-HLB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTT CTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCCACTGGGTG CGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA TACTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACGCACA GAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATGACCGCCGACACG TCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGA GATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	12

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	SEC ID NO
I-HLC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGAGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTT CTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCCACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA TACTTCAACCCTAACAGCGGTTACAGTACTTACAACGA GAAGTTCAAGAGCCGGGTCACCATGACCGCCGACACG TCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGA GATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGGGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	14
I-HHD	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCT CTGGTTTCACATTCACTGACTACAAGATACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACGCACA GAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAA TCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	16
I-HHE	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTT CTGGTTTCACATTCACTGACTACAAGATATCCTGGGTG CGACAGGCTCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAT ATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACGCACAG AAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAAT CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTAT CCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCA AGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	18

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	SEC ID NO
I-HHF	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTT CTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAACTACGCACA GAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAA TCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	20
I-HHG	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTT CTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACGTACGCACA GAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAA TCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	22
I-HLA1	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCT CTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGC TGGATCAATCCTAACAGTGTTATAGTACCTACAGCCC AAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAG TCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGA AGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	24

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	SEC ID NO
I-HLA2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCT CTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGC TGGATCAATCCTAACAGTGTTATAGTACCTACAACGA GAAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAG TCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGA AGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	26
I-HLA3	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCT CTGGTTACACATTCACTGACTACTATATGCACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGC TGGATCAATCCTAACAGTGTTATAGTACCTACAGCCC AAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAG TCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGA AGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	28
I-HLA4	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCT CTGGTTACACATTCACTGACTACTATATGCACTGGGTG CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGC TGGATCAATCCTAACAGTGTTATAGTACCTACAACGA GAAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAG TCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGA AGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACT ATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGC CAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	30

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	SEC ID NO
I-HLA5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGAAGA AGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTC TGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCACTGGGTGC GACAGGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGCT GGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAGCCCA AGCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGT CCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAA GGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTA TCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCC AAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	32
I-HLA6	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGAAGA AGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTC TGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCACTGGGTGC GACAGGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGCT GGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAACGAG AAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGT CCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAA GGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTA TCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCC AAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	34
I-HLA7	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGAAGA AGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTC TGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCCACTGGGTGC GACAGGGCCCGCGGACAACGGCTCGAGTGGATCGGCT GGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAACGAG AAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGT CCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAA GGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTA TCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCC AAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	36

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	SEC ID NO
I-HLA8	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGAAGA AGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTC TGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCCACTGGGTGC GACAGGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAT ATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACGCACAG AAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAAT CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTAT CCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCA AGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	38
I-HLA9	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGCGAGTCGTTGAAGATCTCCTGCAAGGGTTC TGGTTATTCATTCACTGACTACAAGATCCACTGGGTGC GACAGGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAT ATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACGCACAG AAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAAT CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTAT CCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCA AGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	40
I-HLA10	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGCGAGTCGTTGAAGATCTCCTGCAAGGGTTC TGGTTATTCATTCACTGACTACAAGATCCACTGGGTGC GACAGATGCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTA CTTCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAGCCCAA GCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTC CATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAG GCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTAT CCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCA AGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG	120
Secuencia de Señal VH	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAG CAGCCACAGGAGCCCACTCC	42

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	SEC ID NO
ICR62 VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCATTCTGTCTGC ATCTGTGGGAGACAGAGTCACTATCAACTGCAAAGCAA GTCAGAATATTAACAATTACTTAAACTGGTATCAGCAAA AGCTTGGAGAAGCTCCCAAACGCCTGATATATAATACA AACAAATTTGCAAACAGGCATCCCATCAAGGTTCACTGG CAGTGGATCTGGTACAGATTACACACTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGCACATATTTCTGCTTG CAGCATAATAGTTTTCCACGTTTGGAGCTGGGACCAA GCTGGAACTGAAACGTACG	44
I-KC	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTCTGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCCGGGCA AGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGGTACCAGCA GAAGCCAGGGAAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATAAT ACCAACAACCTTGCAGACAGGCGTCCCATCAAGGTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCCTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGCACCTATTACT GCTTGCAGCATAATAGTTTTCCACGTTTGGCCAGGGC ACCAAGCTCGAGATCAAGCGTACG	46
Secuencia de Señal VL	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCTCC TGCTGCTCTGGTTCCAGGTGCCAGGTGT	48
I-KA	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTCTGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCCGGGCA AGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGGTACCAGCA GAAGCCAGGGAAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATAAT ACCAACAACCTTGCAGACAGGCGTCCCATCAAGGTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATACACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGCACCTATTACT GCTTGCAGCATAATAGTTTTCCACGTTTGGCCAGGGC ACCAAGCTCGAGATCAAGCGTACGGTG	50
I-KB	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTCTGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCAAAGCA AGTCAGAATATTAACAATTACTTAAACTGGTACCAGCA GAAGCCAGGGAAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATAAT ACCAACAACCTTGCAGACAGGCGTCCCATCAAGGTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATACACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGCACCTATTACT GCTTGCAGCATAATAGTTTTCCACGTTTGGCCAGGGC ACCAAGCTCGAGATCAAGCGTACGGTG	52

TABLA 7

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA AMINOÁCIDO	SEC ID NO
ICR62 VH	QVNLLQSGAALVKPGASVKLSCKGSGFTFTDYKIHWWKQSH GKSLEWIGYFNPNSGYSTYNEKFKSKATLTADKSTDTAYMEL TSLTSEDSATYYCTRLSPGGYYVMDAWGQGASVTVSS	1
I-HHA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYAISWVRQAP GQGLEWMGGINPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	3
I-HHB	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWWVRQAP GQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	5
I-HHC	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRVTITADKSTSTAYME</u> <u>LSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	7
I-HLA	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHWWVRQA</u> <u>PGQGLEWMGWINPNSGYSTYAQKFQGRVTMTADTSISTAYM</u> <u>ELSRLRSDDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	9
I-HLB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGFTFTDYKIHWWVRQAP GQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTMTADTSISTAYM ELSRLRSDDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	11
I-HLC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGFTFTDYKIHWWVRQAP GQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRVTMTADTSISTAYME LSRLRSDDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	13
I-HHD	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME</u> <u>LSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	15
I-HHE	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKISWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME</u> <u>LSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	17
I-HHF	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGYFNPNSGYSNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME</u> <u>LSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	19
I-HHG	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGYFNPNSGYATYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME</u> <u>LSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	21

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA AMINOÁCIDO	SEC ID NO
I-HLA1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYIMHWVRQA</u> <u>PGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	23
I-HLA2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	25
I-HLA3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	27
I-HLA4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	29
I-HLA5	<u>QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYIMHWVRQA</u> <u>PGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	31
I-HLA6	<u>QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYIMHWVRQA</u> <u>PGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSISTAYL</u> <u>QWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	33
I-HLA7	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYKIHWRQAR GQRLEWIGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	35
I-HLA8	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYKIHWRQAP GQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	37
I-HLA9	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWRQAPG</u> <u>QGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMEL</u> <u>SSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	39
I-HLA10	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWRQMP</u> <u>GKGLEWMGYFNPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS</u>	121
Secuencia de Señal VH	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	41
ICR62 VL	<u>DIQMTQSPSFLSASVGDRVITINCKASQNINNYLNWYQQKLGE</u> <u>APKRLIYNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT</u> <u>YFCLQHNSFPTFGAGTKLELKRT</u>	43

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA AMINOÁCIDO	SEC ID NO
I-KC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGINNYLNWYQQKPGK APKRLIYNTNNLQTVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFAT YYCLQHNSFPTFGQGGTKLEIKRT	45
Secuencia de Señal VL	MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC	47
I-KA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGINNYLNWYQQKPGK APKRLIYNTNNLQTVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFAT YYCLQHNSFPTFGQGGTKLEIKRTV	49
I-KB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQNINNYLNWYQQKPGK APKRLIYNTNNLQTVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFAT YYCLQHNSFPTFGQGGTKLEIKRTV	51

En otra realización, la presente invención está dirigida a un vector de expresión y/o una célula hospedera que comprende uno o más polinucleótidos aislados de la presente invención.

En general, puede usarse cualquier tipo de línea de célula de cultivo para expresar la ABM de la presente invención. En una realización preferida, células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, célula de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insectos, o células de plantas, son usadas como línea de célula de base para generar las células hospederas manipuladas genéticamente de la invención.

La eficacia terapéutica de las ABMs de la presente invención puede realizarse produciéndolas en una célula hospedera que expresa además un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi. En otra realización preferida, la expresión de los ABMs de la presente invención en una célula hospedera que expresa un nucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII da como resultado ABMs con un aumento de la afinidad de unión al recepto Fc y con un aumento de la función efectora. Por consiguiente, en una realización, la presente invención está dirigida a una célula hospedera que comprende (a) un ácido nucleico aislado que comprende una

secuencia que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII; y (b) un polinucleótido aislado que codifica una ABM de la presente invención, tal como un anticuerpo quimérico, primatizado o humanizado que se une a EGFR humano. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización Golgi es el dominio de localización de la manosidasa II. Los métodos para generar dichos polipéptidos de fusión y usarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras incrementadas han sido descritos en la Solicitud de Patente Provisional No. 60/495.142 y Publicación de la Solicitud de Patente Norteamericana No. 2004/0241817 A1, cuyos contenidos completos de cada una se incorporan expresamente aquí como referencia. En otra realización preferida, la ABM quimérica es un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, que tiene la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo quimérico comprende una Fc humana. En otra realización preferida, el anticuerpo es primatizado o humanizado.

En una realización, uno o varios polinucleótidos que codifican una ABM de la presente invención, pueden expresarse bajo un control constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulada. Los sistemas de expresión regulada incluyen, pero no están limitados a, sistemas de expresión regulado con tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión lac-switch, un sistema de expresión inducible por glucocorticoide, un sistema promotor inducible por temperatura, y un sistema de expresión inducible por el metal metalotioneina. Si varios de los ácidos nucleicos diferentes que codifican un ABM de la presente invención están comprendidos dentro del sistema de célula hospedera, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo mientras que otros se expresarán bajo el control de un promotor regulado. El nivel de expresión máximo se considera que es el nivel más alto posible de la expresión estable de un polipéptido que no tiene un efecto adverso significativo sobre el régimen de crecimiento de las células, y podrá ser determinado usando experimentación de rutina. Los niveles de expresión se determinan por métodos generalmente conocidos en la técnica que incluyen análisis de electroinmunotransferencia Western usando un anticuerpo específico

para ABM o un anticuerpo específico para una etiqueta de péptido fusionada al ABM; y análisis de electroinmunotransferencia Northern. En una alternativa adicional, el polinucleótido puede estar ligado operativamente a un gen reportero; los niveles de expresión de una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata, se determinan viviendo una señal que está correlacionada con el nivel de expresión del gen reportero. El gen reportero puede transcribirse conjuntamente con los ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptido de fusión en forma de una molécula de ARNm única; sus secuencias codificadoras respectivas pueden estar ligadas ya sea por sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o por incrementador de traducción independiente de extremo (CITE). El gen reportero puede ser traducido conjuntamente con por lo menos un ácido nucleico que codifica ABM quimérico (es decir, humanizado) que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata de manera que se forma una cadena polipeptídica única. Los ácidos nucleicos que codifican AMBs de la presente invención pueden estar operativamente ligados al gen reportero bajo el control de un promotor único, tal como el ácido nucleico que codifica al polipéptido de fusión y el gen reportero que son transcritos en una molécula de ARN que está alternativamente empalmada en dos moléculas de ARN mensajero (ARNm) separadas; una de las ARNm resultantes es traducida a dicha proteína informante, y la otra es traducida a un polipéptido de fusión.

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

Pueden utilizarse una variedad de sistemas vectores de expresión hospedero para expresar la secuencia codificadora de las ABMs de la presente invención. Preferiblemente, se usan células de mamífero como sistemas de células hospederas transfectadas con vectores de expresión de ADN plásmido recombinante o ADN cósmido, que contienen la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión. Más preferiblemente, las células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto, o células de planta, se usan como sistema de célula hospedera. Algunos ejemplos de los sistemas de expresión y de los métodos de selección se describen en las referencias siguientes, y en las referencias de las mismas: Borth *et al.*, *Biotechnol. Bioen.* 71(4):266-73 (2000-2001), in Werner *et al.*, *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80 (1998), in Andersen and Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123 (2002), in Chadd and Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001), y en Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). En realizaciones alternativas, pueden usarse otras sistemas de células hospederas de eucarióticas, incluyendo células de levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen la secuencia codificadora de una ABM de la presente invención tal como los sistemas de expresión que se enseñan en la Solicitud de patente Norteamericana No. 60/344.169 y WO 03/056914 (métodos para producir glicoproteína de tipo humano en una célula hospedera eucariótica no humana) (el contenido de cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad); sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contiene una secuencia codificadora de una ABM quimérica que tiene substancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata; sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus mosaico del coliflor, CaMV; virus mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plásmido recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contiene la secuencia codificadora del ABM de la invención, incluyendo, pero sin

limitarlo a, los sistemas de expresión que se enseñan en la Patente Norteamericana No. 6.815.184 (métodos para la expresión y secreción de polipéptidos biológicamente activos a partir de lentejas de agua manipulada genéticamente); WO 2004/057002 (producción de proteínas glicosiladas en células de planta de briofitos mediante introducción de un gen de glicosil transferasa) y la WO 2004/024927 (métodos para generar proteínas que no son de plantas heterólogas extracelulares en protoplastos de moho); y las Solicitudes de Patentes Norteamericanas Nos. 60/365.769, 60/368.047, y WO 2003/078614 (procesamiento de glicoproteínas en plantas transgénicas que comprende una enzima GnTIII de mamífero funcional) (el contenido de cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad); o sistemas de células de animales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (*por ejemplo*, adenovirus, virus de vaccinia) que incluyen líneas de células manipuladas por la ingeniería genética para contener copias múltiples del ADN que codifica las ABM quiméricas que tienen sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata ya sea amplificado en forma estable (CHO/dhfr) o amplificado en forma inestable en cromosomas doble-minuto (*por ejemplo*, líneas celulares de murino). En una realización, el vector que comprende el/los polinucleótido(s) que codifica/n la ABM de la invención es policistrónico. Asimismo, en una realización de ABM discutida anteriormente, está un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

Para los métodos de esta invención, la expresión estable es generalmente preferida a la expresión transitoria debido a que típicamente logra resultados más reproducibles y también es más propensa al a producción a gran escala. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de réplica virales, las células hospederas pueden transformarse con los respectivos ácidos nucleicos codificadores controlados por elementos de control de expresión apropiados (*por ejemplo*, promotores, incrementadores, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción de ADN extraño, las células manipuladas genéticamente pueden dejarse desarrollar durante 1-2 días en un medio

enriquecido, y luego se traspasan a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite la sección de células que integran establemente el plásmido en sus cromosomas y se desarrollan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse dentro de las líneas de células.

Pueden usarse una variedad de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarlo a, genes de timidinquinasa del virus de herpes simplex (Wigler *et al.*, *Cell* 11:223 (1977)), hypoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* 22:817 (1980)), que pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Asimismo, puede usarse resistencia a los antimetabolitos como base para la selección de dhfr, lo cual confiere resistencia a los genes de metotrexato (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567 (1989); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)); y hygromycin, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, *Gene* 30:147 (1984)). Recientemente, se han descritos seleccionados adicionales, por ejemplo trpB, que permiten a las células utilizar indol en lugar de triptofano; hisD, que permiten a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047 (1988)); sistema de glutamina sintasa; y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluormetil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, *in: Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

La presente invención está dirigida además a un método para modificar el perfil de glicosilación de los ABMs de la presente invención que se producen mediante una células hospederas, que comprende expresar en dicha célula hospedera un ácido nucleico que codifica un ABM de la invención y un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII, o un vector que comprende dichos ácidos nucleicos. Preferiblemente, el polipéptido modificado es IgG o un fragmento del mismo que comprende la región Fc. En una realización

particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

Las ABMs modificadas producidas por las células hospederas de la invención exhiben un aumento de la afinidad de unión al recetor Fc y/o un aumento de la función efectora como resultado de la modificación. En una realización particularmente preferida la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que contiene la región Fc. Preferiblemente, el aumento de afinidad de unión al receptor Fc se incrementa por la unión al receptor activador Fcγ, tal como el receptor FcγRIIIa. El aumento de la función efectora es preferiblemente un aumento en uno o más de los siguientes: aumento de la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, aumento de la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP), aumento de la secreción de citoquina, aumento de la absorción de antígeno intermediada por un complejo inmunitario mediante células presentadoras de antígeno, aumento de la citotoxicidad celular intermediada por Fc, aumento de la unión a las células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a células polimorfonucleares (PMNs), aumento de la unión a monocitos, aumento del entrecruzamiento a anticuerpos unidos a el objetivo, aumento señalización directa inductoras de apoptosis, aumento de la maduración células dendríticas, y aumento de cebado de células T.

La presente invención está también dirigida a un método para producir una ABM de la presente invención que tiene oligosacáridos modificados en una célula hospedera que comprende (a) cultivar una célula hospedera manipulada por ingeniería genética de manera de expresar por lo menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de una ABM de acuerdo con la presente invención, donde dicho polipéptido que tiene actividad GnTIII se expresa en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de dicha ABM producida mediante dicha célula hospedera; y (b) aislar dicha ABM. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII. En una realización particularmente preferida, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi.

Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II o GnTI. Alternativamente, el dominio de localización Golgi está seleccionado del grupo que consiste: el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII, y el dominio de localización de una fcositransferasa de núcleo α 1-6. Las ABMs producidas por los métodos de la presente invención, tienen un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y/o un aumento de la función efectora. Preferiblemente, el aumento de la función efectora es uno o más de los siguientes: aumento de la citotoxicidad celular intermediada por Fc (que incluye un aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), aumento de la fagocitosis celular que depende de anticuerpos (ADCP), aumento de la secreción de citoquina, aumento de la absorción de antígeno intermediada por complejo inmunitario, mediante células presentadoras de antígeno, aumento de unión a las células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, aumento de apoptosis inducida por señalización directa, aumento del entrecruzamiento de anticuerpos unido al objetivo, aumento de maduración de células dendríticas, o aumento de cebado de células T. El aumento de la afinidad de unión al receptor Fc es preferiblemente un aumento de la unión a los receptores activadores Fc tales como Fc γ RIIIa. En una realización particularmente preferida, el ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

En otras realización, la presente invención está dirigida a una ABM quimérica que tiene substancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpos ICR62 de rata producidos por lo métodos de la invención, que tiene un aumento de la proporción de oligosacáridos bisectados en la región Fc de dicho polipéptido. Se ha contemplado que dicha ABM abarca anticuerpos y fragmentos del mismo que comprenden la región Fc. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos bisectados en la región Fc de la ABM es de por lo menos 50%, más preferiblemente, de por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, o de por lo menos 90%, y aún más preferiblemente por lo menos 90-95% de los oligosacáridos totales. En una realización más, la ABM producida por los

métodos de la invención tiene una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos mediante los métodos de la presente invención. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es de por lo menos 50%, preferiblemente, de por lo menos 60% a 70%, más preferiblemente de por lo menos 75%. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser de tipo híbrido o complejo. En una realización particularmente preferida, la ABM producida por las células hospederas y los métodos de la invención tiene un incremento de la proporción de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc. Los oligosacáridos no fucosilados, bisectados pueden ser híbridos o complejos. Específicamente, los métodos de la presente invención pueden usarse para producir ABMs en las cuales por lo menos el 15%, más preferiblemente por lo menos el 20%, más preferiblemente por lo menos el 25%, más preferiblemente por lo menos el 30%, más preferiblemente por lo menos el 35% de los oligosacáridos en la región Fc del ABM son bisectados, no fucosilados. Los métodos de la presente invención pueden usarse también para producir polipéptidos en los cuales por lo menos el 15%, más preferiblemente por lo menos 20%, más preferiblemente por lo menos el 25%, más preferiblemente por lo menos el 30%, más preferiblemente por lo menos el 35% de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son híbridos bisectados no fucosilados.

En otra realización, la presente invención está dirigida a una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata manipulado genéticamente para tener una función efectora incrementada y/o una afinidad de unión al receptor Fc incrementada, que se produce por los métodos de la invención. Preferiblemente, la función efectora incrementada es una o más de las siguientes: aumento de la citotoxicidad celular intermediada por Fc (que incluye el incremento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), aumento de la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), aumento de la secreción de citoquina, aumento de la absorción de antígeno intermediada por complejo inmunitario, mediante células

presentadoras de antígeno, aumento de la unión a las células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, aumento de la señalización directa inductora de apoptosis, aumento del entrecruzamiento de anticuerpos ligados al objetivo, aumento de la maduración de células dendríticas o aumento del cebado de células T. En una realización preferida, el aumento de la afinidad de unión al receptor Fc, se incrementa por la unión a un receptor activador de Fc, más preferiblemente FcγRIIIa. En una realización, la ABM es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

La presente invención está además dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden las ABMs de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención está además dirigida al uso de dichas composiciones farmacéuticas en el método de tratamiento de cáncer. Específicamente, la presente invención está dirigida a un método para el tratamiento de cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la invención.

La presente invención provee además métodos para la generación y uso de sistemas de células hospederas para la producción de glicoformas de las ABMs de la presente invención, que tienen un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc, preferiblemente un aumento de la unión a los receptores activadores de Fc y/o que tiene un aumento de las funciones efectoras, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La metodología de glicoingeniería que puede usarse con las ABMs de la presente invención ha sido descrita en forma más detallada en la Patente Norteamericana N° 6.602.684, la

publicación de la solicitud de Patente Norteamericana N° 2004/0241817 A1, la publicación de la solicitud de Patente Norteamericana N° 2003/0175884 A1, solicitud de Patente Norteamericana Provisional N° 60/441.307 y WO 2004/065540, cuyos contenidos completos de cada una de ellas se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Las ABMs de la presente invención pueden estar alternativamente glicomanipuladas para tener residuos de fucosa reducidos en la región Fc de acuerdo con las técnicas descritas en la publicación de solicitud de Patente Norteamericana N° 2003/0157108 (Genentech), o en EP 1 176 195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 y la publicación de las solicitudes de Patentes Norteamericanas Nos. 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140 (Kyowa). El contenido de cada uno de estos documentos se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Las ABMs glicomanipuladas de la invención pueden producirse también en sistemas de expresión que producen glicoproteínas modificadas tales como las que se enseñan en la publicación de solicitud de Patente Norteamericana N° 60/344.169 y WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) o en WO 2004/057002 y WO 2004/024927 (Greenovation), el contenido de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Generación De Líneas De Células Para La Producción De Proteínas Con Un Patrón De Glicosilación Alterado

La presente invención provee sistema de expresión de células hospederas para la generación de las ABMs de la presente invención que tienen patrones de glicosilación modificados. En particular, la presente invención provee sistemas de células hospederas para la generación de glicoformas de las ABMs de la presente invención que tienen un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la invención provee sistemas de expresión de células hospederas seleccionadas o manipuladas por ingeniería genética para expresar un polipéptido que tiene actividad GnTIII. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es

un polipéptido de fusión que comprende dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo. Específicamente, dichos sistemas de expresión de células hospederas pueden ser manipuladas por ingeniería de manera de contener una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene GnTIII, ligado operativamente a un sistema promotor constitutivo o regulado.

En una realización específica, la presente invención provee una célula hospedera que ha sido modificada por ingeniería genética para expresar por lo menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene una actividad GNTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente heterólogo Golgi. En un aspecto, la célula hospedera es manipulada por ingeniería dentro de una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos un gen que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo.

En general, cualquier tipo de línea de célula cultivada, incluyendo las líneas de células discutidas anteriormente, pueden usarse como base para manipular por ingeniería las líneas de células hospederas de la presente invención. En una realización preferida, las células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células de plantas se usan como línea de célula base para generar las células hospederas manipuladas por ingeniería de la invención.

La invención contempla abarcar cualquier célula hospedera manipulada por ingeniería que exprese un polipéptido que tiene actividad GnTIII, incluyendo un

polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo tal como el que se define aquí.

Uno o varios ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene actividad GnTIII puede expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente un sistema de expresión regulado. Dichos sistemas son bien conocidos en la técnica e incluyen los sistemas discutidos anteriormente. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican polipéptidos de fusión que tienen actividad GnTIII y que comprenden el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo, están comprendidas dentro del sistema de célula hospedera, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión de los polipéptidos de fusión que tienen actividad GnTIII, están determinados por métodos que son generalmente conocidos en la técnica, incluyendo análisis de electroinmunotransferencia Western, análisis de electroinmunotransferencia Northern, análisis de expresión génica informante o medición de la actividad GnTIII. Alternativamente, puede emplearse una lectina que se une a los productos biosintéticos del GnTIII, por ejemplo la lectina E₄-PHA. Alternativamente, puede usarse un ensayo funcional que mide el aumento de la unión al receptor Fc, o el aumento de la función efectuada intermediada por los anticuerpos producidos por las células manipuladas por ingeniería con el ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII.

Identificación De Transfectantes o Transformantes Que Expresan La Proteína Que Tiene Un Patrón de Glicosilación Modificado

Las células hospederas que contienen la secuencia codificadora de una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata, que expresa los productos

génicos biológicamente activos, puede ser identificada mediante por lo menos cuatro realizaciones generales; (a) hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN; (b) la presencia o ausencia de funciones génicas “marcadoras”; (c) verificación del nivel de transcripción medido por la expresión de las transcripciones ARNm respectiva en la célula hospedera; y (d) detección del producto génico medido por inmunoensayo o por su actividad biológica.

En la primera realización, la presencia de la secuencia codificadora de una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata, y la secuencia codificadora del polipéptido que tiene actividad GnTIII puede ser detectada por la hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN usando sondas que comprenden secuencias nucleotídicas que son homólogas de las respectivas secuencias codificadoras, respectivamente, o porciones o derivados de éstas.

En la segunda realización, el sistema recombinante de vector de expresión/hospedero puede identificarse y seleccionarse en base a la presencia o ausencia de ciertas funciones génicas “marcadoras” (por ejemplo, actividad de timidina quinasa, resistencia a los antibióticos, resistencia al metotrexato, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia codificadora de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y la secuencia codificadora del polipéptido que tiene actividad GnTIII, se insertan dentro de una secuencia génica marcadora del vector, los recombinantes que contienen las secuencias de codificación respectivas, pueden identificarse por la ausencia de la función génica marcadora. Alternativamente, el gen marcador puede colocarse en tandem con las secuencias codificadoras bajo el control del mismo promotor o un promotor diferente usado para controlar la expresión de las secuencias codificadoras. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia

codificadora de la ABM de la invención y la secuencia codificadora del polipéptido que tiene actividad GnTIII.

En la tercera realización, la actividad transcripcional para la región codificadora de la ABM de la invención o un fragmento de la misma, y la secuencia codificadora del polipéptido que tiene actividad GnTIII, puede verificarse mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, el ARN puede aislarse y analizarse mediante electroinmunotransferencia Northern usando una sonda homóloga de las secuencias codificadoras de la ABM de la invención o un fragmento de las mismas, y la secuencia codificadora del polipéptido que tiene actividad GnTIII o porciones particulares del mismo. Alternativamente, los ácidos nucleicos totales de la célula hospedera pueden extraerse y ensayarse para la hibridación a dichas sondas.

En la cuarta realización, la expresión de los productos de proteína puede verificarse inmunológicamente, por ejemplo mediante electroinmunotransferencias Western, inmunoensayos tales como radioinmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a enzimas y similares. El ensayo final del éxito de los sistemas de expresión sin embargo involucra la detección de los productos génicos biológicamente activos.

Generación Y Uso de las ABMs Que Tienen Un Aumento De La Función Efectora Que Incluye Citotoxicidad Celular Dependiente De Anticuerpos

En realizaciones preferidas, la presente invención provee glicoformas de ABMs quiméricos (es decir, humanizados) que tienen sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata y que tienen un aumento de la función efectora que incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La glicosilación manipulada por ingeniería de los anticuerpos ha sido previamente descrita. Ver por ejemplo, la Patente

Norteamericana N° 6.602.684, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Las pruebas clínicas de anticuerpos monoclonales no conjugados (mAbs) para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, han proporcionado recientemente resultados alentadores. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997); Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Una IgG1 no conjugada, quimérica ha sido aprobada para el linfoma no hodquiniiano de células B foliculares o de bajo grado. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), mientras que otros mAb no conjugados, una IgG1 humanizada, que tiene como objetivo tumores de mama sólidos, ha demostrado también resultados prometedores en pruebas clínicas de fase III. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Los antígenos de estos dos mAbs están expresados altamente en sus respectivas células tumorales, y los anticuerpos son intermediarios en una potente destrucción de tumores mediante células efectoras *in vitro* e *in vivo*. En contraste, muchos otros mAbs no conjugados con especificidades tumorales finas, no pueden desencadenar funciones efectoras de suficiente potencia para resultar clínicamente útiles. Frost *et al.*, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus *et al.*, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). Para algunos de estos mAbs más débiles, se ha ensayado corrientemente terapia agregada con citoquinas. La adición de citoquinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), mediante el aumento de la actividad y de la cantidad de linfocitos circulantes. Frost *et al.*, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus *et al.*, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). ADCC, un ataque lítico sobre células que es blanco del anticuerpo, se desencadena por unión de los receptores leucocíticos a la región constante (Fc) de los anticuerpos. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997).

Una realización diferente, pero complementaria para aumentar la actividad de ADCC de las IgG1s no conjugadas, consiste en manipular por ingeniería la

región Fc del anticuerpo. Los estudios de manipulación de ingeniería en proteínas han demostrado que las FcγRs interactúan con la región de bisagra más baja, del dominio CH2 de IgG. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996). Sin embargo, la unión FcγR requiere también la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente a la Asn 297 conservada, en la región CH2. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996); Wright and Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31 (1997), sugieren que cualquiera del oligosacárido y el polipéptido contribuyen ambos directamente al sitio de interacción o que el oligosacárido es necesario para mantener una conformación de polipéptido CH2 activa. La modificación de la estructura de oligosacárido puede ser por lo tanto explorada como un medio para aumentar la afinidad de la interacción.

Una molécula IgG es portadora de dos oligosacáridos N-ligados en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Tal como con cualquier glicoproteína, se produce un anticuerpo como población de glicoformas que comparten la misma estructura polipeptídica pero que tienen diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación. Los oligosacáridos que se encuentran normalmente en la región Fc de la IgG del suero son de un tipo biantenarico complejo (Wormald *et al.*, *Biochemistry* 36:130-38 (1997), con un bajo nivel de ácido siálico terminal y con bisección de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y con un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación de núcleo. Algunos estudios sugieren que la estructura de carbohidrato mínima requerida para la unión de FcγR radica dentro del núcleo de oligosacáridos. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996).

Las líneas de células derivadas de ratón o de hámster usadas en la industria y en la academia para la producción de mAbs terapéuticos no conjugados, adhieren normalmente los determinantes oligosacáridos requeridos a los sitios Fc. Las IgGs expresadas en estas líneas de células carecen, sin embargo, de la GlcNAc biseccionante que se encuentra en bajas cantidades en las

IgGs del suero. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). En contraste, se observó recientemente que un IgG1 humanizado, producido por mieloma de rata, (CAMPATH-1H) es portador de un GlcNAc bisectante en algunas de sus glicoformas. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). El anticuerpo derivado de célula de rata alcanza una actividad ADCC máxima similar *in vitro* como anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas de células estándar pero en concentraciones de anticuerpo significativamente inferiores.

El antígeno CAMPATH está presente normalmente en altos niveles en las células de linfomas, y este mAb quimérico tiene una alta actividad en ausencia de un GlcNAc bisectante. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). En la vía de glicosilación ligada a N, se agrega un GlcNAc bisectante a GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986).

Los estudios previos usaron una línea de célula CHO productora de un anticuerpo único, que fue previamente manipulado por ingeniería genética para expresar, de una manera externamente regulada, diferentes niveles de una enzima génica GnTIII clonada (Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Esta realización estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de GnTIII y la actividad de ADCC del anticuerpo modificado. Por lo tanto, la invención contempla un anticuerpo quimérico recombinante o un fragmento del mismo con la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata que tiene una glicosilación alterada resultante del aumento de la actividad de GnTIII. La actividad incrementada de GnTIII da como resultado un aumento del porcentaje de oligosacáridos bisectados, así como también una disminución en el porcentaje de los residuos fucosa, en la región Fc de la ABM. Este anticuerpo, o fragmento del mismo tiene un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y un aumento de la función efectora. Además, la invención está dirigida al fragmento de anticuerpo y a las proteínas de fusión que comprenden una región que es

equivalente a la región Fc de las inmunoglobulinas. En una realización preferida, el anticuerpo está humanizado.

Aplicaciones Terapéuticas de ABMs Producidos de Acuerdo con los Métodos de la Invención.

En su sentido más amplio, las ABMs de la presente invención pueden usarse como células objetivo *in vivo* o *in vitro* que expresan el EGFR. Las células que expresan el EGFR, pueden ser elegidas para diagnóstico o para propósitos terapéuticos. En un aspecto, las ABMs de la presente invención pueden usarse para detectar la presencia de EGFR en una muestra. En otro aspecto las ABMs de la presente invención pueden usarse para inhibir o reducir la transducción de señales intermediada por EGFR en células que expresan EGFR en la superficie. El EGFR se expresa anormalmente (es decir, hiperexpresa) en muchos tumores humanos en comparación con tejidos no tumorales del mismo tipo de célula. Por lo tanto, las ABMs de la invención son particularmente útiles en la prevención de la formación de tumores, en la erradicación de tumores y en la inhibición del crecimiento tumoral. Mediante bloqueo de la unión de los ligandos de EGFR a EGFR, las ABMs de la invención inhiben la activación de las células tumorales que dependen de EGF incluyendo la fosforilación de tirosina de EGFR, el aumento del régimen de acidificación extracelular y la proliferación de células. Las ABMs de la invención actúan también para detener el ciclo celular, para causar la apoptosis de las células objetivo (es decir, las células tumorales) y para inhibir la angiogénesis y/o la diferenciación de las células objetivo. Las ABMs de la invención pueden usarse para tratar cualquier tumor que expresa EGFR. Las enfermedades malignas que pueden tratarse con las ABMs de la invención incluyen, pero no están limitadas a, carcinomas de células escamosos y epidérmicos, carcinomas pulmonares de células no pequeñas, gliomas, cáncer

pancreático, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello y carcinomas de células renales.

Las ABMs de la presente invención pueden usarse solas para dirigir y matar células tumorales *in vivo*. Las ABMs pueden usarse también conjuntamente con un agente terapéutico apropiado para tratar carcinoma humano. Por ejemplo, las ABMs pueden usarse en combinación con métodos de tratamiento estándar o convencionales tales como quimioterapia, terapia de radiación o bien pueden conjugarse o ligarse con un fármaco terapéutico o toxina, así como también con una linfoquina o con un factor de crecimiento inhibidor de tumores, para liberar el agente terapéutico al sitio del carcinoma. Los conjugados de la ABMs de esta invención que son de importancia primordial son (1) inmunotoxinas (conjugados de la ABM y una porción citotóxica) y (2) ABMs marcadas (por ejemplo, radio-marcadas, marcadas con enzimas o marcadas con fluorcromo) en las cuales el marcador provee un medio para identificar los complejos inmunitarios que incluyen el ABM marcado. Los ABMs pueden usarse también para inducir lisis a través del procedimiento de complemento natural, y para interactuar con las células citotóxicas dependientes de anticuerpos que están normalmente presentes.

La porción citotóxica de la inmunotoxina puede ser un fármaco citotóxico, o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano o vegetal, o un fragmento enzimáticamente activo ("cadena A") de dicha toxina. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se usaron son cadena A de difteria, fragmentos activos no adherentes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica carantia, inhibidor de curcina, crotina, sapaonaria

officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina. En otra realización, las ABMs están conjugadas con fármacos anticáncer de moléculas pequeñas. Los conjugados de la ABM y dichas porciones de citoquina se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales. Ejemplos de dichos reactivos son SPDP, IT, derivados bifuncionales de imidoésteres tales como HCl de adipimidato de dimetilo, ésteres activos tales como suberato de disuccinimidilo, aldehídos tales como glutaraldehído, compuestos bis-azido tales como bis-(p-azidobenzoil)-hexanodiamina, derivados de bis-diazonio tales como diisocianatos de bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina tales como 2,6-diisocianato de tolileno y compuestos de flúor bis-activos tales como 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno. La porción de lisado de una toxina puede unirse al fragmento Fab de las ABMs. Se conocen en la técnica toxinas adicionales apropiadas, tal como se evidencia en por ejemplo, la solicitud de Patente Norteamericana publicada N° 2002/0128448, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

En una realización, una ABM glicomanipulada quimérica (por ejemplo, humanizada), que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata, se conjuga con la cadena A de ricina. Más ventajosamente, la cadena A de ricina esté glicosilada y producida a través de medios recombinantes. Un método ventajoso para preparar la inmunotoxina de ricina ha sido descrito en Vitetta et al., *Science* 238, 1098 (1987), que se incorpora aquí como referencia.

Cuando se usa para matar células de cáncer humano *in vitro* para propósitos de diagnóstico, los conjugados se agregarán típicamente al medio de cultivo de células en una concentración de por lo menos aproximadamente 10 nM. La formulación y el modo de administración para el uso *in vitro* no es crítico. Normalmente se usarán formulaciones acuosas que son compatibles con el medio

de cultivo o de perfusión. La citotoxicidad puede leerse por técnicas convencionales para determinar la presencia o el grado de cáncer.

Tal como se discutió anteriormente, puede prepararse un radiofarmacéutico citotóxico para el tratamiento del cáncer, mediante conjugación de un isótopo radioactivo (por ejemplo, I, Y, Pr) para una ABM quimérica glicomanipulada que tiene sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata. El terminal "porción citotóxica" tal como se usa aquí incluye dichos isótopos.

En otra realización, se llenan liposomas con un fármaco citotóxico y dichos liposomas son recubiertos con las ABMs de la presente invención. Debido a que existen muchas moléculas de EGFR en la superficie de la célula maligna que expresa EGFR, este método permite liberar grandes cantidades de fármaco al tipo de célula correcta.

Las técnicas para conjugar dichos agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas (ver, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunoobjectivoing of Drugs in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)).

Otras aplicaciones terapéuticas para las ABMs de la invención incluyen la conjugación o enlace, por ejemplo mediante técnicas de ADN recombinante, a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico y al uso de este conjugado de anticuerpo-enzima en combinación con el profármaco para

convertir el profármaco en un agente citotóxico en el sitio del tumor (ver por ejemplo Senter et al., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the *in vitro* and *in vivo* Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49:5789-5792 (1989); y Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," *FASEB J.* 4:188-193 (1990)).

Otro uso terapéutico más para las ABMs de la invención involucra el uso ya sea sin conjugar, en presencia de complemento, o como parte de un conjugado anticuerpo-fármaco o anticuerpo-toxina, para remover las células tumorales de la médula ósea de los pacientes con cáncer. De acuerdo con esta realización, la médula ósea autóloga puede purgarse *ex vivo* mediante tratamiento con el anticuerpo, y la médula puede ser nuevamente infundida en el paciente [ver por ejemplo, Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8(2):81-88 (1988)].

Además, se contempla que la invención comprende una inmunotoxina de cadena sencilla que comprende dominios de unión al antígeno que permiten sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo ICR62 de rata (por ejemplo polipéptidos que comprenden los CDRs del anticuerpo ICR62 de rata) y que comprende además un polipéptido de toxina. Las inmunotoxinas de una cadena sencilla de la invención pueden usarse para tratar carcinoma humano *in vivo*.

Similarmente, una proteína de fusión que comprende por lo menos la región de unión al antígeno de una ABM de la invención unida a por lo menos una porción funcionalmente activa de una segunda proteína que tiene actividad anti-tumoral, por ejemplo una linfoquina u oncostatina, puede usarse para tratar carcinoma humano *in vivo*.

La presente invención provee un método para matar selectivamente células tumorales que expresan EGFR. Este método comprende hacer reaccionar el inmunoconjugado (por ejemplo la inmunotoxina) de la invención con dichas células tumorales. Estas células tumorales pueden ser de carcinoma humano.

Adicionalmente, esta invención provee un método para el tratamiento de carcinomas (por ejemplo carcinomas humanos) in vivo. Este método comprende administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que contiene por lo menos uno de los inmunoconjugados (por ejemplo la inmunotoxina) de la invención.

En otro aspecto, la invención está dirigida a un método mejorado para tratar desórdenes de proliferación de células en las cuales se expresa el EGFR, particularmente en las cuales el EGFR se expresa en forma anormal (por ejemplo hiperexpresado), incluyendo cánceres de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una ABM de la presente invención a un sujeto humano que lo necesita. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo anti-EGFR de glico-ingeniería, con una especificidad de unión sustancialmente igual a la del anticuerpo ICR62 de rata. En otra realización preferida, el anticuerpo está humanizado. Ejemplos de desórdenes de proliferación celular que pueden tratarse con una ABM de la presente invención incluyen pero no están limitadas a neoplasmas localizados en: el abdomen, huesos, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenal, paratiroidea, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, región torácica y sistema urogenital.

De manera similar, otros desórdenes de proliferación de células pueden tratarse mediante las ABMs de la presente invención. Ejemplos de dichos

desórdenes de proliferación de células incluyen pero no están limitados a: hipergamaglobulinemia, desórdenes linfoproliferativos, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, Síndrome de Sezary, Macroglobulinemia de Waldenström, Enfermedad de Gaucher, histiocitosis y cualquier otra enfermedad de proliferación celular, además de neoplasia, localizada en un sistema de órganos enumerado anteriormente.

De acuerdo con la práctica de esta invención, el sujeto puede ser un ser humano, equino, porcino, bovino, murino, canino, felino y aves. Se incluyen también otros animales de sangre caliente en esta invención.

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

La invención está además dirigida a métodos para el tratamiento de enfermedades o desórdenes no malignos en un mamífero, que se caracterizan por una activación o producción anormal de EGFR o uno o más ligandos de EGFR, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de las ABMs de la invención. El sujeto tendrá generalmente células que expresan EGFR, por ejemplo en un tejido enfermo del mismo, tal como las ABMs de la invención que son capaces de unirse a células dentro del sujeto.

La activación o expresión anormal de EGFR o de un ligando de EGFR puede ocurrir en células de un sujeto, por ejemplo de tejido enfermo del sujeto. La activación anormal de EGFR puede atribuirse a una amplificación, hiperexpresión o producción aberrante del EGFR y/o del ligando de EGFR. En una realización de la invención, se llevará a cabo un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si ocurre una producción anormal o activación de EGFR (o ligando de EGFR) en el sujeto. Por ejemplo, la amplificación génica y/o la hiperexpresión de

EGFR y/o ligando puede ser determinada. Varios ensayos para determinar dicha amplificación/hiperexpresión se encuentran disponibles en el arte e incluyen los ensayos IHC, FISH y ensayos de pérdida de antígeno descritos anteriormente. Alternativamente o adicionalmente, los niveles de un ligando de EGFR, tal como TGF- α en o asociado con la muestra pueden determinarse de acuerdo con procedimientos conocidos. Dichos ensayos pueden detectar proteína y/o ácido nucleico que la codifica en la muestra a ensayarse. En una realización, los niveles de ligando de EGFR en una muestra pueden determinarse usando inmunohistoquímica (IHC); ver por ejemplo, Scher *et al. Clin. Cancer Research* 1:545-550 (1995). Alternativamente o adicionalmente, se pueden evaluar los niveles de ácido nucleico codificador de EGFR en la muestra a ensayar; por ejemplo a través de FISH, electroinmunotransferencia southern o técnicas de PCR.

Además, la hiperexpresión o amplificación de EGFR o de ligando de EGFR pueden evaluarse usando un ensayo de diagnóstico in vivo, por ejemplo mediante la administración de una molécula (tal como un anticuerpo) que une la molécula que se desea detectar y es etiquetada con un marcador detectable (por ejemplo un isótopo radioactivo) y el paciente es escaneado externamente para la localización del marcador.

Alternativamente, pueden detectarse los heterodímeros de EGFR, especialmente los heterodímeros EGFR-ErbB2, EGFR-ErbB3 o EGFR-ErbB4, en el paciente, por ejemplo en tejido enfermo del mismo, antes de la terapia. Se encuentran disponibles varios métodos para detectar interacciones de proteína-proteína no covalentes o indicar de otra manera la proximidad entre proteínas de interés. Ejemplos de métodos para detectar heterodímeros EGFR incluyen sin limitación métodos a base de inmuoafinidad tales como inmunoprecipitación; transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET) (Selvin, *Nat.*

Struct. Biol. 7:730-34 (2000); Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.* 129:1543-58 (1995); y Nagy *et al.*, *Cytometry* 32:120-131 (1998)); co-localización de EGFR ya sea con ErbB2 o ErbB3 usando técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta convencionales y microscopía de escaneo láser confocal; formación de imagen por escaneo con láser (LSI) para detectar la unión del anticuerpo y para la co-localización del EGFR ya sea con ErbB2 o ErbB3 en un formato de alto rendimiento, tal como una placa de micropozos (Zuck *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11122-11127 (1999)); o sistema de ensayo eTag/m (Aclara Bio Sciences, Mountain View, Calif.; y solicitud de Patente Estadounidense N° 2001/0049105, publicada el 6 de diciembre de 2001).

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

Las composiciones de ABM de la invención pueden administrarse usando modos convencionales de administración que incluyen pero que no están limitados a, endovenoso, intraperitoneal, oral, intralinfático o administración directamente dentro del tumor. Se prefiere la administración endovenosa.

En un aspecto de la invención, se preparan las formulaciones terapéuticas que contienen ABMs de la invención para almacenamiento mediante mezcla de un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado, con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de

formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los que los reciben, en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las ABMs de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para tratar una enfermedad o un desorden que se caracteriza por una actividad anormal de EGFR o un ligando de EGFR tal como un tumor, ya sea solo o en terapia de combinación con por ejemplo un agente quimioterapéutico y/o terapia de radiación. Ejemplos de formulaciones de anticuerpos anti-EGFR se describen en Herbst and Shen, *Cancer* 94(5):1593-1611. Los agentes quimioterapéuticos apropiados incluyen cisplatina, doxorrubicina, topotecan, paclitaxel, vinblastina, carboplatina y etoposida.

Las formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea se describen en WO97/04801. Tales formulaciones liofilizadas pueden ser

reconstituidas con un diluyente apropiado hasta una concentración elevada de proteína y luego la formulación reconstituida puede administrarse subcutáneamente al mamífero que se trata aquí.

La formulación presente puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular tratada, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan entre sí. Por ejemplo, puede ser conveniente proveer además un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, citoquina o un agente inmunosupresor (por ejemplo uno que actúa sobre las células T, tal como ciclosporina o un anticuerpo que se une a las células T, por ejemplo uno que se une a LFA-1). La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de antagonista presente en la formulación, del tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento, y de otros factores discernidos anteriormente. Estos generalmente se usan en las mismas dosis y con las vías de administración que se usaron anteriormente o desde aproximadamente 1 a 99% de las dosis empleadas hasta el presente.

Los ingredientes activos pueden estar también atrapados en microcápsulas preparadas por ejemplo por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo) respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition*, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el antagonista, donde dichas matrices tienen la forma de artículos configurados, por ejemplo

películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinil alcohol)), poliláctidos (Patente Estadounidense N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se usan para la administración in vivo deben ser esterilizadas. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las composiciones de la invención pueden estar en una variedad de formas de dosificación que incluyen pero que no están limitadas a soluciones o suspensiones líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas y soluciones inyectables o infusibles. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

Las composiciones de la invención incluyen también preferentemente portadores y adyuvantes convencionales farmacéuticamente aceptable conocidos en la materia tales como albúmina de suero humano, intercambiadores de iones, alúmina, lecitina, sustancias reguladoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio y sales o electrolitos tales como sulfato de protamina.

El modo de administración y el régimen de dosificación más eficaces para las composiciones farmacéuticas de esta invención dependen de la gravedad y del curso de la enfermedad, de la salud y respuesta del paciente al tratamiento y de la opinión del médico que lo trata. Por consiguiente, las dosis de composiciones deben ser evaluadas para cada paciente individual. Sin embargo, una dosis eficaz de las composiciones de la invención estará generalmente dentro

de un rango de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 2000 mg/kg. En una realización, la dosis eficaz está en el rango de desde aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15,0 mg/kg. En una realización más específica, la dosis eficaz está en el rango de desde aproximadamente 1,5 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis está en el rango de desde aproximadamente 1,5 mg/kg hasta aproximadamente 4,5 mg/kg, o desde aproximadamente 4,5 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. La dosis de la presente invención puede ser cualquier dosis dentro de estos rangos incluyendo pero sin limitarlo a 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg o 15,0 mg/kg.

Las moléculas aquí descritas pueden estar en una variedad de formas de dosificación que incluyen pero que no están limitadas a soluciones o suspensiones líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas y soluciones inyectables o infusibles. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

Las dosis de la presente invención pueden estar determinadas en algunos casos mediante el uso de biomarcadores predictivos. Los biomarcadores predictivos son marcadores moleculares que se usan para determinar (es decir, observar y/o cuantificar) un patrón de expresión y/o activación de los genes o proteínas relacionadas con el tumor, o de los componentes celulares de una vía de señalización relacionada con un tumor. Para verificar los efectos biológicos de las terapias dirigidas a un objetivo en los tejidos tumorales y para correlacionar estos efectos con la respuesta clínica, ayudaría la identificación de las vías de

supervivencia y crecimiento predominantes que son operativas en tumores, estableciendo de este modo un perfil de la terapia que tendrá probabilidades de responder bien y a la inversa, proveer un fundamento para diseñar estrategias para superar la resistencia. Por ejemplo, los biomarcadores para terapia anti-EGFR pueden comprender moléculas que están en la vía de señalización cadena abajo de EGFR que conduce a un desorden de proliferación de células que incluye pero que no está limitado a Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, STAT5 (Mitchell, *Nature Biotech.* 22: 363-364 (2004); Becker, *Nature Biotech* 22:15-18 (2004); Tsao and Herbst, *Signal* 4:4-9 (2003)). Los biomarcadores para terapia anti-EGFR pueden comprender también receptores del factor de crecimiento tales como EGFR, ErbB-2 (HER2/neu) y ErbB-3 (HER3), y pueden ser pronosticadores positivos o negativos de la respuesta del paciente a una terapia anti-EGFR. Por ejemplo, se determinó que el receptor del factor de crecimiento ErbB-3 (HER3) era un biomarcador de pronóstico negativo para el anticuerpo anti-EGFR ABX-EGF (publicación de solicitud de Patente Estadounidense N° 2004/0132097 A1).

Los biomarcadores pronosticadores pueden medirse mediante ensayos celulares que son bien conocidos en la técnica y que incluyen pero que no están limitados a inmunohistoquímica, citometría de flujo, inmunofluorescencia, ensayos de captura y detección, y ensayos de fase reversa y/o los ensayos establecidos en la publicación de solicitud de Patente Estadounidense N° 2004/0132097 A1, cuyos contenidos en su totalidad se incorporan aquí como referencia. Los biomarcadores pronosticadores de terapia anti-EGFR por sí mismos pueden ser identificados de acuerdo con las técnicas que se indican en la publicación de solicitud de Patente Estadounidense N° 2003/0190689 A1, cuyos contenidos en su totalidad se incorporan aquí como referencia.

En un aspecto, la presente invención provee un método para el tratamiento de un desorden relacionado con EGFR que comprende pronosticar una respuesta

para una terapia anti-EGFR en un sujeto humano que necesita tratamiento, mediante el ensayo de una muestra del sujeto humano antes de recibir la terapia con una o una pluralidad de reactivos que detectan la expresión y/o activación de los biomarcadores pronosticadores para un desorden relacionado con EGFR tal como cáncer; determinar un patrón de expresión y/o activación de uno o más de los biomarcadores pronosticadores donde el patrón pronostica la respuesta del sujeto humano a la terapia anti-EGFR; y administrar a un sujeto humano que se ha pronosticado que responde positivamente al tratamiento anti-EGFR, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una ABM de la presente invención. Tal como se usa aquí, un *sujeto humano* al que se ha pronosticado que responde *positivamente a un tratamiento anti-EGFR*, es uno para el cual el anti-EGFR tendrá un efecto mensurable sobre el desorden relacionado con EGFR (por ejemplo regresión/encogimiento del tumor) y para el cual los beneficios de terapia anti-EGFR no son superados por efectos adversos (por ejemplo toxicidad). Tal como se usa aquí, una muestra significa cualquier muestra biológica de un organismo, particularmente de un ser humano que comprende una o más células que incluyen células únicas de cualquier origen, muestras de tejido o biopsias que han sido removidos de los órganos tales como de mama, pulmón, tracto gastrointestinal, piel, cuello uterino, ovario, próstata, riñón, cerebro, cabeza y cuello o cualquier otro órgano o tejido del cuerpo, y otras muestras del cuerpo que incluyen pero que no están limitadas a sustancias grasas, esputos, secreciones, fluido cerebroespinal, bilis, sangre, fluido linfático, orina y heces.

La composición que comprende una ABM de la presente invención se formulará, dosificará y administrará de manera coherente con una buena práctica médica. Los factores que hay que tener en cuenta en este contexto incluyen la enfermedad o desorden particular a ser tratado, el mamífero particular que se

trata, el estado clínico del paciente individual, la causa de la enfermedad o desorden, el sitio de liberación del agente, el método de administración, el esquema de administración y otros factores conocidos por los médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista que debe administrarse estará gobernada por dichas consideraciones.

Como proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que se administra por vía parenteral, por dosis, estará en el rango de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, con un rango inicial típico de antagonista usado dentro del rango de aproximadamente 2 a 10 mg/kg. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz está en el rango de desde aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15,0 mg/kg. En una realización más específica, la dosis eficaz está en el rango de desde aproximadamente 1,5 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis está en el rango de desde aproximadamente 1,5 mg/kg hasta aproximadamente 4,5 mg/kg, o desde aproximadamente 4,5 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. La dosis de la presente invención puede ser también cualquier dosis dentro de estos rangos incluyendo pero sin limitarlo a 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg o 15,0 mg/kg.

En una realización preferida, al ABM es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo humanizado. Las dosis apropiadas para dicho anticuerpo no conjugado están por ejemplo dentro del rango de desde aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m². Por ejemplo, puede administrarse al paciente una o más dosis de sustancialmente menos de 375 mg/m² del anticuerpo, por ejemplo

donde la dosis está en el rango de desde aproximadamente 20 mg/m² hasta aproximadamente 250 mg/m², por ejemplo desde aproximadamente 50 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m².

Además, puede administrarse una o más dosis iniciales de anticuerpo seguido de una o más dosis subsiguientes donde la dosis de mg/m² del anticuerpo de las dosis subsiguientes exceden la dosis de mg/m² del anticuerpo en la dosis inicial. Por ejemplo, la dosis inicial puede estar en el rango de desde aproximadamente 20 mg/m² hasta aproximadamente 250 mg/m² (por ejemplo desde aproximadamente 50 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m²) y la dosis subsiguiente puede estar en el rango de desde aproximadamente 250 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m².

Tal como se observó anteriormente, sin embargo, estas cantidades sugeridas de ABM están sujetas en gran medida a la discreción terapéutica. El factor clave para seleccionar una dosis apropiada y para programarla es el resultado obtenido tal como se indicó anteriormente. Por ejemplo, inicialmente pueden ser necesarias dosis relativamente elevadas para el tratamiento de las enfermedades ya declaradas y agudas. Para obtener los resultados más eficaces dependiendo de la enfermedad o desorden, el antagonista se administrará lo más pronto posible a la aparición de la primera señal, diagnóstico, aparición u ocurrencia de la enfermedad o desorden o durante las remisiones de la enfermedad o desorden.

En el caso de anticuerpos anti-EGFR usados para tratar tumores, generalmente se han logrado resultados terapéuticos óptimos con una dosis que es suficiente para saturar completamente los receptores EGF en las células objetivo. La dosis necesaria para lograr la saturación dependerá de la cantidad de receptores EGF expresados por célula tumoral (los cuales pueden variar significativamente entre diferentes tipos de tumores). Concentraciones de suero

tan bajas como 30 nM han sido eficaces en el tratamiento de ciertos tumores mientras que para lograr un efecto terapéutico óptimo con otros tumores, pueden ser necesarias concentraciones por arriba de 100 nM. La dosis necesaria para lograr la saturación para un tumor determinado puede ser fácilmente determinado in vitro mediante radioinmunoensayo o inmunoprecipitación.

En general, para la terapia de combinación con radiación, un régimen terapéutico apropiado involucra 8 infusiones semanales de una ABM anti-EGFR de la invención, en una dosis de carga de 100-500 mg/m² seguido de dosis de mantenimiento de 100-250 mg/m² y radiación en una cantidad de 70,0 Gy a una dosis de 2,0 Gy al día. Para terapia de combinación con quimioterapia, un régimen terapéutico apropiado involucra administrar una ABM anti-EGFR de la invención como dosis de carga/mantenimiento semanalmente de 100/100 mg/m², 400/250 mg/m² o 500/250 mg/m² en combinación con cisplatina en una dosis de 100 mg/m² cada tres semanas. Alternativamente, puede usarse gemcitabina o irinotecan en lugar de cisplatina.

La ABM de la presente invención se administra por cualquier medio apropiado incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonaria e intranasal, y si se desea para tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, endovenosa, intra-arterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el antagonista puede administrarse convenientemente por infusión pulsátil, por ejemplo con dosis declinantes del antagonista. Preferentemente, la dosis se administra mediante inyecciones, más preferentemente inyecciones endovenosas o subcutáneas, dependiendo en parte si la administración es breve o crónica.

Pueden administrarse otros compuestos tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores y/o citoquinas con los presentes antagonistas. La administración combinada incluye coadministración

usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente existe un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Sería evidente que la dosis de la composición de la invención requerida para lograr la curación puede ser más reducida con una optimización de programa.

De acuerdo con la práctica de la invención, el portador farmacéutico puede ser un portador lípido. El portador lípido puede ser un fosfolípido. Además, el portador lípido puede ser un ácido graso. Asimismo, el portador lípido puede ser un detergente. Tal como se usa aquí, un detergente es cualquier sustancia que altera la tensión superficial de un líquido, generalmente disminuyéndola.

En un ejemplo de la invención, el detergente puede ser un detergente no iónico. Ejemplos de detergentes no iónicos incluyen pero no están limitados a polisorbato 80 (también conocido como Tween 80 o (polioxietilensorbitano monooleato), Brij y Triton (por ejemplo Triton WR-1339 y Triton A-20).

Alternativamente, el detergente puede ser un detergente iónico. Un ejemplo de un detergente iónico incluye pero no está limitado a bromuro de alquiltrimetilamonio.

Adicionalmente, de acuerdo con la invención, el portador lípido puede ser un liposoma. Tal como se usa en esta solicitud, un "liposoma" es cualquier membrana unida a una vesícula que contiene cualquier molécula de la invención o combinaciones de las mismas.

En incluso otra forma de realización, la invención se refiere a una ABM de acuerdo con la presente invención para ser usado como medicamento, en particular para el uso en un tratamiento o profilaxis de cáncer o para usar en una afección o lesión precancerosa. El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de

pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioalveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma intraocular o cutáneo, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma del tejido liso, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, leucemia crónica o aguda, linfomas linfocíticos, neoplasmas del sistema nervioso central (CNS), tumores de la médula espinal, glioma cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenomas de la pituitaria, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres mencionados o una combinación de los mismos. La lesión o afección precancerosa incluye, por ejemplo, el grupo formado por oral leucoplasia oral, queratosis actínica (queratosis solar), pólipos precanceros del colon o recto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome de cáncer de colon no poliposo hereditario (HNPCC), esófago de Barrett, displasia de la vejiga, y afecciones cervicales precancerosas.

Preferentemente dicho cáncer se selecciona del grupo formado por cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de cerebro.

Incluso otra forma de realización es el uso de la ABM de acuerdo con la

presente invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis del cáncer. Cáncer se define anteriormente.

Preferentemente dicho cáncer se selecciona del grupo formado por cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de cerebro.

Además preferiblemente, dicha molécula de unión al antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente efectiva de desde aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg.

Además más preferiblemente, dicha molécula de unión al antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente efectiva de desde aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg.

Además más preferiblemente, dicha molécula de unión al antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente efectiva de desde aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg.

Además más preferiblemente, dicha molécula de unión al antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente efectiva de desde aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg.

Muy preferiblemente, dicha molécula de unión al antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente efectiva de aproximadamente 1,5 mg/kg.

Incluso más preferiblemente, dicha molécula de unión al antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente efectiva de aproximadamente 4,5 mg/kg.

Incluso más preferiblemente, dicha molécula de unión al antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente efectiva de aproximadamente 12 mg/kg.

Artículos de manufactura

En otra realización de la invención, se provee un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento de los desórdenes descritos

anteriormente. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta o inserto de paquete que está sobre o asociado con el recipiente. Los recipientes apropiados incluyen por ejemplo botellas, frascos, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la enfermedad y puede tener una puerta de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa con una solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable mediante una aguja hipodérmica para inyección). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-EGFR. El inserto de paquete o etiqueta indica que la composición se usa para tratar la enfermedad de elección tal como un desorden o enfermedad no maligna, donde la enfermedad o desorden involucra una activación anormal o la producción de un receptor EGFR y/o un ligando EGFR, por ejemplo una enfermedad o desorden hiperproliferativo benigno. Además, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un primer anticuerpo que se une a EGFR y que inhibe el crecimiento de las células que hiperexpresan EGFR; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo donde la composición comprende un segundo anticuerpo que se une a EGFR y bloquea la activación del ligando de un receptor EGFR. El artículo de manufactura en esta realización de la invención puede comprender además un inserto para un paquete que indica que la primera y segunda composición de anticuerpo puede usarse para tratar una enfermedad o desorden no maligno de una lista de dichas enfermedades o desórdenes en la sección de Definición anterior. Además, el inserto para el paquete puede instruir al usuario de la composición (que comprende el anticuerpo que se une a EGFR y bloquea la activación del ligando de un receptor EGFR) para combinar la terapia con el anticuerpo y cualquiera de las terapias adjuntas descritas en la sección

precedente (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido a EGFR, un agente anti-angiogénico, un agente inmunosupresor, un inhibidor de tirosina quinasa, un compuesto anti-hormonal, un cardioprotector y/o una citoquina). Alternativamente o adicionalmente, el artículo de manufactura puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los ejemplos siguientes explican la invención en forma más detallada. Las preparaciones y ejemplos siguientes se proveen para capacitar a los expertos en la materia para comprender más claramente y llevar a la práctica la presente invención. La presente invención sin embargo, no está limitada en su alcance por realizaciones ejemplificadas, que se proveen como ilustraciones de aspecto único de la invención solamente, y los métodos que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. En realidad, varias modificaciones de la invención además de las descritas aquí resultarán obvias para los expertos en la materia a partir de la descripción precedente y de los dibujos que se acompañan. Tales modificaciones entran dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Todas las patentes, solicitudes y publicaciones citadas en esta solicitud se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de las posiciones de los residuos de aminoácidos específicos en los ejemplos siguientes están de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. A menos que

se indique lo contrario, los materiales y métodos usados para preparar los anticuerpos descritos en estos ejemplos de trabajo están de acuerdo con lo que se estableció en los ejemplos de la solicitud de Patente Estadounidense N° 10/981.736, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Realización de un aceptor de alta homología

La búsqueda de la estructura que el aceptor de alta homología se llevó a cabo alineando la secuencia de proteínas ICR62 de rata en una colección de secuencias de línea germinal humana y seleccionando la secuencia humana que mostraba la identidad de secuencia más elevada, mientras conservaba todo los residuos canónicos a un nivel funcional. Aquí, la secuencia 1-e de la familia VH1 dentro de la base de datos VBase se seleccionó para constituir un aceptor estructural para la cadena ligera. En estas dos estructuras aceptoras, se injertaron las tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y/o los residuos determinantes de especificidad de aquellos CDRs de los dominios variables ligeros y pesados de ICR62 de rata. Debido a que la región de la estructura 4 no forma parte de la región variable del gen de línea germinal, la alineación para esa posición se efectuó individualmente. La región JH6 se eligió para la cadena pesada y la región JK2 se eligió para la cadena ligera. La modelación molecular del dominio de inmunoglobulina diseñada reveló una posición fuera de la CDR1 Kabat que requirió potencialmente residuos aminoácidos murinos en lugar de los humanos fuera del CDR. La reintroducción de los residuos aminoácidos murinos en la estructura humana generaría lo que se denomina "retromutaciones". Por

ejemplo, el residuo aminoácido aceptor humano en la posición 27 Kabat (Glicina en 1-e), fue mutada nuevamente a un residuo tirosina. Para demostrar la importancia de los residuos para la unión al antígeno, se diseñaron variantes de anticuerpo humanizadas que incluían o bien omitían las retromutaciones. La cadena ligera de anticuerpo humanizado no requirió ninguna retromutación. Después de diseñar la secuencia de proteínas, se sintetizaron las secuencias de ADN codificadoras de estas proteínas tal como se detalla a continuación.

Realización de la estructura mixta

Para evitar la necesidad de introducir retromutaciones de posiciones críticas (críticas para retener buenas funciones de afinidad de unión al antígeno o del anticuerpo) de la estructura aceptora humana, se investigó si la región de estructura 1 (FR1), las regiones 1 (FR1) y 2 (FR2) conjuntamente, o la región de estructura 3 (FR3) de un anticuerpo funcionalmente humanizado podría ser reemplazado por secuencias de anticuerpos humanos que ya tienen residuos donadores, o residuos de aminoácido que son funcionalmente equivalentes a los residuos donadores, en posiciones importantes de los residuos en la secuencia de la línea germinal humana natural. Para las estructura de VH 1, 2 y 3 de la secuencia VH de ICR62 de rata, fueron alineadas individualmente con secuencias de línea germinal humana. Aquí, no se usó la identidad de secuencia más elevada para elegir estructuras aceptoras; en lugar de esto se llevó a cabo un apareamiento de varios residuos críticos. Esos residuos críticos comprenden los denominados residuos canónicos, y también aquellos residuos en las posiciones 27, 28, y 30 (numeración Kabat), que están fuera de la definición de CDR1 de Kabat, pero que a menudo están involucrados en la unión de antígeno. Además, residuos críticos son aquellos que muestran una importante interacción con los CDRs, tal como puede determinarse usando moderación molecular. La secuencia

de IMGT IGHV1-58 (Acceso No. M29809), IGHV5-51 (Acceso No. M99686), así como también la secuencia VBase 1-02 de la familia VH1, fueron elegidas como las secuencias apropiadas para reemplazar FR1, 2, o 3. Resumiendo: la IGHV1-58 mostró un modelo promisorio en las posiciones 27 a 30 Kabat, pero no cumplió con los criterios para la posición canónica 71. La IGHV5-51 tiene un apareamiento de residuo 71 de modo que su FR3 podría ser usado. Asimismo su FR1 está próximo a la secuencia FR1 deseada.

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

Después de diseñar la secuencia de proteína, se sintetizaron las secuencias de ADN que codificaban estas proteínas tal como detallará a continuación. Usando esta realización no fueron necesarias retromutaciones en la mayoría de las construcciones de la cadena pesada, para retener buenos niveles de unión al antígeno. La cronología y el razonamiento de las construcciones de estructura mixta se explica en la sección de resultados.

Síntesis de los genes de anticuerpos

Después de haber diseñado la secuencia de aminoácido de la región de anticuerpo humanizada, se generó la secuencia de ADN. Los datos de la secuencia de ADN de las regiones de estructura individual se hallaron en las bases de datos (por ejemplo IMGT o VBase) para las secuencias de la línea germinal humana. La información de la secuencia de ADN de las regiones CDR se recogió una secuencia publicada del anticuerpo ICR62 de rata (ver por ejemplo, la Publicación PCT WO 95/20045). Con estas secuencias, la secuencia de ADN completa fue virtualmente reunida. Una vez obtenidos estos datos de secuencia de ADN, se introdujeron los sitios de restricción de diagnóstico en la

secuencia virtual mediante la introducción de mutaciones silentes, lo cual creó sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción. Para obtener la cadena de ADN física, se llevó a cabo una síntesis de genes (ver por ejemplo Wheeler *et al.* 1995). En este método, se diseñaron oligonucleótidos a partir de los genes de interés, de tal modo que se derivó una serie de oligonucleótidos a partir del cadena codificador, y otra serie a partir de la cadena no codificador. Los extremos 3' y 5' de cada oligonucleótido (excepto el primero y el último de la hilera) muestran siempre secuencias complementarias para los dos cebadores derivados de la cadena opuesta. Cuando se ponen estos oligonucleótidos dentro de un amortiguador de reacción apropiado para cualquier polimerasa estable al calor, y se les agrega Mg^{2+} , dNTPs y una polimerasa de ADN, cada uno de los oligonucleótidos se extiende desde su extremo 3'. El extremo 3' recientemente formado de un cebador se acopla luego con el cebador siguiente de la cadena opuesta, y su secuencia se extiende más bajo las condiciones apropiadas para la elongación de cadena de ADN dependiente del modelo. El producto final fue clonado en un vector convencional para la propagación en *E. coli*.

Producción de anticuerpos

Para la construcción de los vectores de expresión de cadena pesada y ligera anti-EGFR quiméricos (es decir de región V completamente de rata y de región C humana), y humanizados, se agregaron secuencias líder de cadena pesada y cadena ligera humana (para la secreción) cadena arriba de las secuencias de ADN de región variable. Cadena abajo de las regiones variables, se agregaron a regiones constantes de la IgG1 para la cadena pesada, y la región constante kappa para la cadena ligera usando técnicas convencionales de biología molecular. Las secuencias de ADN de cadena ligera y pesada del

anticuerpo completo resultante fueron subclonadas en vectores de expresión de mamíferos (una para la cadena ligera y una para la cadena pesada) bajo el control del promotor MPSV y cadena arriba de un sitio poliA sintético, siendo cada vector portador de una secuencia OriP de EBV

Se produjeron anticuerpos mediante co-transfección de células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de cadena ligera y pesada de anticuerpos de mamífero, usando una realización de transfección de fosfato de calcio. Las células HEK293-EBNA que se desarrollaban exponencialmente fueron transfectadas mediante un método con fosfato de calcio. Para la producción del anticuerpo no modificado, las células fueron transfectadas únicamente con vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos en una relación de 1:1. Para la producción del anticuerpo glico manipulado por ingeniería genética las células fueron co-transfectadas con cuatro plásmidos, dos para la expresión del anticuerpo, uno para la expresión del polipéptido GnTIII, y una para la expresión de manosidasa II en una relación de 4:4:1:1 respectivamente. Las células fueron cultivadas como cultivos de monocapas adherente en frascos T usando un medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FCS, y fueron transfectadas cuando estaban con una confluencia de entre 50 y 80%. Para la transfección de un frasco T75, se sembraron 8 millones de células 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (al 10% de V/V final), 250 µg/ml de neomicina, y las células se colocaron a 37°C en una incubadora con una atmósfera de CO₂ al 5% durante la noche. Para cada frasco T75 que debía ser transfectado, se preparó una solución de ADN, CaCl₂ y agua, mezclando 47 µg de ADN de vector de plásmido total dividido igualmente entre los vectores de expresión de cadena ligera y cadena pesada, 235 µl de una solución CaCl₂ 1M, y se agregó agua hasta un volumen final de 469 µl. A esta solución se le agregaron 469 µl de una solución de

50mM de HEPES, 280 mM de NaCl, 1,5 mM de solución Na_2HPO_4 a pH 7,05, se mezclaron inmediatamente durante 10 segundos y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 segundos. La suspensión se diluyó con 12 ml de DMEM suplementado con 2% de FCS, y se agregó al T75 en lugar de al medio existente. Estas células fueron incubadas a 37°C, 5% de CO_2 durante aproximadamente 17 a 20 horas, y luego el medio fue reemplazado con 12 ml de DMEM, 10% de FCS. El medio de cultivo acondicionado fue cosechado 5 a 7 días después de la transfección, se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 minutos a 4000 rpm y se mantuvo a 4°C.

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

Las variantes glicomanipuladas por ingeniería genética del anticuerpo humanizado se produjeron mediante co-transfección de los vectores de expresión de anticuerpos conjuntamente con un vector de expresión de glicosiltransferasa GnT-III, o conjuntamente con un vector de expresión GnT-III más un vector de expresión Golgi de manosidasa II. Los anticuerpos glico manipulados fueron purificados y formulados tal como se describió anteriormente para los anticuerpos no glico manipulados. Los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos fueron analizados mediante MALDI/TOF-MS tal como se describe a continuación.

Análisis de oligosacáridos

Los oligosacáridos fueron liberados enzimáticamente a partir de los anticuerpos mediante digestión con PNGaseF, inmovilizándose los anticuerpos sobre una membrana de PVDF o en solución.

La solución digerida resultante y que contenía los oligosacáridos liberados se preparó directamente para análisis de MALDI/TOF-MS, o bien fue digerida con glicosidasa EndoH antes de la preparación de la muestra para el análisis de MALDI/TOF-MS.

Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos inmovilizados en membrana PVDF

Los pozos de una placa de 96 pozos preparados con una membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) fueron humedecidos con 100 μ l de metanol, y el líquido se extrajo a través de la membrana de PVDF usando un vacío aplicado al conducto de vacío Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). Las membranas de PVDF se lavaron tres veces con 300 μ l de agua. Luego los pozos se lavaron con 50 μ l de amortiguador RCM (8M de Urea, 360mM de Tris, 3,2mM de EDTA, pH 8,6). Se cargaron entre 30-40 μ g de anticuerpo en un pozo que contenía 10 μ l de amortiguador de RCM. El líquido en el pozo, se extrajo a través de la membrana mediante la aplicación de vacío, y la membrana se lavó subsiguientemente dos veces con 50 μ l de amortiguador de RCM. La reducción de los puentes disulfuro se efectuó mediante la adición de 50 μ l de ditioneitol 0,1M en y con una incubación a 37°C durante 1 hora.

Después de la reducción se aplicó vacío para remover la solución de ditioneitol del pozo. Los pozos se lavaron tres veces con 300 μ l de agua antes de efectuar la carboximetilación de los residuos cisteína mediante la adición de 50 μ l

de ácido yodoacético 0,1M en amortiguador RCM y con incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos.

Después de la carboximetilación, se sacaron los pozos con vacío y subsiguientemente se lavaron tres veces con 300 µl de agua. Luego se bloqueó la membrana de PVDF, para evitar la absorción de la endoglicosidasa, mediante incubación de 100 µl de una solución acuosa al 1% de plivinilpirrolidona 360 a temperatura ambiente durante 1 hora. El reactivo de bloqueo fue extraído luego mediante suave vacío seguido de tres lavados con 300 µl de agua.

Se liberaron los oligosacáridos N-ligados mediante adición de 2,5 mU de péptido N-glicosidasa F (N-Glicanasa recombinante, GLYKO, Novato, CA) y 0,1 mU de Sialidasa (GLYKO, Novato, CA), para remover cualquier residuo de monosacárido potencial cargado, en un volumen final de 25 µl en 20mM de NaHCO₃, pH7,0). La digestión se llevó a cabo durante 3 horas a 37°C.

Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos en solución

Entre 40 y 50 µg de anticuerpo se mezclaron con 2,5 mU de PNGaseF (Glyko, U.S.A.) en 2 mM de Tris, pH 7,0 en un volumen final de 25 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C.

Uso de digestión de endoglicosidasa H, de oligosacáridos liberados por PNGaseF- para asignación de estructuras de oligosacáridos bisectados híbridos a picos de oligosacáridos neutro MALDI/TOF-MS

Los oligosacáridos liberados por PNGaseF, fueron subsiguientemente digeridos con endoglicosidasa H (EC 3.2.1.96). Para la digestión con EndoH, se agregaron 15 mU de EndoH (Roche, Suiza) al digesto de PNGaseF (anticuerpo en solución método anterior) para obtener un volumen final de 30 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C. El EndoH se disocia entre los residuos

N-acetilglucosamina del núcleo de quitobiosa de los oligosacáridos N ligados. La enzima puede digerir únicamente oligomanosa y los glicanos de tipo más híbrido, mientras que los oligosacáridos de tipo complejo no son hidrolizados.

Preparaciones de muestras para MALDI/TOF-MS

Los digestos enzimáticos que contenían los oligosacáridos liberados fueron incubados durante 3 horas más a temperatura ambiente después de agregar ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y luego se hicieron pasar subsiguientemente a través de 0,6 ml de una resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Suiza), cargada en una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Suiza) para remover los cationes y las proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa objetivo de acero inoxidable, y se mezcló en la placa con 1 µl de matriz sDHB. La matriz sDHB se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico además de 0,1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/10 mM de cloruro de sodio acuoso 1:1 (v/v). Las muestras se secaron al aire, se aplicaron 0,2 µl de etanol, y luego las muestras se dejaron finalmente recristalizar bajo el aire.

MALDI/TOF-MS

El espectrómetro de masa MALDI-TOF usado para adquirir la espectrografía de masa fue un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento funcionó en la configuración lineal con una aceleración de 20kV y una demora de 80 ns. La calibración externa usando modelos de oligosacáridos se usó para la asignación de masa de los iones. Los espectros para las aplicaciones de 200 lasers se sumaron para obtener el espectro final.

Ensayo de unión al antígeno

Las variantes de anticuerpo humanizadas monoméricas purificadas fueron ensayadas para la unión al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR, denominado también en la literatura HER-1 o ErbB1) en la línea de células epidérmicas humanas A431, usando un ensayo a base de citometría de flujo. Se transfirieron 200.000 (por ejemplo de una línea de célula A431 humana) en 180 μ l de amortiguador FACS (PBS que contenía 2% de FCS y 5mM de EDTA), a tubos de poliestireno de 5 ml, y se agregaron 20 μ l de muestras de anticuerpo anti-EGFR 10 veces concentrado (anticuerpo primario) (concentración final 1-5000 ng/ml), o PBS solamente. Después de mezclar suavemente las muestras, los tubos fueron incubados a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. Subsiguientemente se lavaron dos veces las muestras con amortiguador FACS y se granularon a 300 x g durante 3 minutos. El sobrenadante se aspiró y se recogieron las células en 50 μ l de amortiguador FACS y 2 μ l de fragmentos de anticuerpo secundario (anti-Fc-specific F(ab')₂-FITC (Jackson Immuno Research Laboratories, USA)), y los tubos se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las muestras se lavaron dos veces con amortiguador FACS y se recogieron en 500 μ l de amortiguador FACS para el análisis mediante citometría de flujo. La unión se determinó graficando la fluorescencia promedio geométrica contra las concentraciones de anticuerpo.

Unión de glicovariantes IgG1 monoméricas a la línea de células CHO que expresan Fc γ RIIIA

Se transfectaron células CHO por electroporación (280 V, 950 μ F, 0,4 cm) con un vector de expresión que codifica para la cadena α y la cadena γ de

FcgammaRIIIA-Val158. Se seleccionaron transfectantes por adición de 6 µg/ml de puomicina y se analizaron los clones estables mediante FACS usando 10 µl de anticuerpo monoclonal 3G8 de FITC-conjugado-anti-FcgammaRIII (BD Biosciences, Allschwil/Suiza) para 10⁶ células. Se llevó a cabo la unión de IgG1 a células CHO que expresan FcgammaRIIIA-Val158. Resumiendo, se agregaron los fragmentos anti-FcgammaRIIIA 3G8 F(ab')₂ (Ancell, Bayport, MN/USA) en una concentración de 10 µg/ml para competir con la unión de las glicovariantes del anticuerpo (3 µg/ml). La intensidad de la fluorescencia con referencia a las variantes de anticuerpo unidas, se determinó en un FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil /Suiza).

Ensayo ADCC

Se usaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como células efectoras y se prepararon usando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 USA), siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. Resumiendo, se extrajo sangre venosa con jeringas heparinizadas de voluntarios sanos. La sangre se diluyó a 1:0,75-1,3 con PBS (que no contenía Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺) y se depositó en capas sobre Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) sin rupturas. La interfase que contenía la PBMC se recogió y se lavó con PBS (50 ml para células de dos gradientes) y se cosechó por centrifugación a 300 x g durante 10 minuto a temperatura ambiente. Después de la resuspensión del granulado con PBS, se contó la PBMC y se lavó por segunda vez por centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron resuspendidas en el medio apropiado para los procedimientos subsiguientes.

La relación de efector a objetivo que se usó para los ensayos de ADCC fue de 25:1 y de 10:1 para PBMC y para células NK, respectivamente. Se prepararon células efectoras en un medio AIM-V en la concentración apropiada con el fin de agregar 50 μ l por pozo en placas de 96 pozos de fondo redondo. Las células objetivo fueron células que expresan EGFR humana (por ejemplo, A431, EBC-1, o LN229) cultivadas en DMEM que contenía 10% de FCS. Las células objetivo se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a razón de 0,3 millones por ml para agregar 30.000 células en 100 μ l por micropozo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, se agregaron en 50 μ l a las células objetivo predepositadas y se dejaron unir a los objetivos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humedecida que contenía 5% CO₂. Se verificó la muerte de las células objetivo por medición y la liberación de la lacto deshidrogenasa (LDH) de células deterioradas usando el equipo de Detección de Citotoxicidad (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Después de 4 horas de incubación las placas se centrifugaron a 800 x g. Se transfirieron 100 μ l de sobrenadante de cada pozo a una placa de 96 pozos transparente de fondo plano. Se agregaron 100 μ l de amortiguador de sustrato de color del equipo por cada pozo. Los valores Vmax de la reacción de color se determinaron en un lector ELISA a 490 nm durante por lo menos 10 minutos usando el software SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). Se midió la liberación de LDH espontánea de los pozos que contenían únicamente células objetivo y efectoras pero ningún anticuerpo. La liberación máxima se determinó a partir de los pozos que contenían únicamente células objetivo y 1% de Triton X-100. El porcentaje de muerte intermediada por anticuerpo específico se calculó de la manera siguiente: $((x - SR)/(MR - SR) \times 100$, donde x es el promedio de Vmax en

una concentración de anticuerpo específica, SR es el promedio de Vmax de la liberación espontánea y MR es el promedio de Vmax de la liberación máxima.

EJEMPLO 2

Resultados y discusión

La comparación de la unión al receptor EGF humano de las variantes de anticuerpo I-HHA, I-HHB, I-HHC, I-HLA, I-HLB, I-HLC, I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, I-HLA6, I-HLA7, I-HLA8, I-HLA-9, I-HHD, I-HHE, I-HHF, y I-HHG, ya sea el complejo con la cadena ligera ICR62 quimérica o con las cadenas ligeras ICR62 (I-KA, I-KB, o I-KC) y el anticuerpo quimérico parental, ch-ICR62 muestran que todos los anticuerpo tienen adentro una unidad logarítmica similar a los valores CE50. Únicamente la I-HHA tiene una actividad de unión enormemente disminuida (ver Figura 2). La figura 1 muestra la actividad funcional de las cadenas de polipéptidos ICR62 (ch-ICR62) quiméricas individuales, cuando se combina con las construcciones I-HHC e I-KB humanizadas, respectivamente. En este experimento, la cadena ligera, o bien la cadena pesada o ambas cadenas simultáneamente de ch-ICR62 fueron reemplazadas con las construcciones humanizadas antes mencionadas. Esto muestra que la formación de la interfaz VH/VL parece funcionar también en el anticuerpo roedor como en las construcciones humanizadas.

Tal como se muestra en la figura 2, la cadena I-HHA pesada humanizada no pudo restaurar la actividad de unión ni con la cadena ligera I-KA, ni la I-KB. Debido a que la I-HLA no mostró unión con I-KA, y la I-KB, los inventores llegaron a la conclusión de que la cadena pesada de I-HHA no es funcional en la unión del antígeno. Las figuras 1 y 2, combinadas con la figura 3, muestran que las construcciones de cadena ligera I-KA, I-KB, y I-KC muestran un comportamiento

de unión que no es distinguible de la contraparte del roedor. La variante I-KC no posee ninguna retromutación y adicionalmente tiene su CDR1 parcialmente humanizado de modo que los residuos 24-29 pueden ser derivados de secuencia aceptora humana (A30 de VK1, tal como se mencionó anteriormente).

En las series I-HHA, I-HHB, y I-HHC, únicamente las últimas dos variantes mostraron un comportamiento de unión satisfactorio (Figuras 2 y 3). El análisis de secuencia de I-HHA reveló tres potenciales residuos aminoácidos responsables para este comportamiento: Lys33, His35, y Tyr50. Las construcciones que tienen Lys33 reemplazado por tirosina mostraron una buena unión así como también las construcciones que tienen Tyr50 reemplazado con triptofano. Únicamente cuando estos dos residuos fueron reemplazados con alanina y glicina respectivamente se perdió la unión. Debido a que I-HHC no muestra una unión mejor que la de I-HHB, los presentes inventores llegaron a la conclusión que no es necesario que los residuos Asn60, Glu61, Lys64, y Ser65 sean de origen roedor; o pueden reemplazarse con Ala, Gln, Gln, y Gly, respectivamente. Este procedimiento conduce a una construcción en la cual la CDR2 está más humanizada, debido a que las posiciones 60 a 65 del aminoácido forman parte de la definición CDR de Kabat, pero no hay ninguna necesidad de injertar los residuos donadores de roedor para este anticuerpo.

Las figuras 4 y 5 comparan las construcciones de las series I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, y I-HLA6. El mejor comportamiento de unión se observó en las construcciones ch-ICR62, I-HLA1, y IHLA2, con un valor de EC50 de aproximadamente 300 ng/ml. Las otras construcciones tenían este valor incrementado por un factor de dos y por lo tanto tienen una actividad de unión ligeramente reducida. La primera conclusión que surge de estos datos es que, dentro de las CDR1 Kabat, se toleraron las sustituciones Lys33Tyr, y Ile34Met. Estas dos posiciones se localizaron dentro de la definición Kabat de CDR1, pero

fuera de los límites de CDR Chothia (los cuales estaban basados en análisis estructural en vez de análisis de secuencia). En la última parte de la CDR1, se permite entonces, por lo menos cierta promiscuidad.

La segunda conclusión es que, dentro de la CDR2, además del reemplazo antes mencionado de los residuos Asn60 y Glu61 con residuos no donadores, se permitieron también las sustituciones Asn60Ser, Glu61Pro, y Lys62Ser no donadores dentro de la CDR Kabat. Estos residuos fueron derivados de la secuencia aceptora IGHV5-51 de línea germinal humana, que se usó como secuencia aceptora FR3. Las construcciones I-HLA3 y I-HLA4 difieren de I-HLA1 y I-HLA2 únicamente por la remoción de la retromutación Phe27Tyr y ambas construcciones la I-HLA3 e I-HLA4 pierden afinidad en comparación con su construcción parental. Por lo tanto, la tercera conclusión de la comparación de I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, y I-HLA6 es la involucración de Phe27 en la unión del antígeno, ya sea en forma directa o indirecta, a través de la modificación de la conformación de asa de la CDR1.

Las variantes I-HLA5 y I-HLA6 tienen la FR1 de I-HLA1 y I-HLA2, respectivamente, reemplazadas por otra secuencia aceptora de línea germinal con el Phe27 naturalmente presente (es decir, IGHV1-58). Esto pudo lograrse únicamente por la introducción simultánea de varias otras mutaciones que son: Val2Met, Ala9Pro, y Ala16Thr. Al hacer esto, se anuló nuevamente el efecto beneficioso de la (re-)introducción del Phe27.

Se investigó la construcción I-HLA7 para determinar si la restauración de los residuos donadores adicionales en la CDR1 y CDR2 de cadena pesada de la construcción I-HLA6 restauraría la actividad de unión completa en comparación con la ICR62. Tal como se muestra en la figura 6, esto no sucedió.

Tal como se muestran las figuras 7 y 8, dos construcciones adicionales, I-HLA8 y I-HLA9, fueron ensayados para determinar si podía lograrse la actividad

de unión total en comparación con ch-ICR62. A partir de la construcción I-HHB, las regiones FR1 fueron reemplazadas por regiones FR1 que tenían una homología máxima dentro de la región CDR1 Chothia. La construcción 8 tiene la FR1 de la secuencia IGHV1-58, y la I-HLA9 tiene la región FR1 de IGHV5-51. Ambas construcciones unen el antígeno por lo menos tan bien como el anticuerpo ch-ICR62. La construcción I-HLA8 puede ser en realidad incluso mejor con la CE50 disminuirá en un factor de 2. La construcción I-HLA8 tiene la misma secuencia de FR1 que las construcciones I-HLA5 e I-HLA6 y por lo tanto tiene los mismos residuos no donadores (es decir, Val2Met, Ala9Pro, y Ala16Thr), lo cual sugiere que la presencia de estos residuos no donadores no tienen ningún efecto negativo sobre la unión. Las mutaciones no beneficiosa que ocurren en las I-HLA5 y 6 surgen de la combinación de la FR1 de VH1 apareada con una FR3 de VH5, que podría compensarse potencialmente si tuviere una FR1 y una FR3 de la misma familia VH.

En la figura 8 se muestran construcciones que contienen residuos no donadores dentro de la CDRs. Por lo tanto, estas construcciones son incluso más humanizadas dentro de la CDRs debido a que los residuos no donadores ocurren en las regiones estructurales humanas que fueron elegidas para estas construcciones. Las construcciones I-HHE (His35Ser), I-HHF (Thr58Asn) e I-HHG (Ser57Ala) tienen todas un residuo dentro de la CDR1 o CDR2 que está humanizado (comparación con la construcción I-HHB). La construcción I-HHD (Gly24Ala) no fue ensayada. La I-HHF mostró una reducción de la unión lo cual indica la importancia de Thr58. Del contraste con el residuo 58 de CDR Kabat, el aminoácido 57 es más tolerante a las sustituciones, debido que la mutación Ser57Ala no tienen aparentemente ninguna influencia sobre la unión (Figura 8).

Debido a que la región FR3 de IGHV5-51 parecía mostrar propiedades promisorias en las construcciones I-HLA1 y 2, y que la FR1 de la misma

secuencia de línea germinal demostró que era útil en la construcción de I-HLA9, las FR1, FR2 y FR3 de IGHV5-51 se diseñaron para ser usadas conjuntamente como aceptor para el injerto de asa.

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

VL: posición 2 Kabat: Ile probablemente requerido.

posición 71 Kabat: Ile o Phe aceptada.

VH: Pos. 24, Gly, Thr, Ala, Val, Ser aceptada.

Pos. 26, Gly aceptada.

Pos. 29, Phe, Ile, Leu, Val, Ser aceptada.

Pos. 34, Ile, Met, Leu, Val, Trp, Tyr, Thr aceptada.

Pos. 71, Ala, Leu, Val, Thr aceptada.

Pos 94, Arg, Gly, Asn, Lys, Ser, His, Thr, Ala aceptada.

Resultados de los experimentos de ADCC

La figura 9 muestra una comparación de la citotoxicidad celular intermediada por anticuerpos (ADCC) que se muestra para las varias glicoformas del anticuerpo ICR62 quimérico, así como también para la variante humanizada I-HLA4. Las diferentes glicoformas se marcaron con un marcador que o bien indicaba que no había sido glicomanipuladas por ingeniería (WT), Glicoform 1 (G1), o Glicoform 2 (G2). "G1" se refiere a la glicomanipulación por ingeniería del anticuerpo por co-expresión con GnTIII. "G2" se refiere glicomanipulación del anticuerpo mediante la co-expresión con GnTIII y ManII. "WT" se refiere a los anticuerpos que no fueron glicomanipulados. La cadena ligera para todas las construcciones humanizadas es la variante I-KC y no fue explícitamente marcada.

El anticuerpo quimérico así como también el anticuerpo humanizado mejoraron en cuanto a su potencia y eficacia mediante las dos realizaciones de glicomanipulación diferentes. La construcción ch-ICR62 funcionó ligeramente mejor que la I-HLA4 para el tipo salvaje o las glicoformas, respectivamente. Tal como se observa en la figura 4, cuando se comparan las afinidades de los dos anticuerpo con respecto a su antígeno, el ch-ICR62 tenía un valor de CE50 dos veces menor. Esta diferencia de afinidad se refleja aquí en diferencias con relación a la eficacia.

La figura 10 muestra una comparación de la citotoxicidad celular intermediada por anticuerpos (ADCC) para la no-glicomanipulada ("de tipo salvaje") y la glicoforma G2 de las construcciones I-HHB e I-HLA7 del anticuerpo ICR62 humanizado. Se aplicaron los mismos anticuerpos a dos líneas de células objetivo diferentes. En el panel A de la figura 10, se usó la línea de células objetivo LN229; y en el panel B de la figura 10, se usó la línea celular A431. Las células A431 son aparentemente más susceptibles a la muerte celular intermediada por anticuerpos que las células LN229. Lo que es más importante es que la glicomanipulación mejoró la potencia de ambos anticuerpos. Este efecto parecía ser más pronunciado para la I-HLA7 que para la I-HHB. El porcentaje de muerte celular en una concentración de anticuerpos máxima para I-HHB pudo desplazarse de ~30% a ~40% mediante la introducción de la variante glicomanipulada G2 cuando se usó la línea de células objetivo LN229. Cuando se usó la línea de células A431, este valor permaneció aparentemente sin cambios. Este comportamiento fue completamente diferente para el anticuerpo I-HLA7. La muerte de las células objetivo en una concentración de anticuerpos máxima cambió de aproximadamente 10% hasta aproximadamente 50%, para las células LN229 y desde aproximadamente 40% hasta aproximadamente 70% para las células A431 mediante la introducción de las variantes de glicomanipulación G2.

En este caso, a pesar de que había menor actividad en el anticuerpo glicomanipulado para la I-HLA7 en relación a I-HHB, el rango de actividad se invirtió para los anticuerpos glicomanipulados. Las figuras 11 y 12 muestran también comparaciones de las formas no glicomanipuladas (WT) y las glicoformas G2 de ICR62 quimérico y las construcciones del anticuerpo ICR62 humanizadas I-HHB e I-HLA7.

EJEMPLO 3

Estudio de Toxicidad Preliminar mediante Administración Intravenosa (Bolo) para
Macacos Cynomolgus - Análisis Bioanalítico

INTRODUCCIÓN

Ensayo Anti-EGFR glico-manipulado

Este Análisis Bioanalítico describe la medición del anti-EGFR en muestras originadas en macacos cynomolgus después de administración intravenosa (bolo), de anti-EGFR (anticuerpo anti-EGFR glicomanipulado recombinante producido a partir de células de mamíferos transfectadas en cultivo con vectores de expresión de anticuerpos que poseen los genes de cadena pesada I-HHB y genes de cadena ligera I-KC que se describen anteriormente, y purificados según la descripción anterior) tal como se describe en el protocolo que sigue a continuación. Un total de muestras de suero de 78 monos se almacenó congelado a aproximadamente -20°C hasta el momento de su uso.

Los métodos bioanalíticos usados para la determinación de anti-EGFR usaron un método ELISA para medir las concentraciones de anti-EGFR en el suero. Los criterios de aceptación fueron de $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ QC bajo) para la precisión e inexactitud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo: El objetivo de este estudio es la verificación del potencial tóxico sistémico de la administración intravenosa de Glico-mAb (anti-EGFR) (bolo) a macacos cynomolgus seguido de un período de recuperación de 8 semanas.

TABLA 8

Modelo Animal	Macacos cynomolgus, aceptados por las agencias reguladoras, datos de antecedentes disponibles.
Justificación para uso del primate	El primate era una especie de no roedor, de elección debido que conserva solamente dos parámetros críticos: el reconocimiento del antígeno EGFR por el anticuerpo de ensayo, y el reconocimiento de las regiones Fc del anticuerpo de ensayo mediante los receptores Fc del sistema inmunitario.
Vía	Intravenosa (Bolo), para simular las condiciones de administración clínica.

TABLA 9: Grupos y dosis de tratamiento

Grupo	1	2	3
Compuesto	Glico-mAb(Anti-EGFR)		
Dosis (mg/kg/día)	1,5	4,5	12

Fundamentos para la selección del nivel de dosificación

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

TABLA 10: Identidad de los grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	Cantidad de animales	Números ID de animal
-------	-------------	-------------------	----------------------	----------------------

		#	Macho	Hembra	Macho	Hembra
1	Glico-mAb (Anti-EGFR)	1,5	1	1	623	590
2	Glico-mAb (Anti-EGFR)	4,5	1	1	461	462
3	Glico-mAb (Anti-EGFR)	12	1	1	463	612

Expresado en terminals de la sustancia de ensayo suministrada.

TABLA 11: Animales

Especie	Mono Cynomolgus (criados a tal fin)
Edad de recepción	Aprox. 15 meses
Rango de pesos ordenado	1,5 a 2,5 kg

TABLA 12: Administración de Anti-EGFR

Vía	Inyección intravenosa.
Tratada en	Dosis constantes en mg/kg/ocasión.
Volumen de la dosis	Calculada previamente, en base al peso corporal registrado más recientemente.
Volumen de dosis Individual	1 ml/kg/día
Frecuencia	Días 1, 8, 15 y 22, inmediatamente antes de la alimentación.
Secuencia	Por grupo.
Sitios de dosificación	Usando las venas safenas izquierdas.
Inyección	Bolo, aguja descartable estéril nueva para cada animal.

Formulación	Un registro del uso de la formulación es que se mantiene en base al peso. Este balance se compara con el uso esperado como control de una administración correcta.
-------------	--

TABLA 13: Observaciones clínicas

Animales y sus bandejas de jaula	Se inspeccionan visualmente por lo menos dos veces por día para la evidencia de reacción al tratamiento o a la enfermedad-salud.
Desviaciones de la normalidad registradas en el tiempo con respecto a	Naturaleza y gravedad. Fecha y tiempo de inicio. Duración y progreso de la enfermedad observada.
Examen físico	Una vez por semana para todos los animales.
Registros diarios de bandejas de jaula	Para vómitos, sangre, diarrea, etc.

TABLA 14: Frecuencia de la dosis

Frecuencia	1. Pre-dosis inmediatamente. 2. de ½ a 2 horas después de completar la dosis. 3. Lo más tarde posible en el día laboral.
Sitios de inyección	Diarios.

TABLA 15: Toxicocinética

Día	Animales	Muestras	horas después de recibir la dosis.
1	Todos los animales	1, 4, 12, 24, 72, 120.	
8	Todos los animales	Pre-dosis, 1 hora post-dosis (169 horas post-dosis Día 1).	
15	Todos los animales	Pre-dosis, 1 hora post-dosis (337 horas post-dosis Día 1).	
22	Todos los animales	Pre-dosis, 1 hora post-dosis (505 horas post-dosis Día 1).	
29	Todos los animales	672 horas post-dosis Día 1.	

TABLA 16: Muestras

Sitio de la muestra	Vena apropiada.
Volumen de anticoagulante/muestra	Ningún anticoagulante/0,7 ml.
Cantidad total de muestras tomadas	104.
Separación de suero	Por centrifugación a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario para proveer un mínimo de 0,3 ml, cuando es posible.
Almacenamiento del suero	Tubos de plástico apropiadamente marcados. Profundamente congelado (aproximadamente -20°C), mientras se espera el bionálisis.

16)

Histología

TABLA 17: Fijación del tejido

Estándar	Formalina de pH regulado 10% neutra.
Otros	Testículos y epididimidas: Inicialmente en fluido de Bouin. Ojos: Inicialmente en fluido de Davidson.

TABLA 18: Histología

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

Procedimiento de Immunoensayo

Se recubrió una placa con 100 µl por pozo de solución de recubrimiento (5 µl de IgG anti-humano de oveja (IgG adsorbido de mono, the Binding Site, UK) agregado 11495 µl de amortiguador de bicarbonato (0,05M, pH9,6) e incubado durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 µl por pozo de solución de lavado (PBS (Sigma Chemical Co., UK) 0,01% (v/v) Triton-X100 (Sigma Chemical Co., UK)) y se secó.

Se agregó amortiguador de ensayo (1% p/v BSA, Sigma Chemical Co., UK) a razón de 200 µl por pozo y se incubó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 µl por pozo de solución de lavado y se secó.

Los estándares de calibración, los Controles de Calidad (QC) y/o las muestras se agregaron a razón de 100 µl por pozo y se incubaron durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente, después de lo cual la placa se lavó 3 veces con 400 µl por pozo de solución de lavado y se secó.

La solución de conjugado (6 μ l de conjugado kappa-HRP IgG antihumano de cabra (Bethyl Laboratories Inc., USA) se agregó a 100 μ l por pozo y se incubó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 μ l por pozo de solución de lavado y se secó.

Se agregó trimetilbencidina (TMB; Europa Bioproducts, Ely, UK) a 100 μ l por pozo. La placa se cubrió y se incubó durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron a cada pozo 100 μ l de solución de interrupción (0,5M HCl, Fisher, UK). Las absorbancias se leyeron a 450 nm (filtro de referencia 630 nm) en un lector de microplacas DYNATECH MRX (Mettler Instruments, UK).

RESULTADOS Y EXPOSICIÓN

Análisis de la Muestra de Ensayo

Las concentraciones de anti-EGFR se midieron mediante un método de inmunoensayo (ELISA) en 78 muestras de suero de mono generadas de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Estos resultados se presentan en las Tablas 19-21, siguientes.

TABLA 19

Concentración de anti-EGFR en el suero de monos (µg/ml) después de administración intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22

(GRUPO 1)

Tiempo	Número de animal		Promedio	sd
	1M 623	1F 590		
Día 1 1 hora	33,42	30,86	32,14	1,8
Día 1 4 horas	27,33	27,49	27,41	0,1
Día 1 12 horas	13,09	17,01	15,05	2,8
Día 1 24 horas	9,656	9,468	9,562	0,1
Día 1 72 horas	2,528	0,786	1,657	1,2
Día 1 120 horas	0,845	0,431	0,638	0,3
Día 8 predosis	0,538	0,287	0,413	0,2
Día 8 1 hora	30,02	19,07	24,55	7,7
Día 15 predosis	0,902	0,382	0,642	0,4
Día 15 1 hora	17,91	33,08	25,50	10,7
Día 22 predosis	1,065	0,595	0,830	0,3
Día 22 1 hora	19,41	33,00	26,21	9,6
Día 1 672 horas	1,202	0,362	0,782	0,6

sd desviación estándar

TABLA 20

Concentración en el suero de anti-EGFR en suero de mono (µg/ml) después de administración intravenosa de 5,0 mg/kg de anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22

(GRUPO 2)

Tiempo	Número de animales		Promedio	sd
	2M 461	2F 462		
Día 1 1 hora	32,45	29,51	30,98	2,1
Día 1 4 horas	32,39	29,57	30,98	2,0
Día 1 12 horas	28,05	25,88	26,97	1,5
Día 1 24 horas	23,70	23,78	23,74	0,1
Día 1 72 horas	14,03	14,38	14,21	0,2
Día 1 120 horas	10,42	8,137	9,279	1,6
Día 8 predosis	4,672	3,683	4,178	0,7
Día 8 1 hora	25,91	31,06	28,49	3,6
Día 15 predosis	5,752	5,450	5,601	0,2
Día 15 1 hora	32,20	35,38	33,79	2,2
Día 22 predosis	BLQ	6,497	3,249	-
Día 22 1 hora	26,98	30,23	28,61	2,3
Día 1 672 horas	BLQ	4,845	2,42	-

BLQ por debajo del límite de cuantificación (<0,195 µg/ml)

sd desviación estándar

Nota: BLQ entró como cero en los cálculos

TABLA 21

Concentración de anti-EGFR en el suero de monos (µg/ml) después de administración intravenosa de 15 mg/kg de anti-EGFR los días 1, 8, 15 y 22

(GRUPO 3)

Tiempo	Número de animales		Promedio	sd
	3M 463	3F 612		
Día 1 1 hora	262,2	168,0	215,1	66,6
Día 1 4 horas	223,3	174,5	198,9	34,5
Día 1 12 horas	164,9	165,7	165,3	0,6
Día 1 24 horas	141,7	146,0	143,9	3,0
Día 1 72 horas	99,54	86,64	93,09	9,1
Día 1 120 horas	86,64	69,08	77,86	12,4
Día 8 predosis	65,86	45,21	55,54	14,6
Día 8 1 hora	282,1	209,9	246,0	51,1
Día 15 predosis	98,43	71,21	84,82	19,2
Día 15 1 hora	385,9	231,4	308,7	109,2
Día 22 predosis	117,3	105,6	111,5	8,3
Día 22 1 hora	234,1	402,5	318,3	119,1
Día 1 672 horas	127,5	122,9	125,2	3,3

sd desviación estándar

EJEMPLO 4

Estudio de toxicidad preliminar mediante administración intravenosa (bolo) a macacos cynomolgus - Toxicocinética

Resumen

Se administraron a tres grupos de macacos cynomolgus (1 macho y 1 hembra por grupo) dosis intravenosa de bolos de anti-EGFR en los Días 1, 8, 15 y 22 de un estudio de toxicidad de 28 días para verificar la exposición sistémica de los animales a anti-EGFR. Las concentraciones de anti-EGFR en el suero, en las muestras recogidas hasta 672 horas después de la primera dosis, se determinaron por medio de un método de inmunoensayo. El análisis

farmacocinético de los datos de concentración en el suero-tiempo dan como resultado los parámetros de farmacocinética siguientes:

TABLA 22

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

Las relaciones entre áreas bajo las curvas de concentración de anti-EGFR - tiempo (AUC₁₆₈) y el nivel de dosis en el Día 1 se presentan a continuación:

TABLA 23

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

El régimen y grado de exposición sistémica de los monos al anti-EGFR, caracterizado por AUC_{168} , aumentó en forma aproximadamente proporcional al aumentar la dosis en un rango de dosificación de 1,5 a 4,5 mg/kg/por ocasión, pero en más que el aumento de dosis proporcionada con respecto al rango de dosis de 4,5 a 12 mg/kg/ocasión el Día 1. En la dosis más alta (12 mg/kg/ocasión) la AUC_{168} fue de ca 2,8-veces más elevada que la pronosticada por una relación lineal.

El grado de (AUC_{168}) de exposición sistémica de los monos hembra al anti-EGFR fue generalmente similar a la exposición de los monos macho.

Después de dosis intravenosas repetidas, las concentraciones de anti-EGFR en el suero en pre-dosis, fueron generalmente más elevadas que los valores después de una dosis única e indicaron una acumulación de anti-EGFR en el suero a través de todo el período del estudio.

La vida media terminal no pudo ser estimada adecuadamente para todos los animales, pero donde pudo ser estimada fue en el rango de 32,5 a 63,1 horas, y pareció aumentar con las dosis en los animales macho. El aclaramiento total en el suero de anti-EGFR, pareció ser independiente de la dosis en un rango de 1,5 - 4,5 mg/kg/ocasión, pero se redujo al nivel de dosificación máximo en los monos macho y hembra.

Concluyendo, el grado de exposición sistémica de los macacos cynomolgus al anti-EGFR pareció estar caracterizado por cinética no lineal (dependencia de dosis) en un rango de dosificación de 1,5 a 12 mg/kg/ocasión en el Día 1 del estudio de toxicidad intravenosa. El aumento de dosis de anti-EGFR por arriba de 4,5 mg/kg/ocasión probablemente dará como resultado una exposición sistémica mayor de la que se había pronosticado a partir de la relación lineal, lo cual es coherente con la posibilidad de un proceso de capacidad limitada para la eliminación del anti-EGFR.

Además, el estudio proporcionó también evidencia de que en general no había ninguna diferencia en la exposición sistémica de monos macho y hembra al anti-EGFR y que había acumulación después de administración intravenosa repetida.

Introducción

Tres grupos de monos macacos cynomolgus uno macho y uno hembra, recibieron inyección en bolo intravenoso con anti-EGFR, a niveles de dosificación de 1,5, 4,5 y 12 mg/kg/ocasión en los Días 1, 8, 15 y 22 de un estudio de toxicidad preliminar. Se recogieron muestras de sangre de cada animal en los siguientes puntos de tiempo después de la administración en Día 1: 1, 4, 12, 24, 72 y 120 horas de post-dosis. Además, se recogieron muestras en pre-dosis y al cabo de 1 hora de post-dosis en los Días 8, 15 y 22 y a las 672 horas después de la primera dosis el Día 1. El suero separado se congeló a ca -20°C antes del análisis de la concentración de suero de anti-EGFR mediante un método de inmunoensayo.

Abreviaturas

AUC	Áreas bajo la curva de concentración de suero-tiempo hasta tiempo infinito
AUC ₁₆₈	Áreas bajo la curva de concentración de suero-tiempo durante un intervalo de dosificación de 168-horas
BLQ	Por debajo del límite de cuantificación
ca	Aproximadamente
CL	Depuración total del suero
Cmax	Concentración máxima en el suero
F	Hembra
k	Constante de Régimen terminal
M	Macho

t _½	Vida media terminal
Tmax	Tiempo en el cual se produce Cmax
Vss	Volumen de distribución en estado fijo

Anticuerpo usado para el estudio

Se produjo, purificó y caracterizó según lo descrito arriba un anticuerpo anti-EGFR Glico-mAb (Anti-EGFR) Fc-manipulado para una mayor afinidad de unión al receptor Fc-FcgamMaRIII y mayor ADCC. En pocas palabras, el anticuerpo fue producido por cotransfección de células HEK-293-EBNA con vectores de ADN plasmídico para la expresión de la cadena pesada del anticuerpo I-HHB, la cadena ligera del anticuerpo I-KC, GnT-III y ManII. Se utilizó una versión en escala linealmente mayor del método de transfección descrito anteriormente, transfectando monocapas celulares cultivadas en botellas de rodillos en lugar de recipientes en forma de T. Se incluyó una paso cromatográfico de intercambio aniónico de flujo pasante adicional empleando una matriz de Q-sefarosa en el proceso de purificación inmediatamente anterior al paso cromatográfico de exclusión por tamaño que se describió anteriormente.

El patrón de glicosilación del anticuerpo Fc-manipulado se analizó según lo descrito anteriormente utilizando espectrometría MALDI/TOF-MS de oligosacáridos Fc-derivados liberados enzimáticamente. El perfil de los oligosacáridos se muestra en la Fig. 23.

La unión a EGFR humano y EGFR de mono se demostró por medio de la unión de célula entera según lo descrito anteriormente utilizando células A431 y COS-7, respectivamente y un análisis en base a FACS. Las curvas de unión se muestran en las Figuras 24 y 25 respectivamente.

La mayor unión al receptor FcgammaRIII que resulta de la Fcmanipulación aplicada se demostró según lo descrito anteriormente usando unión de célula

entera a células CHO manipuladas para la expresión superficial de FcgammaRIII humano y análisis en base a FACS. Los resultados se muestran en la figura 26. Adicionalmente el anticuerpo manipulado tiene un grado equivalente de FCmanipulación a anticuerpo "Glico 2" (siendo el 75% de los Fc-oligosacáridos de tipo no fucosilado) descrito en otra parte (Ferrara, C. *et al.*, J Biol Chem. 2005 Dec 5; [publicación electrónica anterior a la impresión]. Dichos anticuerpos Fcmanipulados tienen una afinidad de unión de hasta 50 veces mayor para FcgammaRIII humano en comparación con un anticuerpo no Fc-manipulado convencional (las constantes de disociación de equilibrio de 15 y 150 nM para las variantes polimórficas 158V y 158F del receptor humano vs. 750 y 5000 nM para las mismas variantes del receptor, respectivamente, cuando se unen a anticuerpos IgG1 humanos no Fc-manipulados).

La ADCC se midió según lo descrito anteriormente usando dos líneas celulares objetivos: células de carcinoma de pulmón humano A549 y células de queratinocito de mono cynomolgus. Los resultados se muestran en las figuras 27 y 28 respectivamente.

Procesamiento de Datos

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando el programa de computadora WinNonlin Pro version 3,3 (Pharsight Corporation, USA).

Todas las concentraciones de suero suministradas como parte de este estudio se informan como 4 cantidades significativas o 3 lugares decimales. Los parámetros de farmacocinética se informaron de la manera siguiente: C_{max}, AUC₁₆₈, CL y V_{ss} a 4 figuras significativas; k a 4 lugares decimales; t_{1/2} a 1 lugar decimal.

Los valores que fueron BLQ (<0,195 µg/mL) entraron como cero en el procesamiento farmacocinético.

Toxicocinética

Las concentraciones máximas de suero de anti-EGFR (C_{max}) y las veces que ocurren (T_{max}) fueron los valores observados. Las áreas bajo las curvas de concentración anti-EGFR en el suero-tiempo dentro de un intervalo de dosificación de 168-horas (AUC_{168}), fueron estimadas por la regla trapezoidal lineal. En el cálculo de los valores AUC_{168} , las concentraciones de anti-EGFR a las cero horas se estimaron por retro-extrapolación usando el análisis de regresión logarítmica-lineal, en base a las dos primeras veces de muestras, pero sin embargo si la concentración de suero no declinada durante este período, entonces la concentración de suero a las cero horas se considerada equivalente a la concentración en el primer tiempo de las muestras. Las áreas bajo las curvas de concentración de anti-EGFR en el suero-tiempo hasta tiempo infinito (AUC), se estimaron mediante la expresión siguiente:

$$AUC = AUC_{168} + C_{last}/k$$

donde C_{last} es la concentración de suero pronosticada en el último punto de muestra cuantificable y k es la constante de régimen terminal.

Las constantes de régimen termina (k) se estimaron mediante el ajuste de una regresión lineal de concentración logarítmica versus tiempo. Para que la estimación de k se acepte como fiable, se impusieron los criterios siguientes:

1. Los puntos de datos terminales fueron aparentemente distribuidos al azar alrededor de una línea recta única (inspección visual)
2. Un mínimo de 3 puntos de datos estuvo disponible para la regresión
3. El coeficiente de regresión fue $\geq 0,95$, y la fracción de la varianza considerada fue de $\geq 0,90$

4. El intervalo que incluye los puntos de datos que se eligió para la regresión fue por lo menos dos veces mayor que la misma vida media

Las vidas medias terminales ($t_{1/2}$) se calcularon como $\ln 2/k$. La depuración total de suero (CL) se calculó como Dosis / AUC. El volumen de distribución en estado fijo (Vss) se calculó como Dosis.AUMC/AUC². La acumulación (R) se verificó como la relación de la concentración mínima después de la última dosis (Día 22) hasta la concentración mínima después de la primera dosis (Día 1) es *decir*, concentración de suero a las 672 horas/ concentración de suero a las 168 horas (pre-dosis el Día 8).

Resultados y Exposición

Se tomaron muestras de sangre a las 20 horas después de la dosificación el Día 1; en la pre-dosis y al cabo de 1 hora de post-dosis en los Días 8, 15 y 22 y a las 672 horas post-dosis en el Día 1 durante un estudio de toxicidad para verificar la exposición sistémica de monos macho y hembra al anti-EGFR después de administración intravenosa de bolos de anti-EGFR a niveles de dosis de 1,5, 4,5 y 12 mg/kg/ocasión en los Días 1, 8, 15 y 22 del estudio. Las concentraciones de anti-EGFR en el suero, de muestras recogidas a las 168 horas post-dosis se presentan en las Tablas 27-29, y son los perfiles promedio de concentración en el suero-tiempo que se ilustran en las Figuras 18 y 19.

Los parámetros farmacocinéticos de anti-EGFR se presentan en la Tabla 50, y los valores de AUC₁₆₈ se resumen a continuación:

TABLA 24

Nivel del Dosificación	AUC168 (µg.h/mL)	
	Machos	Hembra
(mg/kg/ocasión)		
1,5	830,4	748,4
4,5	2537	2378
12	18310	15980

Las veces que en las cuales se produjeron concentraciones máximas en el suero (T_{max}) fueron generalmente 1 hora post-dosis (el primer punto de muestra) pero ocurrieron a las 4 oras post-dosis (el segundo punto de muestra) en las hembras 2F462 (4,5 mg/kg) y 3F612 (12 mg/kg). Sin embargo, para ambas hembras, las concentraciones a las 4 horas de post-dosis fueron muy similares a aquellas concentraciones al cabo de 1 hora post-dosis, y probablemente estuvieron dentro de la variabilidad del ensayo. Por lo tanto, la demora aparente en la T_{max} seguramente no tendrá ningún significado.

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

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

TABLA 25

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

El régimen y el grado de exposición sistémica de los monos al anti-EGFR, caracterizado por AUC₁₆₈, aumentó aproximadamente en forma proporcional al aumentar la dosis en un rango de dosis de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasión, pero en más del aumento de dosis proporcional en un rango de dosis de 4,5 a 12 mg/kg/ocasión en el Día 1. En la dosis más alta (12 mg/kg/ocasión) las AUC₁₆₈ fueron de ca 2,8-veces más elevadas que las pronosticadas por una relación lineal (Figura 20).

El grado (AUC₁₆₈) de exposición sistémica de monos hembra a anti-EGFR fue generalmente similar a la exposición en los monos macho.

Después de dosis intravenosa repetida, las concentraciones de anti-EGFR de pre-dosis en el suero fueron generalmente superiores que aquellos valores después de una dosis única (Figuras 21-22) e indicaron la acumulación de anti-EGFR en el suero a través del periodo del estudio. Esta acumulación fue generalmente inferior en las hembras que en los machos, excepto al nivel de dosificación más alto. Las relaciones de las concentraciones mínimas (pre-dosis) después de la última dosis el Día 22 (672 horas post Día 1 dosis) hasta la concentración mínima después de la primera dosis en el Día 1 se presentan en la Tabla 26, siguiente.

TABLA 26

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

Las constantes del régimen terminal (k) y las correspondientes vidas medias terminales ($t_{1/2}$), del anti-EGFR en el Día 1 se presentan en la Tabla 30. La medida terminal no pudo ser estimada adecuadamente para todos los animales, pero donde sí pudo ser estimada fue en el rango de 32,5 a 63,1 horas, y pareció aumentar con la dosis en los animales macho. La depuración de anti-EGFR total en el suero pareció ser independiente de la dosis en el rango de 1,5 - 4,5 mg/kg/ocasión, pero se redujo al nivel de dosis más alto en monos macho y hembra.

Concluyendo, el grado de exposición sistémica de los monos macacos cynomolgus al anti-EGFR pareció caracterizarse por cinética lineal (dependiente de dosis) en un rango de dosis de 1,5 a 12 mg/kg/ocasión en el Día 1 del estudio de toxicidad intravenosa. El aumento de la dosis de anti-EGFR anterior a 4,5 mg/kg/ocasión es probablemente el resultado de una exposición sistémica mayor que la que podría pronosticarse a partir de una relación lineal, lo cual es coherente con la posibilidad de un proceso de capacidad limitada para la eliminación de anti-EGFR.

Además, el estudio proporcionó también evidencia de que en general no había ninguna diferencia en la exposición sistémica de los monos macho y hembra al anti-EGFR y que se observó una acumulación después de administración intravenosa repetida.

TABLA 27

Concentraciones (µg/ml) de anti-EGFR en el suero, en sueros de monos después de la administración intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR en los Días 1, 8, 15 y 22

Tiempo	Número de animales	
	1M 623	1F 590
Día 1 1 hora	33,42	30,86

Día 1 4 horas	27,33	27,49
Día 1 12 horas	13,09	17,01
Día 1 24 horas	9,656	9,468
Día 1 72 horas	2,528	0,786
Día 1 120 horas	0,845	0,431
Día 8 pre-dosis	0,538	0,287
Día 8 1 hora	30,02	19,07
Día 15 pre-dosis	0,902	0,382
Día 15 1 hora	17,91	33,08
Día 22 pre-dosis	1,065	0,595
Día 22 1 hora	19,41	33,00
Día 1 672 horas	1,202	0,362

TABLA 28

Concentraciones (µg/ml) de anti-EGFR en el suero, en sueros de monos macacos cynamolgus después de administración intravenosa de 4,5 mg/kg de anti-EGFR en los Días 1, 8, 15 y 22

Tiempo	Número de animales	
	2M 461	2F 462
Día 1 1 hora	32,45	29,51
Día 1 4 horas	32,39	29,57
Día 1 12 horas	28,05	25,88
Día 1 24 horas	23,70	23,78
Día 1 72 horas	14,03	14,38
Día 1 120 horas	10,42	8,137
Día 8 pre-dosis	4,672	3,683
Día 8 1 hora	25,91	31,06
Día 15 pre-dosis	5,752	5,450
Día 15 1 hora	32,20	35,38
Día 22 pre-dosis	BLQ	6,497

Tiempo	Número de animales	
	2M 461	2F 462
Día 22 1 hora	26,98	30,23
Día 1 672 horas	BLQ	4,845

TABLA 29

Concentraciones (µg/ml) de anti-EGFR en el suero, en sueros de monos macacos cynomolgus después de administración intravenosa de 12 mg/kg de anti-EGFR en los Días 1, 8, 15 y 22

Tiempo	Número de animales	
	1M 623	1F 590
Día 1 1 hora	262,2	168,0
Día 1 4 horas	223,3	174,5
Día 1 12 horas	164,9	165,7
Día 1 24 horas	141,7	146,0
Día 1 72 horas	99,54	86,64
Día 1 120 horas	86,64	69,08
Día 8 pre-dosis	65,86	45,21
Día 8 1 hora	282,1	209,9
Día 15 pre-dosis	98,43	71,21
Día 15 1 hora	385,9	231,4
Día 22 pre-dosis	117,3	105,6
Día 22 1 hora	234,1	402,5
Día 1 672 horas	127,5	122,9

TABLA 30

Parámetros farmacocinéticos de anti-EGFR en el Día 1 de una administración intravenosa semanal de anti-EGFR a monos macacos

Dosis (mg/kg)	Animal	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	AUC _t (µg/h/mL)	AUC (µg/h/mL)	CL (mL/h/kg)	V _{ss} (mL/kg)	k (1/h)	t _{1/2} (h)
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ^a	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M461	32,45	1	2537	3005	1,488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1,663	133,2	0,0121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a

El valor es una estimación de que los datos no coincidieron con los criterios de aceptación definidos en los Datos

a Procesamiento
y deberían tratarse con cautela

Química de la sangre y Hematología

Se recogieron muestras de sangre de la vena femoral de monos macacos cynomolgus a los cuales se les había administrado una inyección de bolo intravenoso de GlicoMAB anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22. Se recogieron muestras de la extremidad no usada para la administración de la dosis, después de un ayuno nocturno (no difunto). Se examinaron las muestras en el pre-tratamiento tres días después de la segunda dosis, y al terminar para determinar los parámetros siguientes, usando heparina de litio como anticoagulante:

- Fosfatasa alcalina
- Alanina amino-transferasa
- Aspartato amino-transferasa
- Bilirrubina - total

- Urea
- Creatinina
- Glucosa
- Colesterol - total
- Triglicéridos
- Sodio
- Potasio
- Cloruro
- Calcio
- Fósforo
- Proteína total
- Electroforretograma de proteína
- Relación de albúrnina/globulina

Los datos de los análisis químicos de la sangre de mono cynomolgus normal promedio se presentán en la Tabla 31.

TABLA 31
Monos macacos cynomolgus (origen Mauritius)--Química de la sangre

Parámetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	prome- dio	s.d.
ALP	M	949	837	1339	2147	3201	3899	2175,5	565,44
	F	881	946	1342	2144	3163	3740	2164,1	552,82
ALP-N	M	511	481	579	881	1453	1771	928,0	260,88
	F	499	427	546	846	1362	1694	879,5	240,24
ALT	M	1489	24	30	50	87	127	53,7	19,07
	F	1407	23	28	46	84	111	49,3	18,65
AST	M	1487	26	30	41	63	101	43,6	17,57
	F	1404	25	29	39	61	89	41,7	13,59
gGT	M	663	95	118	178	292	342	188,5	52,47
	F	641	81	102	153	232	266	158,6	38,38

Parámetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	promedio	s.d.
LAP	M	207	18	26	40	79	217	45,1	28,25
	F	205	15	20	35	62	89	37,1	12,73
GLDH	M	159	8	10	17	35	126	20,1	16,46
	F	159	6	8	15	27	35	16,3	5,97
Bilirrubina	M	1494	1	1	3	8	11	3,8	2,04
	F	1413	1	2	4	8	11	4,1	2,07
LDH	M	99	160	596	808	1166	2029	838,3	218,75
	F	82	477	529	711	945	1021	715,0	117,07
CPK	M	331	68	83	179	713	1867	287,4	464,03
	F	335	57	77	184	925	2628	309,7	534,02
Bili Indir	M	59	1	2	4	10	11	4,2	2,15
	F	57	1	2	4	5	7	3,6	1,13
Bilirrubina Directa	M	59	0	0	0	2	3	0,2	0,65
	F	57	0	0	0	1	3	0,2	0,52
Ácidos Biliares	M	386	0,9	2,5	6,4	15,3	23,4	7,38	4,574
	F	380	1,4	3,0	7,0	12,9	17,8	7,41	3,474
Urea	M	1457	3,01	3,66	5,50	8,81	10,53	5,775	1,5710
	F	1379	2,77	3,42	5,33	8,56	9,90	5,559	1,5432
Creatinina	M	1458	55	59	71	87	94	71,6	8,67
	F	1383	56	60	72	87	85	72,7	8,36
Glucosa	M	1455	2,22	2,64	3,71	5,21	6,37	3,809	0,8135
	F	1380	2,23	2,65	3,63	5,18	6,34	3,735	0,7990
Colesterol	M	1455	1,69	1,93	2,68	3,55	3,96	2,706	1,4909
	F	1382	1,83	2,15	2,86	3,69	4,05	2,885	0,4813
Col HDL	M	45	1,26	1,34	1,79	2,23	2,59	1,784	0,3128
	F	45	1,09	1,31	1,82	2,43	2,55	1,844	0,3179
Col VLDL	M	45	0,00	0,00	0,00	0,03	0,11	0,004	0,0175
	F	45	0,00	0,00	0,00	0,12	0,19	0,012	0,0370
NEFA	M	132	0,10	0,28	0,98	1,84	2,44	0,994	0,4700
	F	132	0,14	0,22	1,06	1,90	2,18	1,070	0,4704
Triglicéridos	M	1453	0,26	0,32	0,53	0,86	1,30	0,561	0,2051
	F	1374	0,26	0,34	0,57	0,90	1,14	0,587	0,1778
Ph Lípido	M	64	1,65	1,68	2,18	2,91	3,15	2,254	0,3769

Parámetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	promedio	s.d.
	F	49	1,77	1,83	2,44	2,91	2,98	2,405	0,3267
Ácido úrico	M	17	0	0	0	8	8	1,1	2,34
	F	17	0	0	0	1	1	0,4	0,51
Na	M	1461	141	142	147	152	155	146,8	3,00
	F	1382	140	142	147	153	157	147,3	3,34
K	M	1460	3,2	3,4	4,0	5,0	5,6	4,08	0,511
	F	1382	3,2	3,3	4,0	4,9	5,4	4,01	0,484
Cl	M	1461	102	104	108	112	115	107,7	2,71
	F	1382	102	104	108	113	116	108,4	2,83
Ca	M	1462	2,31	2,39	2,56	2,76	2,87	2,568	0,1176
	F	1382	2,32	2,39	2,57	2,77	2,89	2,572	0,1168
Fos	M	1172	1,16	1,40	1,93	2,43	2,69	1,921	0,3126
	F	1098	1,17	1,37	1,84	2,35	2,60	1,844	0,2978
Col LDL	M	45	0,54	0,62	1,20	1,87	1,92	1,253	0,3694
	F	45	0,69	0,78	1,19	1,83	1,88	1,233	0,2906
Bicarbonato	M	288	7	10	17	22	25	16,5	3,51
	F	283	6	10	16	22	25	15,9	3,81
Proteína total	M	1455	71	74	80	87	90	80,2	4,06
	F	1381	71	74	81	89	92	81,2	4,32
Albúmina (Chemical)	M	346	34	38	43	46	49	42,6	2,67
	F	342	36	38	43	47	49	42,7	2,60
Albúmina	M	1089	33	36	45	51	54	44,3	4,46
	F	1019	34	37	45	52	55	44,7	4,58
Globulina	M	289	31	32	36	41	45	36,3	2,83
	F	285	30	32	37	43	48	37,5	3,59
Relación A/G (Chemical)	M	340	0,79	0,98	1,17	1,39	1,45	1,172	0,1215
	F	336	0,84	0,95	1,14	1,34	1,42	1,143	0,1274
Relación A/G	M	1068	0,68	0,80	1,26	1,65	1,82	1,252	0,2522
	F	998	0,67	0,79	1,26	1,66	1,81	1,247	0,2647
A1 Globulina	M	1105	2	2	3	4	4	2,8	0,62

Parámetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	promedio	s.d.
	F	1035	2	2	3	4	5	2,8	0,64
A2 Globulina	M	1105	3	3	4	6	7	4,2	0,92
	F	1035	3	3	4	6	7	4,2	1,01
beta Globulina	M	1105	12	13	16	22	24	16,6	2,63
	F	1035	12	13	16	22	25	16,8	2,85
gamma Globulina	M	1105	8	9	12	17	18	12,6	2,26
	F	1035	8	9	13	17	20	13,1	2,52
Aldolasa	M	96	9	14	21	38	57	22,0	7,48
	F	97	10	13	19	48	84	21,9	11,91
Plasm CHE	M	17	4159	4159	5745	9160	9160	5919,8	1181,68
	F	17	3371	3371	5869	8367	8367	5689.2	1512,98
CRP	M	57	0,000	0,000	0,002	0,013	0,026	0,0032	0,00414
	F	56	0,000	0,000	0,002	0,004	0,007	0,0017	0,00167
T3	M	40	1,90	1,90	2,50	3,38	3,58	2,537	0,4011
	F	40	1,71	1,96	2,59	3,06	4,02	2,631	0,3799
T4	M	40	35	42	59	86	92	59,7	11,84
	F	40	38	40	56	81	107	58,6	14,37

Se extrajeron muestras para el análisis hematológico de sangre periférica, de la avena femoral de un mono macaco cynomolgus que había recibido una inyección intravenosa de un bolo de GlicoMAB anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22. Las muestras se tomaron de la extremidad que no había sido usada para la administración de las dosis, después de un ayuno nocturno (no difunto). Se examinaron las muestras en el pre-tratamiento tres días después de la segunda dosis, y al terminar, para la determinación de los parámetros siguientes:

- 1) Usando EDTA como anticoagulante
- Concentración de hematocrito hemoglobina
- Recuento de eritrocitos
- Retículos

- Promedio de hemoglobina en las células
- Concentración promedio de hemoglobina en las células
- Volumen de células promedio
- Recuento total de leucocitos
- Recuento diferencial de leucocitos
- Recuento de plaquetas
- Anormalidades de la morfología de la sangre
 - Anisocitosis
 - Microcitosis
 - Macrocitosis
 - Hipocromasia
 - Hipercromasia

- 2) Se usó citrato como anticoagulante
 - Tiempo de protrombina
 - Tiempo de tromboplastina parcial activada

Los datos de los análisis hematológicos correspondientes a los monos cynomolgus normales promedio se presentan en la Tabla 32.

TABLA 32
Monos macacos cynomolgus (origen Mauritius)--Hematología

Parámetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	promedio	s.d.
HCT	M	1495	0,385	0,401	0,443	0,488	0,512	0,4435	0,02776
	F	1426	0,376	0,399	0,442	0,489	0,508	0,4424	0,02947
Hemoglobina	M	1495	11,4	12,1	13,3	14,5	15,1	13,31	0,769
	F	1426	11,2	11,9	13,2	14,5	15,1	13,21	0,855
RBC	M	1495	5,67	6,04	6,74	7,51	7,92	6,744	0,4792
	F	1426	5,58	5,96	6,71	7,45	7,73	6,707	0,4894
Retic (1) %	M	20	0,1	0,1	0,4	1,8	1,8	0,48	0,438
	F	20	0,1	0,1	0,3	0,9	0,9	0,42	0,268

Parámetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	promedio	s.d.
Retic (2) %	M	1476	0,21	0,27	0,49	0,95	1,58	0,551	0,3804
	F	1408	0,22	0,28	0,54	1,06	1,60	0,595	0,2934
MCH	M	1495	17,0	17,8	19,8	21,6	22,5	19,80	1,432
	F	1425	16,7	17,7	19,7	21,8	22,6	19,74	1,216
MCHC	M	1495	27,2	28,2	30,1	31,9	32,7	30,06	1,801
	F	1425	27,0	27,9	29,9	31,8	32,6	29,88	1,174
MCV	M	1495	57,9	60,5	65,8	71,4	73,5	65,88	3,278
	F	1425	58,3	60,4	66,0	71,7	74,5	66,07	3,353
RDW	M	280	12,6	12,9	14,4	16,1	16,7	14,40	0,934
	F	285	12,4	12,8	14,2	15,7	16,3	14,21	0,879
WBC	M	1507	5,61	6,62	10,52	18,59	30,24	11,372	4,7766
	F	1432	5,39	6,58	10,62	19,55	28,79	11,637	4,7307
Neutrófilos	M	1507	0,88	1,28	3,49	10,24	16,27	4,319	3,1741
	F	1432	1,06	1,62	4,45	12,27	17,41	5,392	3,4777
Linfocitos	M	1507	2,19	2,96	5,53	9,81	15,91	6,021	3,4066
	F	1432	2,16	2,67	4,86	8,55	13,95	5,265	2,9997
Eosinófilos	M	1507	0,00	0,01	0,17	0,81	1,49	0,254	0,3127
	F	1432	0,00	0,01	0,14	0,73	1,55	0,232	0,3188
Basófilos	M	1507	0,01	0,02	0,04	0,10	0,25	0,053	0,0627
	F	1432	0,01	0,02	0,04	0,10	0,21	0,051	0,0540
Monocitos	M	1507	0,17	0,25	0,51	1,03	1,45	0,562	0,2575
	F	1432	0,16	0,23	0,49	1,04	1,56	0,547	0,2705

Parámetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	promedio	s.d.
Células grandes no teñidas	M	1507	0,04	0,06	0,14	0,32	0,60	0,163	0,1330
	F	1432	0,04	0,06	0,13	0,29	0,50	0,148	0,1147
Plaquetas	M	1495	158	238	359	497	575	362,1	81,69
	F	1426	181	234	359	496	560	360,5	80,04
PT	M	1481	9,6	9,9	10,8	12,0	14,8	10,88	0,877
	F	1406	9,7	10,0	10,8	12,1	14,1	10,93	0,847
Act PTT	M	1483	23,1	24,4	29,1	37,9	50,1	30,06	5,267
	F	1408	22,8	24,4	29,4	37,4	47,2	30,19	5,185
Fibrinógeno	M	265	1,61	1,86	2,61	3,51	4,88	2,664	0,6178

	F	252	1,58	1,84	2,43	3,27	3,89	2,487	0,4545
--	---	-----	------	------	------	------	------	-------	--------

Los valores individuales acumulativos de bioquímica para los monos se presentan en las Tablas 33a-h, que siguen:

TABLA 33a

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

TABLA 33b

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	Trig mmol/L	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mmol/L	Fos mmol/L	Prot Total g/L	Alb g/L
615	1M	PT	0,24	146	4,7	108	2,54	1,77	91	35
		D11	0,39	145	3,9	106	2,55	1,85	94	41

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

TABLA 33c

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	a1 g/L	a2 g/L	Beta g/L	Gamma g/L	Rela- ción A/G	Alb %	a1 %	a2 %
615	1M	PT	3	5	25	23	0,63	39,0	3,4	5,1
		D11	3	4	22	25	0,77	43,1	3,0	4,5
		TERM	3	4	21	21	0,78	43,5	3,3	4,9
465	2M	PT	4	5	22	13	0,84	45,7	4,5	5,9
		PD	3	4	18	12	1,21	54,9	3,6	5,0
		D11	4	5	20	15	0,89	46,7	4,9	6,4
		TERM	3	5	20	11	1,00	50,5	4,0	5,8
639	2M	PD	3	5	17	14	1,10	52,9	3,5	5,8

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	a1 g/L	a2 g/L	Beta g/L	Gamma g/L	Rela- ción		Alb %	a1 %	a2 %
							A/G				
613	3M	D11	3	6	18	16	0,98		49,1	4,1	6,6
		TERM	3	4	17	11	1,11		52,2	3,7	6,0
		PT	4	4	20	14	0,98		49,5	5,0	4,7
		D11	3	3	17	13	1,29		55,8	3,7	3,7
		TERM	3	3	15	14	1,11		53,0	4,6	3,9
631	4M	PD	3	4	18	16	1,12		53,3	3,6	4,3
		D11	4	4	19	18	0,87		46,4	4,4	4,4
		TERM	3	4	19	15	1,15		53,1	3,4	4,3

TABLA 33d

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

TABLA 33e

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

TABLA 33f

Número de animales	Grupo /Sex	Occn. Código	Trig mmol/L	Na mmol/L	Prot					
					K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mmol/L	Fos mmol/L	total g/L	Alb g/L
614	1F	PT	0.37	148	4,6	109	2,69	2,03	80	39
		D11	0.33	147	4,1	109	2,72	2,08	82	43
		TERM	0.54	148	3,6	108	2,59	1,84	80	41
652	1F	PT	0.57	147	4,3	105	2,58	1,52	78	35
		D11	0.43	149	4,7	108	2,74	1,80	88	43
		TERM	0.59	149	4,4	108	2,59	1,51	80	40
624	2F	PD	0.60	145	4,1	108	2,54	1,50	77	40
		D11	0.51	148	4,0	111	2,58	1,42	77	39
		TERM	0.43	146	3,9	108	2,56	1,46	76	44
632	3F	PT	0.31	151	4,5	109	2,48	1,72	76	34
		D11	0.34	149	4,6	109	2,58	1,85	80	39
		TERM	0.49	150	4,5	111	2,55	1,47	78	38
640	4F	PD	0.36	144	4,8	111	2,31	1,45	68	29
		D11	0.31	145	4,3	112	2,24	1,53	63	25
		TERM	0.27	144	4,7	108	2,20	1,33	60	25

TABLA 33g

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

TABLA 33h

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

Los valores Individuales Acumulativos de Hematología para los monos se presentan en la Tabla 34a-I, siguiente:

TABLA 34a

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	Hct L/L	Hb g/dL	RBC x10 ¹² /L	Retic %	MCH pg	MCHC g/dL	MCV fL
615	1M	PT	0,389	12,4	5,94	0,38	20,9	31,9	65,5
		D11	0,366	11,5	5,59	0,76	20,6	31,4	65,5
		TERM	0,381	11,8	5,91	0,25	20,0	31,0	64,5
465	2M	PT	0,439	13,2	6,76	0,56	19,5	30,1	65,0
		PTR							
		PD	0,460	13,7	7,22	0,50	19,0	29,9	63,8
		D11	0,391	11,7	6,11	1,62	19,1	29,9	64,0
		TERM	0,441	13,6	6,93	0,65	19,7	30,9	63,7
639	2M	PD	0,419	12,7	6,23	0,51	20,4	30,3	67,2
		D11	0,400	11,7	5,99	0,52	19,6	29,3	66,7
		TERM	0,388	12,2	5,70	1,14	21,4	31,4	68,1
613	3M	PT	0,461	14,1	6,79	0,48	20,7	30,5	67,8
		PTR							
		D11	0,396	12,7	6,05	0,92	21,0	32,1	65,4
		TERM	0,410	12,9	6,23	0,49	20,8	31,5	65,9

TABLA 34b

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	WBC x10 ⁹ /L	N x10 ⁹ /L	L x10 ⁹ /L	E x10 ⁹ /L	Basófilo x10-9/L	Mono-cito x10-9/L	LUC x10 ⁹ /L	Plt x10 ⁹ /L
615	1M	PT	7,57	3,06	3,68	0,06	0,03	0,53	0,20	236
		D11	7,56	2,78	4,35	0,06	0,02	0,21	0,13	284
		TERM	7,93	3,77	3,52	0,06	0,02	0,49	0,07	254
465	2M	PT	14,19	1,78	10,37	1,24	0,05	0,55	0,20	302
		PTR	13,69	3,69	8,25	0,93	0,04	0,47	0,29	
		PD	13,36	1,55	9,95	1,01	0,04	0,58	0,25	325
		D11	12,26	4,70	5,63	1,27	0,04	0,51	0,11	403
		TERM	15,45	1,54	11,57	1,65	0,07	0,42	0,20	356
639	2M	PD	10,02	5,21	3,42	0,90	0,01	0,39	0,10	306
		D11	8,26	4,06	2,47	1,17	0,01	0,45	0,10	371
		TERM	8,70	2,55	4,20	1,04	0,02	0,80	0,09	253

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	WBC x10 ⁹ /L	N x10 ⁹ /L	L x10 ⁹ /L	E x10 ⁹ /L	Basófilo x10-9/L	Mono- cito x10-9/L	LUC x10 ⁹ /L	Plt x10 ⁹ /L
613	3M	PT	20,21	12,99	6,45	0,02	0,04	0,50	0,21	438
		PTR	16,85	8,87	6,90	0,08	0,06	0,67	0,26	
		D11	10,85	6,11	4,15	0,03	0,02	0,41	0,12	441
		TERM	23,26	17,70	4,27	0,05	0,04	1,11	0,08	434

TABLA 34c

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

TABLA 34d

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	Aniso- citosiis	Micro- citosiis	Macro- citosiis	Hipo- cromasia	Hiper- cromasia
615	1M	PT	-	-	-	-	+
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	+
465	2M	PT	-	-	-	-	-
		PTR					
		PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	Aniso- citosi	Micro- citosi	Macro- citosi	Hipo- cromasi	Hiper- cromasi
639	2M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
613	3M	PT	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	+
		TERM	-	-	-	-	-

TABLA 34e

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

TABLA 34f

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

TABLA 34g

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

TABLA 34h

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	Aniso- citosis	Micro- citosis	Macro- citosis	Hipo- cromasia	Hiper- cromasia
631	4M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR					
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
652	1F	PT	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
624	2F	PD	-	+	-	-	-
		D11	-	+	-	-	-
		TERM	+	+	-	-	-

TABLA 34i

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

TABLA 34j

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

TABLA 34k

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

TABLA 34l

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	Aniso- citosis	Micro- citosis	Macro- citosis	Hipo- cromasia	Hiper- cromasia
632	3F	PT	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

Número de animales	Grupo /Sexo	Occn. Código	Aniso- citosis	Micro- citosis	Macro- citosis	Hipo- cromasia	Hiper- cromasia
640	4F	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

Patología microscópica -- Hechos relacionados con el tratamiento

Se informó sobre una pericolangitis (inflamación del tejido conjuntivo alrededor del conducto biliar) en monos hembra que recibieron dosis de 12 mg/kg/día, pero en ningún otro mono hembra o macho. Estos hechos pueden relacionarse con el tratamiento con Glico-mAb (Anti-EGFR), pero en cantidades tan pequeñas de animales que el significado es incierto. Todos los otros hechos que se descubrieron se consideraron incidentales y sin ningún significado toxicológico.

Macropatología e Histopatología

El resumen histopatológico para todos los animales sometidos a ensayo se indican en la Tabla 35 siguiente:

TABLA 35

Histopatología - distribución del grupo y gravedad de los hechos descubiertos para todos los animales

Grupo	1	2	3
Compuesto	-GLICO-MAB (ANTI-EGFR)-		
Dosis	1.5	4.5	12

		Cantidad de Animales Afectados						
		Macho			Hembra			
		1	2	3	1	2	3	
Órgano/Tejido Examinado	Número	1	1	1	1	1	1	1

229

			Cantidad de Animales Afectados					
	Sexo		Macho			Hembra		
	Grupo		1	2	3	1	2	3
Órgano/Tejido Examinado	Número		1	1	1	1	1	1
Colon	No Examinado		1	1	1	1	1	1
Corazón	No Examinado		1	1	1	1	1	1
Riñones	No Examinado		1	1	1	1	1	1
Infiltración linfocítica cortical	Mínimo		1	1	0	0	1	1
	Leve		0	0	0	1	0	[?]
	Total		1	1	0	1	1	1
Cefálico izquierdo	No Examinado		0	0	0	0	0	0
Safena izquierda	No Examinado		1	1	1	1	1	1
-- Hiperplasia epidérmica	Mínimo		0	0	0	1	0	0
	Total		0	0	0	1	0	0
Hígado -- Focos de células inflamatorias	No Examinado		1	1	1	1	1	1
	Mínimo		1	1	1	1	1	1
	Total		1	1	1	1	1	1
-- Proliferación en el conducto biliar	Mínimo		0	0	0	0	0	1
	Total		0	0	0	0	0	1
-- Vacuolación de hepatocitos – Hendidura media	Mínimo		0	1	0	0	0	0
	Total		0	1	0	0	0	0
-- Pericolangitis	Mínimo		0	0	0	0	0	1
	Total		0	0	0	0	0	1
Pulmones y bronquios	No Examinado		1	1	1	1	1	1
-- Bronquios/bronquiolos, células inflamatorias mucosales/submucosales	Leve		1	0	0	0	0	0
	Total		1	0	0	0	0	0
-- Macrófagos alveolares	Mínimo		0	1	0	0	0	1
	Total		0	1	0	0	0	1
-- Perivascular Células linfoides/inflamatorias	Mínimo		0	0	1	0	0	1
	Total		0	0	1	0	0	1

		Cantidad de Animales Afectados					
	Sexo	Macho			Hembra		
	Grupo	1	2	3	1	2	3
Órgano/Tejido Examinado	Número	1	1	1	1	1	1
-- Agregados linfoides	Mínimo	0	0	1	0	0	0
	Total	0	0	1	0	0	0
Esófago	No Examinado	1	1	1	1	1	1
-- Agregados linfoides	Mínimo	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	1
Ovarios	No Examinado	0	0	0	1	1	1
-- Quiste(s) folicular	Presente	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
-- Corpora Lutea prominente	Presente	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
Páncreas	No Examinado	1	1	1	1	1	1
-- Atrofia Acinar	Mínimo	0	0	1	1	0	1
	Total	0	0	1	1	0	1
-- Agregados linfoides	Mínimo	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
Cefálico derecho	No Examinado	0	0	0	0	0	0
Safena derecha	No Examinado	0	0	0	0	0	0
Piel (Protocolo)	No Examinado	1	1	1	1	1	1
-- Hiperplasia epidérmica	Mínimo	0	0	0	0	0	1
	Moderado	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	1
Médula espinal	No Examinado	1	1	1	1	1	1
-- Hemorragia	Mínimo	0	0	1	1	1	1
	Leve	0	1	0	0	0	0
	Total	0	1	1	1	1	1

		Cantidad de Animales Afectados						
	Sexo	Macho			Hembra			
	Grupo	1	2	3	1	2	3	
Órgano/Tejido Examinado	Número	1	1	1	1	1	1	
Bazo	No Examinado	1	1	1	1	1	1	
Esternón y médula	No Examinado	0	0	0	0	0	0	
Estómago	No Examinado	1	1	1	1	1	1	
Testículos	No Examinado	1	1	1	0	0	0	
-- Inmadurez	Presente	1	1	1	0	0	0	
	Total	1	1	1	0	0	0	
Timo	No Examinado	1	1	1	1	1	1	
-- Quiste(s)	Presente	0	0	0	0	1	0	
	Total	0	0	0	0	1	0	
-- Involución/Atrofia	Mínimo	0	0	0	0	1	0	
	Total	0	0	0	0	1	0	
Vejiga urinaria	No Examinado	1	1	1	1	1	1	
Cuello uterino	No Examinado	0	0	0	1	1	1	
-- Inflamación epitelial	Presente	0	0	0	1	1	1	
	Total	0	0	0	1	1	1	
Útero	No Examinado	0	0	0	1	1	1	
-- Congestión	Mínimo	0	0	0	0	1	0	
	Total	0	0	0	0	1	0	
Ceco	No Examinado	1	0	0	1	0	0	
-- Tejido adiposo submucosal prominente	Mínimo	1	0	0	1	0	0	
	Total	1	0	0	1	0	0	
Trompa de Falopio	No Examinado	0	0	0	1	1	1	
Ln mesentérico	No Examinado	0	0	0	1	0	0	
-- Aumento de macrófagos pigmentados	Leve	0	0	0	1	0	0	
	Total	0	0	0	1	0	0	

Descubrimientos Individuales para todos los Animales

Las observaciones de las patologías para animales individuales se indican en la Tabla 36 siguiente:

TABLA 36

Macropatología e histopatología - descubrimientos individuales para todos los animales

Grupo	1	2	3
Compuesto	-GLICO-MAB (ANTI-EGFR)-		
Dosis	1,5	4,5	12

Observaciones patológicas

Sexo	Macho	Grupo de dosis	1
Animal N°	0623	Estudio a la semana del sacrificio	11
Peso corporal terminal	2715,0 gramos	Estudio en el día del sacrificio	77
NECROPSIA		HISTOPATOLOGIA	
Ceco :		Ceco :	
- Área(S) Elevadas; Aspecto Mucosal, Múltiple, Hasta 3 mm		- Tejido Adiposo Submucosal Prominente, - Mínimo, Focal	
Colon :		Colon :	
- Área(S) Elevadas; Aspecto Mucosal, Múltiple, Hasta 2 mm		Sin Lesión Significativa	
		Riñones :	
		- Infiltración Linfocítica Cortical, - Mínima	
Hígado :		Hígado :	
- Área(S) de Hendidura Media; Una, Subcapsular, 3 mm		- Focos de Células Inflamatorias, - Mínimas	
		Pulmones y bronquios :	
		- Bronquios/bronquiolos Células Inflamatorias Mucosales/ Submucosales, - Leve	
Estómago :		Estómago :	
- Área(S) Elevadas Corpus; Mucosa, Una, Cerca del Antro, 3 mm		> Sin Lesión Significativa	
		Testículos :	
		- Inmadurez, - Presente	

Sexo	Macho	Grupo de dosis	2
Animal N°	0461	Estudio a la semana del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2573,0 gramos	Estudio en el día del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGIA	
		Riñones	
		- Infiltración Linfocítica Cortical, - Mínima	
Hígado:		Hígado	
- Área(S) Pale. de Hendidura Media; Una, Subcapsular, 4 mm		- Focos Celulares Inflamatorios, - Mínimo, - Vacuolación Hepatocítica - Hendidura Media, - Mínima	
Pulmones y Bronquios :		Pulmones y Bronquios :	
- Colapso Incompleto; Lóbulos Derechos		- Macrófago Alveolares, - Mínimo	
		Médula Espinal :	
		- Hemorragia, - Leve, Multi-Focal	
		Testículos :	
		-Inmadurez, - Presente	
Sexo	Macho	Grupo de dosis	3
Animal N°	0463	Estudio a la semana del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2919,0 gramos	Estudio en el día del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGIA	
		Hígado :	
		- Focos Celulares Infamatorios, - Mínimo	
		Pulmones y Bronquios :	
		- Células Linfoides Inflamatorias Perivasculares, - Mínimo - Agregados Linfoides, - Mínimo, Focal	
		Páncreas :	
		- Atrofia Acinar, - Mínima, Focal	
		Médula Espinal :	
		- Hemorragia, - Mínima	
		Testículos :	
		- Inmadurez, - Presente	
El animal no tiene observaciones importantes registradas			

Sexo	Hembra	Grupo de dosis	1
Animal No.	0590	Estudio a la semana del sacrificio	11
Peso corporal terminal	3176,0 gramos	Estudio en el día del sacrificio	77
NECROPSIA		HISTOPATOLOGIA	
Ceco:		Ceco :	
- Área(S) Elevadas; Aspecto Mucosal, Múltiple Hasta 2 mm		- Tejido Adiposo Submucosal Prominente, - Mínimo, Multi-Focal	
Colon:		Colon :	
- Área(S) Elevadas; Aspecto Mucosal, Múltiple Hasta 2 mm		> Sin Lesión Significativa	
		Riñones :	
		- Infiltración Linfocítica Cortical, - Leve, Focal	
		Safena Izquierda :	
		- Hiperplasia Epidérmica, - Mínimo	
Hígado :		Hígado :	
- Área(S) Pale. de Hendidura Media; Una, Subcapsular, 3 mm		- Focos de Células Infamatorias, - Mínimo	
Ln Mesentérico :		Ln Mesentérico :	
- Congestionado, Mínimo		- Aumento de los Macrófagos Pigmentados, - Leve	
Ovarios:		Ovarios :	
- Quiste(s); Izquierdo, Uno, Fluido Claro-Llenado, 4 mm		- Quiste(s) Foliculares, - Presentes	
		Páncreas :	
		- Atrofia Acinar, - Mínima	
		- Agregados Linfoides, - Mínimos	
		Piel(Protocolo) :	
		- Hiperplasia Epidérmica, - Moderada	
		Médula espinal :	
		- Hemorragia, - Mínima	
Bazo :		Bazo :	
- Cápsula Engrosada; Área, Difusa		> Sin Lesión Significativa	
		Cuello Uterino :	
		- Inflamación Epitelial, - Presente	

Sexo	Femenino	Grupo de Dosis	2
Animal No.	0462	Estudio de la semana del sacrificio	18
Peso corporal terminado	2910,0 gramos	Estudio del día de sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Riñones:	
		-Infiltración Linfocítica Cortical,-Minima, Focal	
		Hígado:	
		-Focos de Células Inflamatorias, -Mínimo	
Pulmones y Bronquios:		Pulmones y Bronquios:	
-Colapso Incompleto, Lóbulos Izquierdos.		Ninguna Lesión Significativa	
Ovarios:		Ovarios :	
-Área(S) Elevada; Una de Cada Lado, Izquierda, 3mm; Derecha, 2mm. (Folículos)		-Corpora Lutea Prominente, -Presente	
		Médula Espinal:	
		-Hemorragia,-Mínima	
Timo:		Timo:	
-Pequeño; 1,066g.		-Quiste(S),-Presente	
		-Involución/Atrofia,-Mínima	
		Cuello Uterino:	
		-Inflamación Epitelial,-Presente	
Útero:		Útero:	
-Congestionado, Mínimo		-Congestión,-Mínima	
Sexo	Femenino	Grupo de Dosis	3
Animal No.	0612	Estudio de la semana del sacrificio	18
Peso corporal terminado	2934,0 gramos	Estudio del día de sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Riñón:	
		-Infiltración Linfocítica Cortical, -Mínima, Focal	
Hígado:		Hígado:	

-Área(S) Pal. de Hendidura Media; Uno, Subcapsular, 3mm. -Quiste(S); Dentro de la Hendidura, Una, Fluido Oscuro-Relleno, Verde, 2mm.	-Focos de Células Inflamatorias, -Mínimo -Proliferación del Tracto Biliar, -Mínimo -Pericolangitis,-Mínima
Pulmones y Bronquios:	Pulmones y Bronquios:
-Colapso Incompleto; Lóbulo Izquierdo.	-Macrofagos Alveolares,-Mínimo
	-Células Linfoides/inflamatorias Perivasculares, -Mínimo
	Esófago:
	-Agregados Linfoides,-Mínimo
	Páncreas:
	-Atrofia Acinar,-Mínima, Focal
	Piel (Protocolo) :
	-Hiperplasia Epidérmica,-Mínima
	Médula Espinal:
	-Hemorragia,-Mínima
	Cuello Uterino:
	-Inflamación Epitelial, -Presente

Los pesos corporales individuales de los monos macacos cynomolgus se presentan en la Tabla 37, siguiente:

TABLA 37: Pasos corporales: Valores Individuales

N. de Animal es	Peso corporal (kg) en el día													Cambio de peso (kg)	
	-17	-9	1*	8*	15*	22*	29	36	50	57	64	71	77		
														D 1 a 71	D 29 a 71
Grupo 1: GA201-ge, 1.5 mg/kg/ocasión															
623m	2.67	2.65 (-0.02)	2.69 (+0.04)	2.72 (+0.03)	2.76 (+0.04)	2.62 (-0.14)	2.72 (+0.10)	2.65 (-0.07)	2.71 (+0.06)	2.73 (+0.02)	2.61 (-0.12)	2.74 (+0.13)	2.71 (-0.03)	2.75 (+0.04)	+0.06 +0.03
590f	2.98	2.92 (-0.06)	2.97 (+0.05)	3.14 (+0.17)	3.13 (-0.01)	3.01 (-0.12)	3.06 (+0.05)	3.00 (-0.06)	3.19 (+0.19)	3.16 (-0.03)	3.11 (-0.05)	3.18 (+0.07)	3.27 (+0.09)	3.23 (-0.04)	+0.27 +0.17
Grupo 2: GA201-ge, 4.5 mg/kg/ocasión															
461m	2.50	2.56 (+0.06)	2.53 (-0.03)	2.47 (-0.06)	2.53 (+0.06)	2.53 NC	2.53 NC	2.61 (+0.08)	2.53 (-0.08)	2.45 (-0.08)	2.54 (+0.09)	2.60 (+0.06)	2.59 (-0.01)		+0.03 +0.06
462f	2.87	2.96 (+0.09)	2.91 (-0.05)	2.82 (-0.09)	2.95 (+0.13)	2.89 (-0.06)	2.88 (-0.01)	2.79 (-0.09)	2.91 (+0.12)	2.95 (+0.04)	3.05 (+0.10)	3.02 (-0.03)	2.96 (-0.06)		+0.05 +0.08
Grupo 3: GA201-ge, 12 mg/kg/ocasión															
463m	2.69	2.81 (+0.12)	2.86 (+0.05)	2.74 (-0.12)	2.81 (+0.07)	2.81 NC	2.81 NC	2.81 NC	2.75 (-0.06)	2.71 (-0.04)	2.92 (+0.21)	2.98 (+0.06)	3.09 (+0.11)		+0.23 +0.28
612f	2.84	2.96 (+0.12)	2.92 (-0.04)	2.98 (+0.06)	3.06 (+0.08)	3.01 (-0.05)	3.01 NC	2.94 (-0.07)	2.91 (-0.03)	2.81 (-0.10)	3.04 (+0.23)	3.05 (+0.01)	3.10 (0.05)		+0.18 +0.09

No hubo ningún efecto de tratamiento en los sitios de inyección y ningún hallazgo clínico que se considerara que estuviese en relación al tratamiento con Glyco-mAb (anti-EGFR). Los cambios del peso corporal se encontraban dentro de los rangos esperados. No hubo hallazgos que se considerara que estuviesen relacionados para tratamiento en estudios microscópicos y el peso de los órganos de los animales se encontraba en los rangos normales esperados. En conclusión, el estudio con 1,5; 4,5 o 12 mg/kg/ocasión fue bien tolerado sin hallarse claramente toxicidad sistémica.

EGFR no es un objetivo específico del tumor ya que se encuentra en la superficie de varios tejidos normales incluyendo hígado, riñón y piel. Los anticuerpos Anti-EGFR con región Fc de la IgG1 humana, fueron previamente suministrados a humanos y mostraron un perfil con efectos colaterales tolerables. (Vanhoefer, U. et al., Clin. Oncol. 2004 Jan 1; 22(1):175-84; Needle MN, Semin Oncol. 2002 Oct; 29 (5 Suppl 14):55-60). Claramente, habría preocupaciones significantes para suministrar a un humano o a otro mamífero un anticuerpo anti-EGFR con ADCC muy aumentado, debido a una actividad destructiva mejorada que puede presentarse contra tejidos normales críticos tales como hígado, riñón y piel. Sorpresivamente, los presentes inventores han descubierto que administrar dicho anticuerpo anti-EGFR, Fc manipulado según se describe anteriormente y con hasta 1000 veces aumentada la actividad ADCC in vivo a mamíferos, no condujeron a toxicidades significantes. Las concentraciones de anticuerpo ser mantuvieron por encima de 1 microgramo por mililitro por lo menos durante 4 semanas (y por encima de 100 microgramos por mililitro para algunos animales). Tales niveles de exposición son típicos para la terapia de anticuerpo. El ADCC máximo para el anticuerpo del presente estudio ya se encuentra alcanzado en concentraciones de 1 microgramo por mililitro. Suministración de dosis únicas de dosis de 40 a 100 mg del anticuerpo anti-EGFR (el anticuerpo ICR62 de la rata

parental) a pacientes con cáncer humano mostraron objetivos específicos de tumores in vivo (Modjtahedi, H. et al., Br J Cancer. 1996 Jan;73(2):228-35.) Las células efectoras de los monos *Cynomolgus* contienen receptores FcγRIII altamente homologos y han mostrado mediar ADCC mejorada con anticuerpos Fc manipulados (y con anticuerpos glicomanipulados para niveles aumentados de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc). El nivel de ADCC aumentada es muy similar a aquel observado con células efectoras humanas (PBMCs).

Finalmente, encontramos que los anticuerpos anti-EGFR Fc manipulados para Fc-FcγRIII aumentado con afinidad de unión y para ADCC aumentada, pueden ser suministrados a los mamíferos para dar concentraciones por encima de 1 microgramo del anticuerpo por milímetro de suero para un período de al menos 4 semanas para dar exposiciones del fármaco normalmente asociadas con acumulación importante de anticuerpo en las células objetivo in vivo, sin llegar a una toxicidad significativa.

La toxicidad de una molécula de antígeno de unión de la presente invención puede ser medida y/o determinada usando cualquiera de los métodos y /o parámetros (e.g. valores químicos de sangre, indicadores histopatológicos, etc.) descritos anteriormente, o por cualquier medio conocido por aquellos expertos en la materia.

EJEMPLO 5

Modificaciones a las CDRs de Cadena Ligera

Utilizando métodos descritos anteriormente, las variantes de la región variable de la cadena ligera de anti-EGFR fueron generadas de la construcción I-KC de la región variable de la cadena ligera (SEC ID NO:43 y SEC ID NO:45), donde la secuencia que codifica el residuo del aminoácido en posiciones varias en la rata ICR62 CDRs fue reemplazada con el correspondiente residuo del aminoácido de una secuencia de gen variable de una línea germinal humana.

Tabla 38 muestra las sustituciones que fueron realizadas en la CDRs de la construcción I-KC de la región variable de la cadena ligera (SEC ID NO:45):

Tabla 38: CDRs de Cadenas ligeras minimizadas

<u>NOMBRE DE LA CONSTRUCCIÓN</u>	<u>SUSTITUCION DE AMINOACIDO REALIZADA EN SEC ID NO:45</u>	<u>CDR DE CADENA LIGERA EN DONDE LA SUSTITUCION FUE REALIZADA</u>
<u>I-KC1</u>	<u>N30R*</u>	<u>CDR1</u>
<u>I-KC2</u>	<u>Y32W</u>	<u>CDR1</u>
<u>I-KC3</u>	<u>N34G</u>	<u>CDR1</u>
<u>I-KC4</u>	<u>N50T</u>	<u>CDR2</u>
<u>I-KC5</u>	<u>T51A</u>	<u>CDR2</u>
<u>I-KC6</u>	<u>N52S</u>	<u>CDR2</u>
<u>I-KC7</u>	<u>N53S</u>	<u>CDR2</u>
<u>I-KC8</u>	<u>T56S</u>	<u>CDR2</u>
<u>I-KC9</u>	<u>F94Y</u>	<u>CDR3</u>

* Identificado de acuerdo con la nomenclatura estándar (por ej., “N30R” significa el residuo Asparragina (N) en la posición 30 de la secuencia SEC ID NO:45 está reemplazado con el residuo Arginina (R)).

Todos los residuos de sustitución identificados anteriormente fueron obtenidos de la secuencia aceptora VK1_6 humana salvo el intercambio Y32W, donde la W de una secuencia de línea germinal humana relacionada se sustituyó por Y en la posición 32 de SECID NO:45.

Cada una de las construcciones de la variante I-KC (I-KC1 a I-KC9) fue apareada con la región variable de cadena pesada que comprende la construcción I-HHD (SEC ID NO:16 y SEC ID NO:15) y se llevó a cabo un ensayo de unión de acuerdo con los métodos descritos en los ejemplos anteriores. Las construcciones I-KC1 a I-KC9 fueron comparadas con la construcción I-KC (SEC ID NO:46 y SEC ID NO:45) para determinar la afinidad de unión a EGFR en células objetivo A431 (Figura 29). Tal como puede verse en la Figura 29, sólo la modificación del residuo 34 a su correspondiente secuencia humana (N34G) dio como resultado una leve disminución en la afinidad de unión (el valor EC50 aumentó en un factor 10). Todas las demás construcciones mantuvieron una actividad de unión comparable con la construcción I-KC (SEC ID NO: 45). Por ende, cuando se aparea con una construcción de cadena pesada quimérica (por ejemplo, humanizada) específica para EGFR, la cadena ligera puede ser totalmente humana (por ejemplo, de una secuencia genética V de cadena ligera humana) y conserva aún la unión específica para EGFR. En particular, CDR2 y CDR 3 pueden estar totalmente en forma de línea germinal humana

Moléculas de unión al antígeno que comprenden CDRs EGRF-específicos

La presente invención contempla por lo tanto una molécula que se une al antígeno que comprende una región variable de cadena quimérica (por ej. humanizada) que comprende CDRs EGRF-específicos en par con una región variable de cadena ligera en donde la región de cadena variable tiene menos que diez residuos de aminoácidos no humanos. En otras realizaciones, la región variable de cadena ligera tiene menos que nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o uno residuo (s) de aminoácidos no humanos. En realizaciones preferidas, la región variable de cadena ligera tiene menos de dos o menos de un (por ej. no tiene) residuos de aminoácidos no humanos. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende una o más secuencias de genes de

línea germinal humana. Las secuencias de genes de región variable de línea germinal humana que codifican regiones variables de cadenas ligeras son conocidas en el arte y pueden ser encontradas por ejemplo, en la bases de datos IMGT disponible en: <http://imgt.cines.fr/home.html>. En una realización preferida, la secuencia de línea germinal humana es derivada de la secuencia de línea germinal VK1-6. En otras realizaciones, los residuos de aminoácidos dentro de la región de cadena variable ligera de línea germinal humana pueden estar substituidos con uno o más residuos de otra secuencia de región de cadena variable ligera de línea germinal humana.

En otra realización, la presente invención está dirigida a una molécula que se une a un antígeno que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEC ID NO.:1; SEC ID No:3; SEC ID No:5; SEC ID No:7; SEC ID No:9; SEC ID No:11; SEC ID No:13; SEC ID No:15; SEC ID No:17; SEC ID No:19; SEC ID No:21; SEC ID No:23; SEC ID No:25; SEC ID No:27; SEC ID No:29; SEC ID No:31; SEC ID No:33; SEC ID No:35; SEC ID No:37; SEC ID No:39; y SEC ID No:121, y una cadena ligera que comprende un polipéptido codificado por una o más secuencias de genes de línea germinal humana variable. En una realización preferida la secuencia de línea germinal humana está derivada de la secuencia de línea germinal VK1-6.

En otra realización, la presente invención está dirigida a una molécula que se une a un antígeno que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, y SEC ID NO:124; (b) una secuencia seleccionada del grupo consistente en: SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98,

SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, y SEC ID NO:126; (c) SEC ID NO:108; y (d) un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera humana codificada por una o más secuencias de genes de línea germinal humana. En una realización particular, la secuencia de línea germinal humana está derivada de la línea de secuencia germinal VK1-6. En otra realización, la secuencia de genes de región variable de línea germinal humana comprende la línea de secuencia germinal VKi-6 con una sustitución de uno o más codones de aminoácidos con una secuencia de una secuencia de región variable de cadena ligera de línea germinal humana diferente.

En otras realizaciones, la molécula que se une al antígeno de la presente invención comprende un región variable de cadena pesada específica para EGFR de la presente invención, y una variante de la SEC ID NO:45. En una realización, la variante de la SEC ID NO:45 comprende una sustitución de amino ácidos en una o más posiciones en las regiones determinantes de complementaridad (CDRs). En realizaciones específicas la sustitución es de un residuo amino ácido en la posición seleccionada del grupo que consiste en la: posición 30 de amino ácido de la SEC ID NO:45; posición 32 de amino ácido de la SEC ID NO:45; posición 34 de amino ácido de la SEC ID NO:45; posición 50 de amino ácido de la SEC ID NO:45; posición 51 de amino ácido de la SEC ID NO:45; posición 52 de amino ácido de la SEC ID NO:45; posición 53 de amino ácido de la SEC ID NO:45; posición 56 de amino ácido de la SEC ID NO:45; posición 94 de amino ácido de la SEC ID NO:45; y cualquier combinación de sustituciones de las mismas. En realizaciones más específicas, la sustitución en la SEC ID NO:45 es seleccionada del grupo que consiste en: sustitución de una arginina (R) por la asparragina (N) en la posición 30 de la SEC ID NO:45; sustitución de un triptofano (W) por la tirosina (Y) en la posición 32 de la SEC ID NO:45; sustitución de una glicina (G) por la asparragina (N) en la posición 34 de la SEC ID NO:45;

sustitución de una treonina (T) por la asparragina (N) en la posición 50 de la SEC ID NO:45; sustitución de una alanina (A) por la treonina (T) en la posición 51 de la SEC ID NO:45; sustitución de una serina (S) por la asparragina (N) en la posición 52 de la SEC ID NO:45; sustitución de una serina (S) por la asparragina (N) en la posición 53 de la SEC ID NO:45; sustitución de una serina (S) por treonina (T) en la posición 56 de la SEC ID NO:45; sustitución de una tirosina (Y) por la fenilalanina (F) en la posición 94 de la SEC ID NO:45; y cualquier combinación de las mismas. En una realización particular, todas las sustituciones de residuos de amino ácidos en la SEC ID NO:45 se incorporan en una sola variante de cadena ligera. En realizaciones preferidas, las moléculas que se unen al antígeno que comprenden variantes de cadena ligera con sustituciones de amino ácidos para CDRs de ICR62 retienen la unión específica a EGFR (en comparación con una molécula de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID NO:45) cuando la variante de la cadena ligera es apareada con un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada de la presente invención.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican para uno cualquiera de los polipéptidos y/o a moléculas que se unen a antígenos anteriores. La presente invención se relaciona además con las moléculas que unen antígenos descritas anteriormente, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

* * *

Todas las publicaciones tales como libros de texto, artículos de diarios, entradas al GenBank u a otras bases de datos de secuencias y las solicitudes publicadas, y las solicitudes de patente mencionadas en esta memoria se incorporan aquí como referencia en el mismo grado que si cada publicación o

solicitud de patente individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada como referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Umana, Pablo
Mossner, Ekkehard

<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO QUE SE ENLAZAN A EGFR, VECTORES QUE
LAS CODIFICAN Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 1975.0430000

<160> 127

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 120
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<220>
<223> ICR62 VH

<400> 1

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

297

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

<220>
 <223> ICR62 VH

<400> 2
 caggtcaacc tactgcagtc tggggctgca ctggtgaagc ctggggcctc tgtgaagttg 60
 tcttgcaaag gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gaagcagagt 120
 catggaaaga gccttgagtg gattgggtat tttaatccta acagtgggta tagtacctac 180
 aatgaaaagt tcaagagcaa ggccacattg actgcagaca aatccaccga tacagcctat 240
 atggagctta ccagtctgac atctgaggac tctgcaacct attactgtac aagactatcc 300
 ccaggggggtt actatgttat ggatgcctgg ggtcaaggag cttcagtcac tgtctcctc 359

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

<220>
 <223> I-HHA

<400> 3

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

100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> I-HHA

<400> 4
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatt tacattcact gactacgcca tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagt gatgggaggg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>
<223> I-HHB

<400> 5

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> I-HHB

<400> 6
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagt gatgggatatt tccaacccta acagcgggta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>
<223> I-HHC

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HHC

<400> 8
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta tagtacctac 180
aatgaaaagt tcaagagcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> I-HLA

<400> 10
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLB

<400> 11

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

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

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

<220>
<223> I-HLB

<400> 12
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcggtta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLC

<400> 13

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

<210> 14
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLC

<400> 14
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcggtta cagtacttac 180
aacgagaagt tcaagagccg ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggggggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>

<223> I-HHD

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 360

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> I-HHD

<400> 16

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcttgcaagg cctctggttt cacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagt gatgggatat ttcaacccta acagcggtta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctoctca 360

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

<220>
<223> I-HHE

<400> 17

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

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

<220>
<223> I-HHE

<400> 18

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggct	60
tcctgcaagg	gttctggttt	cacattcact	gactacaaga	tatcctgggt	gcgacaggct	120
cctggacaag	ggctcgagtg	gatgggatat	ttcaacccta	acagcggtta	tagtacctac	180
gcacagaagt	tccagggcag	ggtcaccatt	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>
 <223> I-HHF

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> I-HHF

<400> 20

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagt gatgggatatt ttcaacccta acagcgggta ttcgaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctctcca 360

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

<220>
<223> I-HHG

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HHG

<400> 22
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagt gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tgccacgtac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> I-HLA1

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24
 <211> 360

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA1

<400> 24
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagt gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA2

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 26
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> I-HLA2

<400> 26
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagt gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
 aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>
 <223> I-HLA3

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 28
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> I-HLA3

<400> 28
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctgggta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
 agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>
 <223> I-HLA4

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA4

<400> 30
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctgggta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>
<223> I-HLA5

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA5

<400> 32
cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctgggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtggtta tagtacctac 180
agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>
<223> I-HLA6

<400> 33

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA6

<400> 34
cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>
<223> I-HLA7

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA7

<400> 36
cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cgcggaacaac ggctcgagtg gatcggtg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA8

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
<223> I-HLA8

<400> 38
cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

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

<220>

<223> I-HLA9

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40

<211> 360

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> I-HLA9

<400> 40

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

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

<220>
<223> Secuencia de Señal

<400> 41

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

Ala His Ser

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

<220>
<223> Secuencia de Señal

<400> 42
atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

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

<220>
<223> ICR62 VL

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> ICR62 VL

<400> 44
gacatccaga tgaccagtc tccttcattc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60
atcaactgca aagcaagtca gaatattaac aattacttaa actggtatca gcaaaagctt 120
ggagaagctc ccaaacgcct gatataaat acaaacaatt tgcaaacagg catcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagatg tacacactca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacatatatt ctgcttgtag cataatagtt ttcccacggt tggagctggg 300
accaagctgg aactgaaacg tagc 324

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

<220>
<223> I-KC

<400> 45

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 85 90 95

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

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

<220>
<223> I-KC

<400>	46						
gatatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtcggaga	cggggtcacc	60	
atcacctgcc	gggcaagtca	gggcattaac	aattacttaa	attggtacca	gcagaagcca	120	
gggaaagccc	ctaagcgctt	gatctataat	accaacaact	tgcagacagg	cgtcccatca	180	
aggttcagcg	gcagtggatc	cgggacagaa	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240	
gaagattttg	ccacctatta	ctgcttgcat	cataatagtt	ttcccacgtt	tggccagggc	300	
accaagctcg	agatcaagcg	tacg				324	

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

```
<220>
<223> Secuencia de Señal
```

<400> 47

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

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

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

```
<220>  
<223> Secuencia de Señal
```

<400> 48
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctgggtt cccaggtgcc 60
aggtgt 66

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

<220>
<223> I-KA

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> I-KA

<400> 50

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgtag cataatagtt ttcccacggt tggccagggc 300
accaagctcg agatcaagcg tacggtg 327

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

<220>
<223> I-KB

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> I-KB

<400> 52

gatattcaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
atcacctgca aagcaagtca gaatattaac aattacttaa actggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

agggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatttttg ccacctatta ctgcttgag cataatagtt ttcccacgtt tggccagggc 300
accaagctcg agatcaagcg tacggtg 327

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 Kabat

<400> 53

Asp Tyr Lys Ile His
1 5

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 Kabat

<400> 54
gactacaaga tacac 15

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

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 55

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

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

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 56
gactacgccca tcagc 15

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

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 57

Asp Tyr Tyr Met His
1 5

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

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 58
gactactata tgcac 15

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Chothia

<400> 59

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 60
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Chothia

<400> 60
ggttttacat tcactgacta c 21

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada Chothia

<400> 61

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 62

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> CDR1 de cadena pesada Chothia

<400> 62

ggttacacat tcactgacta c

21

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada Chothia

<400> 63

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 64

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada Chothia

<400> 64

ggttattcat tcactgacta c

21

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 65

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
1 5 10

<210> 66
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 66
 gggttttacat tcactgacta caagatacac

30

<210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 67

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10

<210> 68
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 68
 gggttttacat tcactgacta cgccatcagc

30

<210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 69

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

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

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 70
ggttttacat tcactgacta ctatatgcac 30

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 71

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

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

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 72
ggttacacat tcactgacta ctatatgcac 30

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 73

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
1 5 10

<210> 74
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada AbM

<400> 74
ggttattcat tcactgacta caagatacac 30

<210> 75

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

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 75

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

Ser

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

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 76
 tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacaatgaaa agttcaagag c 51

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

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 77

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

Gly

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

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 78
 gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 79

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

Gly

<210> 80
<211> 51
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 80
tatttcaacc ctaacagcgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 81

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

Gly

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 82
tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agtttcaggg c 51

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 83

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

Gly

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 84
tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gcttccaagg c 51

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 85

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

Gly

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 86
tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacaacgaga agttccaagg c 51

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 87

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

Gly

<210> 88
<211> 51
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 88
tatttcaacc ctaacagcgg ttattcgaac tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 89

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

Gly

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 90

tatttcaacc ctaacagcgg ttatgccacg tacgcacaga agttccaggg c 51

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 91

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
1 5

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 92
aatcctaaca gtggttatag tacc 24

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 93

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn
1 5

<210> 94
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 94
aaccctaaca gcggttattc gaac 24

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 95

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr
1 5

<210> 96
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 96
aaccctaaca gcggttatgc cacg

24

<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 97

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

<210> 98
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 98
tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc

30

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 99

Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr

284

1	5	10	
---	---	----	--

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 100
gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 101

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

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 102
tgggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 103

Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Asn
1		5				10			

<210> 104
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

28

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 104
tatttcaacc ctaacagcgg ttattcgaac 30

<210> 105
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 105

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr
1 5 10

<210> 106
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 106
tatttcaacc ctaacagcgg ttatgccacg 30

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada Kabat Chothia AbM

<400> 107

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 108
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada Kabat Chothia AbM

<400> 108
ctatccccag gcggttacta tggttatggat gcc 33

<210> 109
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Región constante de IgG1

<400> 109

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala
 85 90 95

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 100 105 110

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 115 120 125

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 130 135 140

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 145 150 155 160

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 165 170 175

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 180 185 190

207

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
195 200 205

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
260 265 270

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
275 280 285

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

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

<220>
<223> Región constante de IgG1

<400> 110
accaagggcc catcggctctt ccccttgga ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 60
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 120
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 180
tactcctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 240
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagcaga gcccaaattc 300
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 360
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccctgaggtc 420

acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 480
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 540
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 600
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 660
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 720
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 780
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 840
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 900
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 960
agcctctccc tgtctccggg taaatga 987

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

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera Kabat

<400> 111

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

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

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera Kabat

<400> 112
aaagcaagtc agaattattaa caattactta aac 33

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

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera Kabat

<400> 113

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

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

<220>
 <223> CDR1 de cadena ligera Kabat

<400> 114
 cgggcaagtc agggcattaa caattactta aat

33

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

<220>
 <223> Kabat Light Chain CDR2

<400> 115

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
 1 5

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

<220>
 <223> Kabat Light Chain CDR2

<400> 116
 aatacaaaca atttgcaaac a

21

<210> 117
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Kabat Light Chain CDR3

<400> 117

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 1 5

<210> 118
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
<223> Kabat Light Chain CDR2

<400> 118
aataccaaca acttgacagac a 21

<210> 119
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Kabat Light Chain CDR3

<400> 119
ttgcagcata atagttttcc cacg 24

<210> 120
<211> 361
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> I-HLA10

<400> 120
gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gttgaagatc 60
tcctgcaagg gttctgggta ttcattcact gactacaaga tccactgggt gcgacagatg 120
cctggaaagg gcctcgagtg gatgggctac ttcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagga ccaccgtgac cgtctcctca 360
g 361

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

<220>
<223> I-HLA10

<400> 121

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> Kabat Heavy Chain CDR1

<400> 122
gactacaaga tatcc 15

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

<220>
<223> Kabat Heavy Chain CDR1

<400> 123

Asp Tyr Lys Ile Ser
1 5

<210> 124
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> AbM Heavy Chain CDR1

<400> 124
ggtttcacat tcactgacta caagatatcc 30

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> AbM Heavy Chain CDR1

<400> 125

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile Ser
1 5 10

<210> 126
<211> 51
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Kabat Heavy Chain CDR2

<400> 126
tacttcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gcttccaagg c 51

<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Kabat Heavy Chain CDR2

<400> 127

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

Gly

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma cómo la misma ha de ser llevada a la práctica se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Un polinucleótido aislado que comprende

- (a) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, y SEC ID NO:124; y
- (b) a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, y SEC ID NO:126; y
- (c) SEC ID NO:108.

2. Un polinucleótido aislado que comprende

- (a) a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, y SEC ID NO:124; y
- (b) a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:94, SEC ID

NO:96, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, y SEC ID NO:126 y

(c) SEC ID NO:108.

3. Un polinucleótido aislado que comprende

(a) SEC ID NO:112 o SEC ID NO:114;

(b) SEC ID NO:118; y

(c) SEC ID NO:119.

4. Un polinucleótido aislado que comprende

(a) SEC ID NO:114;

(b) SEC ID NO:116 y SEC ID NO:118; y

(c) SEC ID NO:119.

5. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que codifica un polipéptido de fusión.

6. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40, y SEC ID NO:120.

7. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEC ID NO:36.

8. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEC ID NO:38.

9. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEC ID NO:40.

10. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:46, SEC ID NO:50, y SEC ID NO:52.

11. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho polinucleótido comprende la SEC ID NO:46.

12. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

13. Un polinucleótido aislado que comprende

- (a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:2; SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40 y SEC ID NO:120; y
- (b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:44, SEC ID NO:46, SEC ID NO:50 y SEC ID NO:52.

14. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:2; SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40 y SEC ID NO:120, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

15. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 85% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:2; SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40 y SEC ID NO:120, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

16. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:2; SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40 y SEC ID NO:120, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

17. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:2; SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40 y SEC ID NO:120, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

18. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 que comprende una secuencia que tiene por lo menos 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:2; SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40 y SEC ID NO:120, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

19. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:44, SEC ID NO:46, SEC ID NO:50, y SEC ID NO:52, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

20. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 85% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:44, SEC ID

NO:46, SEC ID NO:50, y SEC ID NO:52, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

21. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:44, SEC ID NO:46, SEC ID NO:50, y SEC ID NO:52, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

22. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:44, SEC ID NO:46, SEC ID NO:50, y SEC ID NO:52, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

23. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:44, SEC ID NO:46, SEC ID NO:50, y SEC ID NO:52, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

24. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID

NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40, y SEC ID NO:120.

25. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:46; SEC ID NO:50, SEC ID NO:52.

26. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 85% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40, y SEC ID NO:120.

27. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 85% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:46; SEC ID NO:50, SEC ID NO:52.

28. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40, y SEC ID NO:120.

29. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 o 27, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:46; SEC ID NO:50; y SEC ID NO:52.

30. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40; y SEC ID NO:120.

31. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25, 27 o 29, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:46, SEC ID NO:50, y SEC ID NO:52.

32. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26, 28 o 30, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:4; SEC ID NO:6; SEC ID NO:8; SEC ID NO:10; SEC ID NO:12; SEC ID NO:14; SEC ID NO:16; SEC ID NO:18; SEC ID NO:20; SEC ID NO:22; SEC ID NO:24; SEC ID NO:26; SEC ID NO:28; SEC ID NO:30; SEC ID NO:32; SEC ID NO:34; SEC ID NO:36; SEC ID NO:38; SEC ID NO:40 y SEC ID NO:120.

33. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25, 27, 29 o 31, que comprende una secuencia que tiene por lo menos 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:46, SEC ID NO:50, y SEC ID NO:52.

34. Un polinucleótido aislado que comprende

- (a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:1; SEC ID NO:3; SEC ID NO:5; SEC ID NO:7; SEC ID NO:9; SEC ID NO:11; SEC ID NO:13; SEC ID NO:15; SEC ID NO:17; SEC ID NO:19; SEC ID NO:21; SEC ID NO:23; SEC ID NO:25; SEC ID NO:27; SEC ID NO:29; SEC ID NO:31; SEC ID NO:33; SEC ID NO:35; SEC ID NO:37; SEC ID NO:39; y SEC ID NO:121; y
- (b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, a partir de una especie distinta de rata.

35. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 34, donde dicho polipéptido que tiene una secuencia de la región Fc de anticuerpo es una región constante de anticuerpo.

36. Un polinucleótido aislado que comprende

- (a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:43; SEC ID NO:45, SEC ID NO:49, y SEC ID NO:51; y

- (b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región constante de cadena ligera del anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie distinta de rata.

37. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:3; SEC ID NO:5; SEC ID NO:7; SEC ID NO:9; SEC ID NO:11; SEC ID NO:13; SEC ID NO:15; SEC ID NO:17; SEC ID NO:19; SEC ID NO:21; SEC ID NO:23; SEC ID NO:25; SEC ID NO:27; SEC ID NO:29; SEC ID NO:31; SEC ID NO:33; SEC ID NO:35; SEC ID NO:37; SEC ID NO:39, y SEC ID NO:121.

38. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:45, SEC ID NO:49, y SEC ID NO:51.

39. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:3; SEC ID NO:5; SEC ID NO:7; SEC ID NO:9; SEC ID NO:11; SEC ID NO:13; SEC ID NO:15; SEC ID NO:17; SEC ID NO:19; SEC ID NO:21; SEC ID NO:23; SEC ID NO:25; SEC ID NO:27; SEC ID NO:29; SEC ID NO:31; SEC ID NO:33; SEC ID NO:35; SEC ID NO:37; SEC ID NO:39; y SEC ID NO:121.

40. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:45, SEC ID NO:49, y SEC ID NO:51.

41. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-40.

42. El vector de la reivindicación, donde dicho vector es policistrónico.

43. Una célula hospedera que comprende el vector de expresión de la reivindicación 41.

44. Una célula hospedera que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-37.

45. Un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-10 que comprende además una secuencia que codifica una región constante de cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo humano.

46. Una célula hospedera que co-expresa un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 39 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de una cadena ligera del anticuerpo.

47. Un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo ICR62 de rata y una secuencia derivada de un péptido heterólogo.

48. Una molécula de unión al antígeno que comprende el polipéptido de la reivindicación 47.

49. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 48, que se une al EGFR humano.

50. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 48 o 49, que es un anticuerpo.

51. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 50, donde dicho anticuerpo es quimérico.

52. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 51, donde dicho anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado.

53. Un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEC ID NO:1 o una variante del mismo.

54. Un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEC ID NO:43 o una variante del mismo.

55. Un polipéptido quimérico que comprende:

- (a) un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:53, SEC ID NO:55, SEC ID NO:57, SEC ID NO:123, SEC ID NO:59, SEC ID NO:61, SEC ID NO:63, SEC ID NO:65, SEC ID NO:67, SEC ID NO:69, SEC ID NO:71, SEC ID NO:73, y SEC ID NO:125;
- (b) un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO:75 SEC ID NO:77, SEC ID NO:79, SEC ID NO:81, SEC ID NO:83, SEC ID NO:85, SEC ID NO:87, SEC ID NO:89, SEC ID NO:127, SEC ID NO:91, SEC ID NO:93, SEC ID

NO:95, SEC ID NO:97, SEC ID NO:99, SEC ID NO:101, SEC ID NO:101, SEC ID NO:103, SEC ID NO:105, y SEC ID NO:105; y

(c) un polipéptido que tiene la secuencia de la SEC ID NO:107.

56. Un polipéptido quimérico que comprende:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de SEC ID NO:111 o SEC ID NO:113;

(b) un polipéptido que tiene una secuencia de SEC ID NO:115; y

(c) un polipéptido que tiene una secuencia de SEC ID NO:117.

57. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO: 1; SEC ID NO:3; SEC ID NO:5; SEC ID NO:7; SEC ID NO:9; SEC ID NO:11; SEC ID NO:13; SEC ID NO:15; SEC ID NO:17; SEC ID NO:19; SEC ID NO:21; SEC ID NO:23; SEC ID NO:25; SEC ID NO:27; SEC ID NO:29; SEC ID NO:31; SEC ID NO:33; SEC ID NO:35; SEC ID NO:37; SEC ID NO:39; y SEC ID NO:121, o una variante del mismo.

58. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO: 43, SEC ID NO:45, SEC ID NO:49, y SEC ID NO:51, o una variante del mismo.

59. El polipéptido aislado de acuerdo a reivindicación 57 o 58, donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.

60. Una molécula de unión al antígeno que comprende el polipéptido de la reivindicación 57 y el polipéptido de la reivindicación 58.

61. Una molécula de unión al antígeno que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 59.

62. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 61, donde dicha molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

63. La molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 61-62, donde dicha molécula de unión al antígeno se une a EGFR.

64. La molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 61-63, donde dicha molécula de unión al antígeno se une a la variante III del EGFR.

65. La molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 61-64, donde dicha molécula de unión al antígeno se une al mismo epítipo que el ICR62 de anticuerpo de rata.

66. El anticuerpo de la reivindicación 62, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

67. El anticuerpo de la reivindicación 62, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo primatizado.

68. La molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 61 o 63-65, donde dicha molécula de unión al antígeno es un fragmento de anticuerpo.

69. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 68, donde dicho fragmento de anticuerpo es humanizado.

70. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 68 o reivindicación 69, donde dicho fragmento de anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un fragmento scFv, un fragmento Fv, un fragmento F(ab')₂, un minicuerpo, un diacuerpo, triacuerpo, y un tetracuerpo.

71. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 61 o reivindicación 62, donde dicha molécula de unión al antígeno es un anticuerpo recombinante.

72. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 71, donde dicho anticuerpo recombinante está humanizado.

73. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 71 o reivindicación 72, donde dicho anticuerpo recombinante comprende una región Fc humana.

74. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 73, donde dicha región Fc humana es una región Fc de IgG humana.

75. Una molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 61-74, donde dicha molécula de unión al antígeno ha sido glicomanipulada para tener una estructura de oligosacárido alterada en la región Fc.

76. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 75, donde dicha región Fc tiene una cantidad reducida de residuos fucosa en comparación con la molécula de unión al antígeno no glicomanipulada.

77. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 75 o reivindicación 76, donde dicha región Fc tiene una proporción incrementada de oligosacáridos bisectados en comparación con el anticuerpo no glicomanipulado

78. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicación 75-77, donde dichos oligosacáridos modificados son un complejo bisectado.

79. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicación 75-77, donde dichos oligosacáridos modificados tienen una proporción incrementada de oligosacáridos bisectados, no fucosilados en la región Fc de dicha molécula de unión al antígeno en comparación con la molécula de unión al antígeno no glicomanipulada.

80. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicación 75-79, donde dicho anticuerpo glicomanipulado tiene una relación incrementada de residuos GlcNAc a residuos fucosa en la región Fc en comparación con la molécula de unión al antígeno no glicomanipulada.

81. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 79, donde dichos oligosacáridos bisectados, no fucosilados son híbridos.

82. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 79, donde dichas oligosacáridos bisectados, no fucosilados son complejos.

83. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 75, donde por lo menos el 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisectados, no fucosilados

84. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 83, donde por lo menos el 30% de oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisectados, no fucosilados.

85. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 84, donde por lo menos el 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisectados no fucosilados.

86. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 85, donde por lo menos el 70% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisectados, no fucosilados.

87. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 75, donde por lo menos el 50% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

88. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 87, donde por lo menos el 60% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

89. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 88, donde por lo menos el 70% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

90. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 89, donde por lo menos el 80% de los oligosacáridos en la región Fc están bisectados.

91. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 90, donde por lo menos el 90% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

92. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 75, donde por lo menos el 50% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

93. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 92, donde por lo menos el 60% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

94. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 93, donde por lo menos el 70% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

95. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 94, donde por lo menos el 75% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

96. Un método para producir una molécula de unión al antígeno que es capaz de competir con el anticuerpo ICR62 de rata para la unión al EGFR

humano, y donde dicha molécula de unión al antígeno es quimérica; y dicho método comprende:

- a) cultivar la célula hospedera de la reivindicación 43 o reivindicación 44 en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha molécula de unión al antígeno; y
- b) recuperar dicha molécula de unión al antígeno.

97. El método de la reivindicación 96, donde dicha molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

98. El método de la reivindicación 96 o reivindicación 97, donde dicha molécula de unión al antígeno quimérica es humanizada.

99. Una composición farmacéuticamente que comprende la molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 47-52 o 60-95 y un portador farmacéuticamente aceptable.

100. Un método para el tratamiento de un desorden relacionado con EGFR que comprende:

- a) pronosticar una respuesta a una terapia anti-EGFR en un sujeto humano mediante el ensayo de una muestra de un sujeto humano antes de la terapia con una pluralidad de reactivos que detectan la expresión y/o activación de biomarcadores pronosticadores de cáncer;
- b) determinar un patrón de expresión y/o activación de uno más de dichos biomarcadores pronosticadores donde el patrón pronostica la respuesta del sujeto humano a la terapia anti-EGFR;

- c) administrar a un sujeto humano que se ha pronosticado que responde a la terapia dirigida a anti-EGFR, de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la reivindicación 99.

101. El método de la reivindicación 100, donde el biomarcador pronosticador es un receptor factor de crecimiento o una molécula de señalización cadena abajo relacionado con el receptor del factor de crecimiento.

102. El método de la reivindicación 101, donde el receptor del factor de crecimiento es EGFR, EGFR fosforilado, HER2/neu, HER3, o cualquier combinación de éstos.

103. El método de la reivindicación 101, donde las moléculas de señalización cadena abajo relacionadas con el receptor factor de crecimiento, están seleccionadas del grupo que consiste en Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, y STAT5.

104. El método de la reivindicación 100, donde los biomarcadores pronosticadores son EGFR y HER3.

105. La composición farmacéutica de la reivindicación 99 donde dicha composición comprende además un coadyuvante.

106. Un método para dirigir células que expresan EGFR en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto la composición farmacéutica de la reivindicación 99.

107. Un método de acuerdo con la reivindicación 106, donde dichas células hiperexpresan EGFR.

108. Un método de acuerdo con la reivindicación 106, donde dicho método se lleva a cabo para diagnosticar un desorden caracterizado por la expresión de EGFR en dicho sujeto.

109. Un método de acuerdo con la reivindicación 106, donde dicho método se lleva a cabo para tratar un desorden caracterizado por la expresión de EGFR en dicho sujeto.

110. Un método para el tratamiento de un desorden de proliferación de células tratable por bloqueo de la señalización intermediada por EGFR, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 99 a un sujeto humano que lo necesita.

111. Un método para detectar in vivo o in vitro la presencia de EGFR en una muestra que comprende:

- a) poner en contacto una muestra a ser ensayada, opcionalmente con una muestra de control, con la molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 47-52 o 60-95 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre la molécula de unión al antígeno y el EGFR; y
- b) detectar dichos complejos de molécula de unión antígeno-EGFR.

112. Una célula hospedera manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de β (1,4)-N-

acetilglucosaminiltransferasa III en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula hospedera, donde dicho polipéptido es una molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 47-52 o 60-95.

113. La célula hospedera de la reivindicación 112 en la cual dicho polipéptido que tiene una actividad de β (1,4))-N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

114. La célula hospedera de la reivindicación 112 o reivindicación 113 donde dicha molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

115. La célula hospedera de la reivindicación 112 o reivindicación 113, donde dicha molécula de unión al antígeno es un fragmento de anticuerpo.

116. La célula hospedera de la reivindicación 112 o reivindicación 113, donde dicha molécula de unión al antígeno comprende una región equivalente a la región Fc de un a IgG humana.

117. La célula hospedera de la reivindicación 112 o reivindicación 113 donde dicha molécula de unión al antígeno producida por dicha célula hospedera exhibe una afinidad de unión al receptor Fc incrementada como resultado de dicha modificación.

118. La célula hospedera de cualquiera de las reivindicaciones 112, 113 o 117, en la cual dicha molécula de unión al antígeno producida por dicha célula

hospedera exhibe un aumento de la función efectora como resultado de dicha modificación.

119. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 113, donde dicho polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.

120. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 119, donde dicho polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo.

121. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 120, donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II.

122. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 120, donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I.

123. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 120, donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II

124. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 120, donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa I.

125. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 120, donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de una α 1-6 núcleo fucosiltransferasa.

126. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 118, donde dicha función efectora incrementada es citotoxicidad celular intermediada por Fc incrementada.

127. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 118, donde dicha función efectora incrementada es unión incrementada a células NK.

128. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 118, donde dicha función efectora incrementada es unión a macrófagos incrementada.

129. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 118, donde dicha función efectora incrementada es unión incrementada a células polimorfonucleares.

130. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 118, donde dicha función efectora incrementada es unión incrementada a monocitos.

131. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 118, donde dicha función efectora incrementada es apoptosis inductora de señalización directa incrementada.

132. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 118, donde dicha función efectora incrementada es maduración de célula dendrítica incrementada.

133. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 118, donde dicha función efectora incrementada es cebado de célula T incrementado.

134. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 117, donde dicho receptor Fc es el receptor activador Fcy.

135. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 117, donde dicho receptor Fc es el receptor FcyRIIIA.

136. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 112, donde dicha célula hospedera es una célula HEK293-EBNA, una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma de ratón P3X63, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma.

137. Una célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 112, donde dicha célula hospedera es una célula de planta o una célula de levadura.

138. La célula hospedera de la reivindicación 112, que comprende además por lo menos un polinucleótido transfectado que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 47 y 53-56, y donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

139. La célula hospedera de la reivindicación 112, donde dicho por lo menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, está ligado operativamente a un elemento promotor constitutivo.

140. La célula hospedera de la reivindicación 139, en la cual dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es polipéptido de fusión.

141. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 73, donde por lo menos el 50% de los oligosacáridos en las regiones Fc están bisectados.

142. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 141, donde, por lo menos el 60% de los oligosacáridos en la región Fc están bisectados.

143. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 142, donde, por lo menos el 70% de los oligosacáridos en la región Fc están bisectados.

144. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 143, donde, por lo menos el 80% de los oligosacáridos en la región Fc están bisectados.

145. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 144, donde, por lo menos el 90% de los oligosacáridos en la región Fc están bisectados.

146. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 73, donde por lo menos el 50% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

147. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 146, donde por lo menos el 60% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

148. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 147, donde por lo menos el 70% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

149. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 148, donde por lo menos el 75% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

150. El método de acuerdo con la reivindicación 110, donde dicho desorden es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de cerebro.

151. Un polinucleótido aislado que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata, o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

152. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 151, donde dicha región determinante de complementariedad, está seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, SEC ID NO:124, SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, SEC ID NO:126, SEC ID NO:108, SEC ID NO:112, SEC ID NO:14, SEC ID NO:116, SEC ID NO:118, y SEC ID NO:119.

153. un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 151, donde dicho polinucleótido aislado codifica una molécula de unión al antígeno.

154. Un polinucleótido aislado que comprende por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata, o una variante o forma truncada del mismo que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dichas regiones determinantes de complementariedad donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

155. Un polinucleótido aislado de la reivindicación 154, donde dichas por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad están seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, SEC ID NO:124, SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, SEC ID NO:126, SEC ID NO:108, SEC ID NO:112, SEC ID NO:14, SEC ID NO:116, SEC ID NO:118, y SEC ID NO:119.

156. Un polinucleótido aislado que comprende por lo menos tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad para cada uno de tres regiones determinantes de complementariedad donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

157. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 156 donde dichas por lo menos dichas tres regiones determinantes de complementariedad están seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, SEC ID NO:124, SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102,

SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, SEC ID NO:126, SEC ID NO:108, SEC ID NO:112, SEC ID NO:14, SEC ID NO:116, SEC ID NO:118, y SEC ID NO:119.

158. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 156, donde dichas regiones determinantes de complementariedad comprenden por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, y SEC ID NO:124; y por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, y SEC ID NO:126; y SEC ID NO:108, o formas truncadas de dichas secuencias que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad.

159. Un polinucleótido aislado que comprende por lo menos cuatro regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dichas regiones determinantes de complementariedad donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

160. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 159, donde dichas por lo menos cuatro regiones determinantes de complementariedad están seleccionados del grupo que consiste en: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID

NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, SEC ID NO:124, SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, SEC ID NO:126, y SEC ID NO:108, SEC ID NO:112, SEC ID NO:14, SEC ID NO:116, SEC ID NO:118, y SEC ID NO:119.

161. Un polinucleótido aislado que comprende por lo menos cinco regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o una forma variante o truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dichas regiones determinantes de complementariedad, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

162. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 161, donde dichas por lo menos cinco regiones determinantes de complementariedad están seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, SEC ID NO:124, SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, SEC ID NO:126, y SEC ID NO:108, SEC ID NO:112, SEC ID NO:14, SEC ID NO:116, SEC ID NO:118, y SEC ID NO:119.

163. Un polinucleótido aislado que comprende seis regiones

determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata, o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dichas regiones determinantes de complementariedad, donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

164. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 163, donde dichas regiones determinantes de complementariedad están seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, SEC ID NO:124, SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, SEC ID NO:126, y SEC ID NO:108, SEC ID NO:112, SEC ID NO:14, SEC ID NO:116, SEC ID NO:118, y SEC ID NO:119.

165. Un polipéptido aislado codificado por los polinucleótidos aislados de cualquiera de las reivindicaciones 151-164.

166. Un molécula de unión al antígeno que comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dichas regiones determinantes de complementariedad y comprende además una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo.

167. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 166, donde dicha molécula de unión al antígeno comprende por lo menos tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo ICR62 de rata o variantes o formas truncadas de la misma que contienen por lo menos tres residuos determinantes de especificidad para cada una de las regiones determinantes de complementariedad.

168. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 167, donde dicha molécula de unión al antígeno comprende la región variable de una cadena pesada o ligera del anticuerpo.

169. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 167 o reivindicación 168, donde dicha molécula de unión al antígeno es un anticuerpo quimérico o humanizado.

170. Un método para producir una molécula de unión al antígeno que tiene oligosacáridos modificados en una célula hospedera, donde dicho método comprende:

- a) cultivar una célula hospedera manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III bajo condiciones que permiten la producción de dicha molécula de unión al antígeno y que permiten la modificación de los oligosacáridos presentes en la regiones Fc de dicha molécula de unión al antígeno; y
- b) aislar dicha molécula de unión al antígeno donde dicha molécula de unión al antígeno es capaz de competir con el anticuerpo ICR62

para la unión a EGFR y donde dicha molécula de unión al antígeno o fragmento de la misma es quimérico.

171. Un método de acuerdo con la reivindicación 170 donde dichos oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida en comparación con los oligosacáridos no modificados.

172. Un método de acuerdo con la reivindicación 170 o reivindicación 171 donde dichos oligosacáridos modificados son híbridos.

173. Un método de acuerdo con la reivindicación 170 o reivindicación 171 donde dichos oligosacáridos modificados son complejos.

174. Un método de acuerdo con la reivindicación 170 o reivindicación 171 donde dicho anticuerpo recombinante o fragmento del mismo producido por dicha célula hospedera tiene una proporción incrementada de oligosacáridos bisectados no fucosilados en la región Fc de dicho polipéptido.

175. Un método de acuerdo con la reivindicación 174, donde dichos oligosacáridos bisectados no fucosilados son híbridos.

176. Un método de acuerdo con la reivindicación 174, donde dichos oligosacáridos bisectados no fucosilados son complejos.

177. Un método de acuerdo con la reivindicación 170, donde por lo menos el 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dichos polipéptidos son bisectados, no fucosilados.

178. Un método de acuerdo con la reivindicación 177, donde por lo menos el 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dichos polipéptidos son bisectados no fucosilados.

179. Un método de acuerdo con la reivindicación 178, donde por lo menos el 35% de los oligosacáridos para la región Fc de dichos polipéptidos son bisectados no fucosilados.

180. Una molécula de unión al antígeno manipulada para tener una función efectora incrementada producida por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 170-179.

181. Una molécula de unión al antígeno de la reivindicación 180, donde dicha molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

182. Moléculas de unión al antígeno manipuladas para tener una afinidad de unión al receptor Fc incrementada, producidas el método de cualquiera de las reivindicaciones 170-179.

183. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 182 donde dicha molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

184. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 180, donde dicha función efectora incrementada es citotoxicidad celular intermediada por Fc incrementada.

185. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 180, donde dicha función efectora incrementada es una unión incrementada a las células NK.

186. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 180, donde dicha función efectora incrementada es una incrementada a macrófagos.

187. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 180, donde dicha función efectora incrementada es unión incrementada a monocitos.

188. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 180 donde dicha función efectora incrementada es unión incrementada a células polimorfonucleares.

189. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 180, donde dicha función efectora incrementada es señalización directa que induce apoptosis.

190. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 180, donde dicha función efectora incrementada es un aumento de la maduración de células dendríticas.

191. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con a reivindicación 180, donde dicha función efectora incrementada es un incremento del cebado de la célula T.

192. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 182, donde dicho receptor Fc es un receptor activador Fc.

193. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 192, donde dicho receptor Fc es el receptor FcγRIIIa.

194. Una molécula de unión al antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 170-179 donde dicha molécula de unión al antígeno es un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc y es manipulada para tener una función efectora incrementada.

195. Una molécula de unión al antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 170-179, donde dicha molécula de unión al antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID No:1; SEC ID No:3; SEC ID No:5; SEC ID No:7; SEC ID No:9; SEC ID No:11; SEC ID No:13; SEC ID No:15; SEC ID No:17; SEC ID No:19; SEC ID No:21; SEC ID No:23; SEC ID No:25; SEC ID No:27; SEC ID No:29; SEC ID No:31; SEC ID No:33; SEC ID No:35; SEC ID No:37; SEC ID No:39, y SEC ID NO:121, y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y está manipulada por ingeniería de modo de incrementar la función efectora.

196. Una molécula de unión al antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 170-179, donde dicha molécula de unión al antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:43, SEC ID

NO:45, SEC ID NO:49, y SEC ID NO51, y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y está manipulada por ingeniería para tener un incremento de la función efectora.

197. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 180 a 196 y un portador farmacéuticamente aceptable.

198. Una composición farmacéutica que comprende el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 68 y un portador farmacéuticamente aceptable.

199. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de fusión de la reivindicación 59 y un portador farmacéuticamente aceptable.

200. Un método para el tratamiento de una enfermedad tratable mediante una actividad de EGFR reducida que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 180-196 a un sujeto humano que lo necesita.

201. El método de acuerdo con la reivindicación 110 o 200 donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente de 1,0mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg.

202. El método de acuerdo con la reivindicación 201, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1,5mg/kg hasta 12mg/kg.

203. El método de acuerdo con la reivindicación 202, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1,5mg/kg hasta 4,5mg/kg.

204. El método de acuerdo con la reivindicación 202, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es desde aproximadamente 4,5mg/kg hasta aproximadamente 12mg/kg.

205. El método de acuerdo con la reivindicación 202, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1,5mg/kg.

206. El método de acuerdo con la reivindicación 202, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 4,5mg/kg.

207. El método de acuerdo con la reivindicación 202, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 12 mg/kg.

208. El método para el tratamiento del desorden relacionado con EGFR en un sujeto que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho sujeto la molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 48-52, 60-95, 141-149, 166-169, o 180-196 en una cantidad de desde aproximadamente 1,0 mg/kg hasta aproximadamente 15mg/kg.

209. el método de acuerdo con la reivindicación 208, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de desde aproximadamente 1,5mg/kg hasta aproximadamente 12mg/kg.

210. El método de acuerdo con la reivindicación 208, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de desde aproximadamente 1,5mg/kg hasta aproximadamente 4,5mg/kg.

211. El método de acuerdo con la reivindicación 208, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de desde aproximadamente 4,5mg/kg hasta aproximadamente 12mg/kg.

212. El método de acuerdo con la reivindicación 208, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1,5mg/kg.

213. El método de acuerdo con la reivindicación 208, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 4,5mg/kg.

214. El método de acuerdo con la reivindicación 208, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 12mg/kg.

215. El método de acuerdo con la reivindicación 208, donde dicho sujeto es un mamífero.

216. El método de acuerdo con la reivindicación 215, donde dicho mamífero es un ser humano.

217. El método de acuerdo con la reivindicación 208, donde dicho desorden es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer pancreático,

cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de cerebro.

218. La molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48-52, 60-95, 141-149, 166-169, o 180-196, para ser usada como medicamento, en particular para ser usada en cáncer.

219. La molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 218, donde dicho cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de cerebro.

220. Uso de la molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48-52, 60-95, 141-149, 166-169, o 180-196 para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de cáncer.

221. El uso de acuerdo con la reivindicación 220, donde dicho cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de cerebro.

222. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 220 a 221, donde dicha molécula de unión al antígeno se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz de desde aproximadamente 1,0mg/kg hasta aproximadamente 15mg/kg.

223. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 220 a 222, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de desde aproximadamente 1,5mg/kg hasta aproximadamente 12mg/kg.

224. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 220 a 223, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de desde aproximadamente 1,5mg/kg hasta aproximadamente 4,5mg/kg.

225. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 220 a 224, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de desde aproximadamente 4,5mg/kg hasta aproximadamente 12mg/kg.

226. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 220 a 225, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1,5mg/kg.

227. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 220 a 226 donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 4,5mg/kg.

228. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 220 a 227, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 12mg/kg.

229. Los nuevos compuestos, procedimientos, composiciones farmacéuticas, métodos y usos tal como se describen aquí .

230. Un polipéptido aislado codificado por el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39.

231. Una molécula de unión al antígeno que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 230.

232. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual dicho polinucleótido aislado comprende SEC ID NO:6.

233. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual dicho polinucleótido aislado comprende SEC ID NO:10.

234. Una molécula de unión al antígeno que comprende un polipéptido aislado codificado por el polipéptido aislado de la reivindicación 232 o 233.

235. Una molécula de unión al antígeno que comprende

(a) una secuencia seleccionada del grupo formado por: SEC ID NO:54, SEC ID NO:56, SEC ID NO:58, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:122, y SEC ID NO:124;

(b) una secuencia seleccionada del grupo formado por: SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102, SEC ID NO:104, SEC ID NO:106, y SEC ID NO:126;

(c) SEC ID NO:108; y

un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera humana codificada por una o varias secuencias genéticas de línea germinal humana.

236. Una molécula de unión al antígeno que comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por: SEC ID NO.:1; SEC ID No:3; SEC ID No:5; SEC ID No:7; SEC ID No:9; SEC ID No:11; SEC ID No:13; SEC ID No:15; SEC ID No:17; SEC ID No:19; SEC ID No:21; SEC ID No:23; SEC ID No:25; SEC ID No:27; SEC ID No:29; SEC ID No:31; SEC ID No:33; SEC ID No:35; SEC ID No:37; SEC ID No:39; y SEC ID No:121, y una cadena ligera que comprende un polipéptido codificado por una o varias secuencias genéticas de región variable de línea germinal humana.

237. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 235 o 236, en la cual la secuencia genética de región variable de línea germinal humana comprende la secuencia genética de línea germinal VK1_6.

238. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 237, en la cual la secuencia genética de región variable de línea germinal humana comprende la secuencia genética de línea germinal VK1_6 con una sustitución de uno o varios codones de aminoácidos con una secuencia de una secuencia genética de región variable de cadena ligera de línea germinal humana diferente.

239. Una molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48-52, 60-95, 141-149, 166-169, 180-196, o 234-238, en donde dicha molécula de unión al antígeno, cuando se administra a un sujeto mamífero en concentraciones superiores a un microgramo por mililitro de suero, no causa un nivel clínicamente significativo de toxicidad en dicho sujeto mamífero.

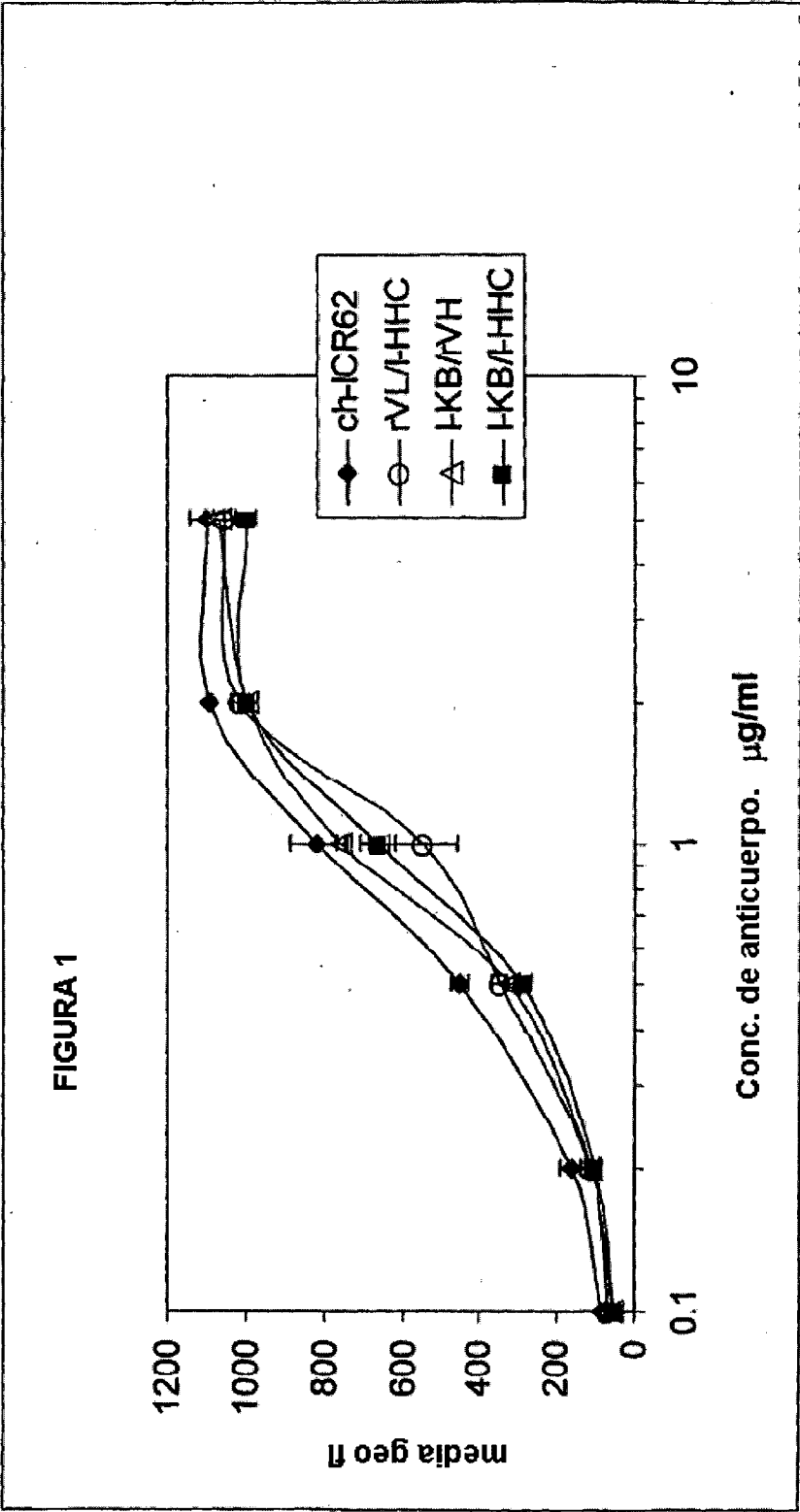
240. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 239, en donde dicho nivel de toxicidad de determina midiendo una serie de valores químicos de la sangre.

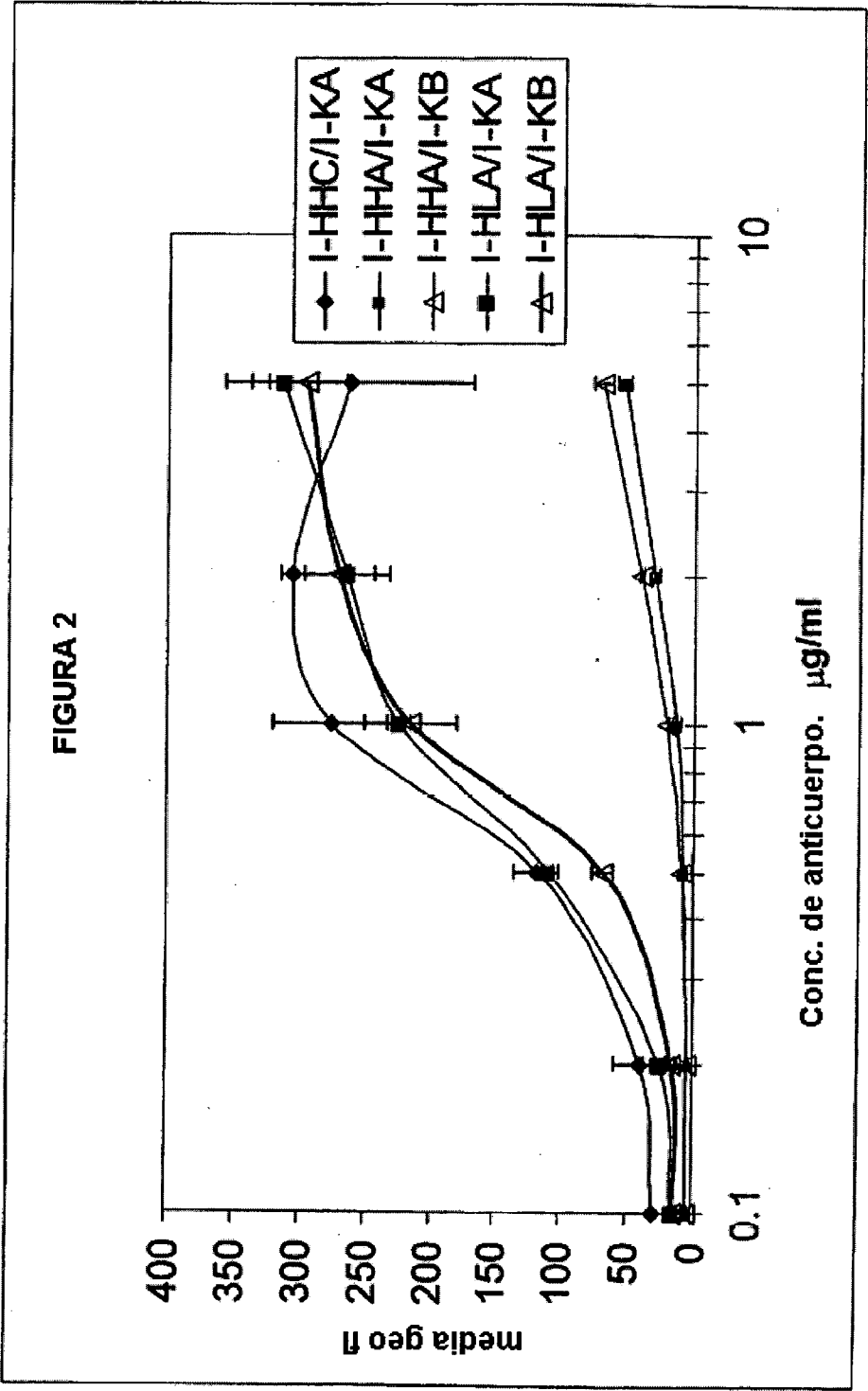
241. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 239, en donde dicho nivel de toxicidad de determina observando una serie de parámetros histopatológicos.

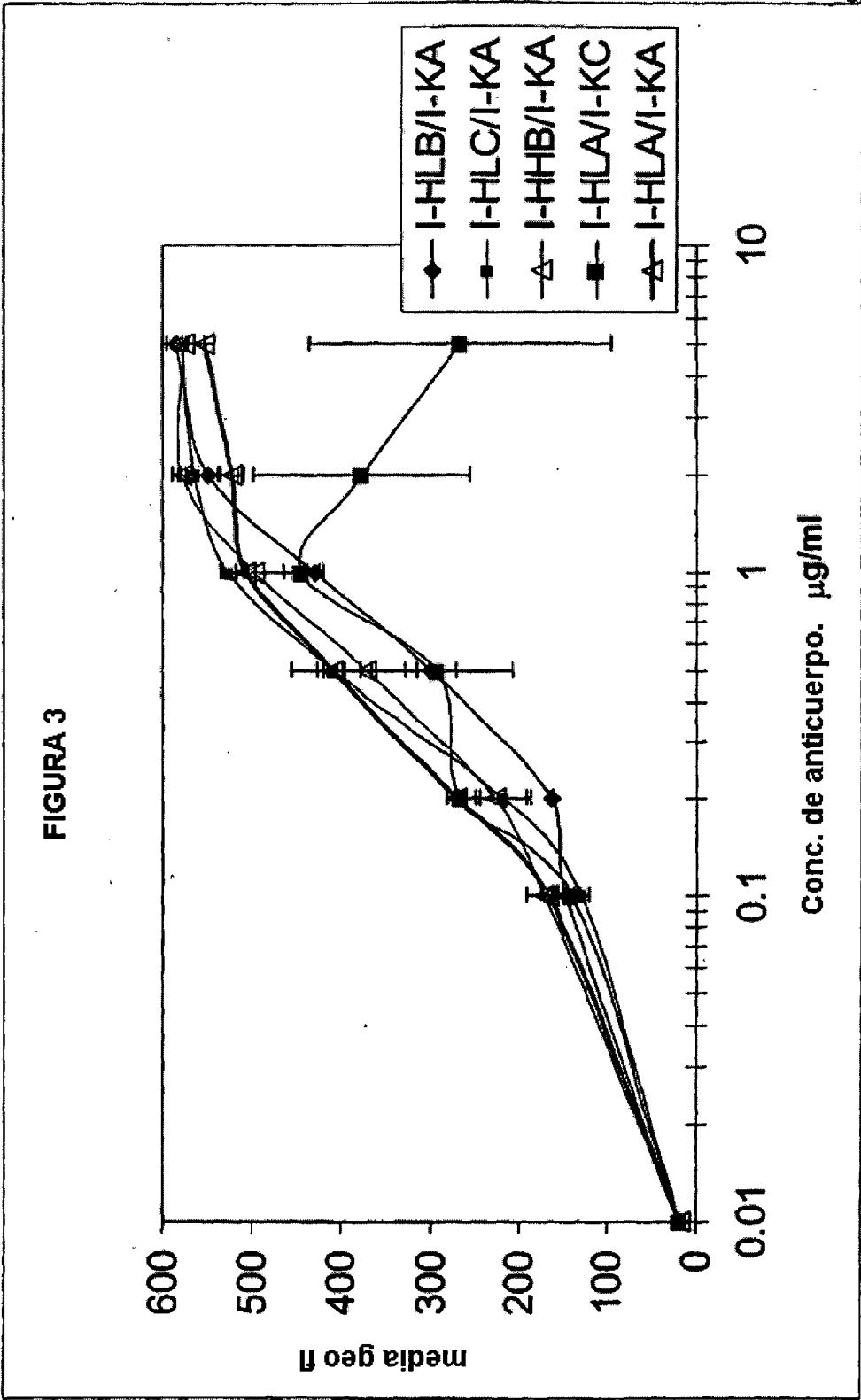
242. Un método para el tratamiento de un desorden relacionado con EGFR en un mamífero en necesidad de este tratamiento, dicho método comprende administrar a dicho mamífero una molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 48-52, 60-95, 141-149, 166-169, 180-196 o 235-241, en donde dicho tratamiento produce concentraciones en suero de dicha molécula de unión al antígeno entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 µg/ml por un período de al menos 4 semanas, y en donde dicho tratamiento no causa un nivel clínicamente significativo de toxicidad en dicho mamífero.

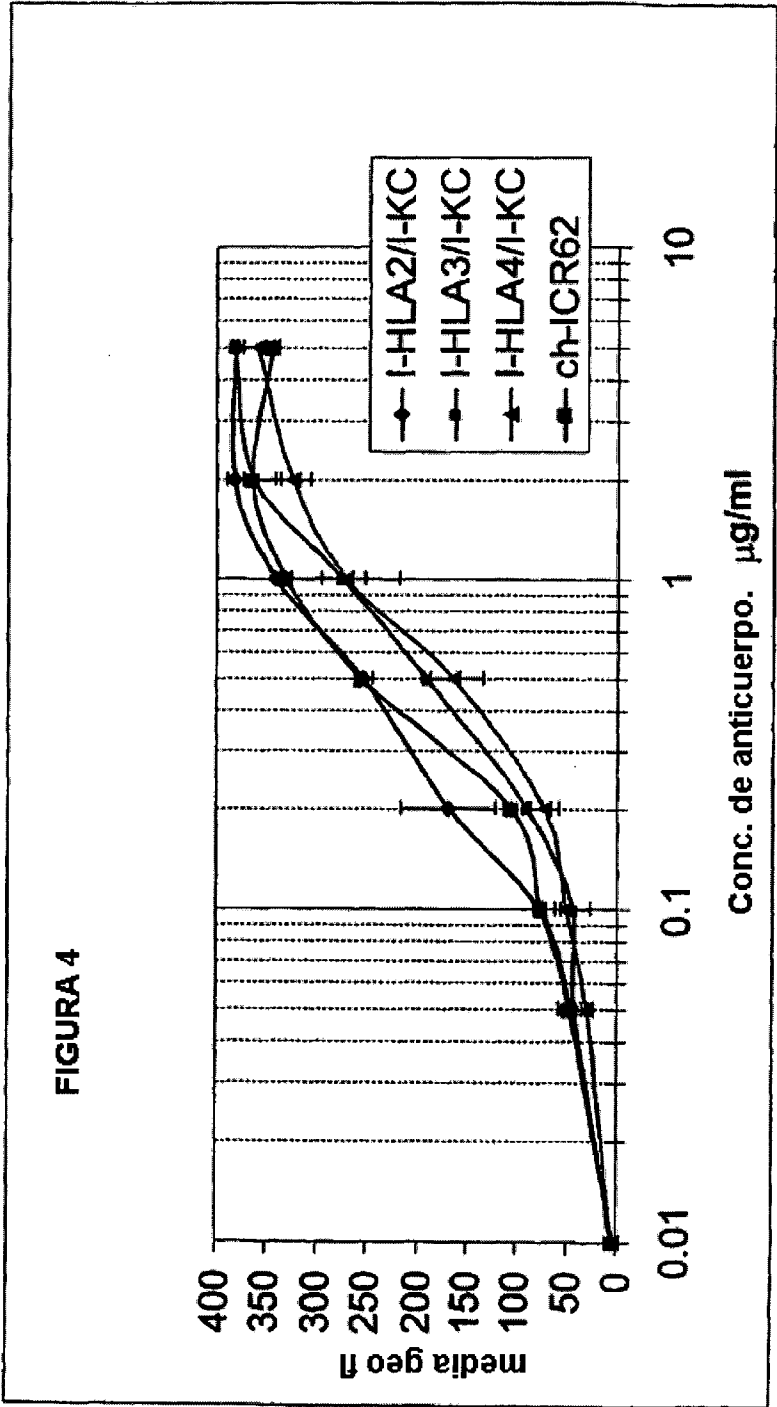
243. EL método de la reivindicación 242, en donde dicha molécula de unión de antígeno comprende un anticuerpo que ha sido glicomanipulado, en donde dicho anticuerpo tiene afinidad de unión Fegamma III aumentada comparada con una forma no glicomonipulada del anticuerpo.

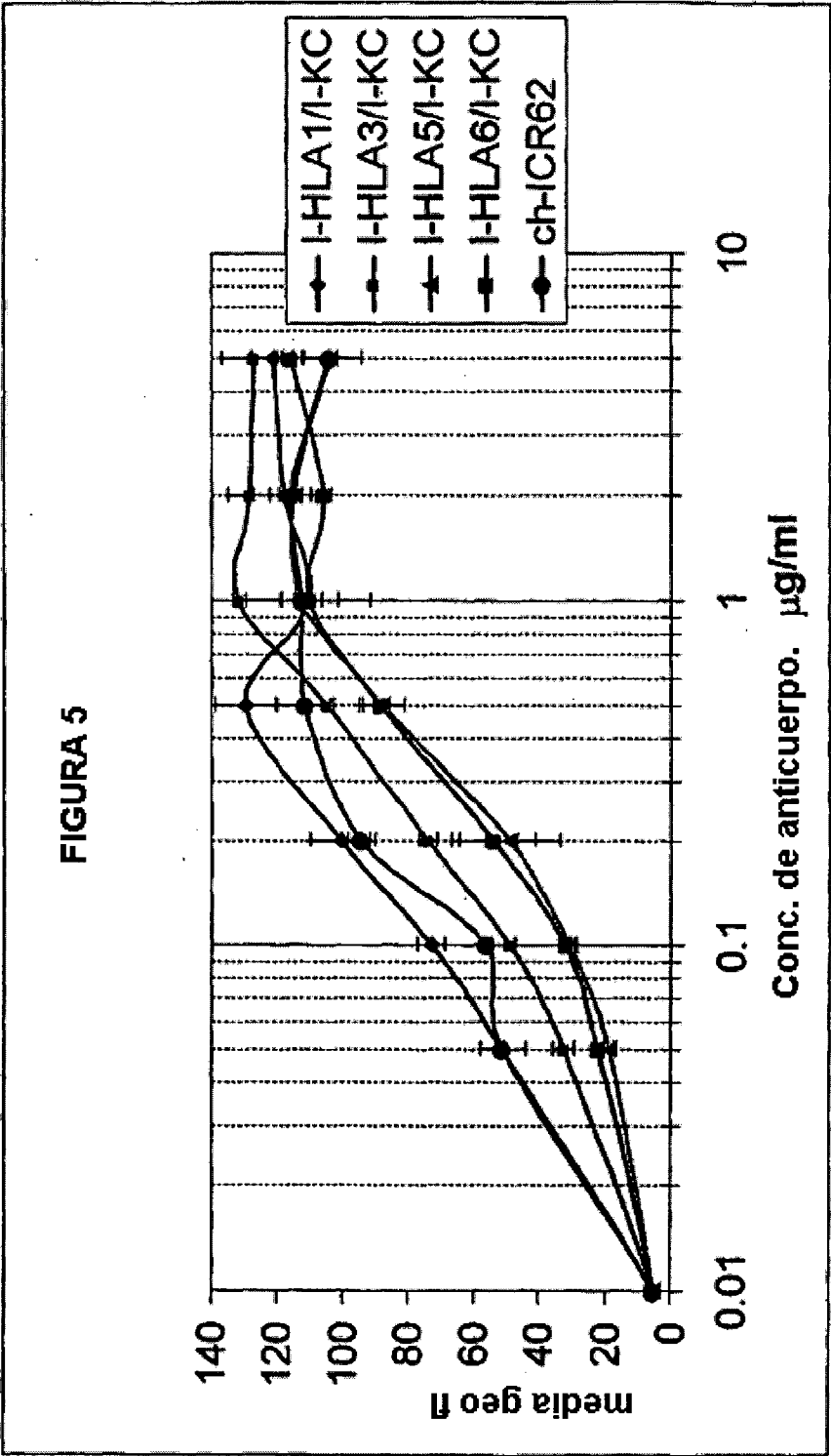
244. El uso de la molécula de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 234-241 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis del cáncer.











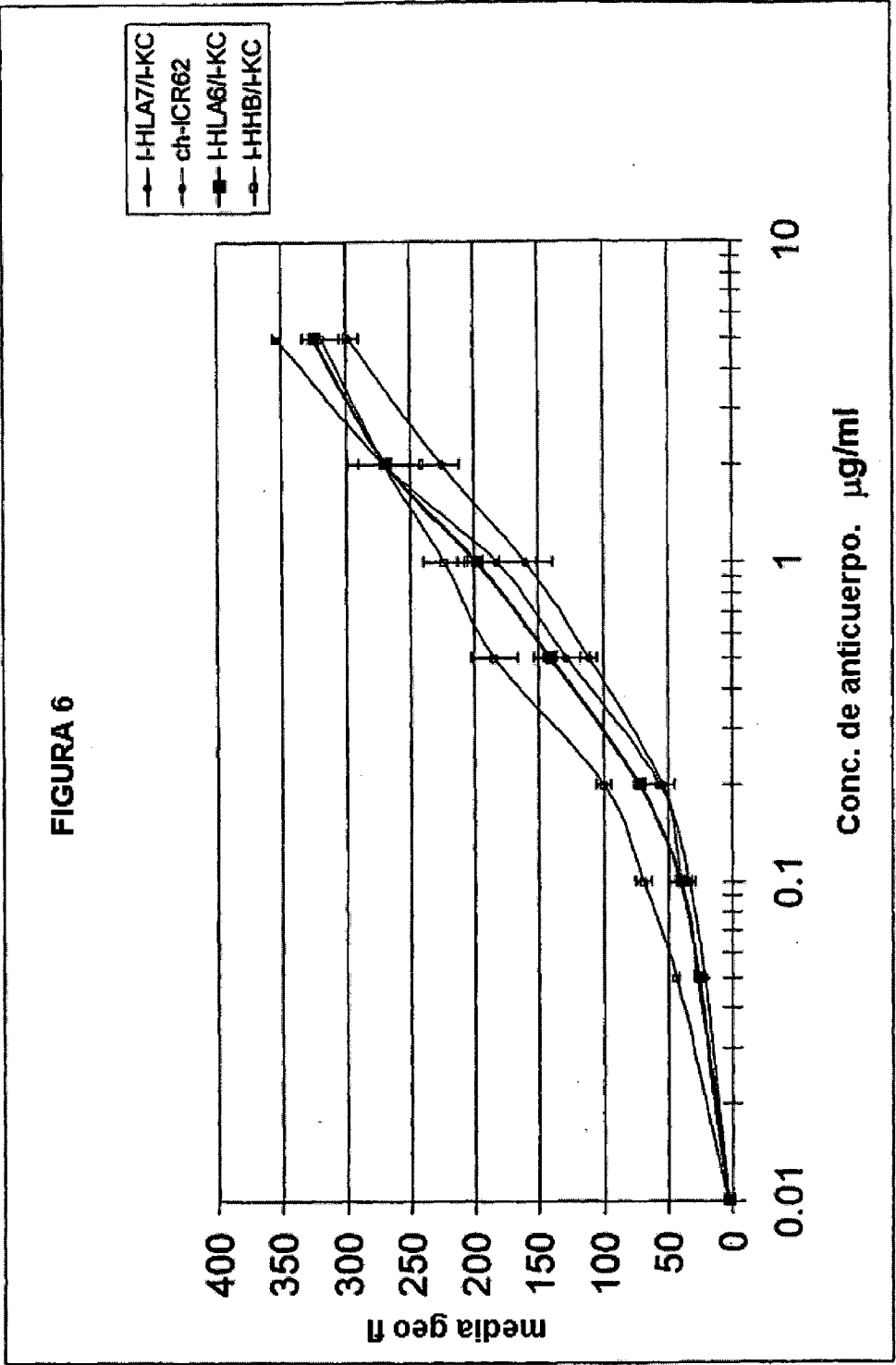


FIGURA 7

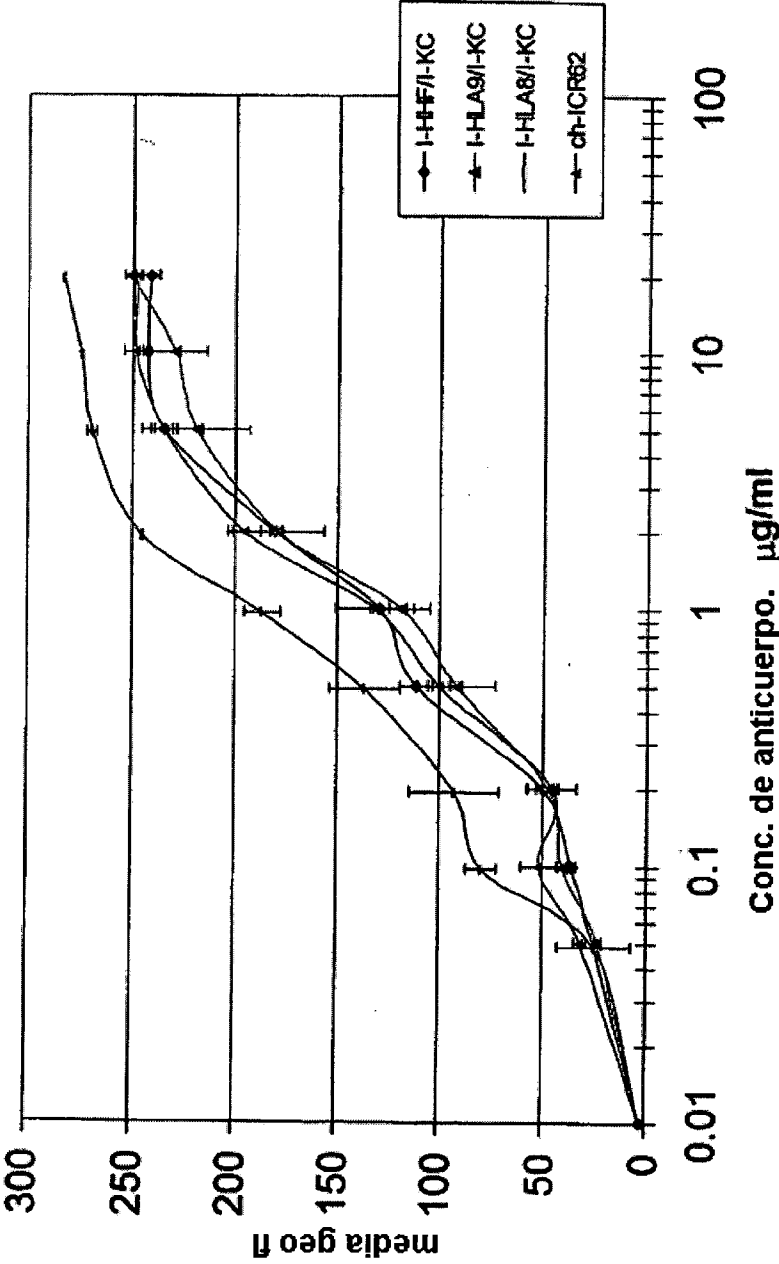


FIGURA 8

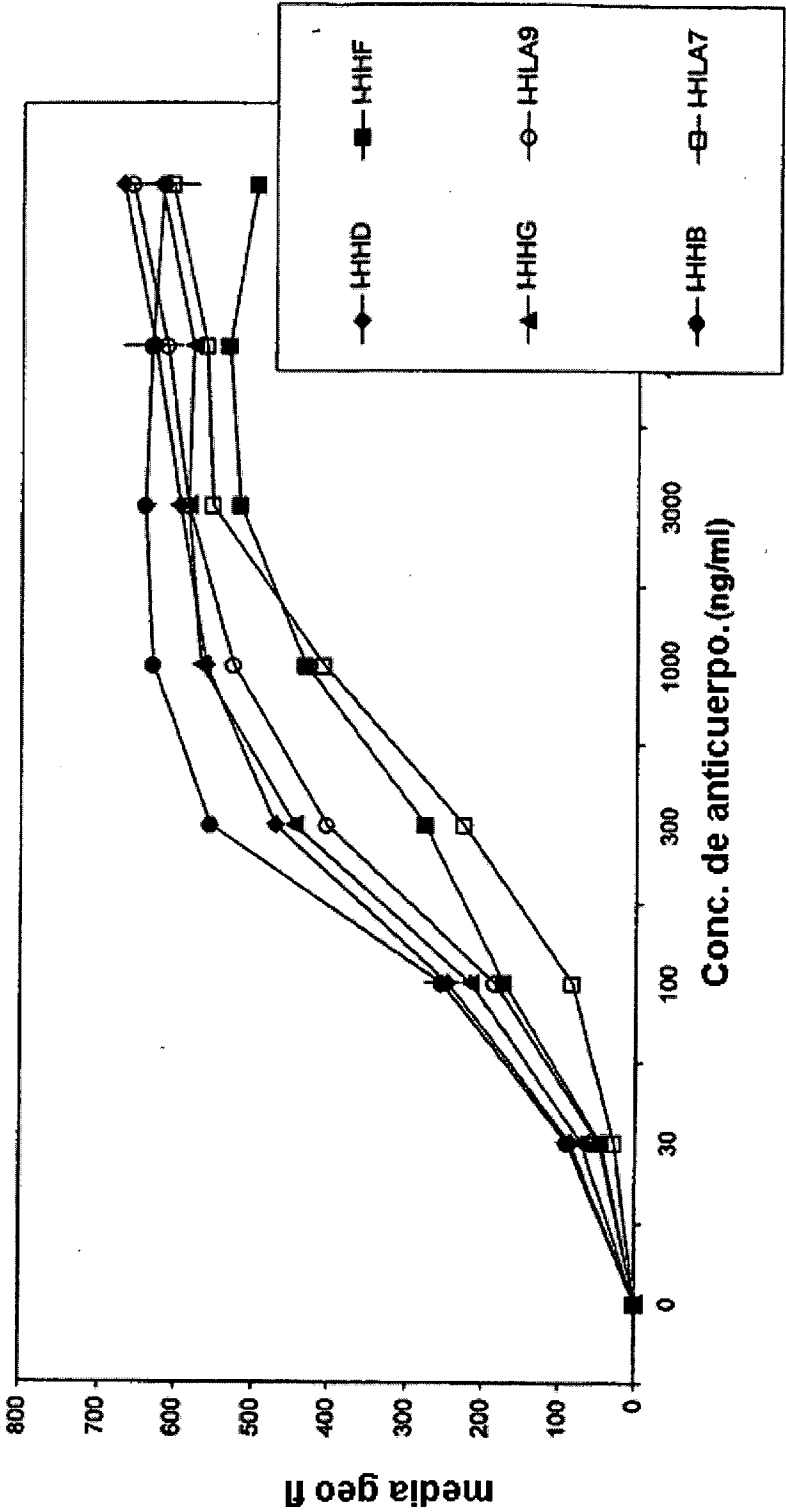
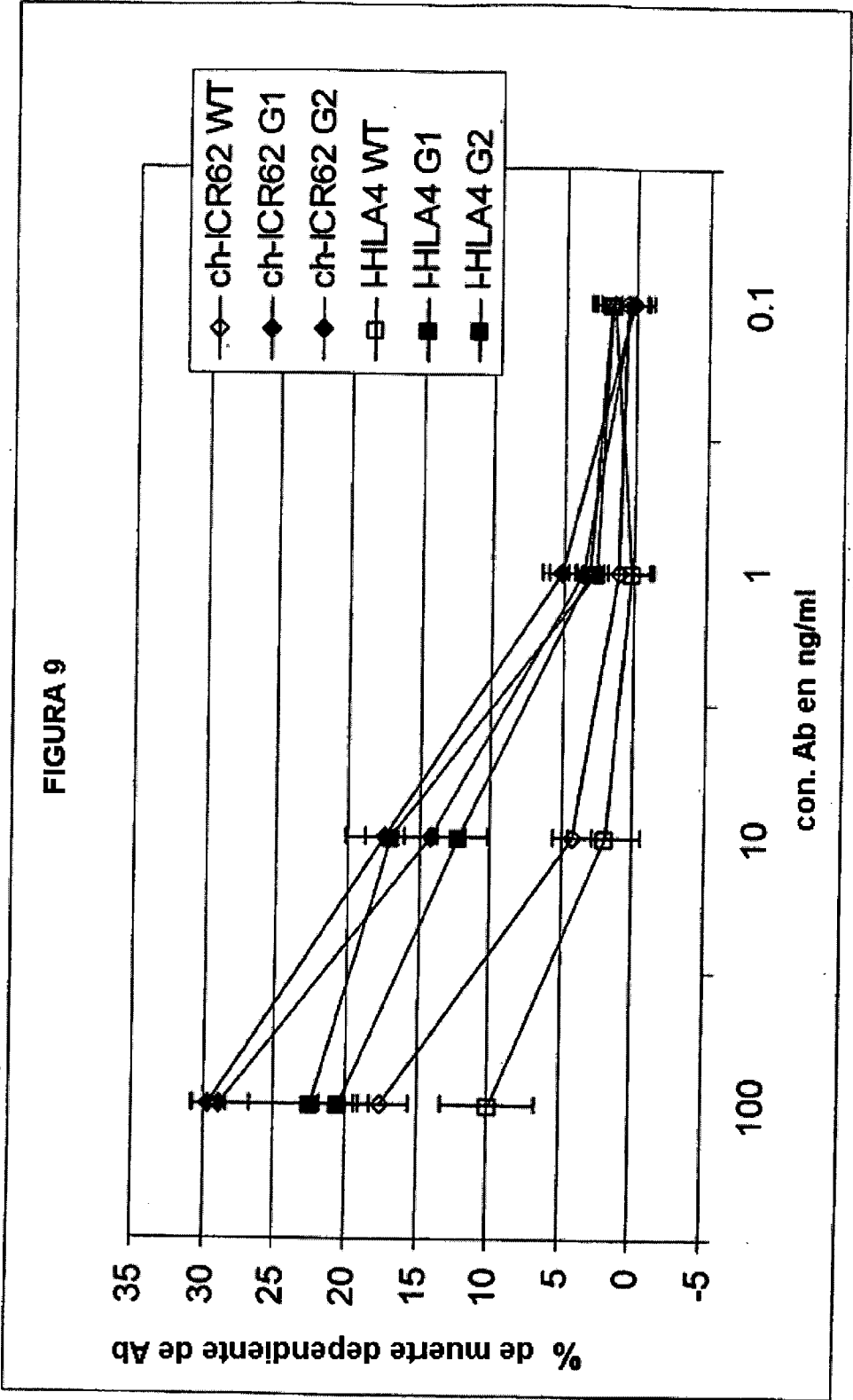
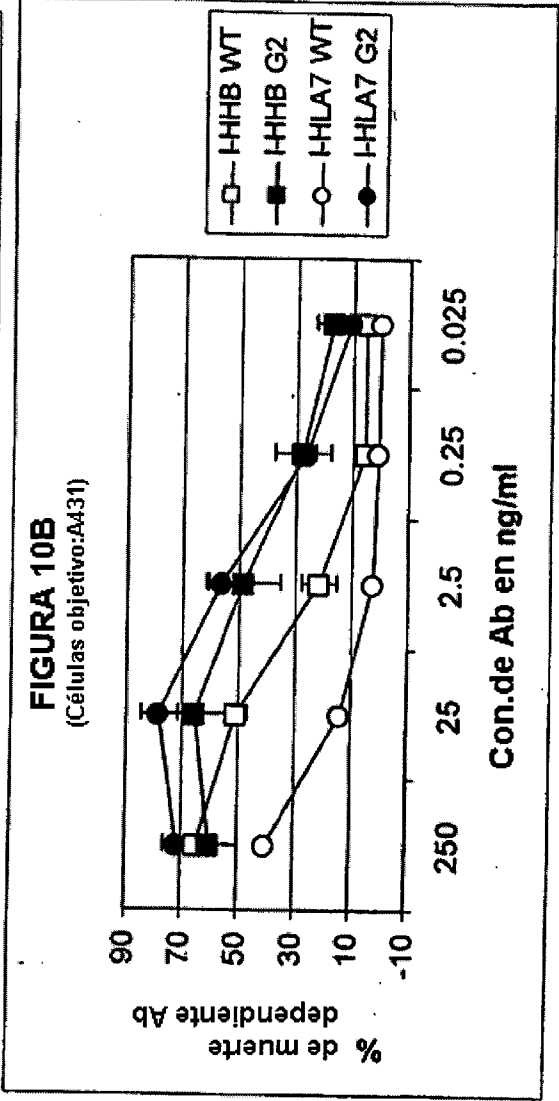
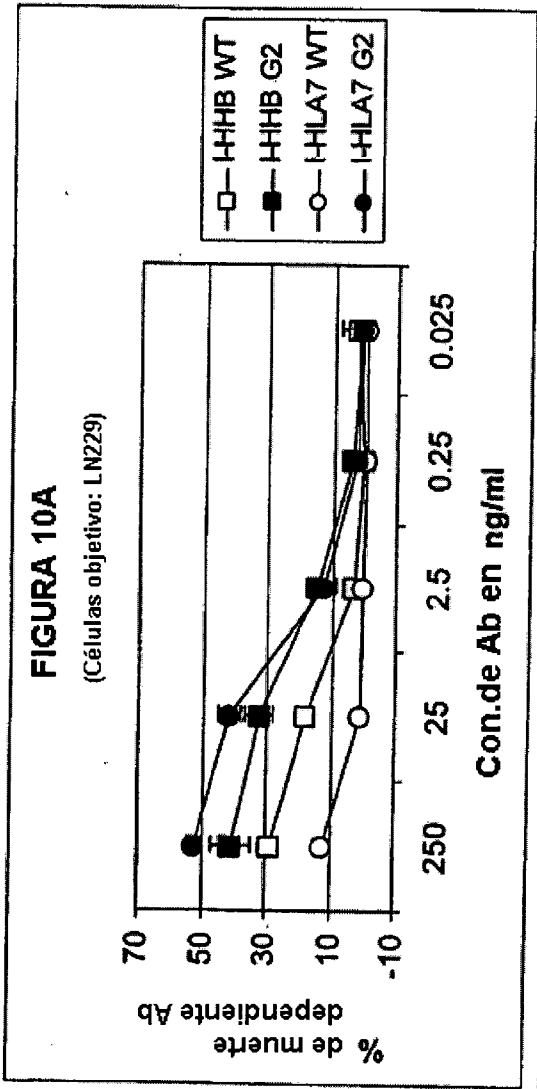


FIGURA 9





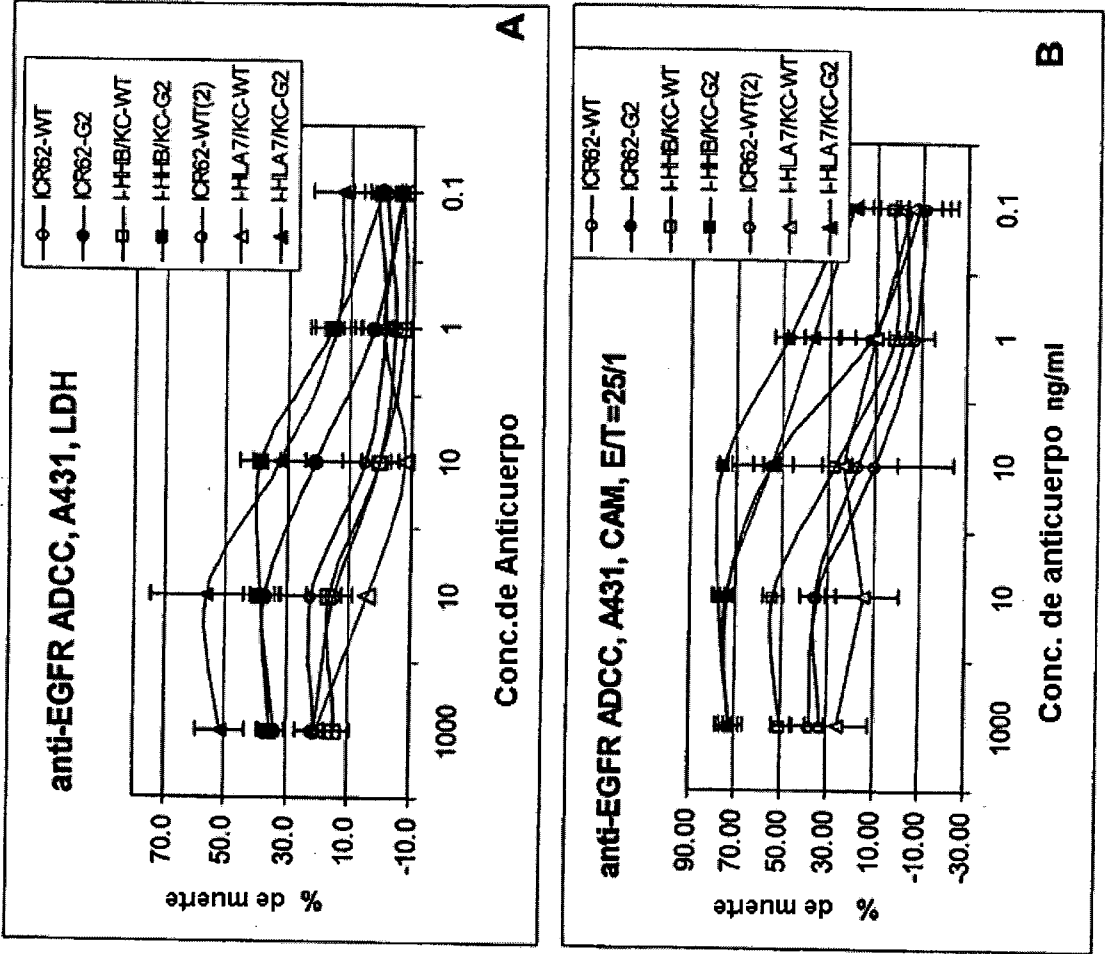


FIGURA 11

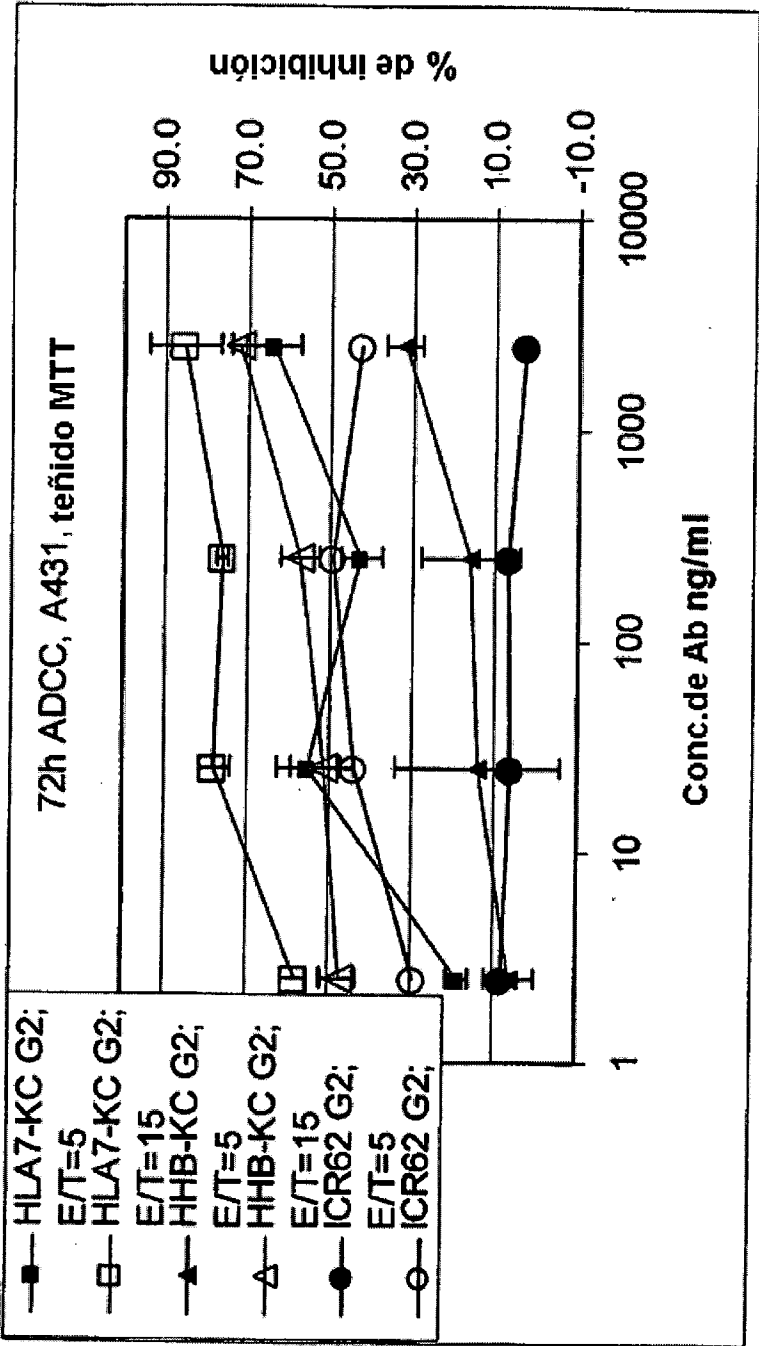


FIGURA 12

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

FIGURA 13

Ensayo de unión FcgammaRIIIa -Fc usando células CHO que muestran FcgammaRIIIa humano recombinante

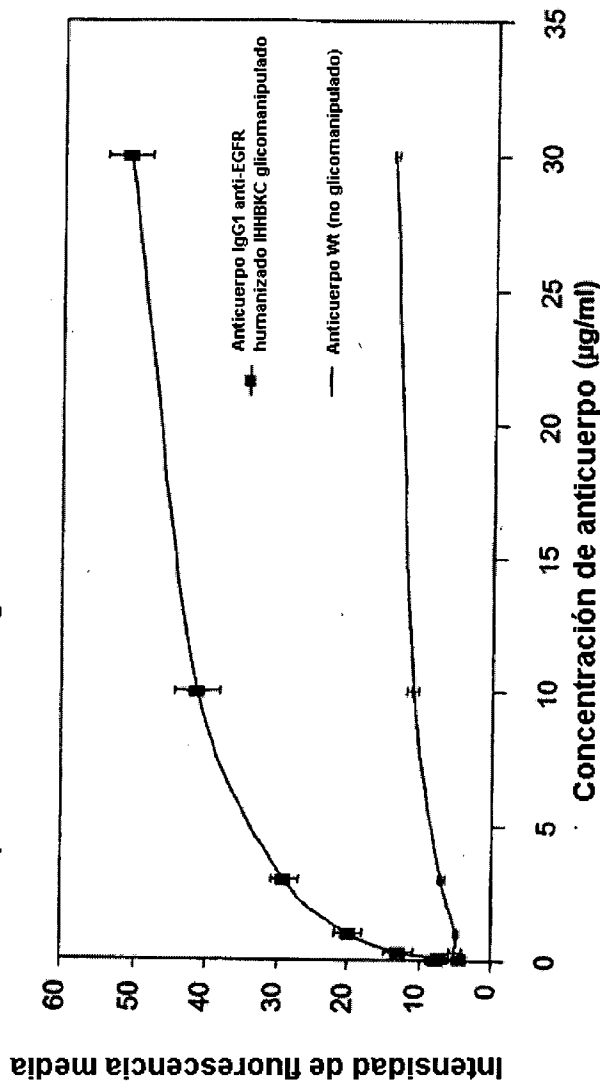


FIGURA 14

FIGURA 15
Perfil de oligosacárido MALDI/TOF-MS para el anticuerpo
IHBB-KC IgG1 humanizado glicomanipulado.

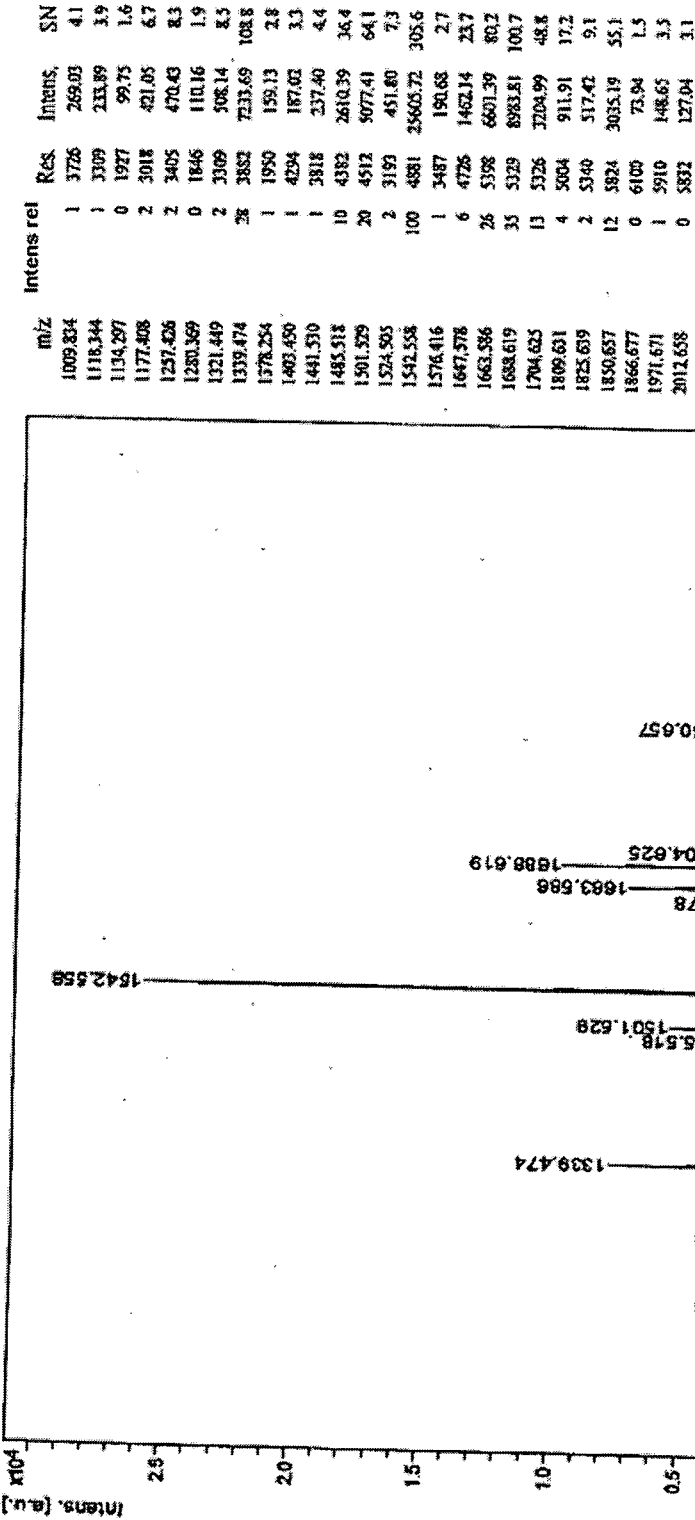


FIGURA 16

Perfil de Precisión AntiEGFR

16/29

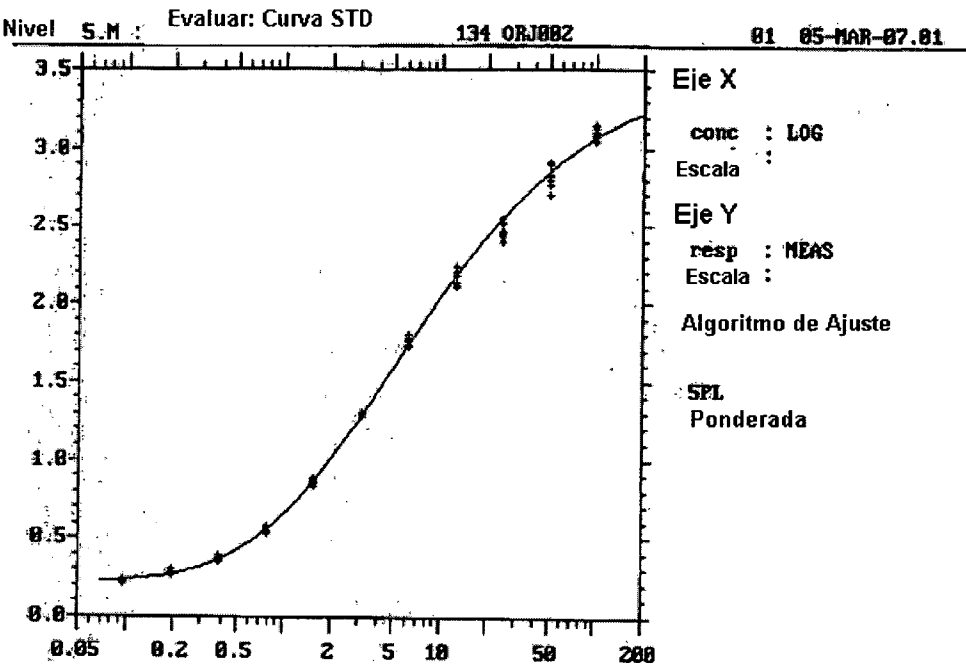


FIGURA 17

17/29

**CURVA DE CALIBRACION ANTI-EGFR
REPRESENTATIVA**

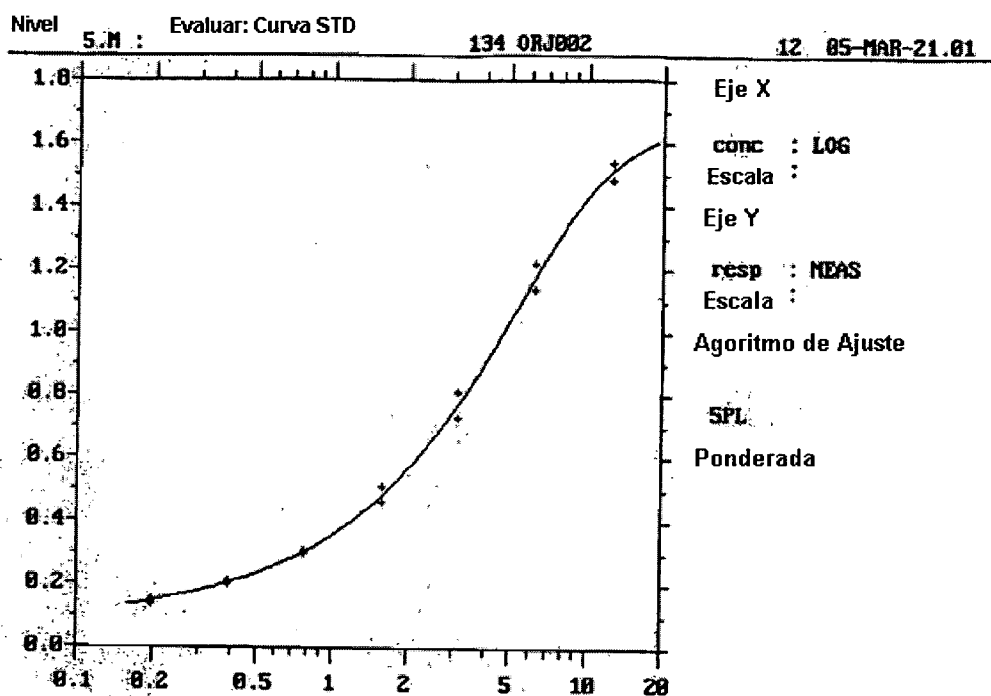


FIGURA 18

Concentraciones en suero de anti-EGFR en el Día 1 de administración intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cynomolgus machos

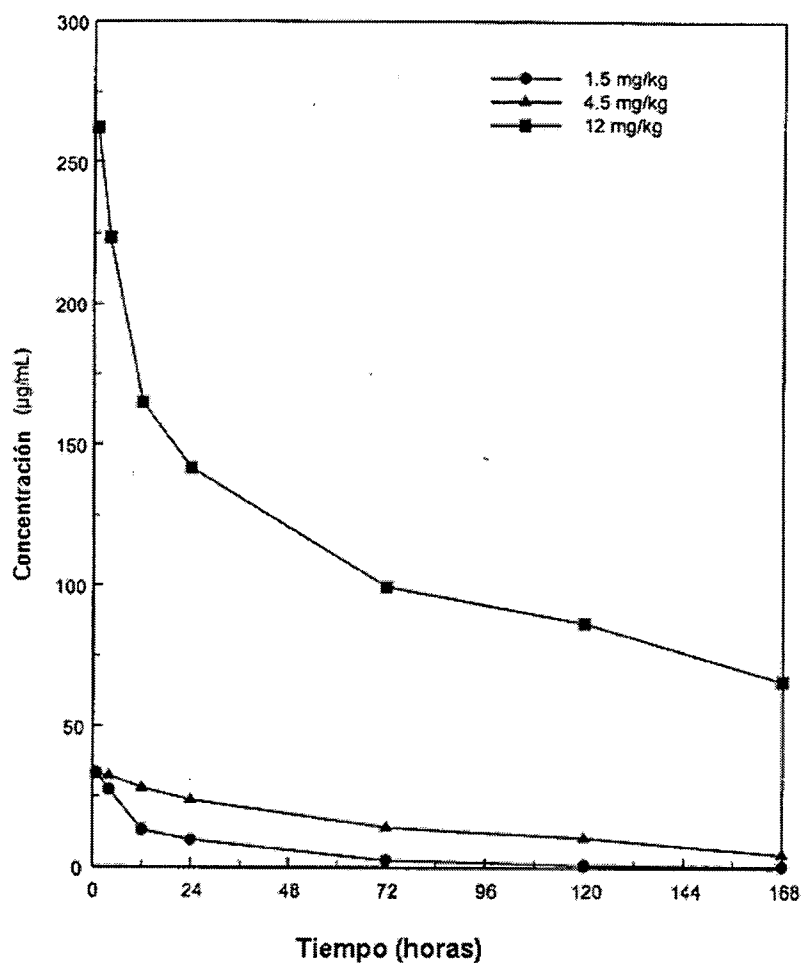


FIGURA 19

**Concentraciones en suero de anti-EGFR
en el día 1 de administración intravenosa
semanal de anti-EGFR a macacos
Cynomolgus hembra**

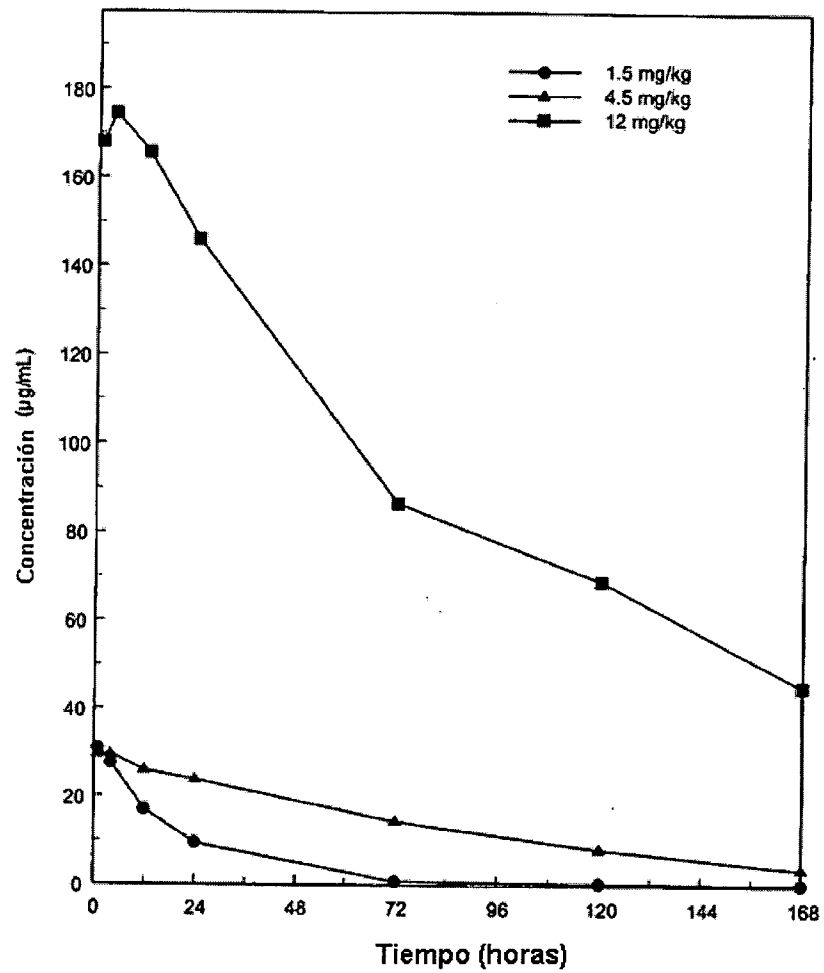


FIGURA 20

Relación entre áreas bajo las curvas de concentración de anti-EGFR en suero tiempo (AUC_{168}) y nivel de dosis en el Día 1 de administración intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cynomolgus

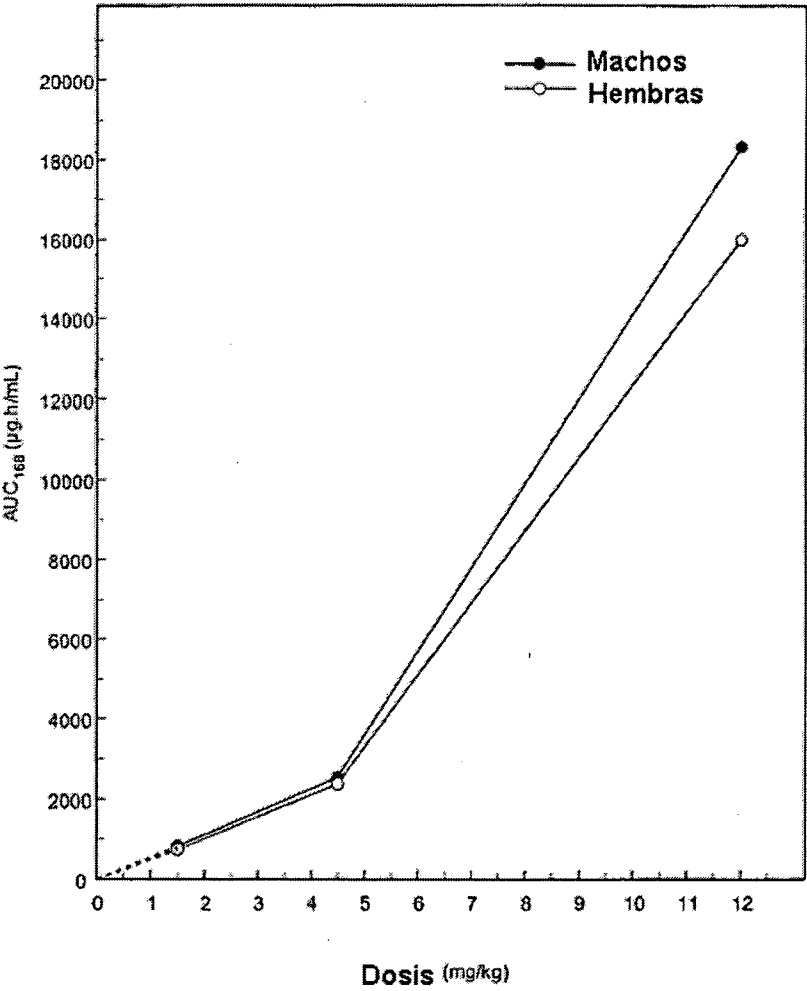


FIGURA 21

Concentraciones en suero de anti-EGFR durante la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cynomolgus

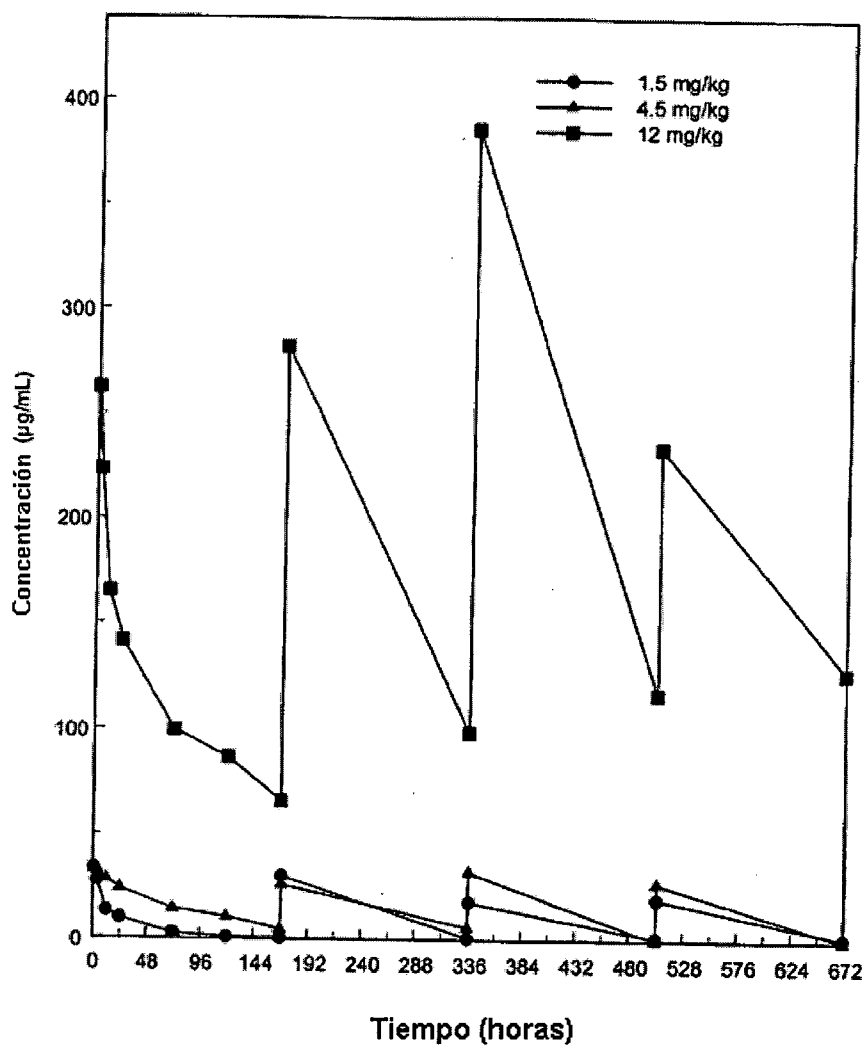


FIGURA 22

Concentraciones en suero de anti-EGFR durante la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cynomolgus hembra

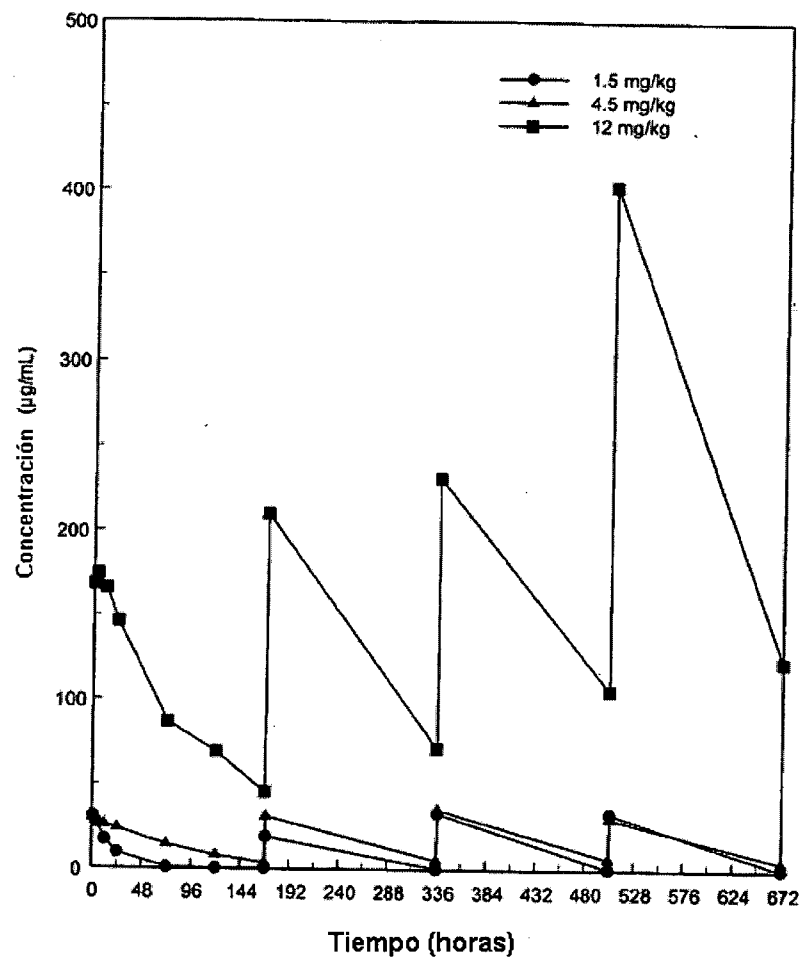


FIGURA 23

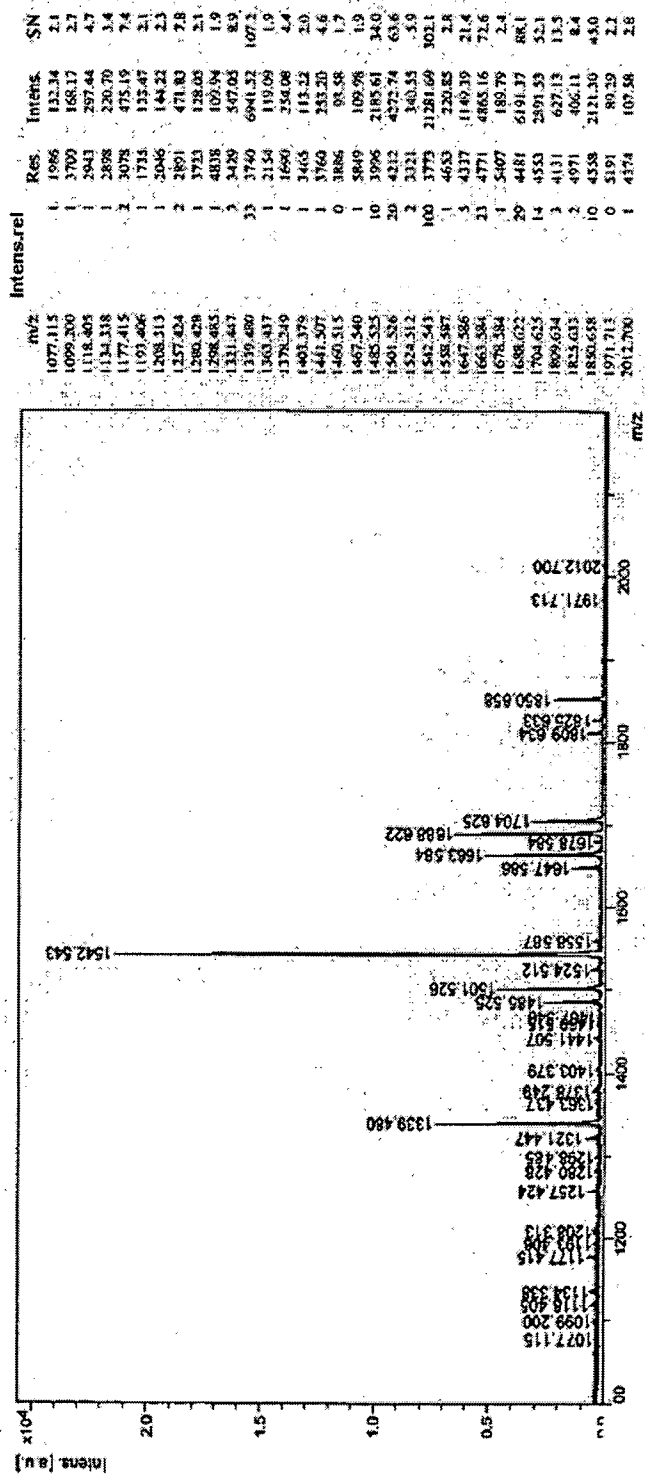


FIGURA 24

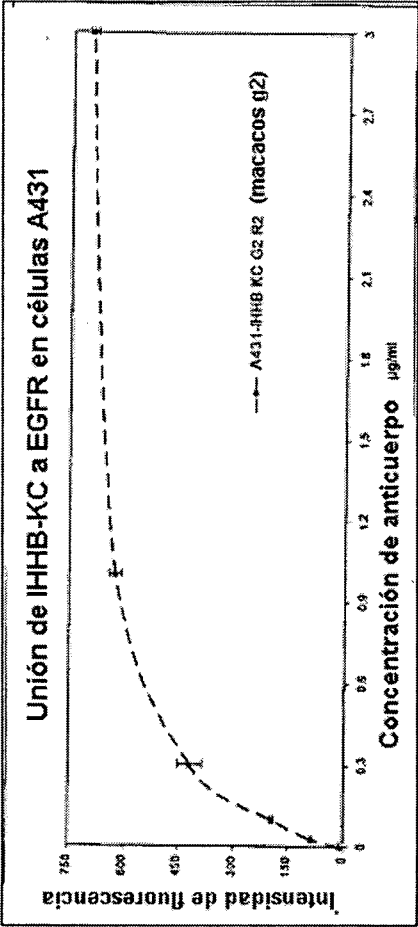


FIGURA 25

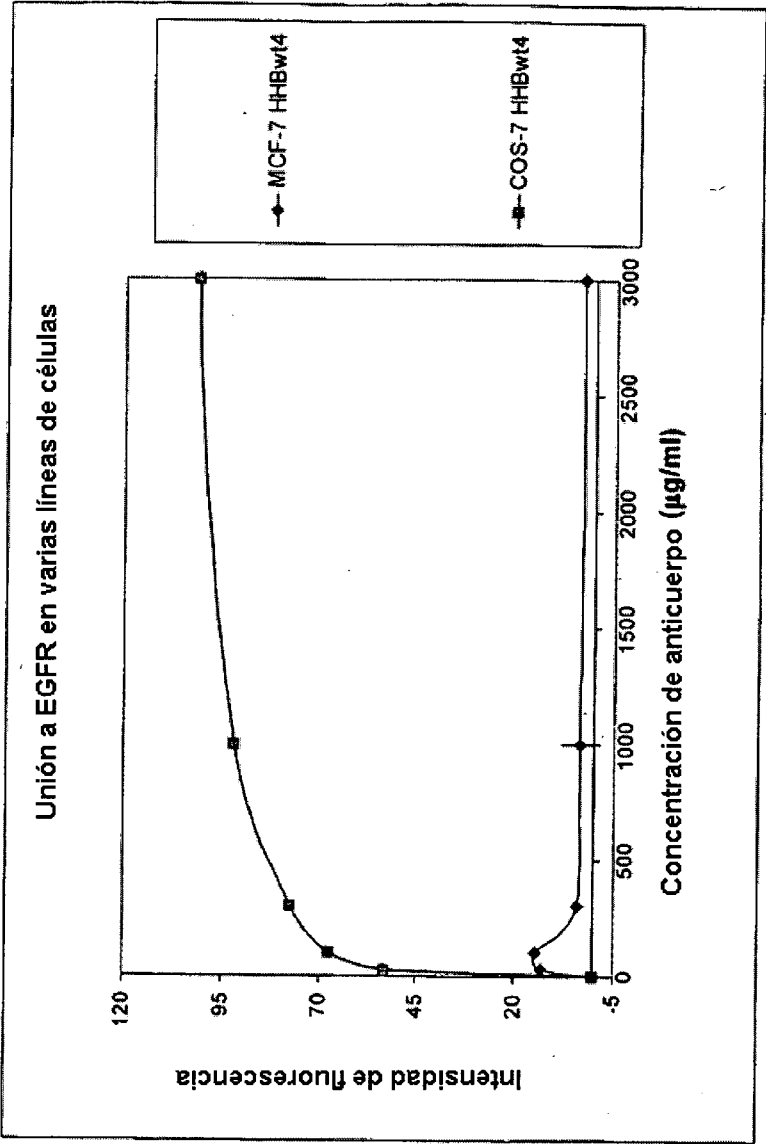


FIGURA 26

Unión de FcR a células CHO que expresan FcgammaRIIIa humanas

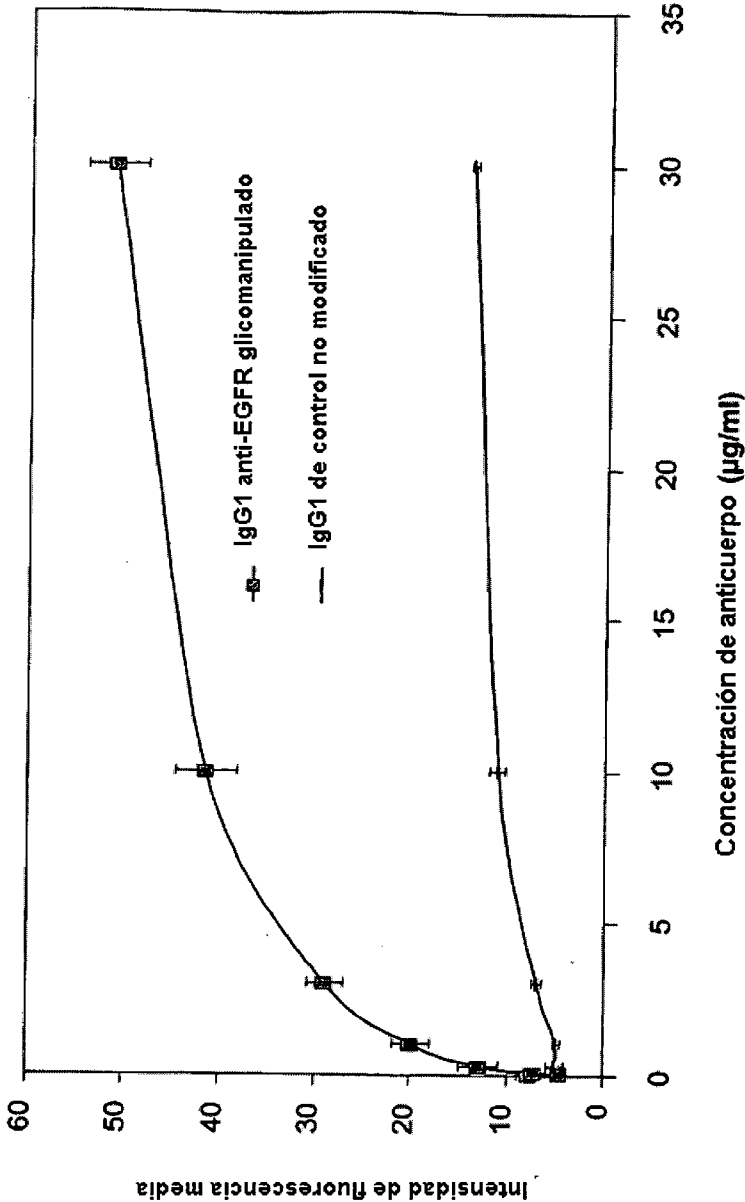


FIGURA 27
Ensayo de ADCC de 4h usando células objetivo (T) A-549
ADCC medida por el método basado en liberación de LDH
Efectores (E)PBMCs humano relación E:T=25:1

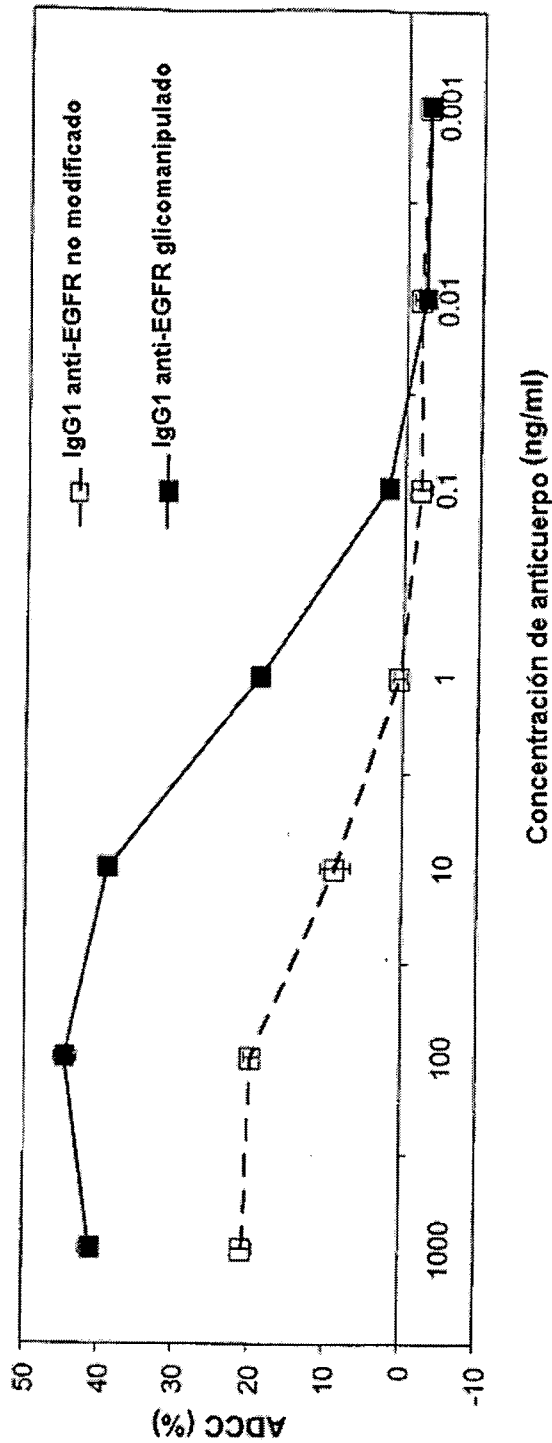


FIGURA 28
Ensayo de ADCC de 4h, usando células objetivo (T) CYNOM-K1.
ADCC medida por el método basado en liberación de LDH
Efectores (E) PBMCs humano- relación E:T=25:1

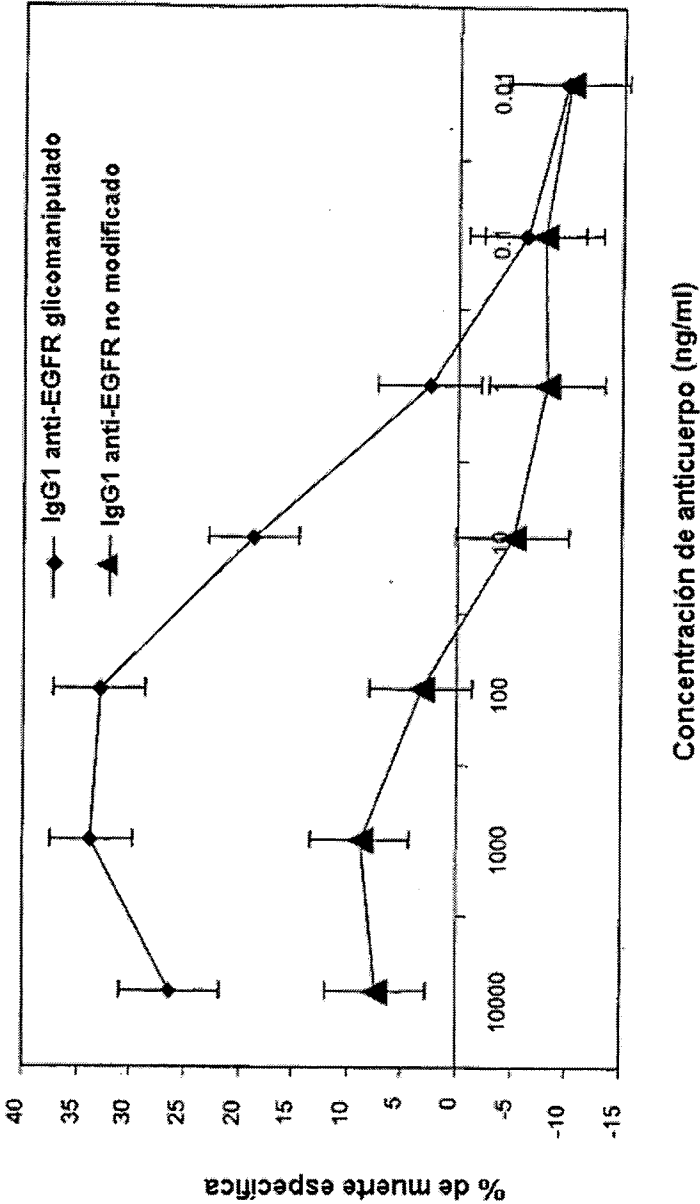
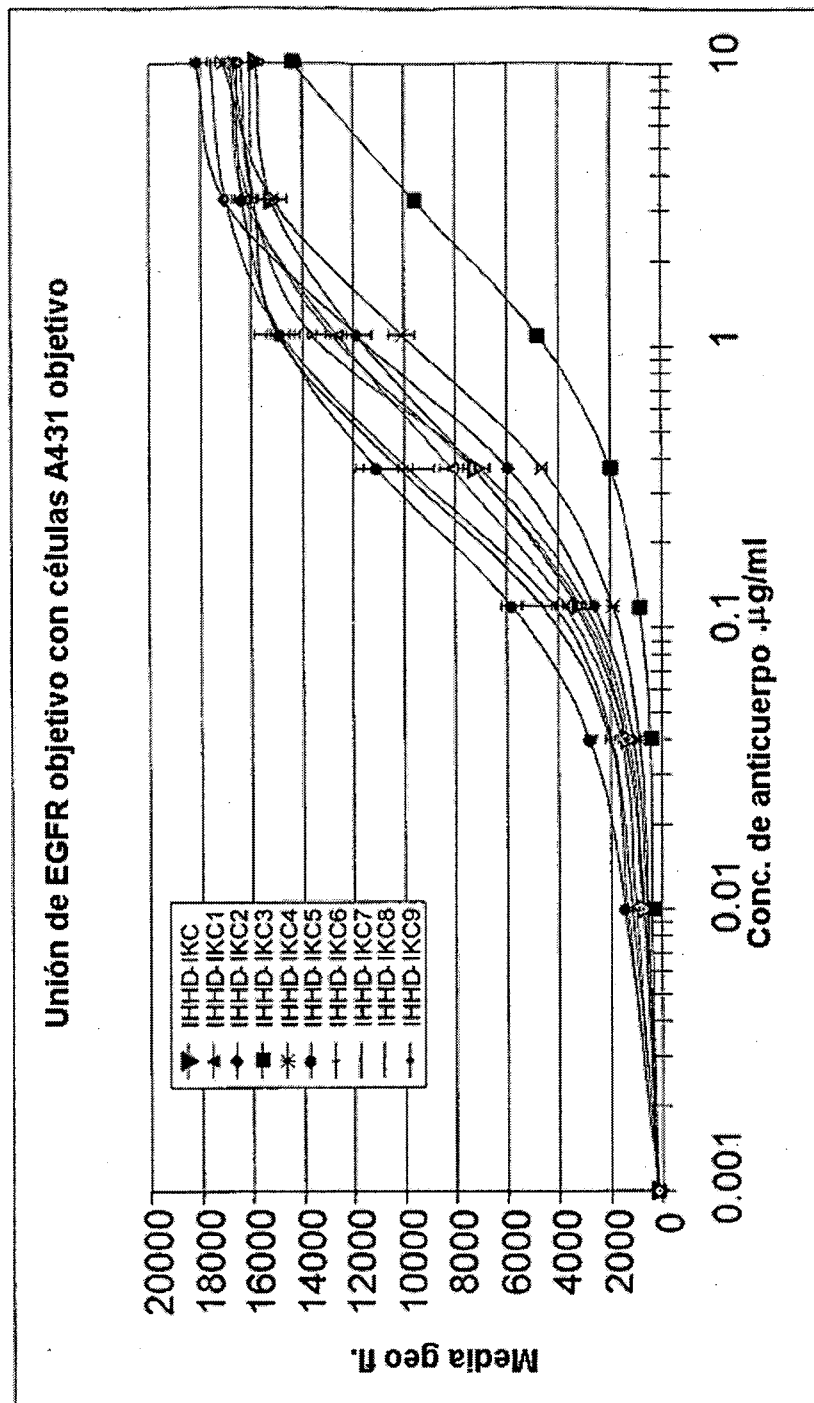


FIGURA 29





No. 07-090225- -00000-0000

Fecha: 2007-09-03 16:20:05 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 367



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒ [x]MODELO DE UTILIDAD ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ [X] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ [X] 1
- ◆ Descripción de la invención ☒ [X] 52
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒ [X] 339
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ [X] 2

COMPLETA ☒ [x]INCOMPLETA ☐ []DISEÑO INDUSTRIAL ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ []INCOMPLETA ☐ []ESQUEMA DE TRAZADO ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ []INCOMPLETA ☐ []

Claudia M Neva.
Firma Responsable

Fecha _____
Conmutador: 3 82 08 40

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia