

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 761 675**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2015 PCT/US2015/033402**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15184403**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2015 E 15800314 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3148581**

(54) Título: **Anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

(30) Prioridad:

30.05.2014 US 201462005887 P

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

20.05.2020

(73) Titular/es:

**HENLIX BIOTECH CO., LTD. (100.0%)
5F., No.36, Ln.15, Sec.6 Minquan E. Rd.
Taipei 11494, TW**

(72) Inventor/es:

**JIANG, WEI-DONG y
LIN, PEI-HUA**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 761 675 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. Nº de Serie 62/005.887, presentada el 30 de mayo de 2014.

Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (también conocido como EGFR, ErbB-1 y HER1) es un receptor de la superficie celular de la familia de receptores ErbB, una subfamilia de cuatro receptores tirosina quinasas estrechamente relacionados, que incluyen EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) y Her 4 (ErbB-4).

La unión del EGFR a un ligando (tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante a (TGF α), HB-EGF, anfiregulina, betacelulina/BTC, epígeno/EPGN u otro) induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de varios restos tirosina (Y) residuos (Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173) en el dominio C-terminal del EGFR. Esta autofosforilación produce la activación corriente abajo de varias cascadas de transducción de señales, que incluyen las rutas de MAPK, Akt y JNK, lo que conduce a la migración celular, adhesión y proliferación celular.

Las mutaciones, amplificaciones o regulaciones erróneas del EGFR o miembros de la familia están implicadas en aproximadamente 30% de todos los cánceres epiteliales. Por ejemplo, las mutaciones que conducen a la sobreexpresión o hiperactividad del EGFR se han asociado con una serie de cánceres, que incluyen el cáncer de pulmón, cáncer anal, cáncer de cabeza y cuello y glioblastoma multiforme. La identificación del EGFR como un oncogén ha llevado a la necesidad de desarrollar terapias contra el cáncer dirigidas contra el EGFR.

NAKANISHI ET AL, *Protein Eng Des Sel.* 2013 Feb;26(2):113-22 (Epub 2012 Oct 31) se refiere a "Development of an affinity-matured humanized anti-epidermal growth factor receptor antibody for cancer immunotherapy".

CHANG ET AL, *Immune Netw.* 2012 Aug;12(4): 155-64 (Epub 2012 Aug 31) se refiere a "Affinity Maturation of an Epidermal Growth Factor Receptor Targeting Human Monoclonal Antibody ER414 by CDR Mutation".

LIPPOW ET AL, *Nat Biotechnol.* 2007 Oct; 25 (10):1171-6 se refiere a "Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation".

FRIEDMAN ET AL, *J Mol Biol.* 2008 Mar 7; 376 (5): 1388-402 se refiere a "Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding affibody molecule".

El documento WO2012/130471 se refiere a "miembros de la familia de ligandos TNF", en particular "polipéptidos que comprenden al menos tres componentes A, cada uno de los cuales comprende la secuencia de un dominio de homología de TNF (THD) de un miembro de la familia de ligandos TNF, o un derivado funcional de los mismos, y que comprende al menos un componente B que consiste en una región VL y una región VH unidas directamente entre sí con una secuencia conectora L que tiene una longitud de <12 aminoácidos".

Breve resumen

Se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos N/T/Q-YGVH (SEQ ID NO: 4); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos Y-N/A/G/D-T/D/N-P/K/E-FTSRF (SEQ ID NO: 9); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY (SEQ ID NO: 14); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos I-G/R/S-T/L/P-NIH (SEQ ID NO: 20); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KY-A/G-SE-S/T-I-S/R (SEQ ID NO: 24); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPT-T/L/S/A/Y (SEQ ID NO: 30).

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 1-3; (2) una CDR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 5-8; y (3) una CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 10-13; y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 15-19; (2) una CDR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 21- 23; (3) una CDR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 25-29. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2)

una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YNTPFTSRF (SEQ ID NO: 5); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos TYDYEFAY (SEQ ID NO: 10); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTT (SEQ ID NO: 25). En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YNTPFTSRF (SEQ ID NO: 5); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27). En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).

En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YATEFTSRF (SEQ ID NO: 7); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27). En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YDDKFTSRF (SEQ ID NO: 6); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27). En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos TYGVH (SEQ ID NO: 3); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IRTNIH (SEQ ID NO: 16); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYGSESIS (SEQ ID NO: 22); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27). En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ISTNIH (SEQ ID NO: 19); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYGSESIS (SEQ ID NO: 22); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).

También se proporciona un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) CDR-H2 aglicosilado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H2 seleccionada que comprende la secuencia de aminoácidos Y-A/G/D-D/N-K/E-FTSRF (SEQ ID NO: 31). En algunas realizaciones, el dominio variable de la cadena pesada comprende además una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos N/T/Q-YGVH (SEQ ID NO: 4) y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY (SEQ ID NO: 14). En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende además una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos I-G/R/S-T/L/P-NIH (SEQ ID NO: 20); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KY-A/G-SE-S/T-T-S/R (SEQ ID NO: 24); y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPT-T/L/S/A/Y (SEQ ID NO: 30).

En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia de Fc de una IgG humana. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como

- se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, Fab', F(ab)'2, Fv monocatenario (scFv), Fv, un diacuerpo y un anticuerpo lineal. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a)
- 5 cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo se conjuga con un agente terapéutico. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo se conjuga con un marcador. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el marcador se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un colorante fluorescente, y una enzima.
- 10 En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo afucosilado.
- En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo se conjuga con un agente citotóxico. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente citotóxico es
- 15 una maytansina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, la maytansina o un derivado de la misma es DM-1.
- También se describe en la presente memoria una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores. También se proporciona un vector de expresión que codifica la molécula de ácido nucleico de acuerdo
- 20 con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores. También se proporcionan células que comprenden el vector de expresión de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores. La descripción también proporciona un método de producción de un anticuerpo, que comprende cultivar una célula de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo del cultivo celular. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a)
- 25 cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula de mamífero es una célula CHO. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula es una línea de células de mamífero estable. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera, la línea de células de mamífero estable es una línea de células CHO.
- 30 La descripción proporciona una composición que comprende el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- La descripción proporciona un método de detección de una proteína EGFR en una muestra de un paciente, poniendo en contacto el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores con la muestra y detectando el anticuerpo anti-EGFR unido a la proteína EGFR. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo se usa en un ensayo de inmunohistoquímica (IHC) o en un ensayo ELISA.
- 35 También se proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con (o como se aplica a) el sujeto. También se proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores para usar en el tratamiento del cáncer. Se proporciona el uso de un anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el cáncer se
- 40 selecciona de cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, se administra además al sujeto un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento y un agente citotóxico.
- 45 En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el cáncer es cáncer de garganta. En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, se administra además al sujeto terapia de radiación.
- 50 En algunas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, se administra además al sujeto un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento y un agente citotóxico.
- 55 En ciertas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto al que se administra una composición que comprende un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria tiene KRAS de tipo natural. En ciertas realizaciones de acuerdo con (o

como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto al que se administra una composición que comprende un anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria tiene la mutación KRAS^{G13D}. En ciertas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto al que se administra una composición que comprende un anticuerpo anti-EGFR o

5 un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria, tiene BRAF de tipo natural. En ciertas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto al que se administra una composición que comprende un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria tiene la mutación BRAF^{V600E}.

10 En ciertas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto al que se administra una composición que comprende un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria es resistente a Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto al que se administra una composición que comprende un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria ha progresado en Erbitux o su biosimilar.

Breve descripción de los dibujos

20 La FIG. 1 muestra los resultados de los ELISA realizados para comparar la unión de variantes de Fab anti-EGFR obtenidas de una biblioteca de CDR-L3/CDR-H3 contra EGFR.

La FIG. 2 muestra los resultados de los ELISA realizados para comparar la unión de variantes de anticuerpos IgG anti-EGFR de longitud completa obtenidas de una biblioteca de CDR-L3/CDR-H3 contra EGFR.

25 La FIG. 3 muestra los resultados de los ELISA de disociación realizados para comparar la disociación del anticuerpo HLX05 (es decir, un anticuerpo biosimilar a ERBITUX de producción interna) y las variantes de anticuerpo anti-EGFR obtenidas de una biblioteca de CDR-H2 contra EGFR.

La FIG. 4 muestra los resultados de los ELISA realizados para comparar la unión directa al EGFR del anticuerpo HLX05 (es decir, un anticuerpo biosimilar a ERBITUX de producción interna), ERBITUX® adquirido de Merck KGaA, anticuerpos anti-EGFR 1-26/2-68, 1-26/3-67, #8/#33, #34/#33 y rituximab.

30 La FIG. 5 muestra los resultados de los ELISA competitivos realizados para comparar la unión al EGFR de HLX05, ERBITUX®, Rituximab y anticuerpos anti-EGFR 1-26/2-68, 1-26/3-67, #8/#33 y #34/#33.

Las FIGS. 6A y 6B muestran los resultados de los análisis de glicanos realizados en HLX05, ERBITUX® y anticuerpos anti-EGFR 1-26/2-68, 1-26/3-67, #8/#33, #34/#33.

La FIG. 7 muestra los resultados de los ELISA realizados para comparar la unión de Fc_YIII de HLX05, ERBITUX® y anticuerpos anti-EGFR 1-26/2-68, 1-26/3-67, #8/#33, #34/#33.

35 La FIG. 8A muestra los resultados de los análisis realizados para comparar la actividad ADCC de HLX05 y el anticuerpo anti-EGFR 1-26/2-68. La FIG. 8B muestra los resultados de los análisis realizados para comparar la actividad ADCC de HLX05 y el anticuerpo anti-EGFR #8/#33. La FIG. 8C muestra los resultados de los análisis realizados para comparar la actividad ADCC de los anticuerpos anti-EGFR 1-26/2-68 y 1-26/3-67. La FIG. 8D muestra los resultados de los análisis realizados para comparar la actividad ADCC de HLX05 y anticuerpo anti-EGFR 1-26/3-67. La FIG. 8E muestra los resultados de los análisis realizados para comparar la actividad ADCC de HLX05 y el anticuerpo anti-EGFR #34/#33. La FIG. 8F muestra los resultados de los análisis realizados para comparar la actividad ADCC de los anticuerpos anti-EGFR #8/#33 y #34/#33. La FIG. 8G muestra resultados cuantificados de análisis realizados para comparar la actividad ADCC de HLX05, 1-26/2-68, 1-26/3-67, #8/#33 y #34/#33.

45 La FIG. 9A muestra los resultados de los análisis realizados para comparar los efectos antiproliferativos de HLX05 y el anticuerpo anti-EGFR 1-26/2-68 en células A431. La FIG. 9B muestra los resultados de los análisis realizados para comparar los efectos antiproliferativos de HLX05 y el anticuerpo anti-EGFR #8/#33 en células A431. La FIG. 9C muestra los resultados de los análisis realizados para comparar para comparar los efectos antiproliferativos de los anticuerpos anti-EGFR 1-26/2-68 y 1-26/3-67 en células A431. La FIG. 9D muestra los resultados de los análisis realizados para comparar los efectos antiproliferativos de HLX05 y el anticuerpo anti-EGFR 1-26/3-67 en células A431. La figura 9E muestra los resultados de los análisis realizados para comparar los efectos antiproliferativos de HLX05 y el anticuerpo anti-EGFR #34/#33 en células A431. La FIG. 9F muestra los resultados de los análisis realizados para comparar los efectos antiproliferativos de los anticuerpos anti-EGFR #8/#33 y #34/#33 en células A431. La FIG. 9G muestra resultados cuantificados de análisis realizados para comparar los efectos antiproliferativos de HLX05, 1-26/2-68, 1-26/3-67, #8/#33 y #34/#33 en células A431.

55 La FIG. 10 representa los resultados de un ensayo de xenoinjerto de tumor A431 que mide la capacidad de

ERBITUX®, #34/#33, 1-26/3-67 y 1-26/2-68 para inhibir el crecimiento tumoral.

La FIG. 11 muestra los niveles séricos de #34/#33, 1-26/3-67, 1-26/2-68, y ERBITUX® tanto el día 3 como el día 35.

La FIG. 12 representa los resultados de un ensayo de xenoinjerto de tumor FaDu que mide la capacidad de HLX05, 1-26/3-67, ERBITUX® y placebo para inhibir el crecimiento tumoral.

5 La FIG. 13 representa los resultados de un ensayo de xenoinjerto de tumor FaDu que mide la capacidad de 1-26/3-67 + radioterapia, ERBITUX®, + radioterapia y placebo + radioterapia para inhibir el crecimiento tumoral.

10 La FIG. 14A muestra los resultados de experimentos in vitro realizados para evaluar la capacidad de HLX07-DM1, HLX07 y anticuerpo de control para inhibir el crecimiento en células DiFi (KRAS^{WT}, BRAF^{WT}). La FIG. 14B muestra los resultados de experimentos in vitro realizados para evaluar la capacidad de HLX07-DM1, HLX07 y anticuerpo de control para inhibir el crecimiento en células HCT-116 (KRAS^{G13D}). La FIG. 14C muestra los resultados de experimentos in vitro realizados para evaluar la capacidad de HLX07-DM1, HLX07 y anticuerpo de control para inhibir el crecimiento en células HT29 (BRAF^{V600E}).

15 La FIG. 15A muestra la actividad ADCC de 1-26/3-67-FF (es decir, "sin fuscosa"), 1-26/3-67 y anticuerpo de control contra células DiFi (KRAS^{WT}) con células efectoras PBMC. La FIG. 15B muestra la actividad ADCC de 1-26/3-67-FF (es decir, "sin fuscosa"), 1-26/3-67 y anticuerpo de control contra las células HCT-116 (KRAS^{G13D}) con células efectoras PBMC. La FIG. 15C muestra la actividad ADCC de 1-26/3-67-FF (es decir, "sin fuscosa"), 1-26/3-67 y anticuerpo de control contra células HT29 (BRAF^{V600E}) con células efectoras PBMC.

20 La FIG. 16A muestra los resultados de un ELISA realizado para comparar las concentraciones en el suero de 34/33 y 3/67 a lo largo del tiempo en macacos cangrejeros. La FIG. 16B muestra los resultados de un ELISA realizado para comparar las concentraciones en el suero de HLX05 (es decir, 1-3) y ERBITUX® (es decir, 4-6) a lo largo del tiempo en macacos cangrejeros.

La FIG. 17 muestra la concentración (mg/ml) de anticuerpo 1-26/3-67 frente al tiempo producido por líneas celulares estables.

Descripción detallada

25 La presente descripción proporciona nuevos anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Los autores de la invención han encontrado sorprendentemente que los anticuerpos anti-EGFR descritos en la presente memoria presentan una eficacia terapéutica mejorada en comparación con ERBITUX® (cetuximab), un anticuerpo anti-EGFR aprobado por la FDA usado para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico y cáncer de cabeza y cuello. Los anticuerpos anti-EGFR descritos en la presente memoria también presentan semividas más largas que ERBITUX®.

30 En un aspecto relacionado, la descripción proporciona nuevos anticuerpos anti-EGFR que carecen de un motivo de N-glicosilación en CDR-H2. La glicosilación dentro de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, como el N-glicano en Asn 99 de la región V_H de ERBITUX®, puede reducir la eficacia terapéutica de un anticuerpo al interferir con la unión al antígeno. Además, dicha glicosilación puede causar heterogeneidad dentro de un lote de anticuerpos que puede dar como resultado una función, inmunogenicidad o estabilidad alteradas. Hay menos glucoformas presentes en lotes de producción de anticuerpos anti-EGFR que carecen de un motivo de glicosilación en CDR-H2.

35 También se proporcionan inmunoconjungados, ácidos nucleicos que codifican los nuevos anticuerpos anti-EGFR descritos en la presente memoria, y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas). La descripción también proporciona métodos para usar nuevos anticuerpos anti-EGFR para detectar EGFR en una muestra (tal como una muestra in vivo o ex vivo), composiciones que comprenden dichos anticuerpos para usar en el tratamiento del cáncer y usos de dichos anticuerpos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Definiciones

40 Como se usa en la presente memoria, "tratamiento" o "tratar" es un planteamiento para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen resultados clínicos. Para los fines de esta descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas que resultan de la enfermedad, disminuir la extensión de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (p. ej., prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la propagación (p. ej., metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la recurrencia de la enfermedad, retrasar o ralentizar el progreso de la enfermedad, mejorar el estado de la enfermedad, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de uno o más de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar el progreso de la enfermedad, aumentar o mejorar la calidad de vida, aumentar la ganancia de peso y/o prolongar la supervivencia. El "tratamiento" también abarca una reducción de las consecuencias patológicas del cáncer (tales como, por ejemplo, el volumen del tumor). Los métodos proporcionados en la presente memoria contemplan uno cualquiera o más de estos aspectos del tratamiento.

Los términos "recurrencia", "recaer" o "recaída" se refieren al regreso de un cáncer o enfermedad después de la evaluación clínica de la desaparición de la enfermedad. Un diagnóstico de metástasis distante o recurrencia local puede considerarse una recaída.

El término "refractario" o "resistente" se refiere a un cáncer o enfermedad que no ha respondido al tratamiento.

5 El término "terapia adyuvante" se refiere al tratamiento dado después de la terapia primaria, normalmente cirugía. La terapia adyuvante para el cáncer o enfermedad puede incluir inmunoterapia, quimioterapia, radioterapia o terapia hormonal.

La expresión "terapia de mantenimiento" se refiere al retratamiento programado que se da para ayudar a mantener los efectos de un tratamiento previo. La terapia de mantenimiento a menudo se da para ayudar a mantener el cáncer en remisión o prolongar una respuesta a una terapia específica, independientemente de la evolución de la enfermedad.

10 La expresión "cáncer invasivo" se refiere al cáncer que se ha extendido más allá de la capa de tejido en la que comenzó a los tejidos circundantes normales. Los cánceres invasivos pueden o no ser metastásicos.

15 La expresión "cáncer no invasivo" se refiere a un cáncer muy temprano o un cáncer que no se ha extendido más allá del tejido de origen.

La expresión "supervivencia sin evolución" en oncología se refiere al período de tiempo durante y después de tratamiento que un cáncer no crece. La supervivencia sin evolución incluye la cantidad de tiempo que los pacientes han experimentado una respuesta completa o parcial, así como la cantidad de tiempo que los pacientes han experimentado una enfermedad estable.

20 El término "enfermedad progresiva" en oncología se puede referir a un crecimiento tumoral de más de 20 por ciento desde que comenzó el tratamiento, ya sea debido a un aumento de masa o una propagación en el tumor.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Por ejemplo, mamíferos que padecen o necesitan profilaxis contra la actividad anormal de EGFR. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en la presente memoria incluyen cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.).

"Tumor", como se usa en la presente memoria, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

30 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales (que incluyen anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos con especificidad polipeptídica, anticuerpos policlonales, anticuerpos monocatenarios, y fragmentos de anticuerpos (véase más adelante) siempre que se unan específicamente a un polipéptido natural y/o presenten una actividad biológica o actividad inmunológica de esta descripción. De acuerdo con una realización, el anticuerpo se une a una forma oligómera de una proteína diana, p. ej., una forma trímera. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo se une específicamente a una proteína, cuya unión puede ser inhibida por un anticuerpo monoclonal de esta descripción (p. ej., un anticuerpo depositado de esta descripción, etc.). La frase "fragmento o análogo funcional" de un anticuerpo es un compuesto que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo al que se hace referencia. Por ejemplo, un fragmento o análogo funcional de un anticuerpo de esta descripción puede ser uno que se puede unir específicamente al EGFR. En una realización, el anticuerpo puede prevenir o reducir sustancialmente la capacidad de un EGFR para inducir la proliferación celular.

45 Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de 95% en peso de anticuerpo determinado por el método de Lowry, y lo más preferiblemente más de 99% en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminales o internos mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

50 La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetrámera compuesta por dos cadenas ligeras (L) iguales y dos cadenas pesadas (H) iguales (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetrámeras básicas junto con un polipéptido adicional llamado cadena J y, por lo tanto, contienen 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar conjuntos polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las

IgG, la unidad de 4 cadenas en general es de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tienen puentes disulfuro entre cadenas espaciados de forma regular. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de

- 5 tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotypos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un sitio de unión al antígeno único. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, p. ej., *Basic and Clinical Immunology*, 8^a edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.
- 10

La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la 15 secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotypos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , γ , ϵ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases basándose en diferencias relativamente pequeñas en la secuencia y función de C_H , p. ej., los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

- 20
- El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo del intervalo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones armazón (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más 25 cortas de extrema variabilidad llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de hoja beta, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la hoja beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, que contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- 30

- 35
- Como se usa en la presente memoria, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" se pretende que signifique los sitios de combinación de antígenos no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); por Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); y 40 MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996), donde las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes del mismo se pretende que esté dentro del alcance del término como se define y usa en la presente memoria. Los restos de aminoácidos que abarcan las CDR definidas por cada una de las referencias citadas antes se exponen a continuación en la Tabla 1 como comparación.
- 45

Tabla 1: Definiciones de CDR

	Kabat¹	Chothia²	MacCallum³
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹La numeración de restos sigue la nomenclatura de Kabat et al., véase antes

²La numeración de restos sigue la nomenclatura de Chothia et al., véase antes

³La numeración de restos sigue la nomenclatura de MacCallum et al., véase antes

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un único sitio antigénico.

- 5 Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto que se pueden sintetizar no contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente descripción se pueden preparar por la metodología del hibridoma descrita por primera vez por Kohler et al. *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden hacer usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas de animales o plantas (véase, p. ej., la patente de EE.UU. Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991), Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), y los ejemplos a continuación, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen anticuerpos "químéricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es igual u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas son iguales u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o

- 20 que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten una actividad biológica de esta descripción (véase la patente de EE.UU. Nº 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos químéricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., cercopitécidos, monos, etc.) y secuencias de la región constante humana.

25 Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión al antígeno así como un C_L y al menos dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (p. ej., dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

- 30 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase patente de EE.UU. Nº 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

- 35 La expresión "anticuerpos lineales" se refiere en general a los anticuerpos descritos en Zapata et al., *Protein Eng.*, 8 (10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos Fd en tandem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman una pareja de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoiespecíficos.

- 40 La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento residual "Fc", una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un solo fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión al antígeno divalente y todavía es capaz de entrecruzamiento con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab al tener pocos restos adicionales en el extremo carboxi del dominio C_{H1}, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para el Fab' en el que el o los restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

45 El fragmento Fc comprende las partes carboxi terminales de ambas cadenas H unidas entre sí por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por secuencias en la región Fc, región que también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en ciertos tipos de células.

- 55 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una "modificación de aminoácidos" como se define en la presente memoria. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, p. ej., de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del

polipéptido original. En una realización, la región Fc variante en la presente memoria tendrá al menos aproximadamente 80% de homología, al menos aproximadamente 85% de homología, al menos aproximadamente 90% de homología, al menos aproximadamente 95% de homología o al menos aproximadamente 99% de homología con una región Fc de secuencia natural. De acuerdo con otra realización, la región Fc variante en la 5 presente memoria tendrá al menos aproximadamente 80% de homología, al menos aproximadamente 85% de homología, al menos aproximadamente 90% de homología, al menos aproximadamente 95% de homología o al menos aproximadamente 99% de homología con una región Fc de un polipéptido parental.

La expresión "polipéptido que comprende la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o 10 inmunoadhesina (véanse las definiciones en otra parte en la presente memoria), que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 según el sistema de numeración de EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende polipéptidos, que incluyen anticuerpos, que tienen una región Fc 15 puede comprender poblaciones de polipéptidos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones de polipéptidos sin restos K447 eliminados o poblaciones de polipéptidos que tienen una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

Las "funciones efectoras" de anticuerpos se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una 20 región Fc de secuencia natural o región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo, y varían con el isótipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); 25 fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular; y activación de células B. Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Se describen ejemplos de secuencias de Fc en, por ejemplo, pero no limitado a, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda. Md (1991)).

25 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha y no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 30 bucles de cada una de la cadena H y L) que aportan los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

35 "Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una sola cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un conector polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, véase más adelante.

40 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos de sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se logra el emparejamiento entre cadenas pero no dentro de la cadena de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a 45 antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen de forma más completa, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

50 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., roedores) son anticuerpos químéricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo del donador) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseados. En algunos casos, los restos de la región armazón (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332: 323-329 55 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" u "homología" con respecto a las secuencias de polipéptidos y anticuerpos identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son iguales a los restos de aminoácidos en el polipéptido que se está comparando, después de alinear las secuencias considerando cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están dentro de la experiencia, por ejemplo, usando software informático disponible al público tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para lograr el máximo alineamiento a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente memoria, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente se ha archivado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los EE.UU., Washington DC, 20559, donde está registrado bajo el Registro de Derechos de Autor de EE.UU. Nº TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En una realización, un FcR de esta descripción es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, que incluyen las variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativos de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase la revisión M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). El término incluye alotipos, tales como los alotipos Fc γ RIIA: Fc γ RIIA-Phe158, Fc γ RIIA-Va1158, Fc γ RIIA-R131 y/o Fc γ RIIA-H131. Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, que incluyen los que se van a identificar en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en la presente memoria. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

El término "FcRn" se refiere al receptor de Fc neonatal (FcRn). FcRn es estructuralmente similar al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y consiste en una cadena α unida de forma no covalente a β 2-microglobulina. Las funciones múltiples del receptor de Fc neonatal FcRn se revisan en Ghetie y Ward (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766. El FcRn desempeña un papel en el suministro pasivo de inmunoglobulinas IgG de la madre a la cría y la regulación de los niveles de IgG en el suero. El FcRn puede actuar como un receptor de rescate, uniendo y transportando IgG pinocitadas en forma intacta tanto dentro como a través de las células, y rescatándolas de una ruta degradativa predeterminada.

El "dominio CH1" de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio "C1" de "H1") normalmente se extiende de aproximadamente el aminoácido 118 a aproximadamente el aminoácido 215 (sistema de numeración EU).

La "región bisagra" se define en general como el tramo de Glu216 a Pro230 de la IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último resto de cisteína que forman enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de restos inmediatamente C-terminales a la región bisagra, es decir, los restos 233 a 239 de la región Fc. En informes anteriores, la unión de FcR se atribuía en general a restos de aminoácidos en la región bisagra inferior de una región Fc de IgG.

El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también denominado "C2" del dominio "H2") en general se extiende desde aproximadamente el aminoácido 231 hasta aproximadamente el aminoácido 340. El dominio CH2 es único en el sentido de que no está emparejado de cerca con otro dominio. Por el contrario, se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificados unidos a N entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec Immunol.* 22: 161-206 (1985).

El "dominio CH3" (también denominado dominio "C2" o "H3") comprende el tramo de restos C-terminales a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde aproximadamente el resto de aminoácido 341 al extremo C-terminal de una secuencia de anticuerpo, típicamente en el resto de aminoácido 446 o 447 de una IgG).

Una "región Fc funcional" tiene una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen la unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc;

citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de superficie celular (p. ej., receptor de células B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras en general requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (p. ej., un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar usando diferentes ensayos como se describe en la presente memoria, por ejemplo.

5 "C1q" es un polipéptido que incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. C1q junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente de la ruta de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). C1q humano se puede comprar en el mercado, por ejemplo, de Quidel, San Diego, CA.

10 El término "dominio de unión" se refiere a la región de un polipéptido que se une a otra molécula. En el caso de un FcR, el dominio de unión puede comprender una parte de una cadena de polipéptido del mismo (p. ej., la cadena alfa del mismo) que es responsable de la unión de una región Fc. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena alfa de FcR.

15 Un anticuerpo con un Fc de IgG variante con afinidad de unión al FcR "alterada" o actividad de ADCC es uno que tiene actividad de unión al FcR potenciada o disminuida (p. ej., FcγR o FcRh) y/o actividad de ADCC comparada con un polipéptido parental o un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia nativa. El Fc variante que "presenta mayor unión" a un FcR se une al menos a un FcR con mayor afinidad (p. ej., valor de IC₅₀ o Kd aparente más bajo) que el polipéptido parental o un Fc de IgG de secuencia natural. De acuerdo con algunas realizaciones, la mejora en la unión en comparación con un polipéptido parental es aproximadamente 3 veces, preferiblemente aproximadamente 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, hasta 500 veces, o aproximadamente de 25% a 1000% de mejora en la unión. El polipéptido variante que "presenta menor unión" a un FcR, se une al menos a un FcR con menor afinidad (p. ej., valor de IC₅₀ mayor o Kd aparente mayor) que un polipéptido parental. La disminución en la unión en comparación con un polipéptido parental puede ser aproximadamente 40% o más de disminución en la unión.

20 25 30 35 La "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada se une a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (p. ej., linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente mata a la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "armen" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Las células primarias que median la ADCC, células NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo de ADCC in vitro, tal como el descrito en la patente de EE.UU. N° 5.500.362 o 5.821.337 o en los Ejemplos más adelante. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, p. ej., en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

40 45 El polipéptido que comprende una región Fc variante que "presenta mayor ADCC" o media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más eficazmente que un polipéptido que tiene Fc de IgG de tipo natural o un polipéptido parental, es uno que in vitro o in vivo es sustancialmente más efectivo en la mediación de la ADCC, cuando las cantidades de polipéptido con región Fc variante y el polipéptido con región Fc de tipo natural (o el polipéptido parental) en el ensayo son esencialmente las mismas. En general, dichas variantes se identificarán usando cualquier ensayo de ADCC in vitro conocido en la técnica, tal como ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, p. ej., en un modelo animal, etc. En una realización, la variante preferida es de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 100 veces, p. ej. de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 veces, más efectiva en la mediación de la ADCC que el Fc de tipo natural (o polipéptido parental).

50 55 La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase adecuada) que están unidos a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC, p. ej., como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la patente de EE.UU. N° 6.194.551B1 y WO99/51642. Véase, también, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o composición como se describe en la presente memoria es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" se puede determinar empíricamente y por métodos conocidos relacionados con el propósito establecido.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o composición como se describe en la presente memoria, eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno

en un mamífero (también conocido como paciente). En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o composición como se describe en la presente memoria puede reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño o peso del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o la composición como se describe en la presente memoria puede prevenir el crecimiento y/o matar las células de cáncer existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad inhibidora del crecimiento. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que prolonga la supervivencia de un paciente. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que mejora la supervivencia sin evolución de un paciente.

Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o composición como se describe en la presente memoria, es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumor, p. ej., célula de cáncer, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de esta descripción con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y por métodos conocidos o mediante ejemplos proporcionados en la presente memoria.

Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o composición de esta descripción es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, en especial tumor, p. ej., célula de cáncer, *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o composición de esta descripción con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y por métodos conocidos en la técnica.

Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o composición de esta descripción es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, en especial tumor, p. ej., célula de cáncer, *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) o composición de esta descripción con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y por métodos conocidos o mediante ejemplos proporcionados en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente compatible" se entiende un material que no es indeseable biológicamente o de otra manera, p. ej., el material se puede incorporar en una composición farmacéutica administrada a un paciente sin causar ningún efecto biológico indeseable significativo o interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición en la que está contenido. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables han cumplido preferiblemente los estándares requeridos de ensayos toxicológicos y de fabricación y/o están incluidos en la Guía de Ingredientes Inactivos preparada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE.UU.

El término "detección" pretende incluir determinar la presencia o ausencia de una sustancia o cuantificar la cantidad de una sustancia (tal como EGFR). El término se refiere por lo tanto al uso de los materiales, composiciones y métodos de la presente descripción para determinaciones cualitativas y cuantitativas. En general, la técnica particular usada para la detección no es crítica para la práctica de la descripción.

Por ejemplo, "detección" de acuerdo con la descripción puede incluir: observar la presencia o ausencia del producto génico EGFR, moléculas de ARNm o un polipéptido de EGFR; un cambio en los niveles de un polipéptido de EGFR o cantidad unida a una diana; un cambio en la función/actividad biológica de un polipéptido de EGFR. En algunas realizaciones, "detección" puede incluir detectar niveles de EGFR de tipo natural (p. ej., niveles de ARNm o polipéptido). La detección puede incluir la cuantificación de un cambio (aumento o disminución) de cualquier valor entre 10% y 90%, o de cualquier valor entre 30% y 60%, o más de 100%, en comparación con un control. La detección puede incluir cuantificar un cambio de cualquier valor de 2 veces a 10 veces, inclusive, o más, p. ej., 100 veces.

La palabra "marcador" cuando se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. El propio marcador puede ser detectable por sí mismo (p. ej., marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente memoria se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente memoria incluye (y describe) aspectos que se dirigen a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la descripción descrita en la presente memoria incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

La presente descripción se basa en la identificación de nuevos anticuerpos que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Los anticuerpos anti-EGFR se pueden usar en una variedad de métodos terapéuticos y de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos anti-EGFR se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por expresión anormal de EGFR o actividad

5 anormal de EGFR, que incluyen, p. ej., cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc. Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria también se pueden usar para detectar la proteína EGFR en pacientes o muestras de pacientes administrando los anticuerpos anti-EGFR a los pacientes y detectando el anticuerpo anti-EGFR unido a la proteína EGFR en una muestra del paciente (p. ej., *in vivo* o *ex vivo*), o 10 poniendo en contacto los anticuerpos anti-EGFR con muestras de los pacientes y detectando cualitativa o cuantitativamente la unión del anticuerpo anti-EGFR a la proteína EGFR.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico o "EGFR" (también conocido como, p. ej., ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA, proteína 40 inhibidora del crecimiento celular, proteína 61 que induce la proliferación celular y EC 2.7.10.1) es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia de cuatro receptores tirosina quinasas estrechamente relacionados. El EGFR se activa por unión de sus ligandos específicos (tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), TGF α, factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina, anfiregulina, betacelulina (BTC), epígeno (EPGN) y otros), tras lo cual el EGFR sufre dimerización y autofosforilación de tirosina. La autofosforilación conduce a la activación corriente abajo de, p. ej., fosfatidil 3-quinasa (PI3K), fosfolipasa (PL) C-g1, Akt, Ras, Raf y proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), y otras cascadas de transducción de señales 15 asociadas con la proliferación celular, motilidad, adhesión y migración. La expresión aberrante de EGFR o la actividad de EGFR se asocia con muchos cánceres (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.).

Un anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo que se une al EGFR con suficiente afinidad y especificidad. Preferiblemente, un anticuerpo anti-EGFR proporcionado en la presente memoria (o el fragmento de unión al antígeno del mismo) se puede usar como un agente terapéutico para dirigirse e interferir con enfermedades o 25 afecciones en donde está implicada la actividad del EGFR. Un anticuerpo anti-EGFR en general no se unirá a otra familia de ERBb, tal como Her2/Neu/ErbB2, Her3/ERBb3 o Her4/ERBb4. Preferiblemente, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR humanizado recombinante. De acuerdo con una realización, el anticuerpo anti-EGFR comprende las CDR, la región de cadena pesada variable y/o la región ligera variable de uno cualquiera 20 de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR (o fragmento de unión al antígeno del mismo) es una variante de un anticuerpo anti-EGFR que comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YNTPFTSRF (SEQ ID NO: 5); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos TYDYEFAY (SEQ ID NO: 10); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTT (SEQ ID NO: 25), en donde la variante comprende al menos una sustitución de 35 aminoácido en una o más de las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 21 y/o 25. En algunas realizaciones la variante comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 sustituciones de aminoácidos en una o más de las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 21 y/o 25. En ciertas 40 realizaciones, la o las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos no reducen sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden hacer alteraciones conservadoras (p. ej., sustituciones conservadoras como se proporcionan en la presente memoria) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión al EGFR. La afinidad de 45 unión de las variantes del anticuerpo anti-EGFR se pueden evaluar usando métodos descritos en los siguientes ejemplos.

Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 2 bajo el título de "sustituciones conservadoras". Se proporcionan más cambios sustanciales en la Tabla 2 bajo el título de "sustituciones de ejemplo", y como se describe con más detalle a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en un anticuerpo de interés y seleccionar los productos según una actividad deseada, p. ej., unión de EGFR retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejoradas.

Tabla 2: Sustituciones conservadoras

Resto original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys

(continuación)

Resto original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Una variante de sustitución de ejemplo es un anticuerpo con afinidad madurada, que se puede generar convenientemente, p. ej., usando técnicas de maduración de afinidad basadas en la presentación en fagos tales como las descritas en la presente memoria. Brevemente, se mutan uno o más restos de la CDR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se seleccionan según una actividad biológica particular (p. ej., afinidad de unión).

- 5 Una variante de sustitución de ejemplo es un anticuerpo con afinidad madurada, que se puede generar convenientemente, p. ej., usando técnicas de maduración de afinidad basadas en la presentación en fagos tales como las descritas en la presente memoria. Brevemente, se mutan uno o más restos de la CDR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se seleccionan según una actividad biológica particular (p. ej., afinidad de unión). Se pueden hacer alteraciones (p. ej., sustituciones) en HVR, p. ej., para mejorar la afinidad de anticuerpos. Dichas alteraciones se pueden hacer en "puntos calientes" de HVR, es decir, restos codificados por codones que sufren mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, p. ej. Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), determinándose la afinidad de la unión en V_H o V_L resultantes. La maduración de la afinidad por construcción y reselección de bibliotecas secundarias se ha descrito, p. ej., en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)).
- 10 15 En algunas realizaciones de maduración de la afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de una variedad de métodos (p. ej., PCR propensa a errores, barajado de cadena o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Después se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca después se criba para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir la diversidad implica procedimientos dirigidos por HVR, en los que varios restos de HVR (p. ej., 4-6 restos a la vez) se aleatorizan. Los restos de HVR implicados en la unión al antígeno se pueden identificar específicamente, p. ej., usando mutagénesis o modelado por barrido de alanina. CDR-H3 y CDR-L3 en particular a menudo son objetivos.
- 20 25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR (o fragmento de unión al antígeno del mismo) comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos N/T/Q-YGVH (SEQ ID NO: 4); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos Y-N/A/G/D-T/D/N-P/K/E-FTSRF (SEQ ID NO: 9); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY (SEQ ID NO: 14); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos I-G/R/S-T/L/P-NIH (SEQ ID NO: 20); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KY-A/G-SE-S/T-I-S/R (SEQ ID NO: 24); y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos

NWPT-T/L/S/A/Y (SEQ ID NO: 30). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 1-3; una CDR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 5-8; una CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 10-13; y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 15-19; una CDR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 21-23, y una CDR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las que consisten en las SEQ ID NO: 25-29. Las secuencias de las CDR indicadas en la presente memoria se proporcionan en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

SEQ ID NO: 1	NYGVH	SEQ ID NO: 11	DYYDYEFAFAY	SEQ ID NO: 21	KYASESIS
SEQ ID NO: 2	QYGVH	SEQ ID NO: 12	TYYDYNFAY	SEQ ID NO: 22	KYGSEISIS
SEQ ID NO: 3	TYGVH	SEQ ID NO: 13	TLYDYEFAFAY	SEQ ID NO: 23	KYASSETIR
SEQ ID NO: 4	N-Q-T-YGVH	SEQ ID NO: 14	T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY	SEQ ID NO: 24	KY-A/G-SE-S/T-I-S/R
SEQ ID NO: 5	YNTPFTSRF	SEQ ID NO: 15	IGTNIH	SEQ ID NO: 25	NWPTT
SEQ ID NO: 6	YDDKFTSRF	SEQ ID NO: 16	IRTNIH	SEQ ID NO: 26	NWPTL
SEQ ID NO: 7	YATEFTSRF	SEQ ID NO: 17	IGLNIH	SEQ ID NO: 27	NWPTS
SEQ ID NO: 8	YGNEFTSRF	SEQ ID NO: 18	IGPNIH	SEQ ID NO: 28	NWPFTA
SEQ ID NO: 9	Y-N/A/G/D-T/D/N-P/K/E-FTSRF	SEQ ID NO: 19	ISTNIH	SEQ ID NO: 29	NWPTY
SEQ ID NO: 10	TYYDYEFAFAY	SEQ ID NO: 20	I-G/R/S-T/L/P-NIH	SEQ ID NO: 30	NWPT-T/L/S/A/Y

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR (o fragmento de unión al antígeno del mismo) comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YNTPFTSRF (SEQ ID NO: 5); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos TYYDYEFAFAY (SEQ ID NO: 10); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTT (SEQ ID NO: 25).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YNTPFTSRF (SEQ ID NO: 5); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFAFAY (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFAFAY (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YATEFTSRF (SEQ ID NO: 7); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFAFAY (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YDDKFTSRF (SEQ ID NO: 6); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una

5 secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos TYGVH (SEQ ID NO: 3); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una

10 secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IRTNIH (SEQ ID NO: 16); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYGSESESIS (SEQ ID NO: 22); y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).

15 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos TYGVH (SEQ ID NO: 3); una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una

20 secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ISTNIH (SEQ ID NO: 19); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYGSESESIS (SEQ ID NO: 22); y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR comprende un dominio variable de la cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 32-35. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR comprende un dominio variable de la cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 36-39. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 32-39 se proporcionan a continuación.

SEQ ID NO: 32

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIKY
ASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQNNNWPTSFGG

30 GTKVEIKRT

SEQ ID NO: 33

EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSIRTNHWYQQKPGQAPRLLIKY
GSESISGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQNNNWPTSFGG
GTKVEIKRT

35 SEQ ID NO:34

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSISTNHWYQQKPGQAPRLLIKY
GSESISGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQNNNWPTSFGG
GTKVEIKRT

SEQ ID NO: 35

40 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIKY
ASESISGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQNNNWPTTFGG
GTKVEIKRT

SEQ ID NO: 36

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTGYGVHWVRQAPGKGLEWL
GVIWSGGNTDYGNEFTSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ALDYYDYEFA (SEQ ID NO: 37)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWRQAPGKGLEWL
GVIWSGGNTDYGNEFTSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA

RALDYYDYEFAWGGQGTMVTVSSA

SEQ ID NO:38

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWRQAPGKGLEWL
GVIWSGGNTDYATEFTSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

ALDYYDYEFAWGGQGTMVTVSSA

SEQ ID NO: 39

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWRQAPGKGLEWL
GVIWSGGNTDYNTPFTSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

ALTYYDYEFAWGGQGTMVTVSSA

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:

15 38. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:

37. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 33 y

20 un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 36. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:

36. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 35 y

25 un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 39.

Los dominios variables de la cadena pesada y ligera se combinan en todas las combinaciones por parejas posibles, para generar una serie de anticuerpos anti-EGFR.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR carece de un motivo de N-glicosilación en CDR-H2 (un “anticuerpo anti-EGFR con CDR-H2 aglicosilado”). La glicosilación en la región variable de la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo terapéutico, tal como el N-glucano en la Asn 99 de la región V_H de ERBITUX®, puede producir diferencias dentro de un lote de anticuerpos que puede dar como resultado la función, inmunogenicidad o estabilidad alteradas.

35 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR con CDR-H2 aglicosilado comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos Y-A/G/D- D/N-K/E-FTSRF (SEQ ID NO: 31). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR con CDR-H2 aglicosilado o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende además una cadena pesada que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos N/T/Q-YGVH (SEQ ID NO: 4) y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY (SEQ ID NO: 14). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR con CDR-

40 H2 aglicosilado o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende además una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos I-G/R/S-T/L/P-NIH (SEQ ID NO: 20); una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KY-A/G-SE-S/T-I-S/R (SEQ ID NO: 24); y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPT-T/L/S/A/Y (SEQ ID NO: 30). Las secuencias de

45 las CDR descritas antes se proporcionan en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

SEQ ID NO: 4	N/T/Q-YGVH
SEQ ID NO: 14	T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY
SEQ ID NO: 20	I-G/R/S-T/L/P-NIH
SEQ ID NO: 24	KY-A/G-SE-S/T-I-S/R
SEQ ID NO: 30	NWPT-T/L/S/A/Y

(continuación)

SEQ ID NO: 31	Y-A/G/D- D/N-K/E-FTSRF
---------------	------------------------

Los métodos de análisis de la glicosilación del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, p. ej., cromatografía (tal como cromatografía de intercambio catiónico (CEX) o cromatografía de líquidos), espectrometría de masas (tal como espectrometría de masas de ionización por electropulverización), y electroforesis capilar-dodecil-sulfato de sodio. Dichos métodos se describen, p. ej., en Jung et al. (2011) *Curr Op Biotechnol.* 22(6):858-67; Cummings RD, Etzler ME. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. En: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2^a edición. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Capítulo 45; Mulloy B, Hart GW, Stanley P. Structural Analysis of Glycans. En: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2^a edición. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Capítulo 47; Leymarie, et al. (2012) *Anal Chem.* 84(7): 3040-3048; Fernandez (2005) *European Biopharmaceutical Review*. pág. 106 - 110; y Raju, T. (2013) *Methods Mol Biol.* 988: 169-180.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR tiene una afinidad de unión más fuerte por un EGFR que la que tiene por un homólogo de este EGFR, tal como Her2/ERBb2, Her3/ERBb3 o Her4/ERBb4. Normalmente, el anticuerpo anti-EGFR "se une específicamente" al EGFR (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) no mayor de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no mayor de aproximadamente 1×10^{-8} y lo más preferiblemente no mayor de 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión para un miembro de la familia ERBb que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces más débil que su afinidad de unión por el EGFR. El anticuerpo anti-EGFR que se une específicamente al EGFR puede ser de cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos como se han definido antes, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

En algunas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo anti-EGFR a una proteína no diana (tal como Her2/ERBb2, Her3/ERBb3 o Her4/ERBb4) es menor que aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a EGFR determinado por métodos conocidos en la técnica, tales como ELISA, análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que en general es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar por competición con una molécula de control que es similar al objetivo, por ejemplo, un exceso de objetivo no marcado. En este caso, se indica unión específica si la unión del objetivo marcado a una sonda es inhibida de manera competitiva por un objetivo no marcado en exceso. La expresión "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un objetivo de polipéptido particular como se usa en la presente memoria, se puede mostrar, por ejemplo, por una molécula que tiene una Kd para el objetivo de al menos aproximadamente 10^4 M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor. En una realización, la expresión "unión específica" se refiere a la unión donde una molécula se une a un polipéptido particular o epítopo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítopo de polipéptido.

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo de acción de anticuerpos terapéuticos contra células tumorales. La ADCC es una defensa inmunitaria mediada por células por la cual una célula efectora del sistema inmunitario produce la lisis activamente de una célula objetivo (p. ej., una célula de cáncer) cuyos antígenos de superficie de membrana se han unido a anticuerpos específicos (p. ej., tales como un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR presenta función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) similar a la de ERBITUX®, como se demuestra p. ej., por los ensayos descritos en el ejemplo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la actividad de función efectora de ADCC de un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria es al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 100%, o mayor de 100% (p. ej., aproximadamente 105%, aproximadamente 106%, aproximadamente 107%, aproximadamente 108%, aproximadamente 109%, aproximadamente 110%, aproximadamente 111%, aproximadamente 112%, aproximadamente 113%, aproximadamente 114%, aproximadamente 115%, aproximadamente 116%, aproximadamente 117%, aproximadamente 118%, aproximadamente 119%, aproximadamente 120%, aproximadamente 121%, aproximadamente 122%, aproximadamente 123%, aproximadamente 124%, aproximadamente 125%, o aproximadamente 130%) de la actividad de función efectora de ADCC de ERBITUX®, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR presenta afinidad de unión similar por FcγRIIIa que ERBITUX®. En ciertas realizaciones, la unión a FcγRIIIa se demuestra por ELISA, como se describe en los ejemplos. Por ejemplo, la afinidad de unión del anti-EGFR por FcγRIIIa es aproximadamente 1%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente

20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 100%, o más de 100% mayor (p. ej., aproximadamente 105%, aproximadamente 106%, aproximadamente 107%, aproximadamente 108%, aproximadamente 109%, aproximadamente 110%, aproximadamente 111%, aproximadamente 112%,

5 aproximadamente 113%, aproximadamente 114%, aproximadamente 115%, aproximadamente 116%, aproximadamente 117%, aproximadamente 118%, aproximadamente 119%, aproximadamente 120%, aproximadamente 121%, aproximadamente 122%, aproximadamente 123%, aproximadamente 124%, aproximadamente 125%, o más de aproximadamente 125%) que la afinidad de unión de ERBITUX® (cetuximab) por 10 FcγRIIIa.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se une a un EGFR humano con una Kd entre aproximadamente 0,1 pM y 200 pM (0,2 nM), p. ej., aproximadamente 0,1 pM, aproximadamente 0,25 pM, aproximadamente 0,5 pM, 15 aproximadamente 0,75 pM, aproximadamente 1 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 50 pM,

20 aproximadamente 60 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 110 pM, aproximadamente 120 pM, aproximadamente 130 pM, aproximadamente 140 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 160 pM, aproximadamente 170 pM, aproximadamente 180 pM, aproximadamente 190 pM, o más de aproximadamente 190 pM, incluyendo cualquier 25 intervalo entre estos valores. En ciertas realizaciones la afinidad de unión del anticuerpo anti-EGFR por el EGFR es aproximadamente 1%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 100%, o más de 30 aproximadamente 100% mayor (p. ej., aproximadamente 105%, aproximadamente 110%, aproximadamente 120%, o aproximadamente 130%) mayor que la afinidad de unión de ERBITUX® (cetuximab) por EGFR. En ciertas 35 realizaciones, la afinidad de unión del anti-EGFR por el EGFR es aproximadamente 1,1 veces, aproximadamente 1,2 veces, aproximadamente 1,3 veces, aproximadamente 1,4 veces, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,6 veces, aproximadamente 1,7 veces, aproximadamente 1,8 veces, aproximadamente 1,9 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,25 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,75 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,25 veces, aproximadamente 3,5 veces, 40 aproximadamente 3,75 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4,25 veces, aproximadamente 4,5 veces, aproximadamente 4,75 veces, o más de aproximadamente 4,75 veces mayor que la afinidad de unión de ERBITUX® (cetuximab) por el EGFR, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR proporcionados en la presente memoria tienen semividas 35 prolongadas in vivo en comparación con ERBITUX®. En ciertas realizaciones, la semivida in vivo de un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria no es más corta que la semivida in vivo de ERBITUX®.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR proporcionados en la presente memoria presentan propiedades farmacocinéticas que son similares a las de ERBITUX® (cetuximab) o su biosimilar. En ciertas realizaciones, los 40 anticuerpos anti-EGFR proporcionados en la presente memoria presentan un AUC (área bajo la curva) que es aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o más de 95% (tal como aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más de aproximadamente 99%) de los perfiles de concentración en el suero-tiempo de ERBITUX® (cetuximab) o su biosimilar, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores.

45 En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de Fc de una IgG humana, p. ej., IgG1 humana o IgG4 humana. En ciertas realizaciones, la secuencia de Fc se ha alterado o cambiado de otra manera, de modo que carece de la función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), a menudo relacionada con su unión a los receptores de Fc (FcR). Hay muchos ejemplos de cambios o mutaciones en las secuencias de Fc que pueden alterar la función efectora. Por ejemplo, el documento WO 00/42072 y Shields et al. *J Biol. Chem* 9 (2): 50 6591-6604 (2001) describe variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcR. El anticuerpo puede estar en forma de un fragmento Fab, Fab', un F(ab')2, Fv monocatenario (scFv), un Fv; un diacuerdo y un anticuerpo lineal. Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo multiespecífico que se une al EGFR, pero también se une a uno o más objetivos distintos e inhibe su función. El anticuerpo se puede conjugar con un agente terapéutico (p. ej., agente citotóxico, un radioisótopo y un agente quimioterapéutico) o un marcador para detectar el EGFR en muestras 55 de pacientes o in vivo por formación de imágenes (p. ej., radioisótopo, colorante fluorescente y enzima). Otras modificaciones incluyen la conjugación de toxinas a anticuerpos anti-EGFR proporcionados en la presente memoria.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-EGFR, vectores de expresión que comprenden 60 moléculas de ácido nucleico que codifican las CDR y/o un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera descritos en la presente memoria, y las células que comprenden las moléculas de ácido nucleico también están contemplados. Estos anticuerpos se pueden usar en las terapias descritas en la presente memoria y para detectar la proteína EGFR en muestras de pacientes (p. ej., por FACS, inmunohistoquímica (IHC), ensayos ELISA) o en pacientes.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar, p. ej., usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) o se pueden preparar por métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. Nº 4.816.567) o se pueden producir por los métodos descritos en la presente memoria en los ejemplos a continuación. En un método de hibridoma, un hámster, ratón u otro animal hospedante adecuado se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro.

El agente inmunizante típicamente incluirá un polipéptido o una proteína de fusión de la proteína de interés o una composición que comprende la proteína. En general, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Despues, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (New York: Academic Press, 1986), pág. 59-103. Las líneas celulares inmortalizadas en general son células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Normalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan un nivel alto de expresión estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al. MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pág. 51-63.

Después, en el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede analizar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se puede determinar por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y desarrollar por métodos estándar. Goding, véase antes. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer in vivo como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de EE.UU. Nº 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales proporcionados en la presente memoria se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma proporcionadas en la presente memoria sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede poner en vectores de expresión, que después se transfecan en células hospedante tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedantes recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana por la secuencia codificante en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. Nº 4.816.567; Morrison et al., véase antes) o uniéndose covalentemente a la secuencia que codifica la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia que codifica un polipéptido no inmunoglobulínico. Dicho polipéptido no inmunoglobulínico puede sustituir los dominios constantes de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria, o puede sustituir los dominios variables de un sitio de combinación de antígenos de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria para crear un anticuerpo bivalente químérico.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR proporcionado por la descripción es expresado por una línea celular de mamífero estable. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR proporcionado por la descripción se

expresa a partir de una línea celular de mamífero estable con un título de aproximadamente 2,0 gramos/litro, aproximadamente 2,5 gramos/litro, aproximadamente 3,0 gramos/litro, aproximadamente 3,5 gramos/litro, aproximadamente 4,0 gramos/litro, aproximadamente 4,5 gramos/litro, aproximadamente 5,0 gramos/litro, aproximadamente 5,5 gramos/litro, aproximadamente 6 gramos/litro, aproximadamente 6,5 gramos/litro, 5 aproximadamente 7,0 gramos/litro, o más de aproximadamente 7,0 gramos/litro, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En ciertas realizaciones, la línea celular estable de mamífero a partir de la cual se expresa un anticuerpo anti-EGFR proporcionado por la descripción es una línea celular CHO.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca en general en cualquier punto de la región Fc de modo que se evite el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los restos de cisteína relevantes se sustituyen por otro resto de aminoácido o se eliminan para así evitar el entrecruzamiento.

Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede lograr usando, pero no limitado a, técnicas conocidas en la materia.

Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígenos) que típicamente contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo de receptor) en las que los restos de una CDR del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo de donador) tales como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región armazón Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes.

25 Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo del receptor ni en las secuencias de la región armazón o CDR importadas. En general, el anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado preferiblemente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Jones et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Estructura Biol.*, 2: 593-596 (1992).

30 En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". De acuerdo con una realización, la humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al. *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por las CDR o secuencias de CDR de roedores. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos (patente de EE.UU. N° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

35 Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones mutantes químéricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, p. ej., Jakobovits et al. *PNAS USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al. *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); patentes de EE.UU. N° 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669; 5.545.807; y WO 97/17852. Alternativamente, se pueden producir anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este planteamiento se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016, y Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al. *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Alternativamente, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 [1990]) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donadores no inmunizados. De acuerdo con una realización de esta técnica, las secuencias de dominio V del anticuerpo se clonian en el marco en un gen de proteína de recubrimiento

- 5 mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. La presentación en fagos se puede llevar a cabo en una variedad de formatos, p. ej., como se describe a continuación en la sección de Ejemplos o como se revisa en, p. ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Se pueden usar 10 varias fuentes de segmentos de genes de V para la presentación en fagos. Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) aisló un conjunto diverso de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados del bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes de V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra un amplio conjunto de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Véanse, también, las patentes de EE.UU. Nº 5.565.332 y 15 5.573.905.

Como se ha descrito antes, los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas in vitro (véanse las patentes de EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275).

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991).

- 20 Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos. Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991).

Anticuerpos multiespecíficos

25 Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para dos o más antígenos diferentes (p. ej., los anticuerpos biespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos). Por ejemplo, una de las especificidades de unión puede ser para la proteína a5~1, la otra puede ser para cualquier otro antígeno. Según una realización preferida, el otro antígeno es una proteína o receptor o subunidad del receptor de superficie celular. Por ejemplo, la proteína de

- 30 superficie celular puede ser un receptor de linfocitos citolíticos naturales (NK). Por lo tanto, de acuerdo con una realización, un anticuerpo biespecífico de esta descripción se puede unir tanto al EGFR como, p. ej., a un segundo receptor de superficie celular.

Los métodos adecuados para hacer anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes.

- 35 Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se logra mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO*, 10: 3655-3659 (1991).

- 40 Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo hospedante adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

- 50 También se han descrito diversas técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron a la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también se puede usar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *PNAS USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un VH conectado a un VL por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento están forzados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos

biespecíficos usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Están contemplados anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Anticuerpos heteroconjungados

- 5 Los anticuerpos heteroconjungados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE.UU. Nº 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH. Documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089. Está contemplado que los anticuerpos se pueden preparar in vitro usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptopbutirimido y los descritos, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. Nº 4.676.980.
- 10

Modificación genética de la función efectora

- 15 Puede ser deseable modificar el anticuerpo proporcionado en la presente memoria con respecto a la función efectora, para así mejorar, p. ej., la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se pueden introducir resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodímero así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o mayor destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase, Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shapes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodímeros con actividad antitumoral mejorada también se pueden preparar usando entrecruzadores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede modificar genéticamente un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y, así puede tener capacidades mejoradas de lisis del complemento y de ADCC. Véase, Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*3: 219-230 (1989).
- 20
- 25 Se pueden hacer mutaciones o alteraciones en las secuencias de la región Fc para mejorar la unión del FcR (p. ej., Fc γ R, FcRn). De acuerdo con una realización, un anticuerpo de esta descripción tiene al menos una función efectora alterada seleccionada del grupo que consiste en ADCC, CDC y mejor unión del FcRn en comparación con una IgG natural o un anticuerpo parental. Se describen ejemplos de varias mutaciones específicas útiles en, p. ej., Shields, RL et al. (2001) *JBC* 276(6):6591-6604; Presta, L.G., (2002) *Biochemical Society Transactions* 30(4):487-490: y documento WO 00/42072.
- 30

De acuerdo con una realización, la mutación del receptor de Fc es una sustitución de al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en: 238, 239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, en donde la numeración de los restos en la región Fc está de acuerdo con el sistema de numeración EU. En algunas realizaciones, la mutación del receptor de Fc es una sustitución D265A. En algunas realizaciones, la mutación del receptor de Fc es una sustitución N297 A. Mutaciones adecuadas adicionales se exponen en la patente de EE.UU. Nº 7.332.581.

- 35
- 40 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR proporcionado en la presente memoria está afucosilado (es decir, un "anticuerpo anti-EGFR afucosilado" o un "anticuerpo anti-EGFR no fucosilado"). "Anticuerpo afucosilado" o "anticuerpo no fucosilado" se refiere a un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG3 con un patrón alterado de glicosilación en la región Fc en Asn297 que tiene un nivel reducido de restos de fucosa. La glicosilación de la IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 como glicosilación de oligosacáridos del complejo biantennario fucosilado del núcleo terminado con hasta 2 restos Gal. Estas estructuras se designan como GO, G1 (a1,6 o a1,3) o restos de glicano G2, dependiendo de la cantidad de restos Gal terminales (Raju, TS, *BioProcess Int.* 1 (2003) 44-53). La glicosilación de tipo CHO de las partes Fc del anticuerpo se describe, p. ej., por Routier, F.H., *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207. Los anticuerpos que se expresan de forma recombinante en células hospedantes CHO no glicomodificadas normalmente se fucosilan en Asn297 en una cantidad de al menos 85%. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria tiene un nivel reducido de restos de fucosa. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria no tiene fucosa en su patrón de glicosilación. Se sabe habitualmente que la posición típica del resto glicosilado en un anticuerpo es la asparagina en la posición 297 de acuerdo con el sistema de numeración EU ("Asn297").
- 45
- 50

55 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria comprende una secuencia Fc que se ha alterado o cambiado de otro modo para que tenga un nivel reducido de restos de fucosa o ninguna fucosa en su patrón de glicosilación. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR proporcionado en la presente memoria comprende una secuencia Fc que tiene una alteración en la posición 297 de acuerdo con el sistema de numeración EU.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria es producido

por una célula hospedante capaz de producir glicanos hipofucosilados o afucosilados. Se han establecido líneas celulares hospedantes de mamíferos estables que pueden producir anticuerpos afucosilados y se describen, p. ej., en Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng.* 87, 614-622; Mori et al. (2004) *Biotechnol Bioeng.* 88, 901-908; Kanda et al. (2006) *Biotechnol Bioeng.* 94, 680-688; Kanda (2007) *J Biotechnol.* 130, 300-310; Imai-Nishiya (2007)

5 *BMC Biotechnol* 7, 84; Yamane- Ohnuki y Satoh (2009) *mAbs* 1, 230-236. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria se expresa en una célula hospedante glicomodificada genéticamente modificada para expresar actividad de b(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria se expresa en una célula hospedante glicomodificada en la que la actividad de 1,6-fucosiltransferasa se ha reducido o eliminado. Véase, p. ej., el documento US 6.946.292 para obtener detalles en relación con la producción de células hospedante glicomodificadas. La cantidad de fucosilación del anticuerpo se puede predeterminar, p. ej., por condiciones de fermentación (p. ej., tiempo de fermentación) o por combinación de al menos dos anticuerpos con diferente cantidad de fucosilación. Dichos anticuerpos afucosilados y sus respectivos métodos de glicomodificación genética se describen en los documentos WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180, WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739. Estos anticuerpos glicomodificados genéticamente tienen una ADCC aumentada. Otros métodos de glicomodificación genética que producen anticuerpos afucosilados de acuerdo con la descripción se describen, p. ej., en Niwa, R. et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T., et al., *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 3466-3473; WO 03/055993 o US 2005/0249722.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria se produce usando técnicas in vitro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria se sintetiza químicamente. (Véase, p. ej., Yamamoto et al. (2008) *JACS* 130, 501-510, que describe la síntesis química de una forma no fucosilada de proteína quimiotáctica de monocitos 3 (MCP-3). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria se produce usando una fucosidasa para eliminar los restos de fucosa en las IgG (véase, p. ej., Yazawa et al. (1986) *Biochem Biophys Res Commun.* 136, 563-569).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria tiene una función efectora de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) mejorada en comparación con ERBITUX®, como se demuestra, p. ej., mediante ensayos descritos en el Ejemplo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la actividad de la función efectora ADCC de un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria es al menos aproximadamente 140%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 160%, al menos aproximadamente 170%, al menos aproximadamente 180%, al menos aproximadamente 190%, al menos aproximadamente 190%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 210%, al menos aproximadamente 220%, al menos aproximadamente 230%, al menos aproximadamente 240%, al menos aproximadamente 250%, al menos aproximadamente 260%, al menos aproximadamente 270%, al menos aproximadamente 280%, al menos aproximadamente 290%, o al menos aproximadamente 300% de la actividad de función efectora de ADCC de ERBITUX®, que incluye cualquier intervalo entre estos valores. En ciertas realizaciones, la actividad de función efectora de ADCC de un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria es más de aproximadamente 300% de la actividad de función efectora de ADCC de ERBITUX®, que incluye al menos aproximadamente 350%, al menos aproximadamente 360%, al menos aproximadamente 370%, al menos aproximadamente 380%, al menos aproximadamente 390%, al menos aproximadamente 400%, al menos aproximadamente 410%, al menos aproximadamente 420%, al menos aproximadamente 430%, al menos aproximadamente 440%, al menos aproximadamente 450%, al menos aproximadamente 460%, al menos aproximadamente 470%, al menos aproximadamente 480%, al menos aproximadamente 490%, al menos aproximadamente 500%, al menos aproximadamente 510%, al menos aproximadamente 520%, al menos aproximadamente 530%, al menos aproximadamente 540%, al menos aproximadamente 550%, al menos aproximadamente 560%, al menos aproximadamente 570%, al menos aproximadamente 580%, al menos aproximadamente 590%, o al menos aproximadamente 6000% de la actividad de función efectora de ADCC de ERBITUX®, que incluye cualquier intervalo entre estos valores.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene KRAS de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene una mutación de KRAS. En ciertas realizaciones, la mutación KRAS es una mutación en el codón 12 del gen KRAS. En ciertas realizaciones, la mutación de KRAS es una mutación en el codón 13 en el exón 2 del gen KRAS. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene la mutación KRAS^{G13D}. En ciertas realizaciones, la mutación KRAS es una mutación en el codón 61 del gen KRAS. En ciertas realizaciones, la mutación KRAS es una mutación en el codón 117 del gen KRAS. En ciertas realizaciones, la mutación KRAS es una mutación en el codón 146 del gen KRAS.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que

tiene BRAF de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene una mutación de BRAF. En ciertas realizaciones, la mutación de BRAF es una mutación en el codón 600 del gen BRAF. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene la mutación de BRAF^{V600E}. En ciertas realizaciones, la mutación de BRAF es una mutación en el codón G466 del gen BRAF. En ciertas realizaciones, la mutación de BRAF es una mutación en el codón G469 del gen de BRAF. En ciertas realizaciones, la mutación de BRAF es una mutación en el codón L597 del gen de BRAF.

- 5 10 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene PTEN de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene una mutación de PTEN. En ciertas realizaciones, la mutación de PTEN es una mutación en el exón 3 del gen PTEN. En ciertas realizaciones, la mutación de PTEN es una mutación en el exón 4 del gen PTEN. En ciertas realizaciones, la mutación de PTEN es una mutación en el exón 5 del gen PTEN. En ciertas realizaciones, la mutación de PTEN es una mutación en el exón 6 del gen PTEN. En ciertas realizaciones, La mutación de PTEN es una mutación en el exón 7 del gen PTEN. En ciertas realizaciones, la mutación de PTEN es una mutación en el exón 8 del gen PTEN. En ciertas realizaciones, la mutación de PTEN es una mutación que es el codón 233 del gen PTEN.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene NRAS de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene una mutación de NRAS. En ciertas realizaciones, la mutación de NRAS es una mutación es el codón 12 del gen NRAS. En ciertas realizaciones, la mutación de NRAS es una mutación es el codón 13 del gen NRAS. En ciertas realizaciones, la mutación de NRAS es una mutación es el codón 61 del gen NRAS.

30 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene PIK3CA de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado proporcionado en la presente memoria presenta una función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejor que ERBITUX® en un sujeto que tiene una mutación PIK3CA. En ciertas realizaciones, la mutación de PIK3CA es una mutación es el exón 20 del gen PIK3CA.

35 En ciertas realizaciones, el sujeto al que se administra un anticuerpo anti-EGFR afucosilado descrito en la presente memoria es resistente a Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones, el sujeto al que se administra un anticuerpo anti-EGFR afucosilado descrito en la presente memoria ha evolucionado con Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones, el sujeto al que se administra un anticuerpo anti-EGFR afucosilado descrito en la presente memoria es refractario a Erbitux o su biosimilar.

40 Inmunoconjungados

La descripción también se refiere a inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (p. ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjungado).

45 Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, 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 diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Está disponible una variedad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjungados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los agentes quimioterapéuticos de ejemplo útiles en la generación de dichos inmunoconjungados incluyen los descritos en otra parte en la presente memoria.

55 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR proporcionado en la presente memoria (tal como un anticuerpo anti-EGFR con CDR-H2 glicosilado, un anticuerpo anti-EGFR afucosilado o un anticuerpo anti-EGFR con CDR-H2 glicosilado que también está afucosilado) se conjuga con maytansina, un maytansinoide o calicheamicina. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR proporcionado en la presente memoria (tal como un anticuerpo anti-EGFR con CDR-H2 glicosilado y/o un anticuerpo anti-EGFR afucosilado) se conjuga con el DM1 maytansinoide.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se hacen usando una variedad de agentes de acoplamiento de

proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de toleno) y compuestos de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno).

5 Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilenetriaminopentacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase, el documento WO94/11026.

10 En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para usar en el pre-direcciónamiento al tumor en donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de depuración y después administración de un "ligando" (p. ej., avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (p. ej., un radionucleótido).

Modificaciones covalentes

15 Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-EGFR y sus fragmentos están incluidas dentro del alcance de esta descripción. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de restos de aminoácidos dirigidos de un polipéptido con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N o C terminales del polipéptido. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para el entrecruzamiento del polipéptido a una matriz o superficie insoluble en agua para usar

20 en el método de purificación de anticuerpos, y viceversa. Los agentes de entrecruzamiento usados habitualmente incluyen, p. ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditriobis(succinimidil-propionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)-ditio] propioimidato.

25 Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes restos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α-amino de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

30 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido comprende unir el polipéptido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, p. ej., polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de EE.UU. Nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

Moléculas químéricas

35 Un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) de la presente descripción también se puede modificar si es ventajoso de una manera que se forme una molécula químérica que comprenda el polipéptido fusionado con otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos (p. ej., inmunoadhesinas o pepticuerpos).

40 En una realización, dicha molécula químérica comprende una fusión del polipéptido con un dominio de transducción de proteínas que se dirige al polipéptido para su suministro a diversos tejidos y más en particular a través de la barrera hematoencefálica, usando, por ejemplo, el dominio de transducción de proteínas de la proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humana (Schwarze et al., 1999, *Science* 285: 1569-72).

45 En otra realización, dicha molécula químérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido marcador que proporciona un epítopo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-marcador. El marcador epítopo en general se pone en el extremo amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de dichas formas marcadas con epítopo del polipéptido se puede detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Además, proporcionar el marcador epítopo permite que el polipéptido se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se une al marcador epítopo. Se conocen varios polipéptidos marcadores y sus respectivos anticuerpos en la técnica. Los ejemplos incluyen marcadores de poli-histidina (poli-His) o poli-histidina-glicina (poli-His-glic); el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)]; el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para los mismos [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)]; y el marcador glicoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3 (6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido Flag [Hopp et al., *BioTechnology*, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítopo KT3 [Martin et al., *Science*, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítopo de α-tubulina [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)]; y el marcador peptídico de proteína 10 del gen de T7 [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397 (1990)].

55 En una realización alternativa, la molécula químérica puede comprender una fusión del polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula químérica (p. ej., una "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig

de esta descripción incluyen polipéptidos que comprenden aproximadamente o solo los restos 94-243, los restos 33-53 o restos 33-52 de ser humano en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también, la patente de EE.UU. Nº 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995.

5 Inmunoliposomas

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también se pueden formular como inmunoliposomas.

Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., *PNAS USA*, 82: 3688 (1985); Hwang et al., *PNAS USA*, 77: 4030 (1980); y patentes de EE.UU. Nº 10 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo en la circulación mejorado se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.013.556.

15 Se pueden generar liposomas particularmente útiles por el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poros definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente descripción se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martinet et al., *J. Biol Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento o un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina) también están opcionalmente contenidos dentro del liposoma. Véase, Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.*, 81 (19): 1484 (1989).

20 Tratamiento usando anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Los anticuerpos anti-EGFR (o fragmentos de los mismos) y/o las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden administrar a sujetos (p. ej., mamíferos tales como seres humanos) para tratar enfermedades y trastornos que implican actividad anormal del EGFR, que incluyen, por ejemplo, cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.). En ciertas realizaciones, la descripción proporciona anticuerpos anti-EGFR descritos en la presente memoria (o fragmentos de los mismos) para usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón o cáncer colorrectal) en un sujeto. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona anticuerpos anti-EGFR descritos en la presente memoria (o fragmentos de los mismos) para usar en el tratamiento del cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.) en un sujeto. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-EGFR proporcionado en la presente memoria (o fragmentos del mismo) para usar en el tratamiento de cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.) en un sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto a tratar es un mamífero (p. ej., ser humano, primate no humano, rata, ratón, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, etc.). En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un paciente clínico, un voluntario de ensayo clínico, un animal experimental, etc. En ciertas realizaciones, se sospecha que el sujeto tiene o está en riesgo de tener un cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.) o ser diagnosticado de un cáncer o cualquier otra enfermedad que tenga expresión o actividad anormal de EGFR. En algunas realizaciones, el sujeto al que se le administra un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria tiene KRAS de tipo natural. En ciertas realizaciones, el sujeto al que se le administra un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria tiene la mutación KRAS^{G13D}. En algunas realizaciones, el sujeto al que se le administra un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria tiene BRAF de tipo natural. En ciertas realizaciones, el sujeto al que se le administra un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria tiene la mutación BRAF^{V600E}. En ciertas realizaciones, el sujeto al que se le administra un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria es resistente a Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones, el sujeto al que se le administra un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria ha progresado con Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones, el sujeto al que se le administra un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria es refractario a Erbitux o su biosimilar.

50 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que tiene KRAS de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un paciente con cáncer que tiene la mutación KRAS^{G13D}. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un paciente con cáncer que tiene BRAF de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que tiene la mutación BRAF^{V600E}. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que es resistente a Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que ha evolucionado con Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que es refractario a Erbitux o su biosimilar.

55 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que tiene KRAS de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un paciente con cáncer que tiene la mutación KRAS^{G13D}. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un paciente con cáncer que tiene BRAF de tipo natural. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que tiene la mutación BRAF^{V600E}. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que es resistente a Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que ha evolucionado con Erbitux o su biosimilar. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR conjugado con DM1 descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que es refractario a Erbitux o su biosimilar.

Se conocen en la técnica muchos métodos de diagnóstico para el cáncer (tales como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.) o cualquier otra enfermedad que presente actividad anormal de EGFR y la definición clínica de esas enfermedades. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, p.

- 5 ej., inmunohistoquímica, PCR, hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Detalles adicionales con respecto a los métodos de diagnóstico para la actividad o expresión anormal de EGFR se describen, p. ej., en Gupta et al. (2009) *Mod Pathol.* 22 (1): 128-133; Lopez-Rios et al. (2013) *J Clin Pathol.* 66 (5): 381-385; Ellison et al. (2013) *J Clin Pathol.* 66 (2): 79-89; y Guha et al. (2013) *PLoS ONE* 8 (6): e67782.

La administración puede ser por cualquier vía adecuada que incluye, p. ej., intravenosa, intramuscular o subcutánea. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR (o fragmentos de los mismos) y/o las composiciones proporcionadas en la presente memoria se administran en combinación con un segundo, tercer o cuarto agente (que incluye, p. ej., un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico) para tratar las enfermedades o trastornos que implican una actividad anormal de EGFR. Dichos agentes incluyen, p. ej., docetaxel, gefitinib, FOLFIRI (irinotecán, 5-fluorouracilo y leucovorina), irinotecán, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab (anticuerpo anti-VEGF), FOLFOX-4 (fluorouracilo infusional, leucovorina y oxaliplatino, afatinib, gemcitabina, capecitabina, pemetrexed, tivantinib, everolimus, CpG-ODN, rapamicina, lenalidomida, vemurafenib, endostatina, lapatinib, PX-866, Imprime PGG y irlotinibm. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR (o fragmentos de los mismos) se conjugan con el agente adicional.

10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR (o fragmentos de los mismos) y/o las composiciones proporcionadas en la presente memoria se administran en combinación con una o más terapias adicionales, tales como radioterapia, cirugía, quimioterapia y/o terapia dirigida. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-EGFR (o fragmentos de los mismos) y/o las composiciones proporcionadas en la presente memoria se administran en combinación con radioterapia. En ciertas realizaciones, la combinación de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) y/o la composición proporcionada en la presente memoria y la radioterapia se usa para tratar el cáncer de cabeza y cuello. En ciertas realizaciones, la combinación de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) y/o la composición proporcionada en la presente memoria y la radioterapia se usa para tratar el cáncer de garganta. En ciertas realizaciones, la combinación de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) y/o la composición proporcionada en la presente memoria y la radioterapia se usan para tratar el cáncer colorrectal. En ciertas realizaciones, la combinación de un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) y/o la composición proporcionada en la presente memoria y la radioterapia se usa para tratar el cáncer de pulmón.

15 20 25 30 Dependiendo de la indicación que se va a tratar y los factores relevantes para la dosificación con los que un médico experto en el campo estaría familiarizado, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se administrarán con una dosis que sea eficaz para el tratamiento de esa indicación mientras se minimiza la toxicidad y efectos secundarios. Para el tratamiento de un cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.), una dosis típica puede ser, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, dosis por debajo o por encima de este intervalo de ejemplo están dentro del alcance de la descripción. La dosis diaria puede ser de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal total (p. ej., aproximadamente 5 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, o un intervalo definido por cualquiera de los dos valores anteriores), preferiblemente de aproximadamente 0,3 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal total (p. ej., aproximadamente 0,5 µg/kg, aproximadamente 1 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 150 µg/kg, aproximadamente 300 µg/kg, aproximadamente 750 µg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, o un intervalo definido por cualquiera de los dos valores anteriores), más preferiblemente de aproximadamente 1 µg/kg a 1 mg/kg de peso corporal total (p. ej., aproximadamente 3 µg/kg, aproximadamente 15 µg/kg, aproximadamente 75 µg/kg, aproximadamente 300 µg/kg, aproximadamente 900 µg/kg, o un intervalo definido por cualquiera de los dos valores anteriores), e incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal por día (p. ej., aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, o un intervalo definido por cualquiera de los dos valores anteriores, incluyendo cualquier intervalo entre los valores anteriores).

35 40 45 50 Como se ha indicado antes, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede controlar mediante la evaluación periódica de los pacientes tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y están dentro del alcance de la descripción. La dosificación deseada se puede administrar mediante una única administración de bolo de la composición, mediante múltiples administraciones de bolo de la composición, o mediante administración de infusión continua de la composición.

55 Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EGFR se puede administrar una, dos, tres o cuatro veces al día. Las composiciones también se pueden administrar con menos frecuencia que diariamente, por ejemplo, seis veces a la semana, cinco veces a la semana, cuatro veces a la semana, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses o una vez cada seis meses. Las composiciones también se pueden administrar en una formulación de liberación sostenida, tal como en un implante que libera gradualmente la composición para usar a lo largo de un período de tiempo, y que permite que la composición se administre con menos frecuencia, tal como una vez al mes, una vez cada 2-6 meses, una vez al año, o incluso una sola administración. Los dispositivos de liberación sostenida (tales como miniesferas, nanopartículas, micropartículas,

nanoesferas, microesferas y similares) se pueden administrar por inyección.

El anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) se puede administrar en una dosis diaria única, o la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Las composiciones también se pueden administrar con menos frecuencia que diariamente, por ejemplo, seis veces a la semana, cinco veces a la semana, cuatro veces a la semana, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses o una vez cada seis meses. Las composiciones también se pueden administrar en una formulación de liberación sostenida, tal como en un implante que libera gradualmente la composición para usar a lo largo de un período de tiempo, y que permite que la composición se administre con menos frecuencia, tal como una vez al mes, una vez cada 2-6 meses, una vez al año, o incluso una sola administración. Los dispositivos de liberación sostenida (tales como miniesferas, nanopartículas, micropartículas, nanoesferas, microesferas y similares) se pueden administrar por inyección o implantar quirúrgicamente en varios lugares.

Los tratamientos contra el cáncer se pueden evaluar, p. ej., pero no limitado a, por la remisión tumoral, contracción del peso o tamaño del tumor, tiempo de evolución, duración de la supervivencia, supervivencia libre de evolución, tasa de respuesta global, duración de la respuesta, calidad de vida, expresión y/o actividad de proteínas. Se pueden usar planteamientos para determinar la eficacia de la terapia, que incluyen, por ejemplo, la medición de la respuesta mediante imágenes radiológicas.

En algunas realizaciones, la eficacia del tratamiento se mide como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI), calculado usando la ecuación $100 - (T/C \times 100)$, donde T es el volumen tumoral relativo medio del tumor tratado, y C es el volumen tumoral relativo medio de un tumor no tratado. En ciertas realizaciones, el % de TGI es aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95% o más de 95%. En ciertas realizaciones, el % de TGI de un anticuerpo anti-EGFR es igual o mayor que el % de TGI de ERBITUX®, tal como aproximadamente 1,1 veces, aproximadamente 1,2 veces, aproximadamente 1,3 veces, aproximadamente 1,4 veces, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,6 veces, aproximadamente 1,7 veces, aproximadamente 1,8 veces, aproximadamente 1,9 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,1 veces, aproximadamente 2,2 veces, aproximadamente 2,3 veces, aproximadamente 2,4 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,6 veces, aproximadamente 2,7 veces, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores, o más de aproximadamente 2,7 veces mayor que el % de TGI de ERBITUX®.

Formulaciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-EGFR (o fragmentos de los mismos) se pueden formular con vehículos o excipientes adecuados de modo que sean adecuados para la administración. Las formulaciones adecuadas de los anticuerpos se obtienen mezclando un anticuerpo (o fragmento del mismo) que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones usadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecidimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinal; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como olivinilpirrolidona; 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 que forman sales tales como el sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenoglicol (PEG). Se describen formulaciones de anticuerpo de ejemplo en el documento WO98/56418. Las formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea se describen en el documento WO97/04801. Dichas formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado a una alta concentración de proteína y la formulación reconstituida se puede administrar por vía subcutánea al mamífero que se va a tratar en la presente memoria.

La formulación en la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan entre sí de forma adversa. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento, y otros factores descritos antes. Estos se usan en general en las mismas dosis y con las vías de administración que se describen en la presente memoria o aproximadamente de 1 a 99% de las dosis empleadas hasta ahora. Los principios activos también pueden estar

atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se

5 describen en la 16^a edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Osol, A. Ed. (1980). Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej. películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D(-)-3-hidroxibutírico).

10 Las lipofectinas o liposomas se pueden usar para suministrar los polipéptidos y anticuerpos (o fragmentos de los mismos) o las composiciones de esta descripción a las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se 15 prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que retengan la capacidad de unirse a la secuencia de proteína diana. Dichos péptidos se pueden 20 sintetizar químicamente y/o producir por tecnología de ADN recombinante. Véase, p. ej., Marasco et al., PNAS USA, 90: 7889-7893 (1993).

25 Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, véase antes.

30 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo (o fragmento del mismo), cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de los EE.UU. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L- 35 glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D(-)-3-hidroxibutírico). Mientras que los polímeros como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos 40 encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

45 En ciertas realizaciones, la formulación comprende un anticuerpo anti-EGFR descrito en la presente memoria en una concentración mayor de aproximadamente 0,5 mg/ml, mayor de aproximadamente 1 mg/ml, mayor de aproximadamente 2 mg/ml, mayor de aproximadamente 3 mg/ml, mayor de aproximadamente 4 mg/ml, mayor de aproximadamente 5 mg/ml, mayor de aproximadamente 6 mg/ml, mayor de aproximadamente 7 mg/ml, mayor de aproximadamente 8 mg/ml, mayor de aproximadamente 9 mg/ml, mayor de aproximadamente 10 mg/ml, mayor de aproximadamente 11 mg/ml, mayor de aproximadamente 12 mg/ml, mayor de aproximadamente 13 mg/ml, mayor de aproximadamente 14 mg/ml, mayor de aproximadamente 15 mg/ml, mayor de aproximadamente 16 mg/ml, mayor de aproximadamente 17 mg/ml, mayor de aproximadamente 18 mg/ml, mayor de aproximadamente 19 mg/ml, mayor de aproximadamente 20 mg/ml, mayor de aproximadamente 21 mg/ml, mayor de aproximadamente 22 mg/ml, mayor de aproximadamente 23 mg/ml, mayor de aproximadamente 24 mg/ml, mayor de aproximadamente 25 mg/ml, mayor de aproximadamente 26 mg/ml, mayor de aproximadamente 27 mg/ml, mayor de aproximadamente 28 mg/ml, mayor de aproximadamente 29 mg/ml, o mayor de aproximadamente 30 mg/ml, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

50 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se formula (p. ej., en una concentración mayor de aproximadamente 0,5 mg/ml, mayor de aproximadamente 1 mg/ml, mayor de aproximadamente 5 mg/ml, mayor de aproximadamente 10 mg/ml, mayor de aproximadamente 15 mg/ml, mayor de aproximadamente 20 mg/ml, o mayor de aproximadamente 25 mg/ml, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores) en un tampón que comprende un citrato, NaCl, acetato, succinato, glicina, polisorbato 80 (Tween 80), o cualquier combinación de los anteriores. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se formula (p. ej., en una concentración mayor de aproximadamente 0,5 mg/ml, mayor de aproximadamente 1 mg/ml, mayor de aproximadamente 5 mg/ml, mayor de aproximadamente

10 mg/ml, mayor de aproximadamente 15 mg/ml, mayor de aproximadamente 20 mg/ml, o mayor de aproximadamente 25 mg/ml, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores) en un tampón que comprende glicina de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se formula en un tampón que comprende NaCl de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM. En ciertas 5 realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se formula (p. ej., en una concentración mayor de aproximadamente 0,5 mg/ml, mayor de aproximadamente 1 mg/ml, mayor de aproximadamente 5 mg/ml, mayor de aproximadamente 10 mg/ml, mayor de aproximadamente 15 mg/ml, mayor de aproximadamente 20 mg/ml, o mayor de aproximadamente 25 mg/ml, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores) en un tampón que comprende acetato de 10 aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se formula en un tampón que comprende succinato de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. En ciertas 15 realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se formula (p. ej., en una concentración mayor de aproximadamente 0,5 mg/ml, mayor de aproximadamente 1 mg/ml, mayor de aproximadamente 5 mg/ml, mayor de aproximadamente 10 mg/ml, mayor de aproximadamente 15 mg/ml, mayor de aproximadamente 20 mg/ml, o mayor de aproximadamente 25 mg/ml, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores) en un tampón que comprende polisorbato 80 de 20 aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,02%. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se formula en un tampón que tiene un pH entre aproximadamente 5,1 y 5,6. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se formula en un tampón que comprende citrato 10 mM, NaCl 100 mM, glicina 100 mM, y polisorbato 80 al 0,01%, en donde la formulación está a pH=5,5.

En ciertas realizaciones, una formulación (tal como una formulación que comprende tampón que comprende citrato 20 10 mM, NaCl 100 mM, glicina 100 mM, y polisorbato 80 al 0,01%, en donde la formulación está a pH = 5,5) que comprende un anticuerpo para EFGR descrito en la presente memoria (p. ej., en una concentración mayor de aproximadamente 0,5 mg/ml, mayor de aproximadamente 1 mg/ml, mayor de aproximadamente 5 mg/ml, mayor de 25 aproximadamente 10 mg/ml, mayor de aproximadamente 15 mg/ml, mayor de aproximadamente 20 mg/ml, o mayor de aproximadamente 25 mg/ml, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores) es estable a temperatura ambiente (tal como a 20-25°C durante aproximadamente 0,5 semanas, 1,0 semana, 1,5 semanas, 2,0 semanas, 2,5 semanas, 3,5 semanas, 4,0 semanas, 4,5 semanas o 5,0 semanas, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, una formulación (tal como una formulación que comprende tampón que comprende citrato 10 mM, NaCl 100 mM, glicina 100 mM, y polisorbato 80 al 0,01%, en donde la formulación está a 30 pH = 5,5) que comprende un anticuerpo para EFGR descrito en la presente memoria (p. ej., en una concentración mayor de aproximadamente 0,5 mg/ml, mayor de aproximadamente 1 mg/ml, mayor de aproximadamente 5 mg/ml, mayor de aproximadamente 10 mg/ml, mayor de aproximadamente 15 mg/ml, mayor de aproximadamente 20 mg/ml, o mayor de aproximadamente 25 mg/ml, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores) es estable en condiciones aceleradas (tales como almacenamiento a aproximadamente 37°C) durante aproximadamente 0,5 semanas, 1,0 semana, 1,5 semanas, 2,0 semanas, 2,5 semanas, 3,5 semanas, 4,0 semanas, 4,5 semanas o 5,0 35 semanas, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un método bien conocido y ampliamente usado en los estudios de estabilidad de proteínas para detectar la potencial fragmentación y agregación, que corresponde a las inestabilidades físicas y químicas. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria muestra menos de 40 aproximadamente un 1,6%, 1,4%, 1,2%, 1,0%, 0,8%, 0,6%, 0,4%, 0,2%, o 0,1% de aumento de especies de alto peso molecular (HMWS) después de 1 semana a 37°C, con respecto al % inicial de especies de alto peso molecular, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria muestra menos de 45 aproximadamente un 2,0%, 1,8%, 1,6%, 1,4%, 1,2%, 1,0%, 0,8%, 0,6%, 0,4%, 0,2%, o 0,1% de aumento de especies de alto peso molecular después de 2 semanas a 37°C, con respecto al % inicial de especies de alto peso molecular, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un 50 anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria muestra menos de aproximadamente un 3,3%, 3,2%, 3,1%, 3,0%, 2,9%, 2,8%, 2,7%, 2,6%, 2,5%, 2,4%, 2,2%, 2,0%, 1,8% 1,6%, 1,4%, 1,2%, 1,0%, 0,8%, 0,6%, 0,4%, 0,2%, o 0,1% de aumento de especies de alto peso molecular después de 4 semanas a 37°C, con respecto al % inicial de especies de alto peso molecular, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria muestra menos de aproximadamente un 1,6%, 1,4%, 1,2%, 1,0%, 0,8%, 0,6%, 0,4%, 0,2% o 0,1% de aumento de especies de bajo peso molecular (LMWS) después de 1 55 semana a 37°C, con respecto al % inicial de especies de bajo peso molecular, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria muestra menos de aproximadamente un 2,0%, 1,8% 1,6%, 1,4%, 1,2%, 1,0%, 0,8%, 0,6%, 0,4%, 0,2%, o 0,1% de aumento de especies de bajo peso molecular después de 2 semanas a 37°C, con respecto al % inicial de especies de bajo peso molecular, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, una 60 formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria muestra menos de aproximadamente un 2,4%, 2,2%, 2,0%, 1,8% 1,6%, 1,4%, 1,2%, 1,0%, 0,8%, 0,6%, 0,4%, 0,2%, o 0,1% de aumento de especies de bajo peso molecular después de 4

semanas a 37°C, con respecto al % inicial de especies de bajo peso molecular, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no muestra más de aproximadamente un 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, 2,5%, 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9%, 3,0%, 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, o 3,5% de disminución de monómero después de 1 semana a 37°C, con respecto al % inicial de monómero, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no muestra más de aproximadamente un 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, 2,5%, 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9%, 3,0%, 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, o 3,5% de disminución de monómero después de 2 semanas a 37°C, con respecto al % inicial de monómero, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no muestra más de aproximadamente un 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, 2,5%, 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9%, 3,0%, 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, o 3,5% de disminución de monómero después de 4 semanas a 37°C, con respecto al % inicial de monómero, medido usando SEC, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

La cromatografía de intercambio catiónico (CEX) es una herramienta bien conocida y ampliamente usada para detectar los sucesos de degradación de proteínas tales como la desamidación u oxidación (Moorhouse et al. (1997) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16, 593-603). Las especies ácidas son las variantes que eluyen antes que el pico principal de la CEX, mientras que las especies básicas son las variantes que eluyen más tarde que el pico principal de la CEX. En ciertas realizaciones, la fracción de picos de especies ácidas de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es mayor de aproximadamente 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15% de la proteína total después de 1 semana a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, la fracción de picos de especies ácidas de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es mayor de aproximadamente 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, o 18% de la proteína total después de 2 semanas a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, la fracción de picos de especies ácidas de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es mayor de aproximadamente 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, o 27% de la proteína total después de 4 semanas a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

En ciertas realizaciones, la fracción de picos de especies básicas de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es mayor de aproximadamente 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45% o 46% de la proteína total después de 1 semana a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, la fracción de picos de especies básicas de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es mayor de aproximadamente 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45% o 46% de la proteína total después de 2 semanas a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, la fracción de picos de especies básicas de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es mayor de aproximadamente 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45% o 46% de la proteína total después de 4 semanas a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

En ciertas realizaciones, la fracción de pico principal de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es menor de aproximadamente 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45% o 46% de la proteína total después de 1 semana a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, la fracción de pico principal de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es menor de aproximadamente 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, o 46% de la proteína total después de 2 semanas a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores. En ciertas realizaciones, la fracción de pico principal de una formulación que comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml o 25 mg/ml de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente memoria no es menor de aproximadamente 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, o 46% de la proteína total después de 4 semanas a 37°C, medido usando CEX, incluyendo cualquier intervalo entre esos valores.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente, p. ej., por filtración mediante membranas de filtración estériles.

Métodos de diagnóstico y formación de imágenes usando anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico

Los anticuerpos anti-EGFR marcados, fragmentos de los mismos y derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido EGFR se pueden usar con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o controlar enfermedades y/o trastornos asociados con la expresión, expresión aberrante y/o actividad del EGFR. Por ejemplo, los anticuerpos anti-EGFR (o fragmentos de los mismos) proporcionados en la presente memoria se pueden usar en ensayos de diagnóstico *in situ*, *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* o ensayos de formación de imágenes. Los métodos para detectar la expresión de un polipéptido EGFR, comprenden (a) analizar la expresión del polipéptido en células (p. ej., tejido) o fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos de esta descripción y (b)

comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica de referencia, de modo que un aumento o disminución en el nivel de expresión del gen analizado en comparación con el nivel de expresión de referencia es indicativo de expresión aberrante.

Realizaciones adicionales proporcionadas en la presente memoria incluyen métodos de diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o expresión aberrante del EGFR en un animal (p. ej., un mamífero tal como un ser humano). Los métodos comprenden detectar moléculas de EGFR en el mamífero. En ciertas realizaciones, el diagnóstico comprende: (a) administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EGFR marcado (o fragmento del mismo) a un mamífero, (b) esperar durante un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que el anticuerpo anti-EGFR marcado (o fragmento del mismo) se concentre preferentemente en sitios en el sujeto donde se expresa la molécula de EGFR (y para que la molécula marcada no unida sea eliminada hasta nivel base); (c) determinar el nivel base; y (d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de modo que la detección de la molécula marcada por encima del nivel base indica que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno particular asociado con la expresión o expresión aberrante del EGFR. El nivel base se puede determinar mediante varios métodos, que incluyen comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor de referencia previamente determinado para un sistema particular.

Los anticuerpos anti-EGFR (o fragmentos de los mismos) proporcionados en la presente memoria se pueden usar para analizar los niveles de proteínas en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., véase Jalkanen, et al., *J. Cell. Biol.* 101: 976-985 (1985); Jalkanen, et al., *J. Cell. Biol.* 105: 3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa; radioisótopos, como yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (^{115m}In, ^{113m}In, ¹¹²In, ¹¹¹In), y tecnecio (⁹⁹Tc, ^{99m}Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru; luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Las técnicas conocidas en la materia se pueden aplicar a anticuerpos marcados (o fragmentos de los mismos) proporcionados en la presente memoria. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, el uso de agentes de conjugación bifuncionales (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.756.065; 5.714.631; 5.696.239; 5.652.361; 5.505.931; 5.489.425; 5.435.990; 5.428.139; 5.342.604; 5.274.119; 4.994.560; y 5.808.003).

Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de un ácido nucleico o ARNm que codifica el polipéptido EGFR en la célula, p. ej., mediante hibridación fluorescente *in situ* usando una sonda basada en ácido nucleico que corresponde a un ácido nucleico que codifica el EGFR o el complemento del mismo; (FISH; véase el documento WO98/454 79 publicado en octubre de 1998), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión de EGFR midiendo el antígeno vertido en un fluido biológico tal como suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpos (véase también, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.933.294 expedida el 12 de junio de 1990; W091/05264 publicado el 18 de abril de 1991; patente de EE.UU. 5.401.638 expedida el 28 de marzo de 1995, y Sias et al., *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, están disponibles varios ensayos *in vivo* y *ex vivo* para el profesional experto. Por ejemplo, se pueden exponer las células dentro del cuerpo del mamífero a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, p. ej., un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo al mismo, p. ej., por barrido externo de radioactividad o analizando una muestra (p. ej., una biopsia u otra muestra biológica) tomada de un mamífero previamente expuesto al anticuerpo.

Artículos de fabricación y kits

Otra realización proporcionada en la presente memoria es un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento del cáncer, tales como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón o cáncer colorrectal (p. ej., tumores), o. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. En general, el recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja

de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) proporcionado en la presente memoria. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección particular. La etiqueta o el prospecto comprenderán además instrucciones para administrar la composición de anticuerpos al paciente. También se contemplan artículos de fabricación y kits que comprenden terapias combinatorias descritas en la presente memoria.

El prospecto se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos. En una realización, el prospecto indica que la composición se usa para tratar el cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón o cáncer colorrectal).

Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para varios fines, p. ej., para el aislamiento o detección del EGFR en pacientes, opcionalmente en combinación con los artículos de fabricación. Para el aislamiento y la purificación del EGFR, el kit puede contener un anticuerpo anti-EGFR (o fragmento del mismo) proporcionado en la presente memoria acoplado a perlas (p. ej., perlas de sefarosa). Se pueden proporcionar kits que contienen los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) para la detección y cuantificación del EGFR in vitro, p. ej., en un ELISA o una transferencia Western. Al igual que con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Por ejemplo, el recipiente contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-EGFR proporcionado en la presente memoria. Se pueden incluir recipientes adicionales que contienen, p. ej., diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso previsto in vitro o de diagnóstico.

25 Ejemplos

Ejemplo 1. Generación y maduración de afinidad de anticuerpos anti-factor de crecimiento epidérmico con CDR-H2 glicosilada y aglicosilada

El anticuerpo anti-EGFR humanizado 348311 se generó usando la región variable de la cadena pesada de la línea germinal VH3.48 y la región variable de la cadena ligera de la línea germinal VK3.11. Después, 348311 se usó en experimentos de maduración de afinidad basados en la presentación en fagos in vitro para generar clones con un rendimiento de unión mejorado. Primero, se generaron bibliotecas de ácidos nucleicos CDR-L3/CDR-H3 mediante PCR, se clonaron en un vector de presentación en fagos y se transformaron en *E. coli* para producir una biblioteca de fagos. Después de dos rondas de selección por pasos, se seleccionaron 284 clones Fab por ELISA, y se encontró que siete clones (es decir, 1-15, 1-16, 1-26, 1-86, 2-48, 1-13 y 3-66) tenían rendimiento de unión que era equivalente o mejor que 348311 (Figura 1). Se llevaron a cabo ELISA adicionales usando clones de IgG de longitud completa que comprenden las siguientes combinaciones de cadena ligera/cadena pesada: 348311/348311 (LC/HC), 1-15/348311 (LC/HC), 1-26/348311 (LC/HC), 1-86/348311 (LC/HC), 2-48/348311 (LC/HC), 348311/1-26 (LC/HC), 1-15/1-26 (LC/HC), 1-26/1-26 (LC/HC), 1-86/1-26 (LC/HC), y 2-48/1-26 (LC/HC). También se ensayó HLX05 (es decir, un anticuerpo biosimilar a ERBITUX® de producción interna). Los clones que comprendían la cadena pesada de 1-26 presentaban mejor rendimiento de unión al EGFR que los clones que comprendían la cadena pesada de 348311. (Véase la Figura 2.)

Se seleccionó la cadena pesada de 1-26 y se usó como la base para generar bibliotecas de CDR-H2 para la eliminación de un sitio de glicosilación. Las bibliotecas de ácidos nucleicos de CDR-H2 se generaron mediante PCR, se clonaron en un vector de presentación en fagos y se transformaron en *E. coli* para producir una biblioteca de fagos. Después de dos rondas de selección por pasos, se seleccionaron dos clones, es decir, 2-68 y 3-67, por ELISA y se descubrió que tenían propiedades de unión mejoradas. Los ELISA de disociación se llevaron a cabo en pocillos recubiertos con antígeno EGFR de producción interna y clones de anticuerpos anti-EGFR que comprendían las siguientes combinaciones de cadena ligera/cadena pesada: 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC), 1-26/1-26 (LC/HC) y 348311/1-26 (LC/HC). Se encontró que los clones que comprendían 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC), y 348311/1-26 (LC/HC) tenían mayor afinidad de unión a EGFR que HLX05 en el ELISA de disociación (Figura 3).

Se usó el clon de 3-67 como base para generar bibliotecas de CDR-L1/CDR-L2/CDR-H1. Las bibliotecas de ácidos nucleicos CDR-L1/CDR-L2/CDR-H1 se generaron por PCR, se clonaron en un vector de presentación en fagos y se transformaron en *E. coli* para producir una biblioteca de fagos. Después de 2 rondas de selección por pasos, los clones #8, #31, #33 y #34 se seleccionaron por ELISA y se mostró que se unían al EGFR con una afinidad similar a la de ERBITUX®.

Las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de los clones 1-26, 2-68, 3-67, #8, #31, #33 y #34 se barajaron para generar variantes de anticuerpos anti-EGFR adicionales, que también se ensayaron en ELISA. Los siguientes

anticuerpos principales se seleccionaron para su posterior análisis en un ELISA de unión directa: 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC), #8/#33 (LC/HC) y #34/#33 (LC/HC). Brevemente, las diluciones seriadas de cada clon, HLX05, ERBITUX® adquirido en Merck KGaA y rituximab (es decir, un anticuerpo anti-CD20) se capturaron con anticuerpo anti-fd de cabra en pocillos de una placa de microtitulación. La cantidad de anticuerpo capturado en cada pocillo se cuantificó usando un anticuerpo secundario anti-Kappa humano conjugado con HRP. El anticuerpo secundario conjugado con HRP se añadió a los pocillos y, después de una incubación, se eliminó por lavado el exceso de anticuerpo secundario. Se añadió TMB a los pocillos, y después de incubación, se detuvo la reacción y se midió la actividad de HRP controlando el aumento de absorbancia a 450 nm. La unión al EGFR se midió añadiendo proteína de fusión EGFR-AP a los pocillos. Después de una incubación y lavado, se añadió pNPP a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos. La actividad de AP se midió controlando el aumento de la absorbancia a 405 nm. Se representó gráficamente la concentración de anticuerpos en función de la actividad de AP (Figura 4). Como se muestra en la Figura 4, los clones 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC) mostraron afinidades de unión para EGFR que eran similares a HLX05 y ERBITUX® adquirido en Merck KGaA.

Los clones 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC); #8/#33 (LC/HC), #34/#33 (LC/HC), HLX05, ERBITUX® adquirido en Merck KGaA y rituximab se ensayaron en un ELISA competitivo para determinar la unión de EGFR con HLX05 biotinilado. Brevemente, se mezcló previamente una muestra de cada anticuerpo con HLX05 biotinilado. Después se añadió EGFR conjugado con fosfatasa alcalina a la solución premezclada y se preincubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de preincubación se añadió después a pocillos de microtitulación recubiertos con avidina. Después de una incubación de una hora, todos los pocillos se lavaron con PBST y se añadió pNPP a cada pocillo. Después de una segunda incubación a 37°C, se detuvo la reacción. La actividad de la fosfatasa alcalina se midió controlando el aumento de la absorbancia a 405 nm. Todos los clones ensayados mostraron una mayor capacidad competitiva que HLX05 o ERBITUX® adquirido en Merck KGaA (Figura 5). Dichos resultados también verifican que todos los clones ensayados se unen al mismo epítopo de EGFR que ERBITUX®.

Los clones 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC); #8/#33 (LC/HC) comprenden cada uno una CDR-H2 que se modificó genéticamente para eliminar el sitio de glicosilación. Los perfiles de glicosilación de los clones de IgG enteros 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC); #8/#33 (LC/HC), y #34/#33 (LC/HC), ERBITUX® adquirido en Merck KGaA y HLX05 se analizaron por HPLC. G0F y G1F representan la mayoría de los tipos de glicanos entre los clones ensayados, mientras que G0 se detectó tanto en ERBITUX® de Merck KGaA como en HLX05 (Figura 6). Se realizó un análisis adicional de glicanos en fragmentos Fab y fragmentos Fc de 1-26/3-67 (LC/HC), ERBITUX® adquirido en Merck KGaA, y HLX05. G0F y G1F se detectaron en el Fc de 1-26/3-67, pero no se detectaron glicanos en el Fab de 1-26/3-67. Por el contrario, se detectaron trazas de G2F, así como G0F y G1F en fragmentos Fc de ERBITUX® adquiridos en Merck KGaA y HLX05. Se detectaron G2F +2*Gal y G2F+Gal+SA(NeuAc) en el fragmento Fab de ERBITUX® adquirido en Merck KGaA, y se detectaron G2F + 2*SA(NeuAC) y G2F+Gal+SA(NeuAc) en el fragmento Fab de HLX05 (Figura 6).

Se llevó a cabo SPR en HLX05 de producción interna, 348311/2-68 (LC/HC), 1-26/2-68 (LC/HC), 348311/3-67 (LC/HC), y 1-26/3-67 (LC/HC). Los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

LC/HC	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	K _D (M)	Diferencia en K _D
HLX05	5,02E6 (\pm 1,28E3)	6,38E-4 (\pm 8,89E-6)	1,27E-10 (\pm 1,81E-12)	1
348311/2-68	5,80E6 (\pm 2,49E3)	7,29E-4 (\pm 8,83E-6)	1,26E-10 (\pm 1,58E-12)	1
1-26/2-68	6,48E6 (\pm 8,14E2)	4,21E-4 (\pm 9,60E-6)	6,49E-11 (\pm 1,49E-12)	2,0
348311/3-67	6,10E6 (\pm 3,31E3)	1,51E-3 (\pm 6,58E-6)	2,47E-10 (\pm 1,21E-12)	0,5
1-26/3-67	5,09E6 (\pm 1,52E3)	5,53E-4 (\pm 1,13E-5)	1,09E-10 (\pm 2,24E-12)	1,2

Se midió que los clones 1-26/2-68 tenían una Kd de $6,49 \times 10^{-11}$, es decir una afinidad por el EGFR que es 2 veces la de HLX05. Se midió que 1-26/3-67 tenían una Kd de $1,09 \times 10^{-10}$, es decir una afinidad por el EGFR que es 1,2 veces mayor que la de HLX05.

Los clones de IgG que comprendían la cadena ligera 1-26 y la cadena pesada 2-68 o 3-67 demostraron una afinidad de 2 a 3 veces mayor por EGFR que HLX05. (Véase la tabla 6 a continuación).

Tabla 6

LC/HC	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	K _D (M)	Diferencia en K _D
HLX05	8,31E6 (\pm 8,82E4)	2,07E-3 (\pm 1,88E-4)	2,49E-10 (\pm 2,52E-11)	1
1-26/2-68	8,82E6 (\pm 2,73E3)	7,18E-4 (\pm 7,36E-4)	8,14E-11 (\pm 8,34E-11)	3,1
1-26/3-67	8,93E6 (\pm 1,69E3)	9,95E-4 (\pm 2,58E-4)	1,11E-10 (\pm 2,89E-11)	2,2
#8/#33	6,09E6 (\pm 1,33E5)	1,02E-4 (\pm 1,13E-5)	1,67E-11 (\pm 2,22E-12)	13,9
#31/#33	7,24E6 (\pm 2,75E5)	5,47E-4 (\pm 2,69E-5)	7,56E-11 (\pm 6,59E-12)	3,3
#34/#33	8,25E6 (\pm 8,15E4)	6,17E-4 (\pm 1,34E-5)	7,48E-11 (\pm 2,37E-12)	3,3
#8/3-67	6,68E6 (\pm 6,42E3)	6,15E-4 (\pm 1,06E-3)	19,21E-11 (\pm 1,58E-10)	2,7
#8/#31	7,52E5 (\pm 5,26E3)	1,00E-3 (\pm 5,81E-4)	1,33E-10 (\pm 7,74E-11)	1,9
#31/3-67	6,45E6 (\pm 1,68E3)	1,16E-3 (\pm 4,10E-4)	1,80E-10 (\pm 6,36E-11)	1,4

La unión a Fc_YRIIIA de los clones de anticuerpos anti-EGFR generados por maduración de afinidad se ensayó por ELISA. Brevemente, los pocillos de microtitulación se recubrieron con Fc_YRIIIA y se bloquearon con BSA. Se añadieron los siguientes anticuerpos en una concentración de 1 µg/ml: HLX05 de producción interna, 1-26/2-68

5 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC), #8/#33 (LC/HC), #34/#33 (LC/HC) y ERBITUX® adquirido en Merck KGaA. Después de una incubación de 1 hora, se añadió a cada pocillo anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana conjugado con HRP. Se añadió sustrato TMB a los pocillos y se incubaron durante 7 minutos. Después la reacción se detuvo, se midió la actividad de HRP controlando el aumento de la absorbancia a 450 nm. Como se muestra en la Figura 7, cada uno de 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC), #8/#33 (LC/HC), #34/#33 (LC/HC) se une a FCyRIIIa con afinidad similar a la de ERBITUX® adquirido en Merck KGaA y a la de HLX05.

10 La actividad de ADCC de los clones de anticuerpos generados por maduración de afinidad se comparó con la de HLX05 de producción interna. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Suzuki et al. (2007) "A Nonfucosylated Anti-HER2 Antibody Augments Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Breast Cancer Patients." *Clin Cancer Res* 13, 1875-1882. Todos los clones ensayados mostraron que presentaban actividad de ADCC similar a la de HLX05 producido en el laboratorio. Se encontró que #34/#33 (LC/HC) tenía una actividad de ADCC ligeramente mejorada (Figuras 8A-G).

15 Los efectos antiproliferativos de 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC), #8/#33 (LC/HC), #34/#33 (LC/HC) y HLX05 en células de carcinoma epidermoide A431 humano se compararon en un ensayo de MTT. El ensayo colorimétrico de MTT es un método establecido para determinar el número de células viables en estudios de proliferación y citotoxicidad. Este ensayo se basa en la escisión de la sal de tetrazolio amarilla, MTT, para la formación de un producto de formazán azul soluble por enzimas mitocondriales, y la cantidad de formazán producida es directamente proporcional al número de células vivas, no muertas, presentes durante la exposición al MTT (véase Mosmann 20 (1983) *J Immunol Methods* 1983, 65: 55-63). Se añadió 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC), #8/#33 (LC/HC), #34/#33 (LC/HC) o HLX05 a las células en concentraciones crecientes. Despues de la incubación, se añadió reactivo MTT a las células. Los productos de MTT resultantes se determinaron midiendo la absorbancia a 570 nm. La viabilidad celular se determinó usando la fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = (\text{densidad óptica de la muestra}/\text{densidad óptica de control}) \times 100$$

25 Los valores de Cl₅₀ se calcularon como las concentraciones que muestran 50% de inhibición de la proliferación en cualquier línea celular ensayada. Como se muestra en la Figura 9, 1-26/2-68 (LC/HC), 1-26/3-67 (LC/HC), #8/#33 (LC/HC) y #34/#33 (LC/HC) mostraron tener un efecto antiproliferativo mejorado en comparación con HLX05.

30 Se usaron ratones que llevaban xenoinjertos de tumor de carcinoma epidermoide A431 humano para ensayar la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-EGFR descritos en la presente memoria. Brevemente, se implantaron células de carcinoma epitelial A431 humano (inóculo = 2 x 10⁶ células) en ratones BALB/c machos sin sistema inmune. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos. Cada grupo se trató con uno de los regímenes de dosificación descritos en la Tabla 7 a continuación:

Tabla 7

Grupo	Animales	Tumor	Agente de tratamiento (Ab)	Dosis	Programa de tratamiento
1	BALB/c NU macho 6 semanas de edad 7 ratones/grupo	A431 Inóculo = 2×10^6 células	#34/#33	2 mg/kg	Día 7 después de inoculación; dos veces a la semana durante 5 semanas
2			1-26/3-67		
3			1-26/2-68		
4	BALB/c NU macho 6 semanas de edad 6 ratones/grupo		ERBITUX® (Merck KGaA) Lote: 161734		
5			Placebo	10 ml/kg	

35 días después del comienzo del tratamiento, los tumores en ratones tratados con ERBITUX® eran aproximadamente 26% más pequeños que los tumores en ratones que recibieron placebo. Los tumores en ratones tratados con 1-26/2-68 eran aproximadamente un 31% más pequeños que los tumores en ratones que recibían placebo ($p < 0,05$). Los tumores en ratones tratados con #8/#33 o #34/#33 eran aproximadamente 50% más pequeños que los tumores en ratones que recibían placebo ($p < 0,01$) y aproximadamente 50% más pequeños que los ratones que recibían ERBITUX® ($p < 0,05$). Véase la Figura 10 y la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8

	TV ¹ (35 días)	RTV ² (35 días)	TV/CV % ³ (35 días)	TGI % ⁴ (35 días)	Valor p de TV ⁵ (35 días)	
#34/#33 (2 mg/kg)	1116	657%	50%	54%	0,003	$p < 0,01$
1-26/3-67 (2 mg/kg)	1102	670%	50%	54%	0,002	$p < 0,01$
1-26/2-68 (2 mg/kg)	1535	911%	69%	33%	0,045	$p < 0,05$
ERBITUX® (Merck KGaA) Lote: 161734 (2 mg/kg)	1652	991%	74%	27%	0,104	$p > 0,05$
Placebo	2219	1261%				

¹TV: Volumen tumoral (mm^3)

²RTV: Volumen tumoral con respecto al inicial

³TV/CV %: Volumen del grupo de tratamiento/Volumen del grupo de control

⁴TGI %: Tasa de inhibición del crecimiento tumoral = $1 - (T35-T0)/(C35-C0) \%$

⁵Valor p: $< 0,05 = * < 0,01 = ** < 0,001 = ***$

Se tomaron muestras de suero de cada ratón el día 3 y el día 35 para determinar las concentraciones en el suero de #34/#33, 1-26/3-67, 1-26/2-68, o ERBITUX® en estos dos tiempos de medición. Brevemente, los pocillos de una placa de microtitulación se recubrieron con EGFR-AP que se diluyó 8 veces. Las muestras de suero se diluyeron 5000 veces y se añadieron a los pocillos. La cantidad de anticuerpo capturado en cada pocillo se cuantificó usando un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG-Fc humana conjugado con HRP. Este experimento se llevó a cabo por

10

15

20

duplicado, y los resultados se muestran en la Figura 11. Los niveles en el suero de #34/#33, 1-26/3-67, 1-26/2-68 eran más altos que el nivel en el suero de ERBITUX® tanto el día 3 como el día 35.

Ejemplo 2. Ensayos de xenoinjerto de tumor de carcinoma de células escamosas de hipofaringe FaDu

5 Se usaron ratones que llevaban xenoinjertos de tumor de carcinoma de células escamosas de hipofaringe FaDu humano para ensayar la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-EGFR descritos en la presente memoria. Brevemente, se implantaron por vía subcutánea células de carcinoma de células escamosas de hipofaringe FaDu humano (inóculo = 2×10^6 células) en ratones BALB/c hembra sin sistema inmune. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos que contenían 7 ratones cada uno. Cada grupo se trató con uno de los regímenes de dosificación descritos en la Tabla 9 a continuación:

10 Tabla 9

Grupo	Animales	Tumor	Agente de tratamiento (Ab)	Dosis	Programa de tratamiento
1	BALB/c NU Hembra 6 semanas de edad 7 ratones/grupo	FaDu Inóculo = 2×10^6 células	HLX05	2 mg/kg	Día 7 después de inoculación: dos veces a la semana por inyección IP durante 2-3 semanas
2			1-26/3-67		
3			ERBITUX® (Merck KGaA) Lote: 164362		
4			Placebo	10 ml/kg	

15 17 días después del comienzo del tratamiento, los tumores en ratones tratados con ERBITUX® eran aproximadamente 38% más pequeños que los tumores en ratones que recibían placebo. Los tumores en ratones tratados con HLX05 eran aproximadamente 29% más pequeños que los tumores en ratones que recibían placebo ($p < 0,05$). Los tumores en ratones tratados con 1-26/3-67 eran aproximadamente 51% más pequeños que los tumores en ratones que recibían placebo ($p < 0,01$). Véase la Figura 12 y la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10

	TV (17 días)	RTV (17 días)	TV/CV% (17 días)	TGI% (17 días)	Valor p de TV (17 días)	
HLX05 2 mg/kg	605	493%	76%	29%	0,03	$p < 0,05$
HLX07 1-26/3-67 2 mg/kg	458	350%	58%	51%	0,0014	$p < 0,01$
ERBITUX (Merck KGaA) Lote: 164362 2 mg/kg	538	470%	68%	38%	0,003	$p < 0,01$
Placebo 10 ml/kg	794	705%				

20 En otro conjunto de experimentos, los ratones NOD-SCID recibieron tratamiento con anticuerpos más radioterapia (XRT). Brevemente, se implantaron por vía subcutánea células de carcinoma de células escamosas de hipofaringe FaDu humano (inóculo = 1×10^6 células) en ratones NOD-SCID macho. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos. Cada grupo se trató con uno de los regímenes de dosificación descritos en la Tabla 11 a continuación:

Tabla 11

Grupo	Animales	Tumor	Anticuerpo/Dosis	Programa del tratamiento con terapia de radiación	Programa del tratamiento con anticuerpo
1	NOD/SCID Macho 8 semanas de edad 5 ratones/grupo	FaDu Inóculo = 1×10^6 células	Ninguno	10 Gy x 1, Días alternos el día 14 después de inoculación	Inicio el día 13 después de inoculación; Ab administrado por inyección IP durante 5 días
2			ERBITUX® (Merck KGaA) 250 µg/ratón		
3			1-26/3-67 250 µg/ratón		

- Después de 5 días de tratamiento, los tumores en ratones que recibieron tratamiento de combinación de ERBITUX y XRT eran 91% más pequeños que los tumores en ratones que recibieron XRT solo. Los tumores en ratones que recibieron tratamiento de combinación de HLX07 y XRT eran 105% más pequeños que los tumores en ratones que recibieron solo XRT. Véase la Figura 13 y la Tabla 12 a continuación. (RT = radioterapia)

Tabla 12

	TV (17 días)	RTV (17 días)	TV/CV (17 días)	TGI% (17 días)	Valor P de TV (17 días)	
RT_vehículo	591	480%	-	-	-	-
RT_ERBITUX® (Merck KGaA) 250 µg/ratón	156	137%	26%	91%	1,76E-6	p < 0,001
RT_1-26/3-67 250 µg/ratón	102	77%	17%	105%	3,69E-7	p < 0,001

Ejemplo 3. Conjugado de anticuerpo anti-factor de crecimiento epidérmico-fármaco

- 10 DM1 (N2'-desacetyl-N2'-(3-mercaptopropano-1-oxopropil)maytansina) es un inhibidor potente del ensamblado de microtúbulos que se ha demostrado que induce un paro mitótico (véase, p. ej., Chan (2008) *Acc Chem Res* 41, 98-107; Oroudjev et al. (2010) *Mol Cancer Ther* 9, 2700-2713; y Remillard et al. (1975) *Science* 189, 1002-1005). Se preparó un conjugado de HLX07-DM1 y se evaluó su eficacia como agente anti-cáncer como se describe a continuación.
- 15 HLX07 se formuló en PBS, pH 6,5 usando columnas de desalación PD10. La concentración final de HLX07 se ajustó a 7,5 mg/ml usando el mismo tampón. En tubos separados, DM1 y SMCC se prepararon como soluciones en DMF 10 mM. Se mezclaron volúmenes iguales de soluciones de DM1 y SMCC y se dejó que se completara la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Despues el DM1-SMCC se añadió a la solución HLX07 en una relación molar de 4,5 a 1. La solución mezclada se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. La cantidad en exceso de reaccionantes pequeños se eliminó usando columnas PD10. La concentración del conjugado anticuerpo-fármaco se determinó usando A280, con la corrección adecuada de A252. La relación de fármaco a anticuerpo se determinó usando las relaciones A280/A252.

20 Se midió la capacidad de HLX07-DM1 para mediar la inhibición de células de cáncer de colon humano positivas para EGFR en una serie de experimento *in vitro* usando las líneas celulares DiFi (KRAS^{WT} y BRAF^{WT}), HCT-116 (KRAS^{G13D}), y HT-29 (BRAF^{V600E}). En todos los estudios, las células de cada línea celular se incubaron con concentraciones crecientes de HLX07-DM, HLX07 o anticuerpo de control (anti-CD20) (3 veces en serie) a 37°C durante 3 días. La inhibición del crecimiento se midió usando el ensayo de MTT. Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT (es decir, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un colorante amarillo) en un producto de formazán de color púrpura con una absorbancia a 565 nm. Como se muestra en la

Figura 14A, el efecto inhibidor del crecimiento de HLX07-DM1 y HLX07 era similar en las células de carcinoma rectal humano DiFi con EGFR de tipo natural. Sin embargo, solo HLX07-DM1 mostró un efecto antiproliferativo en células HCT-116 con KRAS mutado (Figura 14B) y HT-29 con BRAF mutado (Figura 14C).

Ejemplo 4. Anticuerpo anti-factor de crecimiento epidérmico afucosilado

- 5 Para evaluar la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de HLX07 sin fucosa (es decir, HLX07-FF), se llevaron a cabo ensayos de ADCC usando PBMC de donantes humanos sanos como células efectoras y DiFi, una línea celular de carcinoma rectal humano que tiene KRAS de tipo natural, como células diana. Las PBMC humanas se prepararon recientemente a partir de la sangre entera de donantes sanos usando Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich), y se suspendieron en medio RPMI (RPMI-1640 que contenía L-glutamina, HEPES 25 mM, 10 penicilina, estreptomicina y FBS al 10%) a la densidad de 5×10^6 células/ml. Las células diana DiFi se suspendieron en medio RPMI y se sembraron en una placa de microtitulación con fondo en U de 96 pocillos con 10^4 células/pocillo. Se añadieron diluciones seriadas de HLX07-FF, HLX07 y anticuerpo de control (anti-CD20) a los pocillos individuales en diversas concentraciones de 1,5 pg/ml a 3,3 ng/ml. A continuación, se añadieron PBMC a los pocillos para lograr una relación célula efectora:célula diana de 25:1, y las placas se incubaron a 37°C durante 5 horas. Despues las placas se centrifugaron y se analizó en los líquidos sobrenadantes la actividad de lactato deshidrogenasa. Se registró la absorbancia de los líquidos sobrenadantes a 490 nm para determinar la liberación de lactato deshidrogenasa usando el kit de ensayo de citotoxicidad Cytoscan™-LDH (G-Bioscience). Los valores de CE₅₀ se calcularon como las concentraciones que muestran 50% de inducción de ADCC en líneas celulares ensayadas. Como se muestra en la Figura 15A, HLX07-FF mostró 50% de inducción con 1,69 ng/ml, una concentración 60% menor que la concentración de HLX07 (es decir, 4,388 ng/ml) requerida para mostrar un 50% de inducción.

La mutación de KRAS es un biomarcador predictivo para la resistencia a ERBITUX en el cáncer de colon metastásico. Véase "Class Labeling Changes to anti-EGFR monoclonal antibodies, cetuximab (Erbitux) and panitumumab (Vectibix): KRAS Mutations". Administración de medicamentos y alimentos de EE.UU. 11-01-2010.

- 25 Para comparar la actividad de ADDC de HLX07-FF y HLX07 en células con KRAS mutado, el ensayo descrito anteriormente se repitió usando HCT-116, es decir, una línea celular de carcinoma de colon humano que tiene la mutación KRAS^{G13D}, como células diana. El ensayo se realizó usando una relación de célula efectora:célula diana 30:1. Se añadieron diluciones seriadas de HLX07-FF, HLX07 y anticuerpo de control (anti-CD20) en los pocillos individuales en diversas concentraciones de 0,1 µg/ml a 5,1 pg/ml después de diluciones seriadas de 3 veces. Como se muestra en la Figura 15B, HLX07-FF demostró actividad de ADCC 4,8 veces mayor en células HCT-116 que HLX07 fucosilado.

La mutación BRAF es un biomarcador predictivo de resistencia a ERBITUX en cáncer de colon metastásico. Véase Di Nicolaito et al. (2008) *J. Clin Oncol.* 26, 5705-5712. Para comparar la actividad de ADDC de HLX07-FF y HLX07 en células con BRAF mutado, el ensayo descrito antes se repitió como se ha descrito antes usando HT29, una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano que tiene la mutación BRAF^{V600E}, como células diana. El ensayo se llevó a cabo usando una relación de célula efectora:célula diana 30:1. Se añadieron diluciones seriadas de HLX07-FF, HLX07 y anticuerpo de control (anti-CD20) en los pocillos individuales en diversas concentraciones de 0,1 µg/ml a 5,1 pg/ml después de diluciones seriadas de 3 veces. Como se muestra en la Figura 15C, HLX07-FF demostró una actividad de ADCC 4,7 veces mayor en células HT29 que HLX07 fucosilado.

40 Ejemplo 5. Perfiles farmacocinéticos de anticuerpos anti-factor de crecimiento epidérmico

Se inyectaron a dos macacos cangrejeros (un macho y una hembra) anticuerpos (es decir, 33/34-#1, 33/34-#2, 3/67-#3, y 3/67-#4) 24 mg/kg vía i.v. Las concentraciones en el suero de los anticuerpos anti-EGFR se midieron por el método ELISA en varios tiempos de medición después de la infusión. Este experimento se repitió en un segundo conjunto de macacos cangrejeros con los anticuerpos. Como se muestra en el perfil de concentración en el suero-tiempo en la Figura 16 A, el anticuerpo 3/67 se puede detectar en los sueros de macacos cangrejeros durante aproximadamente 100 más que el anticuerpo 34/33. La Figura 16B muestra el perfil de concentración en el suero-tiempo de HLX05 (1-3) y ERBITUX® (es decir, 4-6) en macacos cangrejeros.

Ejemplo 6. Producción de anticuerpos anti-factor de crecimiento epidérmico a partir de líneas celulares estables

Los subclones superiores HLX07 1-26/3-67 se cribaron mediante conexión a una plataforma de biorreactor DASGIP establecida. Con un programa de alimentación semicontinua, añadiendo butirato y unas condiciones de incubación a temperatura más baja con control de pH a 7, el subclón 1-26/3-67-45-9 alcanzó 4,9 g/l el día 17. Véase la Figura 17.

Ejemplo 7. Estabilidad de los anticuerpos anti-factor de crecimiento epidérmico

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad en los que formulaciones del anticuerpo HLX07 que contenían 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml y 25 mg/ml se sometieron a condiciones de almacenamiento aceleradas (es decir, 37°C) durante hasta 4 semanas. Se tomaron muestras de cada formulación en los tiempos de medición de 0 semanas, 1 semana, 2 semanas y 4 semanas y se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de intercambio catiónico (CEX). SEC se usa ampliamente para detectar agregados de anticuerpos (es decir, especies de alto peso molecular o HMWS), monómeros y fragmentos (es decir, especies de bajo peso

molecular o LMWS). La cromatografía de intercambio catiónico (CEX) es una herramienta bien conocida y ampliamente usada para detectar sucesos de degradación de proteínas tales como la desamidación u oxidación (Moorhouse et al. (1997) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16, 593-603). Los productos de degradación se denominan típicamente especies ácidas o básicas en comparación con las especies principales. Las especies ácidas son variantes con *pI* aparente más bajo y las especies básicas son variantes con *pI* aparente más alto. Las especies ácidas son las variantes que eluyen antes que el pico principal en CEX, mientras que las especies básicas son las variantes que eluyen más tarde que el pico principal en CEX. Los resultados de los análisis de SEC y CEX de las muestras tomadas de formulaciones almacenadas en condiciones aceleradas se proporcionan en la Tabla 13 a continuación:

10 Tabla 13

Concentración de la muestra (mg/ml)	Tiempo de medición	Ensayo de estabilidad a 37°C					
		SEC			CEX(%)		
		% HMWS	% Monómero	% LMWS	Picos especies ácidas	Picos principales	Picos especies básicas
25	0 semanas	0,9	99,1	0	13	42,6	44,4
	1 semana	1,2	97,9	0,8	14,6	41	44,4
	2 semanas	1,4	97,7	1	16,9	39,7	43,4
	4 semanas	1,6	97,1	1,3	25	33,8	41,3
20	0 semanas	0,8	99,2	0	13	42,6	44,4
	1 semana	1,2	98	0,8	14,9	40,6	44,5
	2 semanas	1,3	97,7	1	17,1	39,8	43,2
	4 semanas	1,4	97,2	1,3	24,9	34	41,1
15	0 semanas	0,9	99,1	0	13	42,6	44,4
	1 semana	1,1	98	0,9	14,9	40,5	44,6
	2 semanas	1,2	97,7	1,1	17,5	38,7	43,8
	4 semanas	1,3	97,3	1,4	25,1	33,1	41,9
10	0 semanas	0,9	99,1	0	13	42,6	44,4
	1 semana	1,1	98	1	16	39,9	44
	2 semanas	1,3	97,6	1,1	21,6	38,1	40,4
	4 semanas	1,6	96,9	1,5	27,6	33,2	39,2
5	0 semanas	0,9	99,1	0	13	42,6	44,4
	1 semana	1	98	1	15,1	41,2	43,7
	2 semanas	1,2	97,6	1,2	17,3	39,9	42,8
	4 semanas	1,2	97,4	1,5	25,3	34	40,7

Los ejemplos anteriores se ofrecen solo con fines ilustrativos.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende:
 - (a) una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YNTPFTSRF (SEQ ID NO: 5); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27);
 - (b) una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27);
 - (c) una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YATEFTSRF (SEQ ID NO: 7); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27);
 - (d) una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 1); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YDDKFTSRF (SEQ ID NO: 6); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IGTNIH (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 21); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27);
 - (e) una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos TYGVH (SEQ ID NO: 3); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos IRTNIH (SEQ ID NO: 16); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYGSESES (SEQ ID NO: 22); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27); o
 - (f) una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos TYGVH (SEQ ID NO: 3); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos YGNEFTSRF (SEQ ID NO: 8); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDYEFA (SEQ ID NO: 11); y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos ISTNIH (SEQ ID NO: 19); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos KYGSESES (SEQ ID NO: 22); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos NWPTS (SEQ ID NO: 27).
2. El anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una secuencia Fc de una IgG humana.
3. El fragmento de unión al antígeno del anticuerpo anti-EGFR de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en un Fab, Fab', un F(ab)'2, un Fv monocatenario (scFv), un fragmento Fv, un diacuerpo, y un anticuerpo lineal.
4. El anticuerpo anti-EGFR de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo afucosilado.
- 55 6. El anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 conjugado con un agente terapéutico, o un marcador, en donde opcionalmente el marcador se

selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un colorante fluorescente y una enzima.

7. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

8. Un vector de expresión que codifica la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.

5 9. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 8.

10. Un método de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula de la reivindicación 9 y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

11. Una composición que comprende el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 12. Un método de detección de una proteína EGFR en una muestra de un paciente poniendo en contacto el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 con la muestra y detectar el anticuerpo anti-EGFR unido a la proteína EGFR, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-EGFR o fragmento de unión al antígeno del mismo se usa en un ensayo inmunohistoquímico (IHC) o en un ensayo ELISA.

15 13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición de la reivindicación 11, para usar en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o composición al sujeto,

en donde opcionalmente el cáncer se selecciona de cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de cabeza y cuello.

20 14. El anticuerpo o composición para usar en el método de la reivindicación 13, en donde se administra además al sujeto:

(a) un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento y un agente citotóxico; o

(b) terapia de radiación.

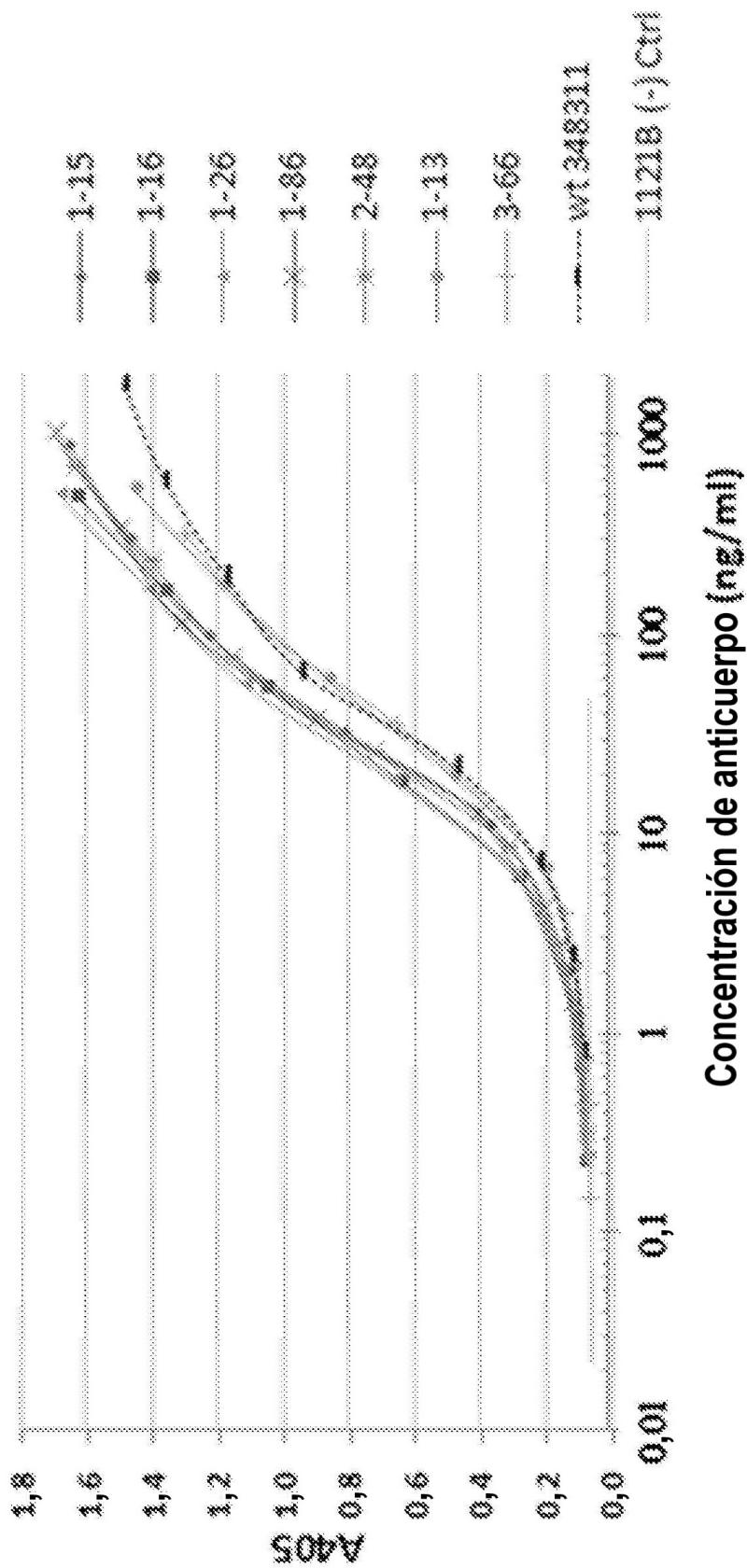
Fig. 1

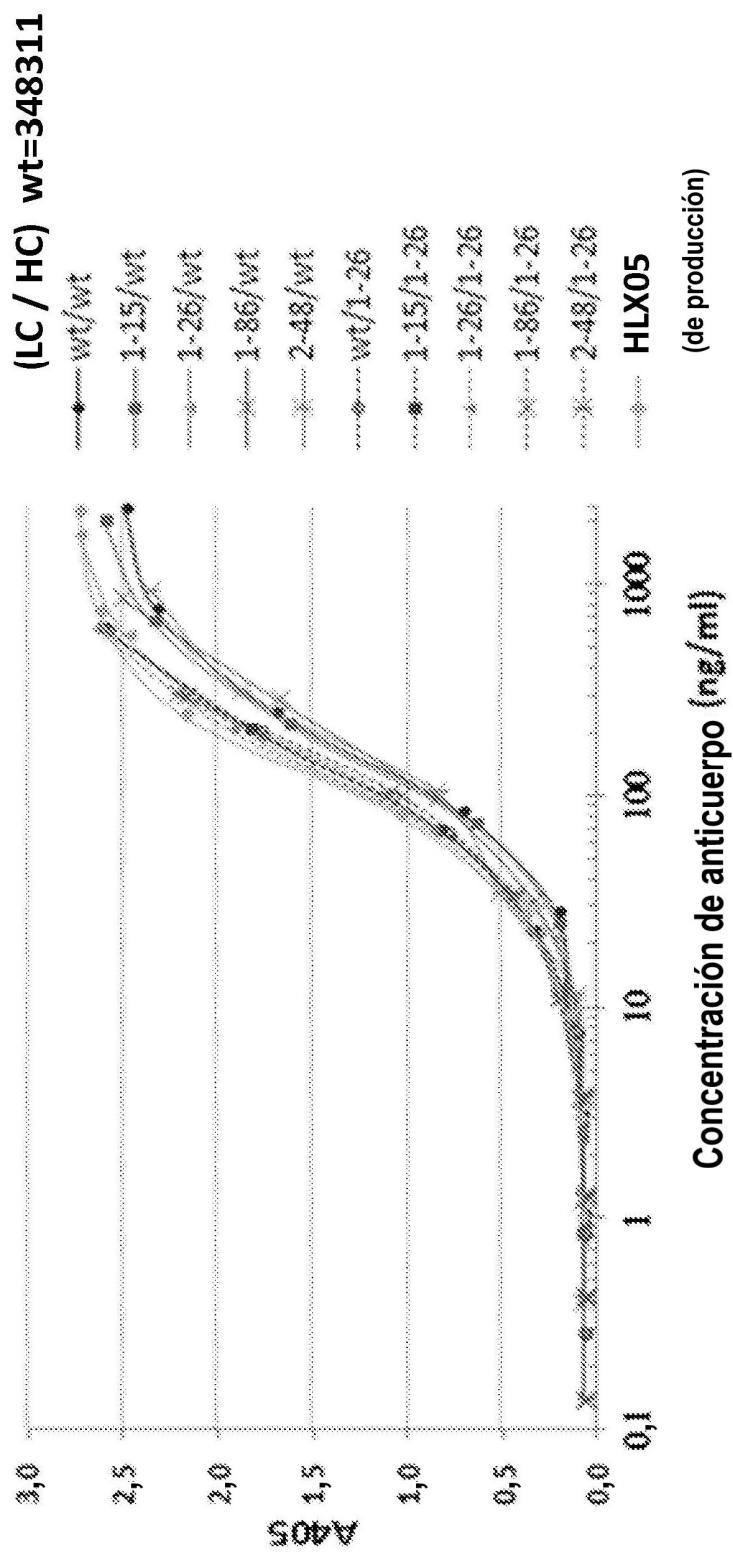
Fig. 2

Fig. 3

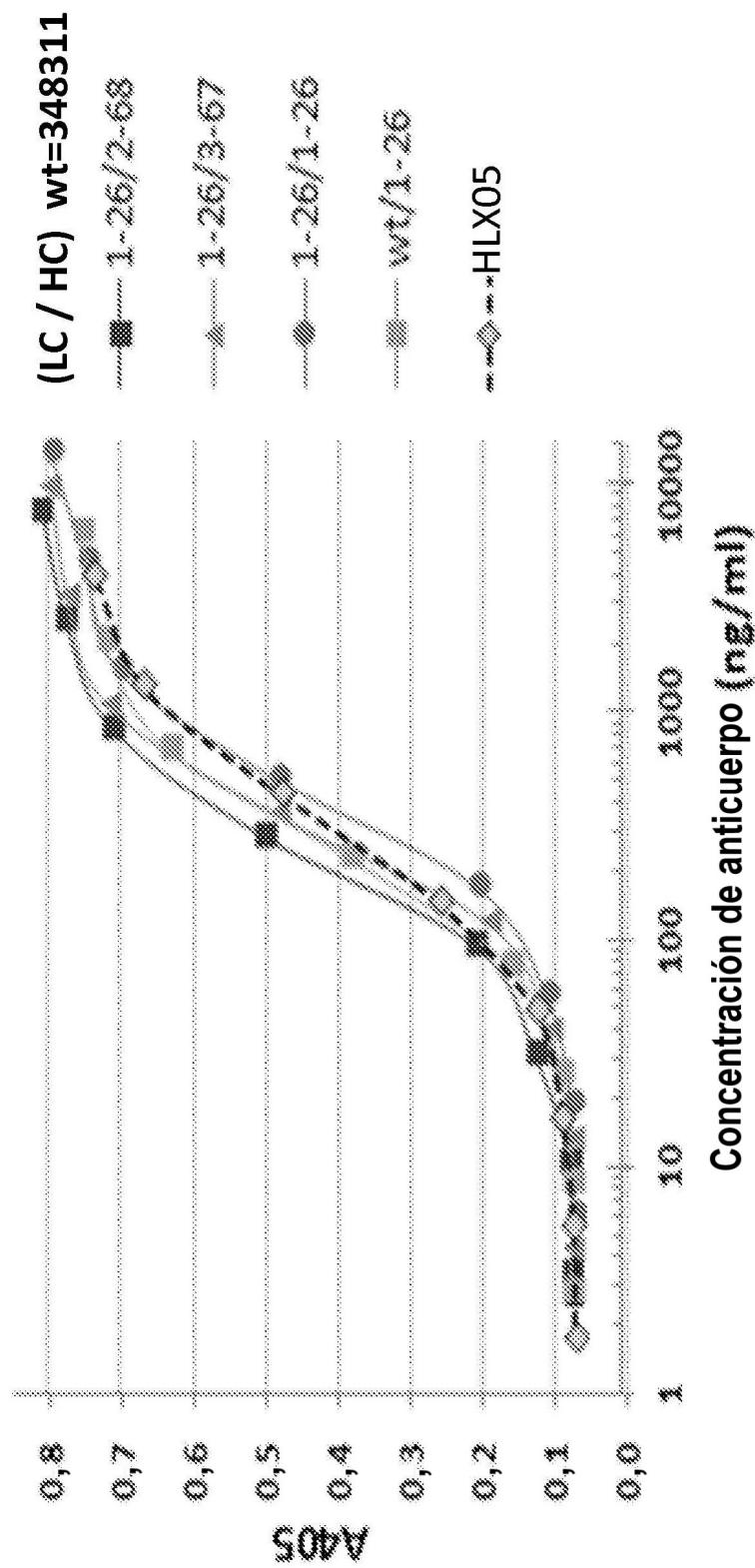


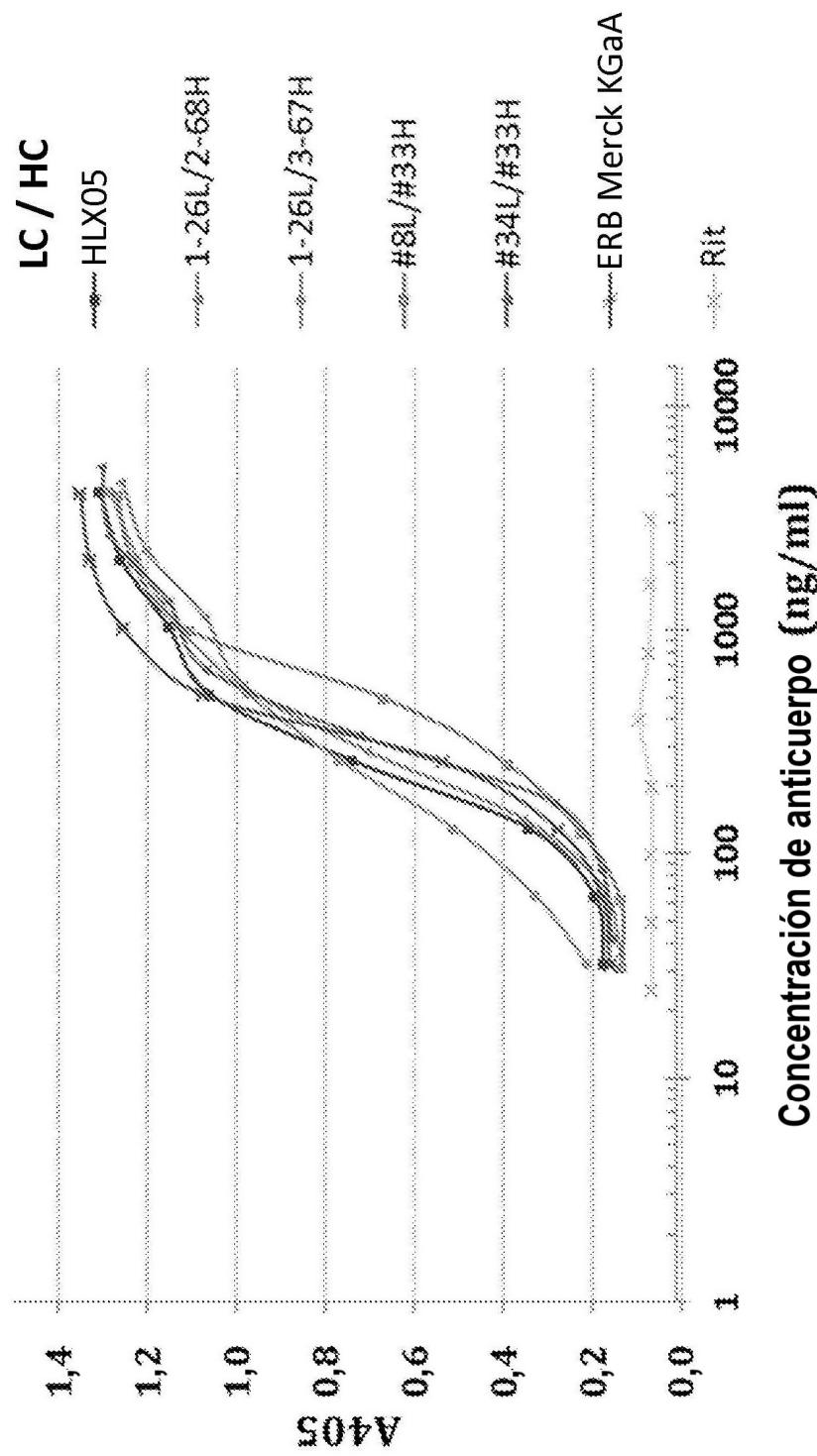
Fig. 4

Fig. 5

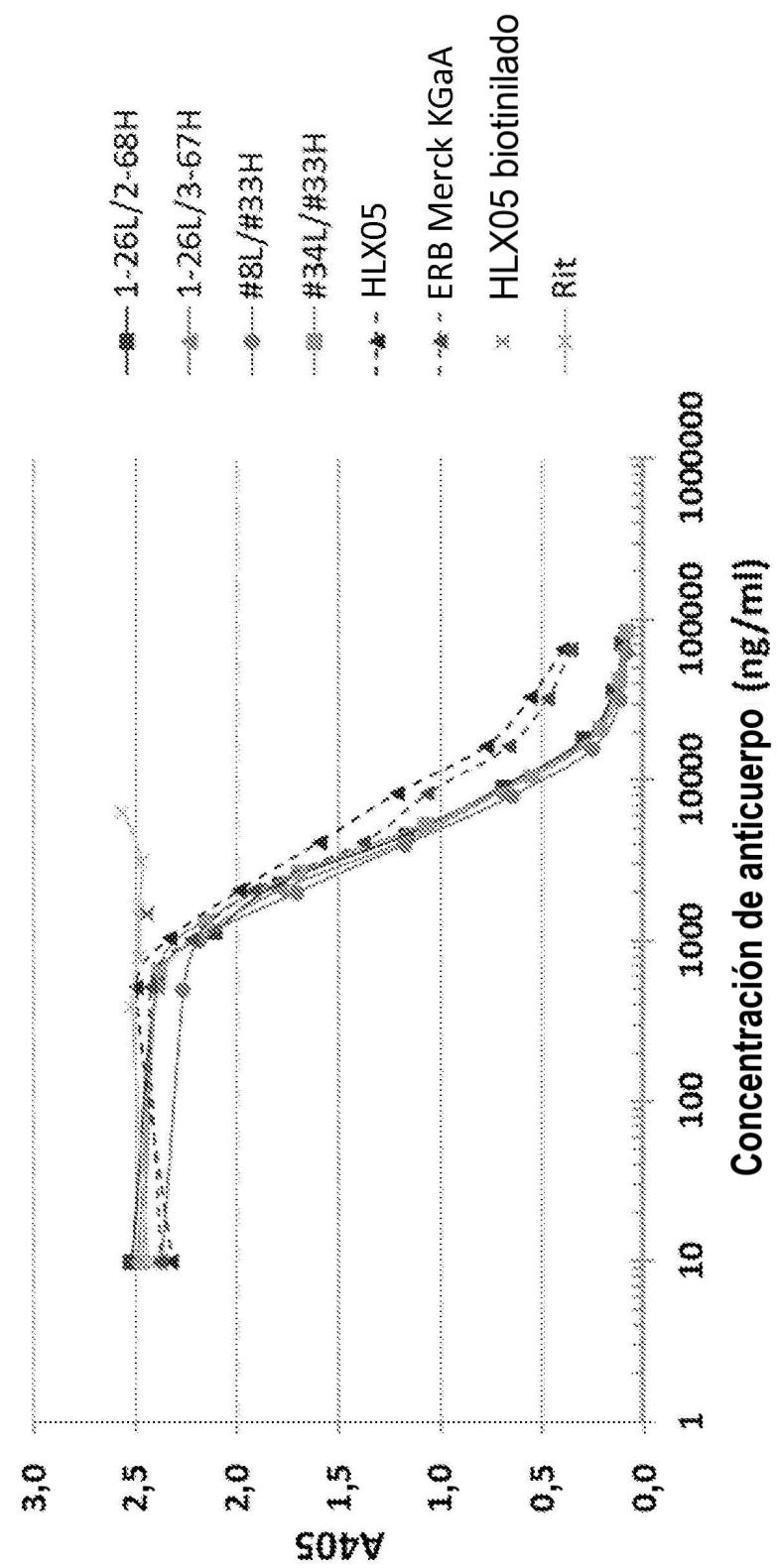


Fig. 6A

(IgG entera)

Análisis de HPLC 2-AB marcado con glicanos					
Área %	G0	G0F	G1F	G2F	
ERBITUX KGaA	1,6	51,1	39,5	7,8	
HLX05	2,5	61,2	32,4	3,8	
1-26/2-68	1,8	73,9	22,6	1,7	
1-26/3-67	3,2	78,4	17,2	1,2	
8/33	2,0	70,2	25,8	2,0	
34/33	1,3	56,0	37,4	5,3	

Fig. 6B

**(130619) Deducción de glicanos en Fab/Fc
(Separación Fab y Fc)**

Muestra	Fragmento	Perfil de glicanos
Erbixux (Merk) KGaA	Fc	GOF G1F G2F {trace}
	Fab	G2F+2*Gal G2F+Gal+SA{Neu5C}
HLX05	Fc	GOF G1F G2F {trace}
	Fab	G2F G2F+SA{Neu5C} G2F+2 * SA{Neu5C}
1-26/3-67	Fc	GOF G1F
	Fab

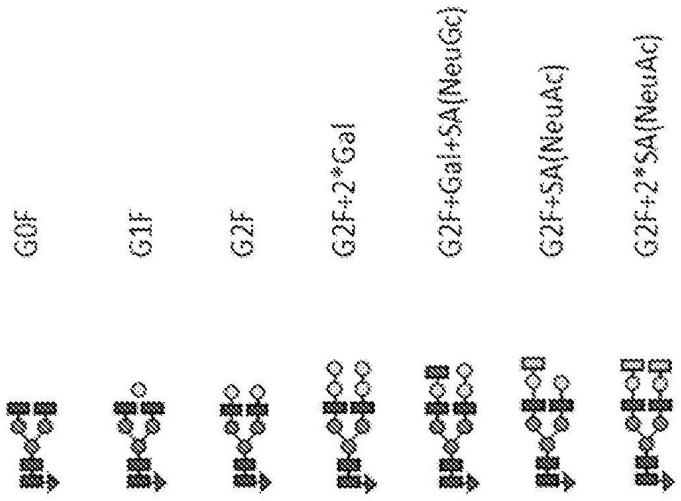


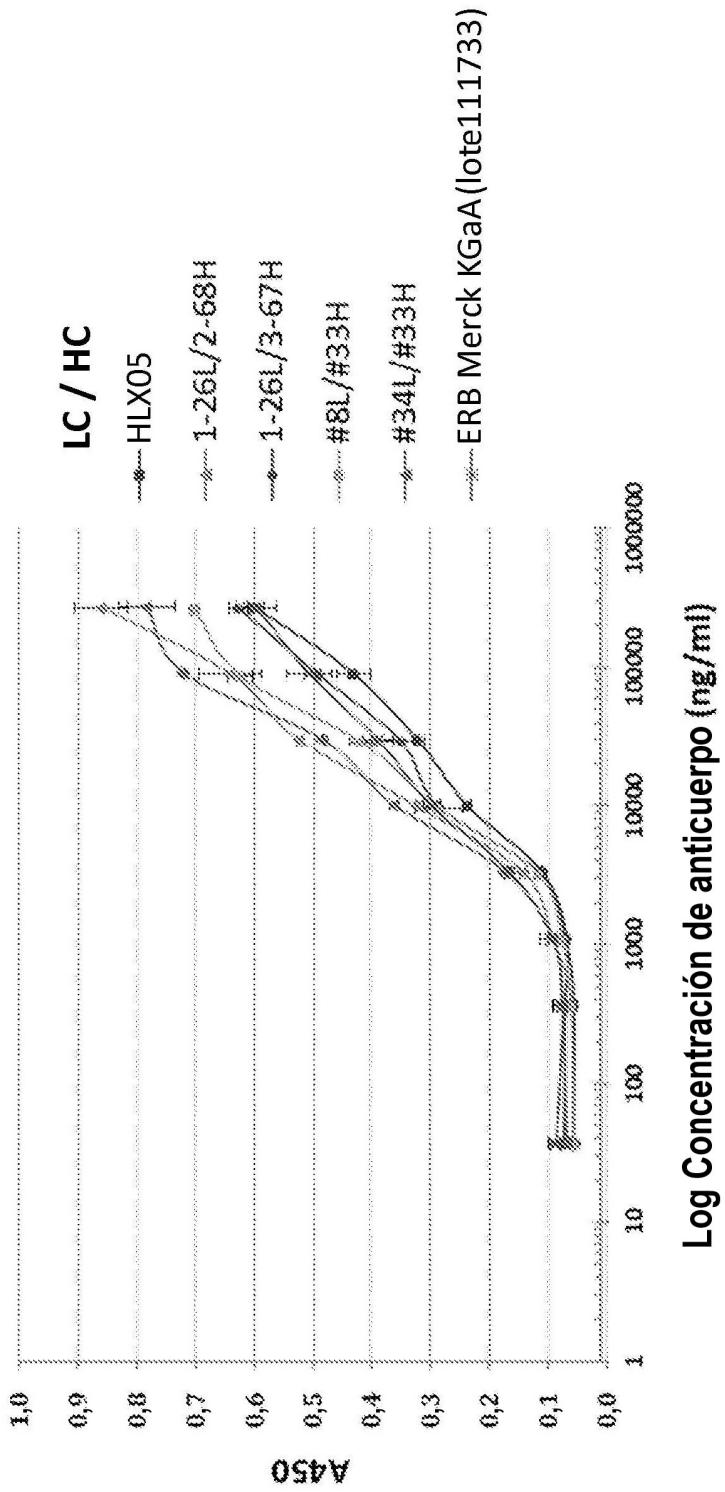
Fig. 7

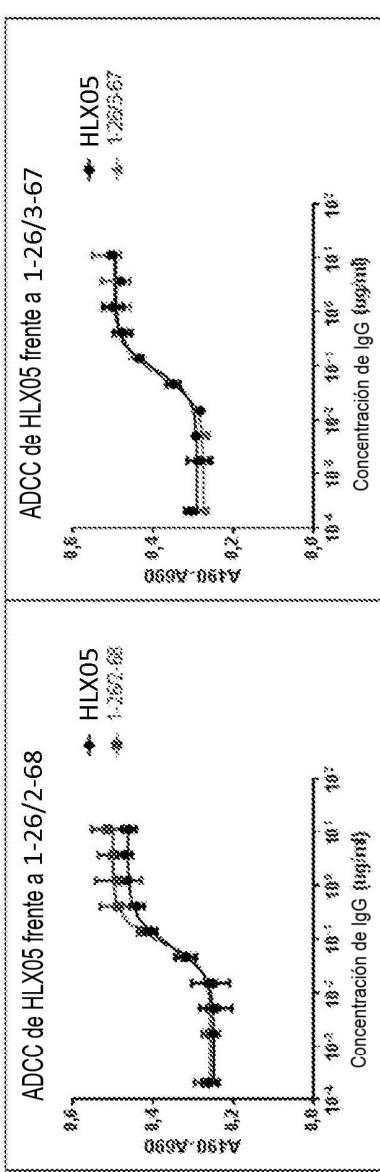
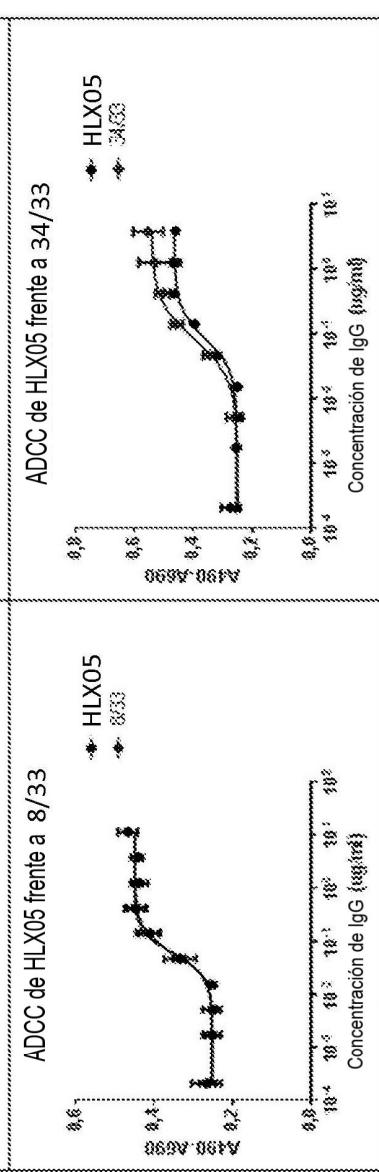
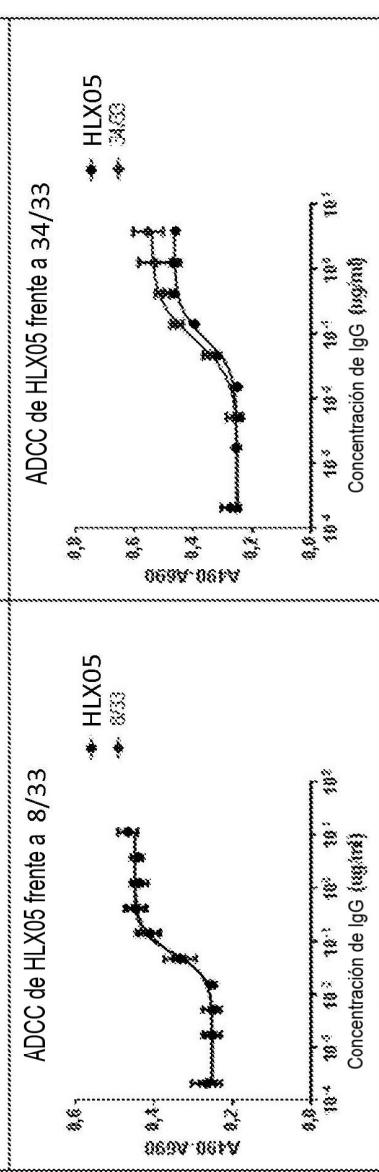
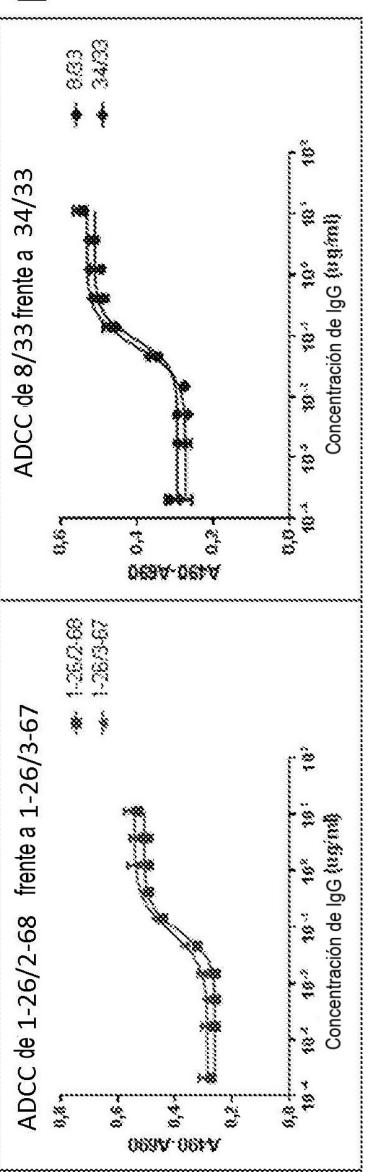
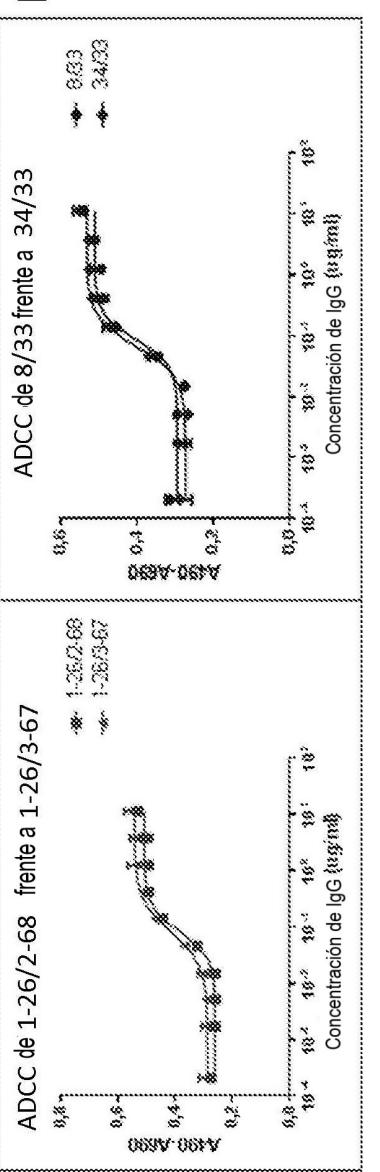
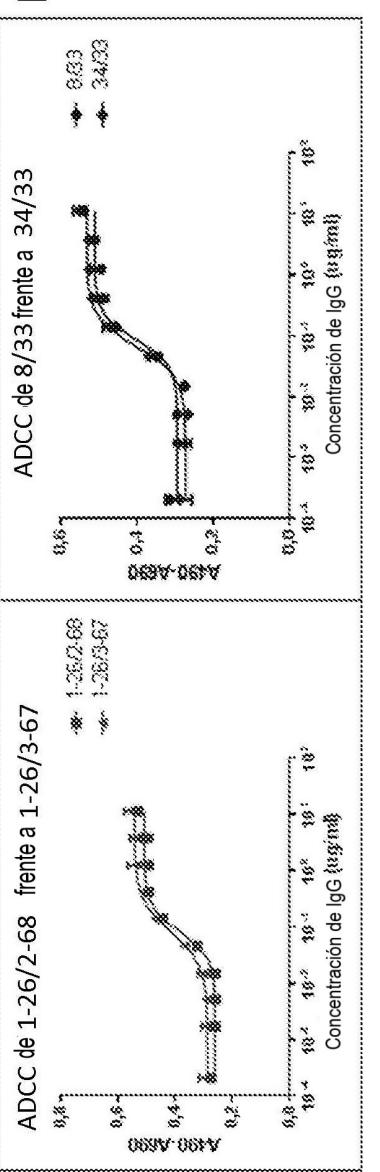
Fig. 8**Fig. 8A****Fig. 8B****Fig. 8D****Fig. 8C****Fig. 8E****Fig. 8F**

Fig. 8G

(ng/ml)	ADCC (PBMC 400K/pocillo)		ADCC (PBMC 600K/pocillo)	
	CE50 media	% de Actividad	CE50 media	% de Actividad
HLX05	99,7	100	80,6	100
1-26/2-68	118,7	84	84,7	95
1-26/3-67	110,2	90	74,2	109
8/33	91,4	109	87,0	93
34/33	80,3	124	72,9	111

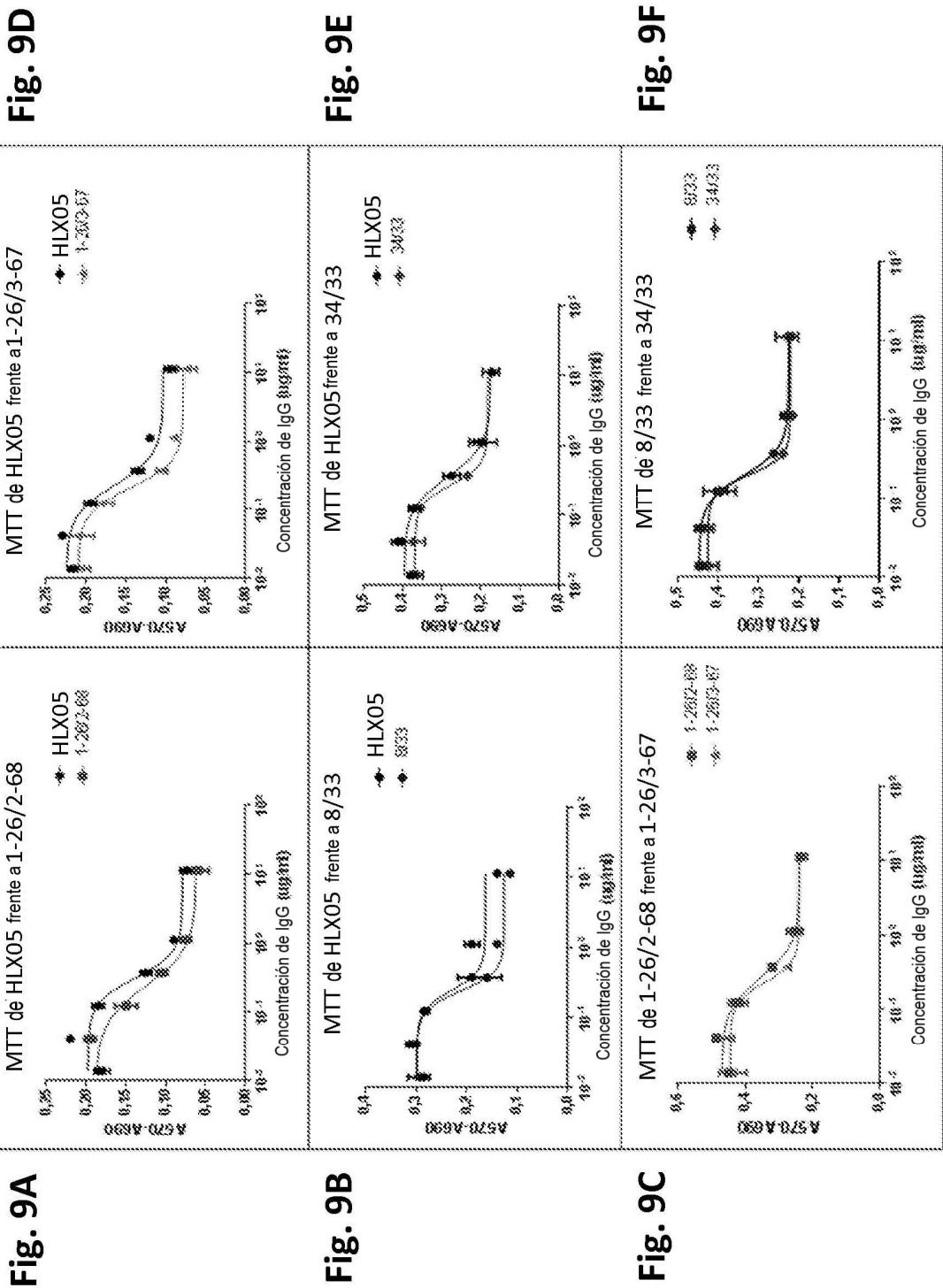
Fig. 9

Fig. 9G

	MTT (ng/ml)	C150 media	% de Actividad
HLX05	285,9	100	
1-26/2-68	254,5	112	
1-26/3-67	220,2	130	
8/33	217,2	132	
34/33	236,2	121	

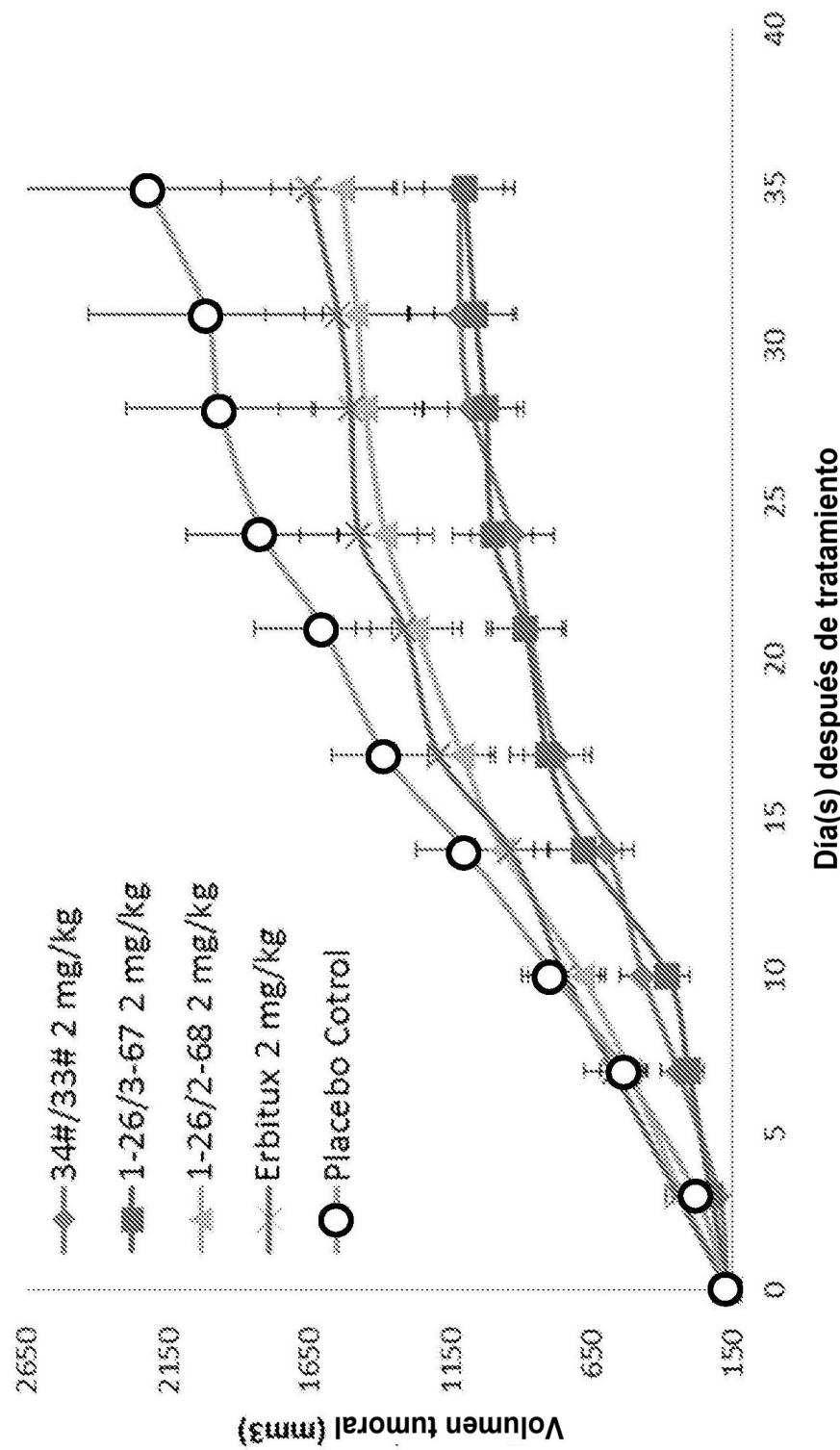
Fig. 10

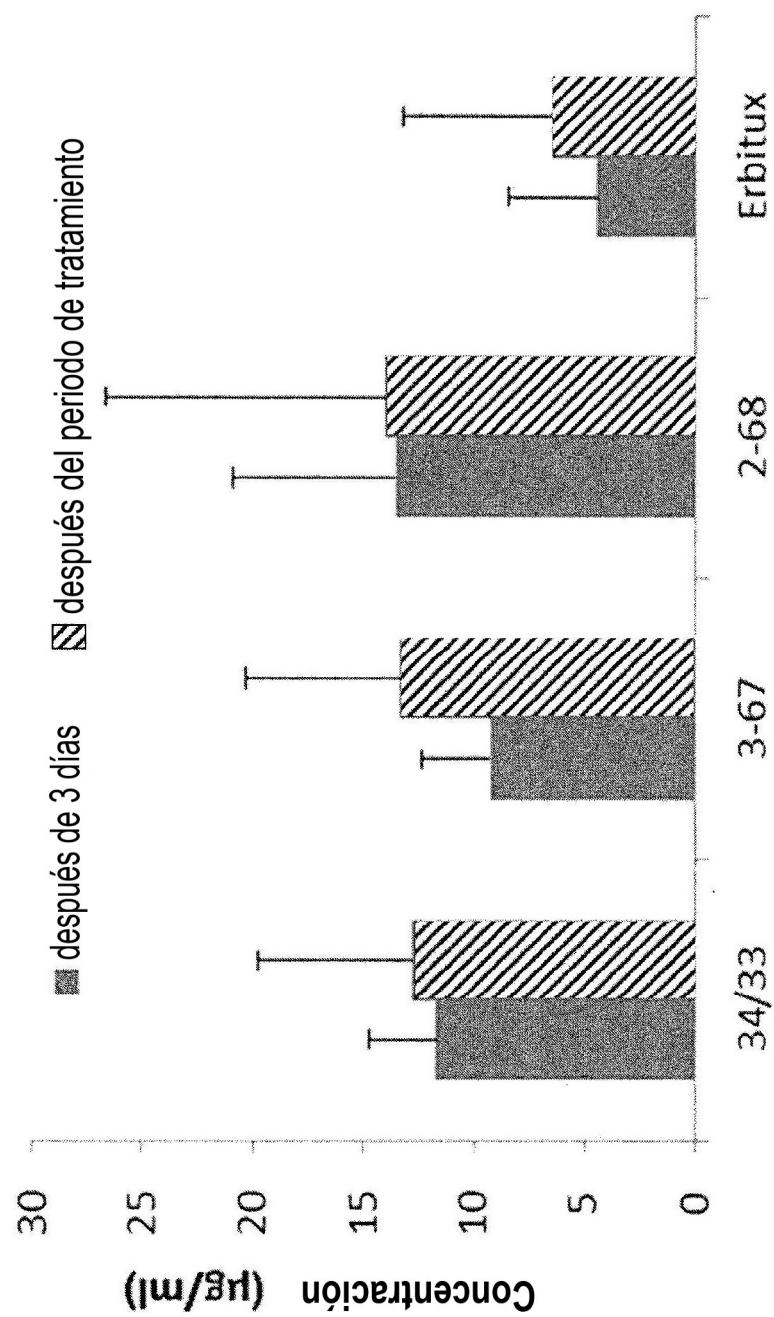
Fig. 11

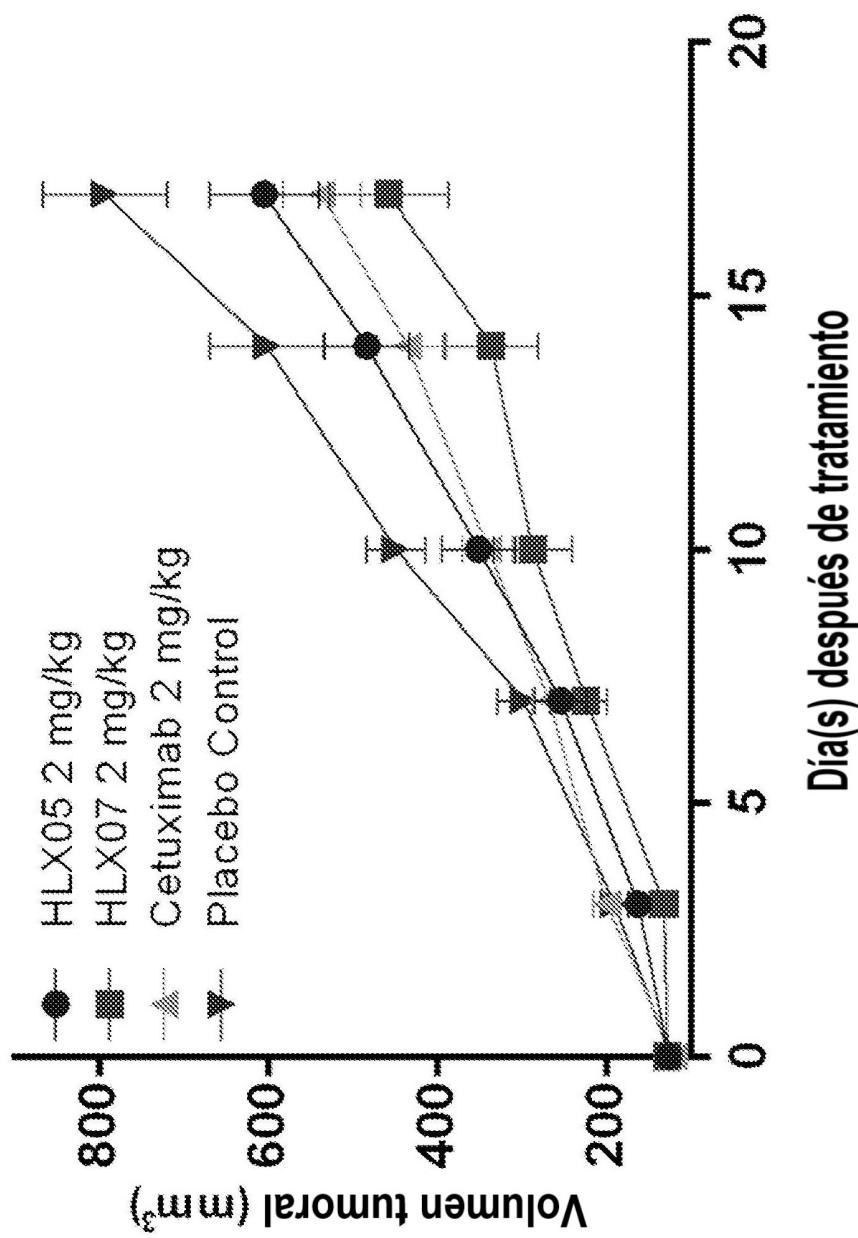
Fig. 12

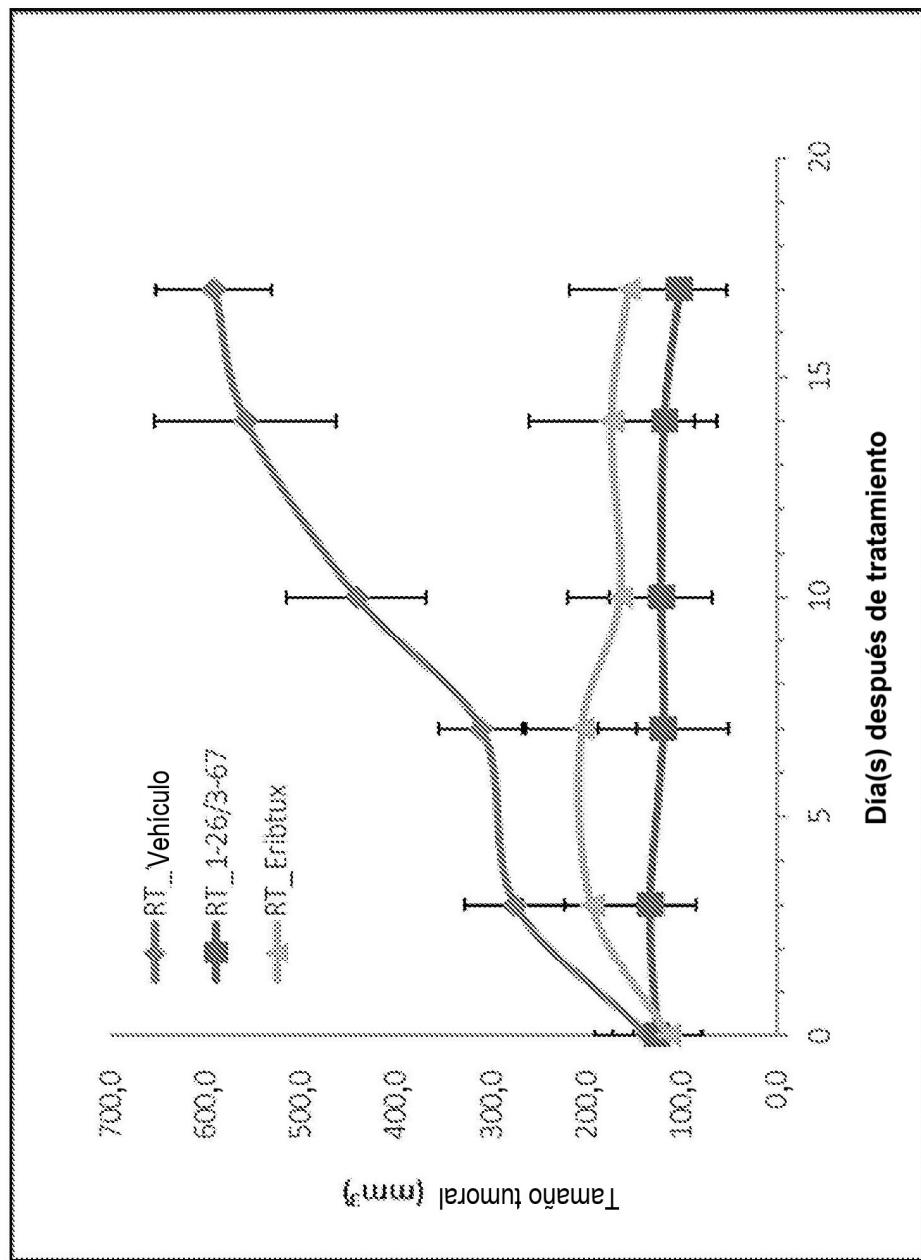
Fig. 13

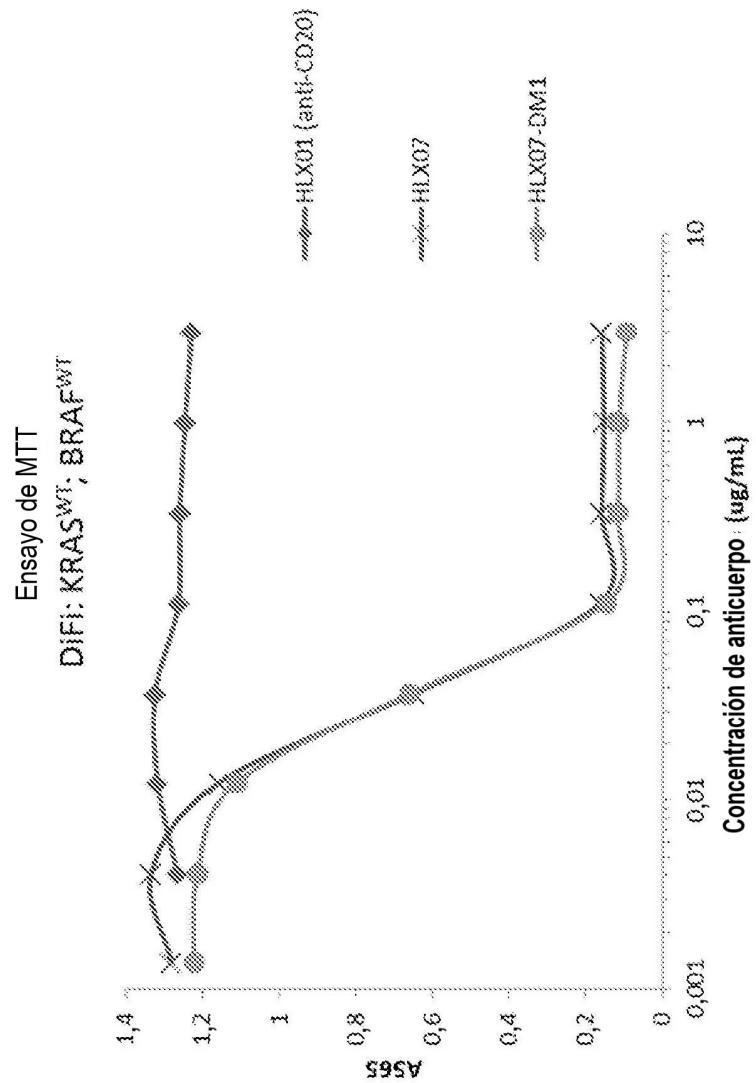
Fig. 14A

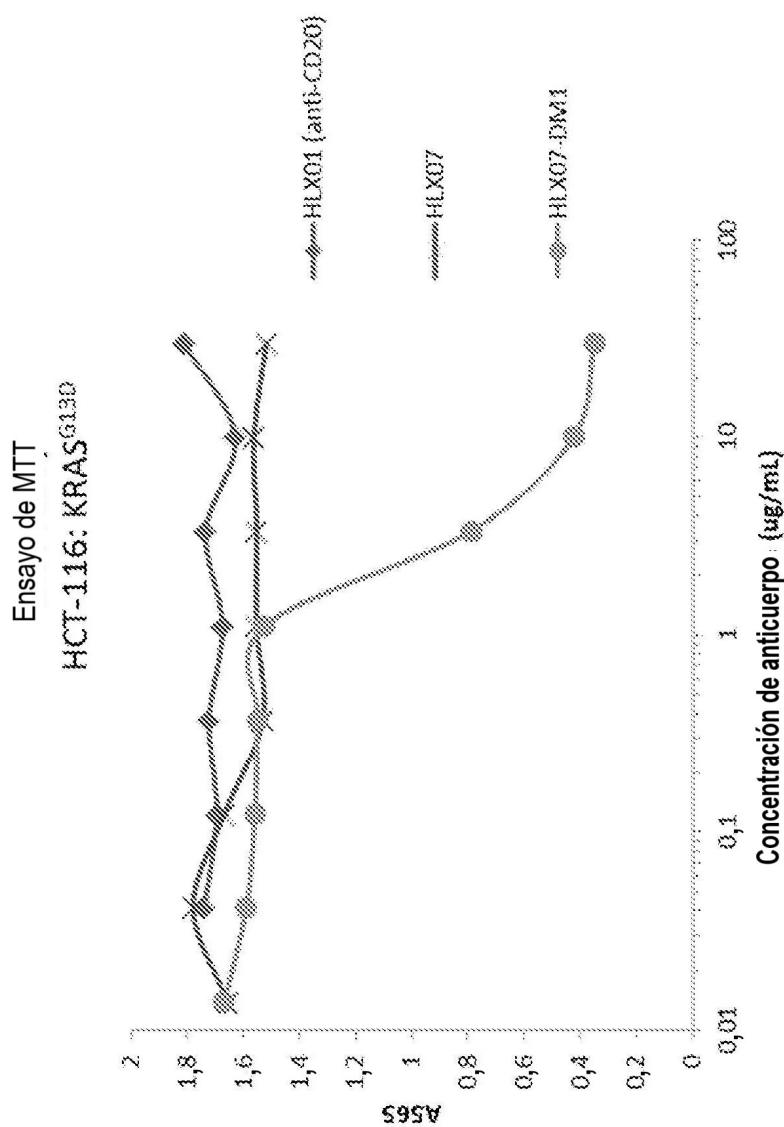
Fig. 14B

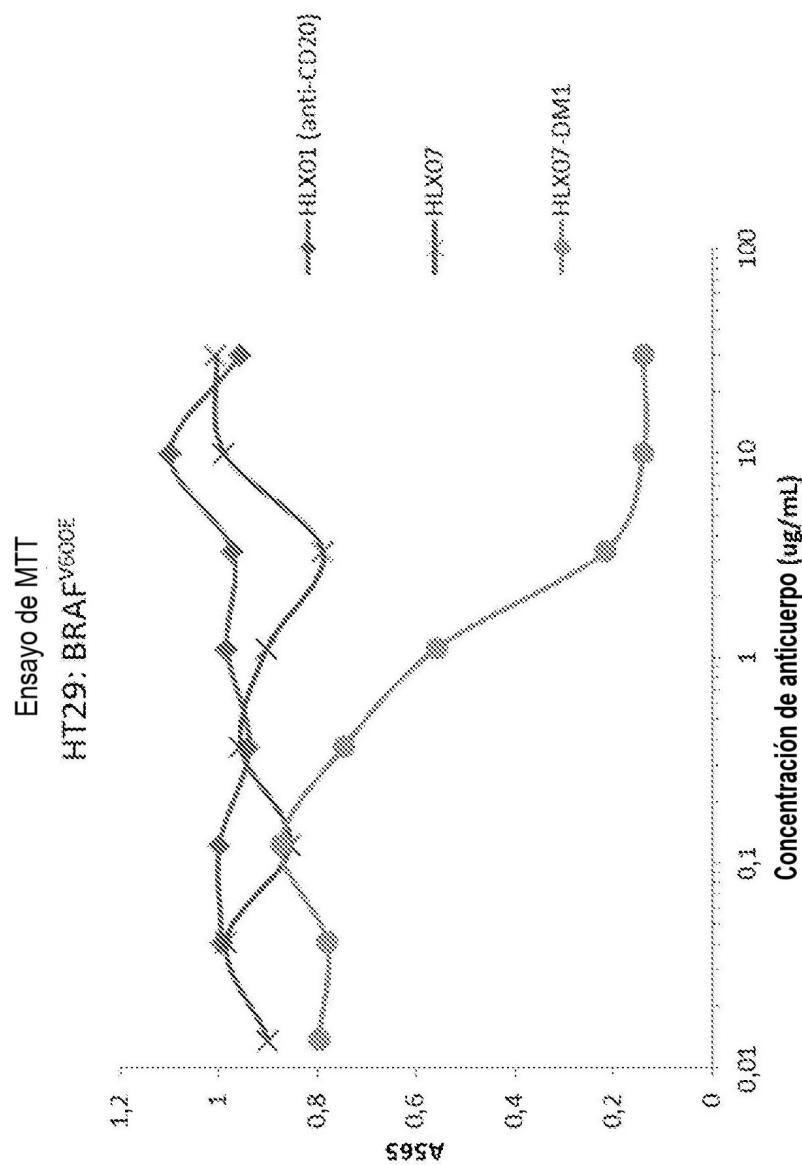
Fig. 14C

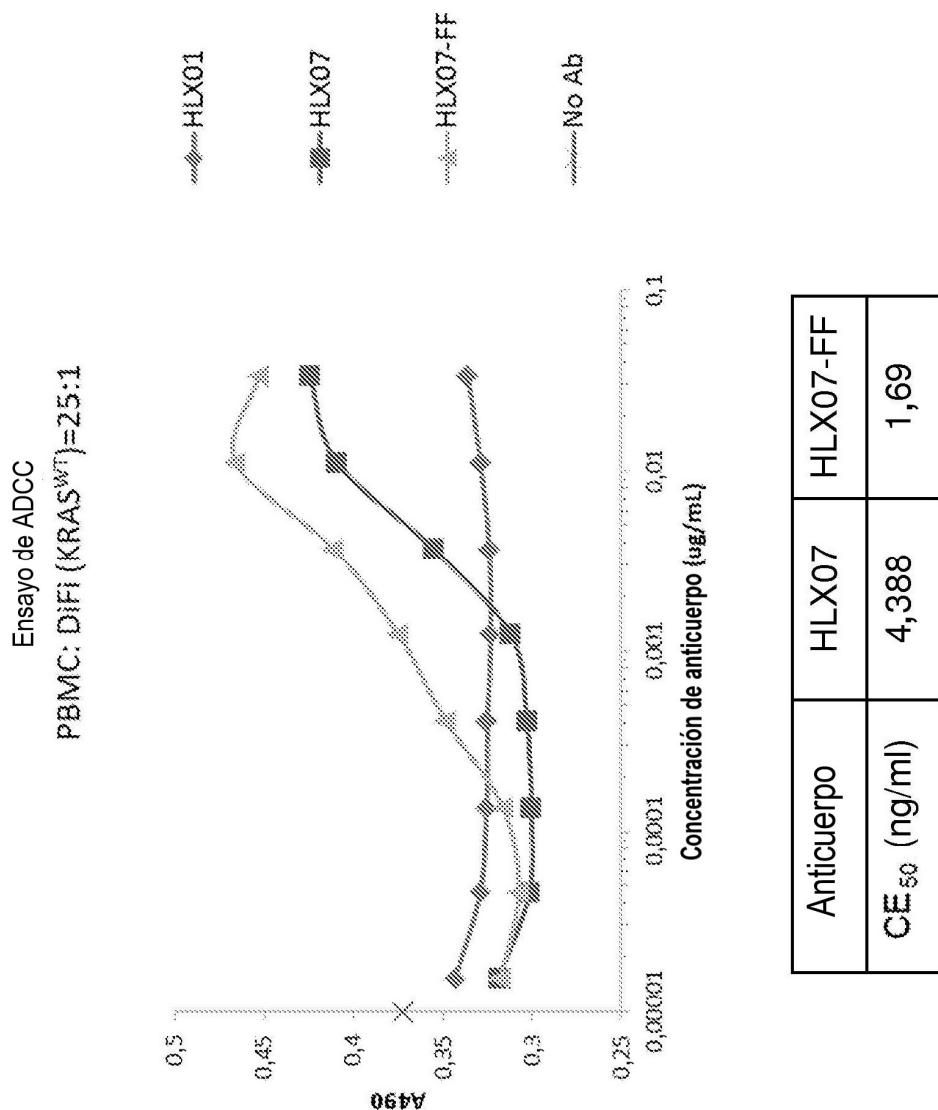
Fig. 15A

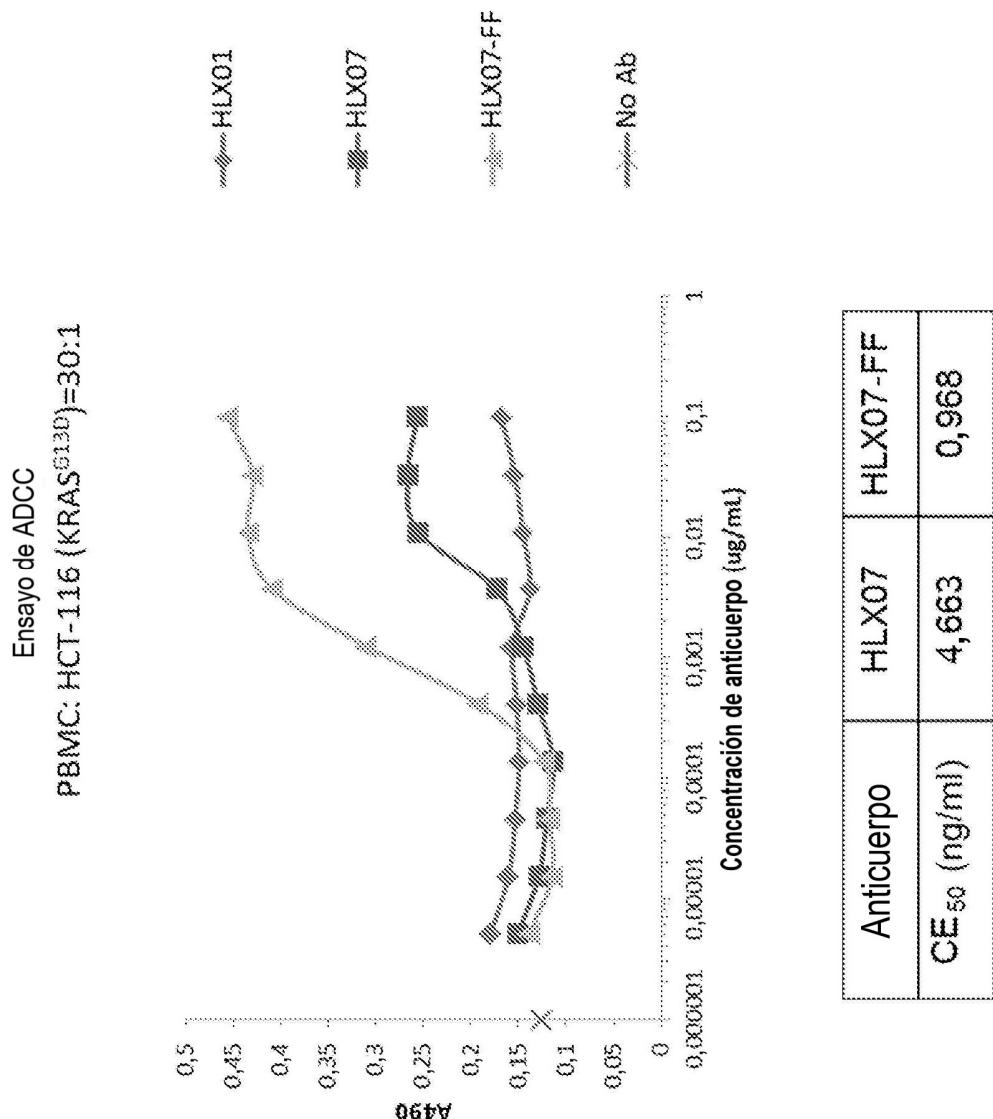
Fig. 15B

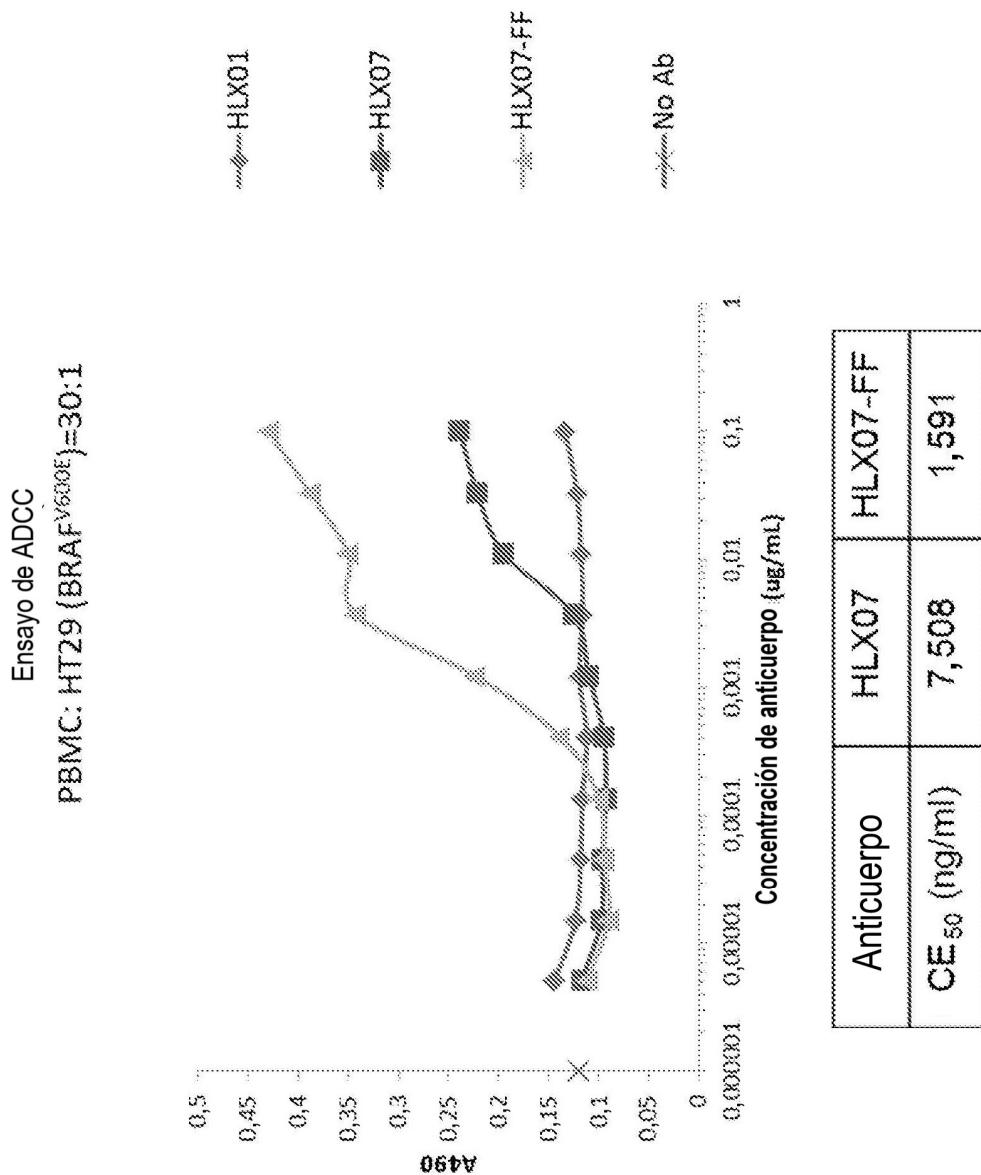
Fig. 15C

Fig. 16A

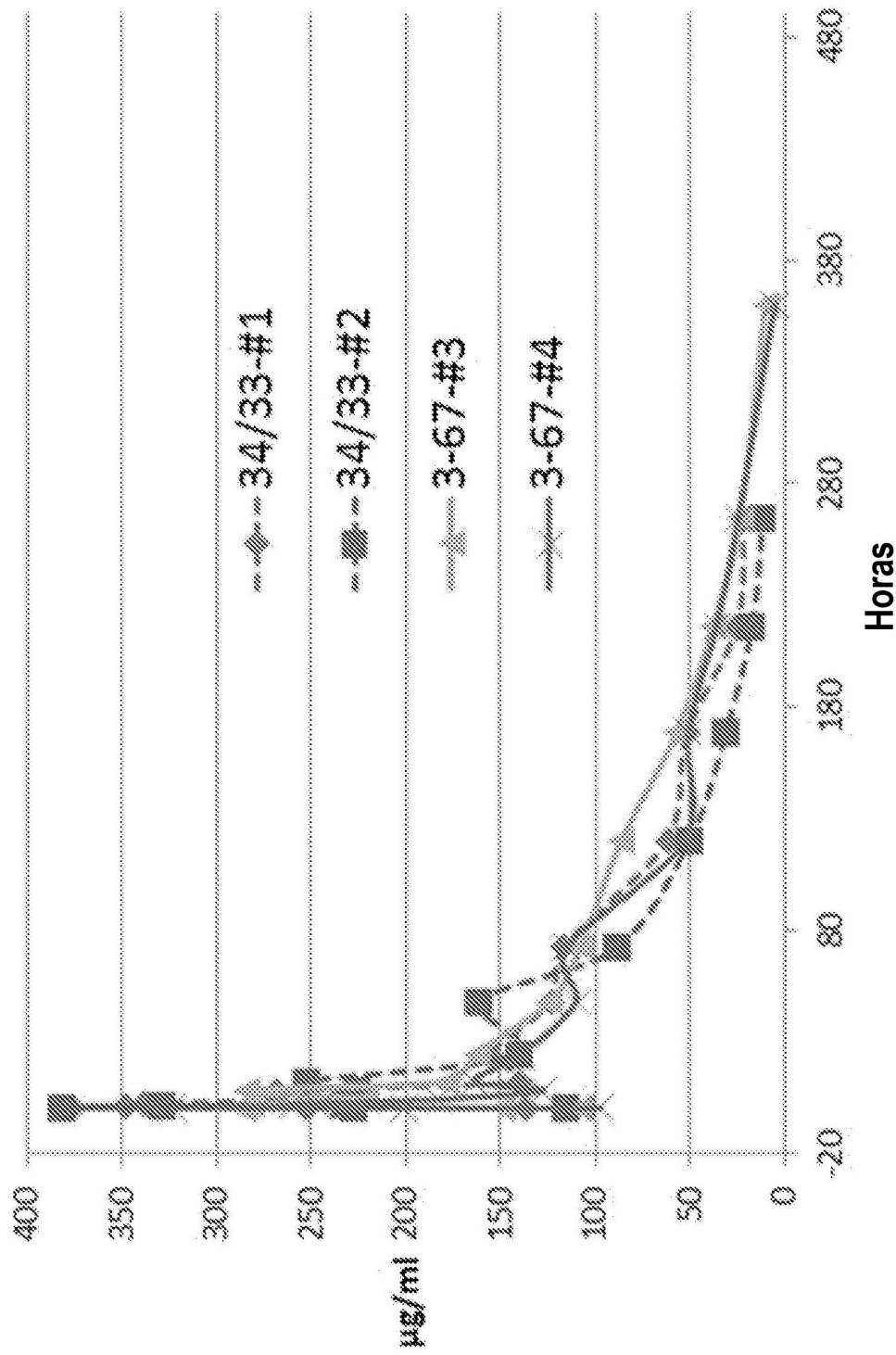


Fig. 16B

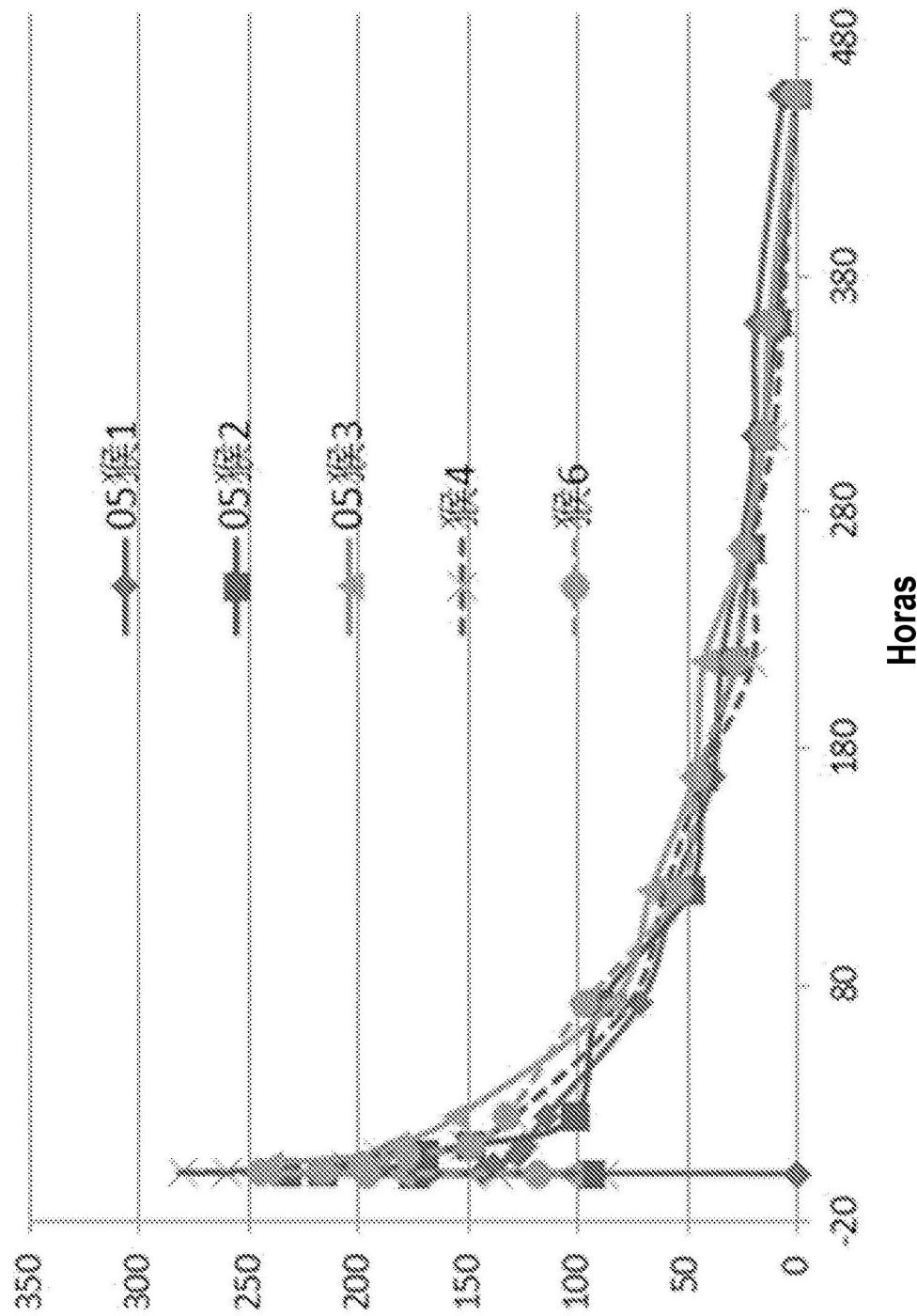


Fig. 17