

ANTICUERPOS DE AFINIDAD INCREMENTADA POR EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y SUS FRAGMENTOS DERIVADOS

CAMPO DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se relaciona con las ramas de la Biotecnología y la Medicina, particularmente con variantes del anticuerpo monoclonal (AcM) nimotuzumab y fragmentos de unión al antígeno derivados de este que tienen mutaciones en los CDR1 y CDR2 de la región variable de la cadena pesada y que reconocen la región extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano con mayor afinidad, así como su aplicación diagnóstica y terapéutica.

ANTECEDENTES

- El EGFR es una glicoproteína transmembrana, que presenta una región extracelular de unión al ligando, y una región intracelular con actividad tirosina cinasa. Entre sus ligandos se encuentran: el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *epidermal growth factor*), la anfirregulina, el factor de crecimiento transformante, la betacelulina, la epirregulina, y el factor de crecimiento similar a EGF con sitio de unión a heparina (Olayioye, M. y otros, The EMBO Journal. 19: 3159-3167, 2000; Yarden, Y. y Slwkowski, M., Nature Reviews. 2: 127-137, 2001). La unión de los ligandos al receptor induce cambios conformacionales y arreglos en la región extracelular del receptor que provocan la dimerización y activación del mismo (Ogiso, H. y otros, Cell. 110: 775-787, 2002). Este receptor está involucrado en diferentes procesos celulares que contribuyen al mantenimiento y supervivencia de las células epiteliales. Sin embargo, la desregulación de la vía EGFR/EGF por sobreexpresión o activación constitutiva promueve la proliferación de células tumorales, la invasión, y está asociada con mal pronóstico en muchas malignidades (Yarden, Y. y Slwkowski, M., Nature Reviews. 2: 127-137, 2001). Por tal motivo el EGFR es considerado como un antígeno (Ag) tumor-asociado muy importante para el desarrollo de terapias antitumorales.

- Actualmente existen en el mercado tres AcMs específicos por el EGFR: el cetuximab (Erbix), el panitumumab (Vectibix), y el nimotuzumab (TheraCIM) (Reichert, J., mAbs.4: 413-415, 2012) y otros siete se encuentran en fase de ensayos clínicos I-III (Reichert, J. y Dhimolea, E., Drug Discovery Today. 17: 954-963, 2012). Los mismos fueron específicamente diseñados para reconocer la región extracelular del EGFR, inhibir competitivamente la unión de los ligandos y la dimerización del receptor, lo que

inhibiría la auto-fosforilación y la cascada de señalización que conlleva a la activación del receptor (Burgess, A. y otros, Molecular Cell, 12: 541–552, 2003).

El nimotuzumab (AcM R3) es un AcM humanizado de isotipo IgG1 que reconoce al EGFR humano, se obtuvo mediante el clonaje del ADN de las regiones hipervariables del AcM de ratón *ior egf/r3* y los marcos de las regiones variables y de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de origen humano (REI y NEWN, respectivamente) (Mateo, C. y otros, Immunotechnology. 3: 71-81, 1997). El AcM R3 reconoce al EGFR con similar afinidad y presenta la misma capacidad de inhibir la unión del EGF al receptor que su predecesor de ratón. Esta variante es menos inmunogénica que la versión quimérica del AcM *ior egf/r3* (Mateo, C. y otros, Immunotechnology. 3: 71-81, 1997). El nimotuzumab reconoce un epítipo en el dominio III de la región extracelular del EGFR que se solapa con el sitio de unión de los ligandos en este dominio, lo que explica su capacidad de bloquear la unión de los ligandos y posterior activación del receptor (Tundidor, Y. y otros, mAbs. 6: 1013-1025, 2014). La eficacia del nimotuzumab se ha demostrado en ensayos clínicos, en pacientes con tumor de cabeza y cuello (Crombet, T. y otros, J Clin Oncol 22: 1646-1654, 2004), glioma (Ramos, T. y otros. Cancer Biol Ther. 5: 375-379, 2006; MacDonald, T. y otros, Neuro Oncol. 13: 1049-1058, 2011) y tumor de esófago (Ramos-Suzarte, M. y otros, Cancer Biology & Therapy 13: 600-605, 2012). Este anticuerpo (Ac) se encuentra en ensayos clínicos fase III para cáncer nasofaríngeo, cáncer de esófago localmente avanzado y carcinoma de esófago de células escamosas (Galluzzi, L. y otros, OncoImmunology. 1: 28-37, 2012). A diferencia de otros Acs dirigidos contra el EGFR, tanto en estudios de preclínica en monos verdes *Cercopithecus aethiops sabaeus* (Arteaga, M. y otros, Cancer Biology & Therapy. 6: 1390-1395, 2007), como en estudios en la clínica (Crombet, T. y otros, J Clin Oncol 22:1646-1654, 2004; Ramos, T. y otros. Cancer Biol Ther. 5: 375-379, 2006; Ramos-Suzarte, M. y otros, Cancer Biology & Therapy 13: 600-605, 2012; Strumberg, D. y otros, Invest New Drugs. 30: 1138-1143, 2010), el nimotuzumab no ha mostrado los signos de toxicidad severos usualmente asociados a las drogas dirigidas contra este Ag. Estas evidencias lo hacen el único de los agentes anti-EGFR que puede ser usado de manera crónica (Allan, D., The Oncologist. 10: 760-761, 2005). El bajo perfil de toxicidad, pero con efecto antitumoral, de este AcM pudiera deberse a su afinidad intermedia (10^{-8}) (Crombet, T. y otros, J Clin Oncol 22: 1646-1654, 2004). Los autores predicen que los AcMs con afinidad intermedia deben tener alto efecto antitumoral y baja toxicidad al favorecerse la unión del Ac por el tejido tumoral (alta expresión del EGFR) sobre el normal (baja expresión del EGFR). Por otra parte, los AcMs de alta afinidad (como el cetuximab) serían capturados tanto por las células tumorales como por las normales; y los AcM de baja afinidad tendrían bajo efecto por la baja incorporación en los tumores

(Crombet, T. y otros, J Clin Oncol 22: 1646-1654, 2004). Sin embargo, se ha descrito que el efecto antitumoral del nimotuzumab depende de la expresión del EGFR, pues en tumores con mediana o baja expresión del receptor disminuye su eficacia (Akashi, Y. y otros, British Journal of Cancer. 98: 749–755, 2008). Por lo que la obtención de una variante del mismo con un aumento moderado de su afinidad por el receptor se podría traducir en un anticuerpo (Ac) con mayor efecto antitumoral y que mantuviera la baja toxicidad. La obtención de esta variante de afinidad intermedia a partir del nimotuzumab, manteniendo su especificidad epitópica fina (que es única entre los Acs terapéuticos contra el EGFR), (Tundidor, Y. y otros, mAbs. 6: 1013-1025, 2014), contribuiría a que las propiedades valiosas del anticuerpo original se conserven.

La maduración de la afinidad de los Acs es un proceso que ocurre de forma natural; y con el desarrollo de la biología combinatoria se ha logrado reproducir este fenómeno en el laboratorio. Estas tecnologías de evolución dirigida requieren de diferentes pasos: mutación, presentación, selección y amplificación (Wark, K. y Hudson, P., Advanced Drug Delivery Reviews. 58: 657– 670, 2006). La tecnología de presentación sobre fagos proporciona una potente plataforma para la generación de nuevos Acs humanos y para mejorar su afinidad *in vitro* (Hoogenboom, H., Nat Biotechnol. 23: 1105–1116, 2005).

Los inventores de la presente invención encontraron variantes mutadas del nimotuzumab presentadas sobre fagos, con un incremento en su capacidad de unión a la región extracelular del EGFR humano. El conjunto de mutaciones que poseen dichas variantes no ha sido descrito anteriormente ni es predecible a partir del análisis de la estructura cristalina del Fab del nimotuzumab. Por tanto, la novedad de esta invención consiste en proporcionar nuevos fragmentos y AcM que reconocen al EGFR humano con una mayor afinidad (entre 3 y 4 veces), por lo que pueden reconocer con mayor eficiencia el nimotuzumab, líneas con mediana expresión del EGFR. Asimismo, estos AcM presentaron una mayor capacidad de inhibir la fosforilación del EGFR mediada por el ligando comparados con el nimotuzumab, lo que indica que presentan un mayor efecto antitumoral que el nimotuzumab. Todo lo anterior permite la utilización de estos fragmentos y AcM en el diagnóstico o terapia de tumores con expresión media del EGFR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

La presente invención se relaciona con AcMs recombinantes que reconocen la región extracelular del EGFR humano Her1 y que tienen más del 95% de identidad respecto al anticuerpo nimotuzumab.

En una modalidad se refiere a AcMs donde las secuencias de la región determinante de

- 5 la complementariedad (CDR) del CDR2 de la región variable de las cadenas pesadas se seleccionan del grupo que comprende:

- SEQ ID NO. 20 y
- SEQ ID NO. 21

las secuencias del CDR1 y del CDR3 de las cadenas pesadas son las SEQ ID NO. 9 y

- 10 SEQ ID NO.3 respectivamente y las secuencias de los CDR de la región variable de las cadenas ligeras son:

- CDR 1 SEQ ID NO. 22
- CDR 2 SEQ ID NO. 23
- CDR 3 SEQ ID NO. 24.

- 15 En otra modalidad los AcMs recombinantes de la presente invención se caracterizan porque la secuencia del CDR2 de la región variable de las cadenas pesadas se selecciona del grupo que comprende:

- SEQ ID NO. 10,
- SEQ ID NO. 11,
- 20 - SEQ ID NO. 12,
- SEQ ID NO. 17,
- SEQ ID NO. 18 y
- SEQ ID NO. 29,

la secuencia del CDR1 es la SEQ ID NO. 9 y la secuencia del CDR3 es la SEQ ID NO.3

- 25 en dichas cadenas pesadas y las secuencias de los CDR de la región variable de las cadenas ligeras son:

- CDR 1 SEQ ID NO. 22
- CDR 2 SEQ ID NO. 23
- CDR 3 SEQ ID NO. 24.

- 30 Otra modalidad de la presente invención se relaciona con AcMs donde la secuencia del CDR2 de la región variable de las cadenas pesadas se seleccionan del grupo que comprende:

- SEQ ID NO. 2 y
- SEQ ID NO. 8,

las secuencias del CDR1 y del CDR3 de las cadenas pesadas son la SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO.3 respectivamente y las secuencias de los CDR de la región variable de las cadenas ligeras son:

- CDR 1 SEQ ID NO. 22
- 5 - CDR 2 SEQ ID NO. 23
- CDR 3 SEQ ID NO. 24.

En una modalidad adicional los AcMs de la presente invención se caracterizan porque la secuencia del CDR1 de la región variable de las cadenas pesadas se seleccionan del grupo que comprende:

- 10 - SEQ ID NO. 13 y
- SEQ ID NO. 19,

las secuencias del CDR2 y del CDR3 de las cadenas pesadas es la SEQ ID NO. 14 y la SEQ ID NO.3 respectivamente y las secuencias de los CDR de la región variable de las cadenas ligeras son:

- 15 - CDR 1 SEQ ID NO. 22
- CDR 2 SEQ ID NO. 23
- CDR 3 SEQ ID NO. 24.

Particularmente, la presente invención se refiere a un AcM se caracteriza por tener la siguiente secuencia de región variable de cadenas pesadas y ligeras:

- 20 Cadena pesada
- CDR1 SEQ ID NO. 15
- CDR2 SEQ ID NO. 16
- CDR3 SEQ ID NO.3
- Cadena ligera
- 25 - CDR 1 SEQ ID NO. 22
- CDR 2 SEQ ID NO. 23
- CDR 3 SEQ ID NO. 24.

La presente invención engloba todos los AcMs anteriores donde las regiones marco (FW) de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras tienen las siguientes secuencias:

- 30 Cadena pesada
- FW 1 SEQ ID NO. 4
- FW 2 SEQ ID NO. 5
- FW 3 SEQ ID NO. 6
- 35 - FW 4 SEQ ID NO. 7
- Cadena ligera
- FW 1 SEQ ID NO. 25

- FW 2 SEQ ID NO. 26
- FW 3 SEQ ID NO. 27
- FW 4 SEQ ID NO. 28

Adicionalmente, los Acs divulgados comprende las regiones constantes IgG1 humana
5 para la cadena pesada y kappa humana para la cadena ligera.

En una modalidad particular se refiere a los fragmentos derivados de los Acs anteriores donde dichos fragmentos pueden ser de tipo Fab, (Fab)₂ y fragmentos de región variable de cadena única.

En otra modalidad, la presente invención se relaciona con una composición
10 farmacéutica útil en la terapia del cáncer que tiene como principio activo los AcMs o fragmentos divulgados en un rango de 50-400 mg y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente se relaciona con una composición farmacéutica útil en el diagnóstico de tumores que tiene como principio activo los AcMs o fragmentos divulgados en un rango de 1-9 mg y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En otra modalidad, la presente invención se refiere al uso de los AcMs y fragmentos divulgados en la terapia de tumores que expresen el EGFR; así como en el diagnóstico de tumores portadores del EGFR, cuando son conjugados a un marcador apropiado. Además se relaciona con el uso de estos AcMs y fragmentos para dirigir la respuesta inmune contra tumores EGFR positivos, cuando son conjugados con proteínas o
20 dominios proteicos de interés inmunológico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Obtención de los fragmentos derivados del nimotuzumab con capacidad de unión incrementada a la región extracelular del EGFR humano

25 La presente invención se relaciona con 13 fragmentos derivados del nimotuzumab que comparten más de un 97% de identidad con la secuencia aminoacídica del mismo y tienen capacidad incrementada de unión a la región extracelular del EGFR humano. Las mutaciones de las variantes descritas en la presente invención, conducen a la obtención de variantes del nimotuzumab con la capacidad de reconocer mayor número células
30 humanas con mediana expresión del EGFR comparadas con el Fab original de nimotuzumab.

Los fragmentos descritos en la presente invención pueden obtenerse mediante la selección de variantes mutadas del Fab del nimotuzumab en virtud de su capacidad de unión a la región extracelular del EGFR humano, a partir de bibliotecas de más de 10⁷
35 moléculas presentadas sobre fagos filamentosos. Los genes correspondientes a dichas variantes pueden insertarse dentro de vectores de expresión de tipo fagomidio

(fusionados a uno de los genes que codifica para las proteínas de la cápside de los fagos filamentosos) y utilizarse para la producción de partículas virales que exponen en su superficie las variantes proteicas. Las bibliotecas de partida pueden incluir distintos grados de diversificación en un conjunto de posiciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), lo que permitiría una exploración exhaustiva de esta región funcionalmente importante para la interacción Ag-Ac. Cada uno de los residuos originales en estas posiciones puede reemplazarse por una mezcla de los 20 aminoácidos, por un conjunto pre-definido de residuos que compartan alguna(s) propiedad(es) físico-química(s) como la hidrofobicidad, el carácter aromático, la carga neta y/o el tamaño, o ser sometido a aleatorización suave mediante la introducción de una proporción minoritaria de una mezcla aleatoria de nucleótidos en cada posición del codón correspondiente (que conservarían un predominio de la secuencia original). Las posiciones escogidas pueden diversificarse simultáneamente en una misma biblioteca, o en varias bibliotecas separadas. Estas bibliotecas pueden contener proporciones variables de moléculas con una o varias mutaciones, conservativas o no, con respecto al Fab del nimotuzumab original.

Selección de los fragmentos y AcM análogos del nimotuzumab con capacidad de unión incrementada a la región extracelular del EGFR humano

La selección de los fagos que presentan variantes con capacidad de unión incrementada a la región extracelular del EGFR humano puede basarse en la incubación de las mezclas de fagos provenientes de las bibliotecas en contacto con el Ag EGFR humano inmovilizado sobre una superficie sólida, la eliminación de los fagos no unidos mediante lavados, y la elución de los fagos unidos en condiciones que interfieran con las interacciones proteicas. Pueden realizarse varios ciclos sucesivos de selección en condiciones similares. El análisis de las secuencias de ADN insertadas en los fagomidios seleccionados puede revelar regularidades que conduzcan a la identificación de aquellas sustituciones más abundantes y potencialmente relacionadas con el aumento de la capacidad de unión al EGFR. Las mutaciones recurrentes encontradas, ya sean modificaciones individuales o combinaciones de cambios seleccionados directamente de las bibliotecas, pueden combinarse entre sí en nuevas variantes para obtener incrementos adicionales de la capacidad de unión al EGFR.

La capacidad de unión al EGFR humano de cada una de las variantes seleccionadas directamente de las bibliotecas, o diseñadas y construidas posteriormente, puede evaluarse por técnicas inmunoquímicas aprovechando el formato de presentación sobre fagos que permite la caracterización simultánea de múltiples variantes.

Alternativamente, los fragmentos de la presente invención pueden obtenerse mediante la explotación de otras plataformas de la biología combinatoria, como la presentación sobre ribosomas o levaduras.

Adicionalmente los genes que codifican para las nuevas regiones variables pueden clonarse en vectores de expresión de células de mamíferos y producir de manera recombinante los AcM completos que contengan las nuevas mutaciones. Igualmente se puede comprobar que en este formato, los AcM obtenidos conservan la capacidad de reconocer más la región extracelular del EGFR humano comparado con el nimotuzumab, a través de mediciones de afinidad basadas en resonancia de plasmones de superficie (BIAcore).

Demostración de la superioridad funcional de los nuevos AcM y fragmentos derivados del nimotuzumab

La superioridad funcional de cada una de las variantes de fragmentos seleccionadas directamente de las bibliotecas o construidas posteriormente en forma de fragmentos o Acs completos, puede demostrarse en ensayos *in vitro* o *in vivo*. Para cada variante se puede evaluar el reconocimiento de líneas celulares con diferente expresión del EGFR mediante citometría de flujo, comprobándose que las nuevas variantes reconocen un mayor porcentaje de células positivas y con mayor intensidad media de fluorescencia; y este efecto es más evidente en líneas con mediana o baja expresión del EGFR. Para ello se pueden utilizar las líneas celulares con:

- alta expresión del EGFR: carcinoma epidermoide de origen humano A431, adenocarcinoma de mama con metástasis en líquido pleural de origen humano MDA-MB-468, sin limitarse a éstas.
- mediana expresión del EGFR: adenocarcinoma de pulmón de origen humano H125 y H292, sin limitarse a éstas.
- baja expresión del EGFR: cáncer de pulmón de células pequeñas de origen humano U1906, adenocarcinoma de mama de origen humano MDA-MB-231, carcinoma de ovario SKOV3, carcinoma de mama SKBR3, sin limitarse a éstas.

Para cada AcM o fragmento también se puede evaluar la capacidad de inhibir la fosforilación del EGFR mediada por su ligando (EGF), a diferentes concentraciones y en líneas celulares con diferente expresión del EGFR. También se pueden realizar ensayos de inhibición de la proliferación por Alamar blue en líneas con diferente expresión del receptor. Adicionalmente, se puede determinar la capacidad de cada AcM de inducir citotoxicidad celular dependiente de Ac, en líneas con diferente expresión del receptor. En todos los casos podría esperarse que las variantes de mayor afinidad

tuviesen un mayor efecto y que el mismo fuera más evidente en líneas con expresión media o baja del EGFR.

Por otro lado se podría medir el efecto antitumoral de los AcMs o fragmentos en ratones atímicos portadores de tumores humanos con diferente expresión del EGFR, donde se
5 mediría el retardo en el crecimiento tumoral.

Adicionalmente se pueden marcar los fragmentos o AcMs con isotopos radioactivos o con fluoróforos e inocularlos en ratones atímicos portadores de tumores humanos con diferente expresión del EGFR. Esto permite evaluar la capacidad de los fragmentos de detectar *in vivo* el reconocimiento de tumores, lo que corrobora su uso como
10 herramientas para el diagnóstico del cáncer mediante la obtención de imágenes.

Aplicación terapéutica y métodos de tratamiento de los nuevos AcM y de los fragmentos derivados

Los nuevos AcM y fragmentos obtenidos en la presente invención, tienen mayor afinidad que el nimotuzumab lo que posibilita utilizarlas en escenarios donde el nimotuzumab
15 presenta limitaciones, como es el caso de células con baja o media expresión del EGFR. Dichos AcM pueden tener aplicación en el tratamiento de pacientes con tumores de cabeza y cuello, glioma, esófago, pulmón y páncreas.

Para su uso terapéutico, los AcM y fragmentos se deben administrar a un sujeto portador de la enfermedad de forma independiente o combinados con terapias convencionales
20 para el tratamiento del cáncer como radioterapia o quimioterapia, para que potencien su acción terapéutica. La ruta de administración podrá ser cualquiera de las descritas en el estado de la técnica para la administración parenteral de fármacos, preferentemente por vía endovenosa o subcutánea.

Para obtener el efecto terapéutico deseado, los AcM y fragmentos de la presente invención deberán ser administrados en dosis que estén en el rango de concentraciones
25 para el cual tengan un efecto antitumoral sin manifestaciones tóxicas. Los rangos de dosis a explorar pueden variar entre 50 mg - 400 mg por paciente en 6 ciclos semanales de tratamiento. El tratamiento con las nuevas variantes con mayor afinidad podría ajustarse a dosis más bajas y mantener un efecto similar al del nimotuzumab o podría
30 utilizarse la dosis recomendada para el nimotuzumab (200 mg) manifestando un mayor efecto antitumoral, lo que dependería del perfil de toxicidad de los nuevos AcM y fragmentos.

Los AcM y fragmentos de la presente invención pueden tener aplicación para el diagnóstico de tumores EGFR positivos al conjugarlos con radioisótopos o fluoróforos;
35 debido a que presentan mayor afinidad y capacidad de reconocer células con mediana

o baja expresión del EGFR tienen una ventaja frente al nimotuzumab en el diagnóstico de tumores con esta característica.

- Para utilizarlos como herramientas de detección estos AcM y fragmentos serían administrados en los pacientes portadores de tumor para identificar mediante
- 5 imagenología la localización del tumor o posibles metástasis EGFR positivas. Los AcM y fragmentos conjugados a radioisótopos o fluoróforos deberán ser administrados en dosis que estén en el rango de concentraciones para la cual la cinética de distribución en los tejidos y su eliminación posibilite la obtención rápida de imágenes de calidad. Este rango puede ser de 0.5mg - 9 mg por paciente, preferentemente 3 mg.
- 10 Adicionalmente los fragmentos descritos en la presente invención se pueden fusionar a proteínas o dominios proteicos de interés inmunológico, con el objetivo de dirigir la respuesta inmune a las células tumorales EGFR positivas. Esta aplicación tiene la ventaja de combinar la potencialidad de ambas terapias por separado al concentrar la respuesta en el sitio tumoral; los fragmentos Fab aportan la especificidad por las células
- 15 tumorales que expresan el Ag mientras que las proteínas o dominios proteicos fusionados desempeñan su rol inmunológico, lo que podría tener un efecto superior al de las monoterapias.

Composiciones farmacéuticas

- Los AcM y fragmentos descritos en la presente invención se administran formando parte
- 20 de una composición farmacéutica útil en la terapia del cáncer. Preferentemente, la presente invención engloba composiciones farmacéuticas, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero no se limitan a: solución salina, salina amortiguada con fosfato, y otros parecidos. Otros agentes de amortiguación, agentes dispersos, y sustancias inertes no
- 25 tóxicas apropiadas para administrar a un paciente podrán ser incluidas en las composiciones de la presente invención. Las composiciones son normalmente estériles y libres de partículas indeseables.

- La presente invención queda aún más elaborada con los siguientes ejemplos y dibujos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían ser interpretados como una limitación del
- 30 ámbito de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1.** Evaluación por ELISA del reconocimiento del FabR3 presentado sobre fagos filamentosos. Las distintas preparaciones de fagos purificados se ajustaron a una
- 35 concentración equivalente de 10^{12} partículas virales/ml. La absorbancia se midió a 490 nm.

Figura 2. Evaluación por ELISA de la reactividad de la mezcla de fagos de la biblioteca del FabR3 luego de tres rondas de selección contra la región extracelular del EGFR humano. Las distintas preparaciones de fagos purificados se ajustaron a una concentración equivalente de 10^{11} partículas virales/ml. La absorbancia se midió a 490 nm.

Figura 3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los tres CDR de la región variable de la cadena pesada (VH) del nimotuzumab y de las 11 variantes del FabR3 con secuencias únicas luego de tres rondas de selección de la biblioteca contra la región extracelular del EGFR humano. Los guiones indican que se mantuvo el aminoácido original en esa posición. Entre paréntesis se indica el número de veces que se repitió la secuencia.

Figura 4. Evaluación por ELISA del reconocimiento de las variantes del FabR3 sobre fagos con secuencias únicas obtenidas a partir de la biblioteca de aleatorización suave luego de tres rondas de selección contra la región extracelular del EGFR humano. Se normalizaron previamente las preparaciones de fagos de acuerdo a las cantidades de proteína presentada. (A) Variantes incluidas en el grupo 1, solo presentan mutaciones en el CDR2 de la VH. (B) Variantes del grupo 2, presentan mutaciones en el CDR1 y CDR2 de la VH. La absorbancia se midió a 490 nm.

Figura 5. Variantes del FabR3 sobre fagos construidas a partir de la combinación de la mutación más recurrente del CDR1 y las mutaciones del CDR2 de las mejores variantes del FabR3 del grupo 1. (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los tres CDR de la VH del nimotuzumab original y las dos variantes construidas. (B) Evaluación por ELISA del reconocimiento de las variantes construidas. La absorbancia se midió a 490 nm.

Figura 6. Reconocimiento de células de la línea H125, por los Fab derivados del nimotuzumab y los AcM K4 y K5. (A) Gráfico de puntos donde se muestra el porcentaje de células EGFR positivas reconocidas. (B) Histogramas de intensidad media de fluorescencia (células EGFR positivas).

Figura 7. Inhibición de la fosforilación del EGFR mediada por EGF e inducida por el nimotuzumab y los AcM K4 y K5. (A) Línea H125, que presenta una expresión media del EGFR. (B) Línea MDA-MB-468, con alta expresión del EGFR.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Presentación exitosa del fragmento de unión al antígeno del nimotuzumab (FabR3) sobre fagos filamentosos M13.

Los genes que codifican para las regiones variables de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) del nimotuzumab flanqueados por los sitios de restricción ApaLI/XhoI y SfiI/BstEII,

respectivamente, se amplificaron por PCR. Ambos fragmentos génicos VL y VH se clonaron en el vector pCES1 (de Haard, H., *Methods in Molecular Biology*. 178: 87-100, 2002) seguidos de los genes que codifican para la región constante ligera kappa(CK) y la región constante pesada (CH1), respectivamente. El gen que codifica para la región

5 CH1 está unido a un gen que codifica para el péptido etiqueta *c-myc* y es seguido por el gen III. Esta construcción genética codificó para un fragmento de unión al Ag derivado del nimotuzumab (FabR3). Se transformaron bacterias competentes de la especie *Escherichia coli* cepa TG1 con las construcciones genéticas resultantes y se usaron para producir y purificar fagos presentadores del FabR3 fusionados a la proteína P3 de

10 la cápsida viral, a escala de 50 mL (Marks, J. y otros, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1991). El reconocimiento específico de las moléculas presentadas sobre los fagos purificados se evaluó mediante ELISA (Figura 1). Para ello se recubrieron placas de poliestireno (MaxiSorp, EUA) con el Ag del nimotuzumab, la región extracelular del EGFR humano (Her1) (Ramirez, B. y otros, *Int. J. Cancer.* 119: 2190–2199, 2006), el AcM anti-etiqueta

15 *c-myc* 9E10 (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus, Cuba) y BSA como molécula no relacionada. Los fagos unidos se detectaron con el AcM anti-M13 conjugado a la peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare, EUA) y el correspondiente sustrato de la enzima. Como se observa en la Figura 1 el FabR3 se presentó correctamente plegado sobre fagos, medido por el reconocimiento del AcM

20 9E10 que detecta los niveles de presentación y porque conservó la capacidad del nimotuzumab de reconocer específicamente al Her1.

Ejemplo 2: Selección y caracterización de fagos filamentosos que presentan fragmentos de variantes del FabR3 con mayor reactividad por la región extracelular del EGFR humano.

25 Se diseñó una estrategia de aleatorización suave de 25 residuos, localizados en segmentos protuberantes de los tres CDRs (según la definición AbM) de la cadena pesada del nimotuzumab. La mayoría de ellos (24/25) se reemplazaron por una mezcla que potencialmente contenía los 20 aminoácidos, pero que conservaba el residuo original en la mayor parte de las moléculas de la biblioteca. Con este fin se introdujeron

30 codones degenerados que mantenían en un 90% el nucleótido original en cada posición, mientras el 10% restante se correspondía con una mezcla equimolar de los otros tres nucleótidos. El otro residuo (F29) solo se reemplazó por otros residuos hidrofóbicos (I, L, M, V), aunque en la mayoría de las moléculas de la biblioteca predominaba el residuo original. Para ello se utilizó un codón degenerado en las posiciones uno y tres del triplete

35 que mantenía en un 90% el nucleótido original (T y C respectivamente) mientras el 10% restante se correspondía con una mezcla equimolar de los otros tres nucleótidos, la

segunda posición del triplete (T) no se modificó. La biblioteca diseñada se construyó en un formato Fab mediante el clonaje de las regiones variables en el vector pCES-1. De este modo quedó construida una biblioteca de variantes del Fab del nimotuzumab compuesta por 1.5×10^7 miembros.

- 5 Los fagos producidos a partir de la biblioteca se purificaron por precipitación con polietilenglicol según procedimientos previamente establecidos (Marks, J y otros, J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991). Para aislar variantes mutadas funcionales del FabR3 presentadas sobre los fagos con mayor capacidad de unión a su antígeno, se incubaron dichas partículas virales sobre inmunotubos (Nunc, Dinamarca), recubiertos con Her1.
- 10 Después de lavar para eliminar los fagos no unidos, los fagos unidos se eluyeron por incubación con una solución básica de trietilamina. Se infectaron bacterias de la cepa TG1 con los fagos seleccionados, que se amplificaron con el fago auxiliador M13KO7 y se utilizaron como material de partida para una nueva ronda de selección. Se realizaron tres ciclos de selección de fagos donde se evidenció un incremento en la reactividad por
- 15 el Her1 de la mezcla de fagos a medida que aumentó el número de ciclos (Figura 2). La secuenciación de los genes insertados en los fagomidios seleccionados, provenientes del tercer ciclo de selección, reveló 11 secuencias únicas divididas en dos grupos (Figura 3). El primer grupo conformado por variantes donde se aleatorizó únicamente el CDR2 y el segundo grupo donde aparecieron mutaciones en el CDR1 y el CDR2.

20 **Ejemplo 3: Demostración del aumento de la reactividad de las nuevas variantes de FabR3 sobre fagos filamentosos por la región extracelular del EGFR humano.**

- Se transformaron bacterias competentes de la especie *E. coli* cepa TG1 con las construcciones genéticas resultantes de los tres ciclos de selección que contenían secuencias únicas diferentes a la del nimotuzumab original. A partir de las mismas se
- 25 produjeron y purificaron fagos presentadores de las variantes del FabR3. Para determinar la reactividad de estas nuevas variantes por el Her1 se determinó por ELISA el reconocimiento de las preparaciones de fagos a diferentes concentraciones de partículas virales. Todas las variantes evaluadas, las 6 con mutaciones exclusivamente en el CDR2 (Figura 4A), y las 5 con mutaciones en el CDR1 y CDR2 (Figura 4B)
 - 30 presentaron mayor reactividad por el Her1 que el FabR3 original a las distintas concentraciones evaluadas. Adicionalmente se construyeron por mutagénesis de Kunkel dos nuevas variantes que combinaron las mutaciones del CDR2 que mayor aumento de reactividad provocaron, con la mutación más recurrente del CDR1 (Figura 5A). El reconocimiento de estas nuevas variantes se evaluó por ELISA. La combinación
 - 35 de las mutaciones fue compatible porque ambas variantes mostraron una mayor reactividad por el Her1 que el FabR3 original sobre fagos (Figura 5B).

Ejemplo 4: Demostración del aumento de la afinidad de las nuevas variantes del nimotuzumab en formato de proteína soluble producida en células superiores.

Los genes que codifican para la VH original del nimotuzumab (AcM R3) y las VH de las dos variantes construidas del nimotuzumab con mutaciones en los CDR1 y CDR2, como se describió en el Ejemplo 3 (Figura 5A), a las que se les denominó K4 y K5, así como la región variable de cadena ligera kappa (VK) original del nimotuzumab se clonaron en los vectores de expresión en células de mamíferos pSV-gpt y pSV-hyg, respectivamente (Orlandi, R. y otros, PNAS. 86: 3833-3837, 1989). Los vectores con los genes de interés incorporados se linearizaron con la enzima PvuI y se precipitaron en presencia de etanol. El ADN reconstituido en solución salina tamponada por fosfatos se utilizó para electroporar células NS0. Para la obtención de clones productores del AcM R3 y de las dos variantes, AcM K4 y AcM K5, se co-transfectaron 4 µg del vector pSV-gpt con la VH correspondiente (Tabla 1) y 8 µg del vector pSV-hyg-VK del nimotuzumab original. El procedimiento de obtención de clones estables se realizó con xantina, hipoxantina y ácido micofenólico como drogas de selección. Esta metodología permitió obtener las tres moléculas de interés como Acs de isotipo IgG1 y cadena ligera kappa. Los Acs producidos se purificaron del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad por proteína A.

Tabla 1. Descripción de los genes VH y VL utilizados para co-transfectar células NS0 para producir los AcM R3, K4 y K5.

	pSV-gpt-VH	pSV-hyg-Vk
AcM R3	Original	Original
AcM K4	Mutaciones 3AS4+3AS22	Original
AcM K5	Mutaciones 3AS4+3AS30	Original

Para determinar que las mutaciones obtenidas sobre fagos que en ese formato mostraron una mayor reactividad por el Her1, provocaban el mismo efecto en el Ac completo, se decidió medir la afinidad por Biacore. Primeramente se obtuvieron los Fab derivados del AcM R3, AcM K4 y AcM K5 mediante digestión enzimática con papaína y posterior separación por proteína A. Como se muestra en la Tabla 2 los nuevos AcM K4 y K5 mostraron un incremento en la afinidad de 3 y 3,6 veces, respectivamente, respecto al AcM R3.

Tabla 2. Incremento de afinidad de los AcM K4 y K5 respecto al nimotuzumab.

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Incremento
AcM R3	$1,879 \cdot 10^4$	$12,483 \cdot 10^{-4}$	$6,643 \cdot 10^{-8}$	-
AcM K4	$2,743 \cdot 10^4$	$6,019 \cdot 10^{-4}$	$2,194 \cdot 10^{-8}$	3X
AcM K5	$3,305 \cdot 10^4$	$6,098 \cdot 10^{-4}$	$1,845 \cdot 10^{-8}$	3,6X

Ejemplo 5: Los Fab derivados de los AcM K4 y K5 producidos en células de mamíferos mostraron mayor reconocimiento de la línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón H125 que el Fab derivado del nimotuzumab.

- 5 Se determinó la capacidad de los Fab derivados de los AcM K4 y K5 de reconocer a la molécula Her1. En este caso se evaluó el reconocimiento del Her1 por citometría de flujo en una línea celular, su contexto natural. Para ello se incubaron los Fab derivados de los AcM R3, AcM K4 y AcM K5 a $1,25 \mu\text{g/ml}$ con células de adenocarcinoma de pulmón de origen humano H125, que presentan una mediana expresión del receptor.
- 10 Los Fab unidos al Her1 en la membrana de las células se detectaron con un AcM de ratón anti-cadena ligera kappa humana conjugado a ficoeritrina. Como se evidencia en la Figura 6A, los Fab derivados de los AcM K4 y K5 reconocieron un mayor porcentaje de células Her1 positiva y con mayor intensidad media de fluorescencia (IMF) (Figura 6B) comparados con el Fab derivado del AcM R3.

- 15 **Ejemplo 6: El aumento en la afinidad de los AcM K4 y K5 se tradujo en una mayor capacidad de estos Acs de inhibir la fosforilación del EGFR mediada por EGF.**

Para determinar la capacidad de inhibir la fosforilación mediada por el EGF de los nuevos AcM se realizó un ensayo de Western Blot. Se emplearon dos líneas celulares:

- 20 -Adenocarcinoma de pulmón de origen humano H125, que presentan una mediana expresión del EGFR.

.Adenocarcinoma de mama con metástasis en líquido pleural de origen humano MDA-MB-468, con alta expresión del EGFR.

- 25 Las células se trataron durante 2 horas con los AcM R3, K4 y K5 a $10 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ y $2,5 \mu\text{g/ml}$. Posteriormente se retiró el medio para remover los AcM no unidos a las células, se adicionó medio fresco con EGF humano durante 10 minutos para inducir la fosforilación del receptor. A continuación se realizó un lisado en tampón RIPA a partir de estas células sometidas a los diferentes tratamientos. La concentración de proteínas se cuantificó según las instrucciones del juego de reactivos del ácido bicinonílico

(Pierce). Se aplicaron 25 µg de proteínas de los lisados en un gel al 9% SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para detectar el EGFR fosforilado (Fosfo-EGFR) se utilizó el Ac primario producido en conejo anti-pEGFR (Y1068). El contenido de proteínas se visualizó con el Ac secundario anti-conejo unido

5 al fluoróforo HRP seguido por el sustrato quimioluminiscente (Pierce). Los gráficos muestran la señal obtenida con el Fosfo-EGFR, indicativo de la cantidad de esta proteína en el lisado celular. Como se evidencia en la Figura 7 a todas las concentraciones evaluadas los AcM K4 y K5 mostraron una mayor capacidad de inhibir la fosforilación del EGFR mediada por EGF en ambas líneas celulares, en comparación

10 con el nimotuzumab. Incluso, ambos AcM a la menor concentración evaluada presentan mayor o el mismo efecto que el nimotuzumab a la mayor concentración evaluada (4 veces más concentrado). Si bien para todos los AcM la inhibición es mayor en la línea MDA-MB-468, con mayor expresión del receptor (Figura 7B), es importante resaltar que el efecto inhibitorio de los AcM K4 y K5 no se pierde en la línea celular con menor

15 expresión del receptor (Figura 7A) como si ocurre con el nimotuzumab. Lo anterior proporciona una ventaja para el uso de estos nuevos AcM obtenidos a partir de incorporar mutaciones en la región variable del nimotuzumab que se traducen en una mayor afinidad por su ligando y en una mayor actividad biológica.

ANTICUERPOS DE AFINIDAD INCREMENTADA POR EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y SUS FRAGMENTOS DERIVADOS**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal (AcM) recombinante que reconoce la región extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano Her1 caracterizado porque tiene más del 95% de identidad respecto al anticuerpo nimotuzumab y la secuencia del CDR2 de la región variable de las cadenas pesadas se seleccionan del grupo que comprende:
- 10 - SEQ ID NO. 20 y
- SEQ ID NO. 21,
la secuencia del CDR1 es la SEQ ID NO. 9 y la secuencia del CDR3 es la SEQ ID NO.3 en dichas cadenas pesadas y las secuencias de los CDR de la región variable de las cadenas ligeras son:
- 15 - CDR 1 SEQ ID NO. 22
- CDR 2 SEQ ID NO. 23
- CDR 3 SEQ ID NO. 24.
2. Un AcM que reconoce al EGFR humano Her1 caracterizado porque la secuencia del CDR2 de la región variable de las cadenas pesadas se selecciona del grupo que comprende:
- 20 - SEQ ID NO. 10,
- SEQ ID NO. 11,
- SEQ ID NO. 12,
- SEQ ID NO. 17,
25 - SEQ ID NO. 18 y
- SEQ ID NO. 29,
donde la secuencia del CDR1 es la SEQ ID NO. 9 y la secuencia del CDR3 es la SEQ ID NO.3 en dichas cadenas pesadas y las secuencias de los CDR de la región variable de las cadenas ligeras son:
- 30 - CDR 1 SEQ ID NO. 22
- CDR 2 SEQ ID NO. 23
- CDR 3 SEQ ID NO. 24.
3. Un AcM que reconoce al EGFR humano Her1 caracterizado porque la secuencia del CDR2 de la región variable de las cadenas pesadas se seleccionan del grupo que comprende:
- 35

- SEQ ID NO. 2 y
 - SEQ ID NO. 8,
- la secuencia del CDR1 es la SEQ ID NO. 1 y la secuencia del CDR3 es la SEQ ID NO.3 en dichas cadenas pesadas y las secuencias de los CDR de la región variable de las cadenas ligeras se muestran a continuación:
- CDR 1 SEQ ID NO. 22
 - CDR 2 SEQ ID NO. 23
 - CDR 3 SEQ ID NO. 24.
4. Un AcM que reconoce al EGFR humano Her1 caracterizado porque la secuencia del CDR1 de la región variable de las cadenas pesadas se seleccionan del grupo que comprende:
- SEQ ID NO. 13 y
 - SEQ ID NO. 19,
- donde la secuencia del CDR2 es la SEQ ID NO. 14 y la secuencia del CDR3 es la SEQ ID NO.3 en dichas cadenas pesadas y las secuencias de los CDR de la región variable de las cadenas ligeras son:
- CDR 1 SEQ ID NO. 22
 - CDR 2 SEQ ID NO. 23
 - CDR 3 SEQ ID NO. 24.
5. Un AcM que reconoce al EGFR humano Her1 caracterizado porque los CDR de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras contiene las siguientes secuencias:
- Cadena pesada
- CDR1 SEQ ID NO. 15
 - CDR2 SEQ ID NO. 16
 - CDR3 SEQ ID NO.3
- Cadena ligera
- CDR 1 SEQ ID NO. 22
 - CDR 2 SEQ ID NO. 23
 - CDR 3 SEQ ID NO. 24.
6. El AcM de acuerdo a la reivindicaciones 1-5 caracterizado porque las regiones marco (FW) de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras tienen las siguientes secuencias:
- Cadena pesada
- FW 1 SEQ ID NO. 4
 - FW 2 SEQ ID NO. 5
 - FW 3 SEQ ID NO. 6

- FW 4 SEQ ID NO. 7
Cadena ligera
- FW 1 SEQ ID NO. 25
- FW 2 SEQ ID NO. 26
- 5 - FW 3 SEQ ID NO. 27
- FW 4 SEQ ID NO. 28
- 7. El Ac de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque la secuencia de las regiones constantes de cadena pesada es la de una IgG1 humana.
- 8. El Ac de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque las regiones
- 10 constantes de cadena ligera es la de una kappa humana.
- 9. Un fragmento derivado de los Ac de las reivindicaciones 1-8 caracterizado porque es un fragmento de tipo Fab.
- 10. Un fragmento según las reivindicaciones 1-8 caracterizado porque es un fragmento de tipo (Fab)₂.
- 15 11. Un fragmento según las reivindicaciones 1-6 caracterizado porque es un fragmento de región variable de cadena única.
- 12. Una composición farmacéutica útil en la terapia del cáncer que tiene como principio activo los Ac o fragmentos de las reivindicaciones 1-11 en un rango de 50-400 mg y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 13. Una composición farmacéutica útil en el diagnóstico de tumores que tiene como principio activo los Acs o fragmentos de las reivindicaciones 1-11 en un rango de 1-9 mg y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 14. Uso de los Acs y fragmentos de las reivindicaciones 1-11 en la terapia de tumores que expresen el EGFR.
- 25 15. Uso de los Acs y fragmentos de las reivindicaciones 1-11 cuando son conjugados a un marcador apropiado para el diagnóstico de tumores portadores del EGFR.
- 16. Uso de los Acs o fragmentos de las reivindicaciones 1-11 cuando son conjugados con proteínas o dominios proteicos de interés inmunológico para dirigir la respuesta inmune contra tumores EGFR positivos.

30