



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 373 715**

⑯ Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C12N 5/16	(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑯ Número de solicitud europea: **03750125 .1**
⑯ Fecha de presentación: **12.05.2003**
⑯ Número de publicación de la solicitud: **1519956**
⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2005**

⑭

Título: **ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A EPHA2 Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS MISMOS.**

⑯ Prioridad:

10.05.2002 US 379322 P
14.10.2002 US 418213 P
03.04.2003 US 460507 P

⑬ Titular/es:

MedImmune, LLC
35 West Watkins Mill Road
Gaithersburg, MD 20878, US

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.02.2012

⑯ Inventor/es:

KINCH, Michael, S.;
CARLES-KINCH, Kelly;
KIENER, Peter y
LANGERMANN, Solomon

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.02.2012

⑯ Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 715 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 monoclonales frente a EPHA2 y procedimientos de uso de los mismos

1. Campo de la invención

La presente solicitud reivindica prioridad respecto a la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 5 60/379.322; presentada el 10 de mayo de 2002, la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/418.213 presentada el 14 de octubre de 2002 y la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/460.507 presentada el 3 de abril de 2003.

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones diseñadas para el tratamiento, gestión o prevención de enfermedades de hiperproliferación celular, particularmente cáncer. Los procedimientos de la 10 invención comprenden la administración de una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos específicos de EphA2, preferentemente anticuerpos monoclonales, que son agonistas de EphA2, inhiben un fenotipo celular de cáncer (tal como formación de colonias en agar blando o formación de red tubular en una preparación tridimensional de membrana basal o matriz extracelular, tal como MATRIGEL™), preferentemente se unen a epítopos sobre EphA2 15 que están expuestos de forma selectiva o incrementados en las células de cáncer con respecto a las células no cancerosas y/o se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos monoclonales de la invención, bien solos o en combinación 20 con uno o más de otros agentes útiles para la terapia del cáncer. También se proporcionan procedimientos diagnósticos y procedimientos para la detección selectiva de anticuerpos específicos de EphA2 terapéuticamente útiles.

2. Antecedentes de la invención

Cáncer

Una neoplasia, o tumor, es una masa neoplásica resultante del crecimiento celular incontrolado anormal que puede ser benigna o maligna. En general, los tumores benignos permanecen localizados. Los tumores malignos se 25 denominan, en conjunto, cánceres. El término "maligno" significa, en general, que el tumor puede invadir y destruir las estructuras corporales vecinas y extenderse a sitios distantes para producir la muerte (para una revisión, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2^a Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pág. 68-122). El cáncer se puede producir en muchos sitios del cuerpo y comportarse de forma diferente dependiendo de su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del cuerpo en el que se originan y, después, se diseminan a otra(s) parte(s) del cuerpo en la(s) que inician un nuevo crecimiento y causan más destrucción.

Más de 1,2 millones de americanos desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa principal de muerte 30 en EE.UU. y, si las tendencias actuales continúan, cabe esperar que el cáncer sea la causa principal de muerte para el año 2010. El cáncer de pulmón y de próstata son los cánceres más asesinos en varones en EE.UU. El cáncer de pulmón y de mama son los cánceres más asesinos en mujeres en EE.UU. A uno de cada dos varones en EE.UU. se diagnosticará cáncer en algún momento de su vida. A una de cada tres mujeres en EE.UU. se diagnosticará cáncer 35 en algún momento de su vida.

Todavía no se ha encontrado una cura para el cáncer. Las opciones terapéuticas actuales, como cirugía, quimioterapia y radioterapia, son, a menudo, ineficaces o producen efectos secundarios graves.

Metástasis

Las formas más letales de cáncer suelen aparecer cuando una población de células tumorales obtiene la capacidad 40 de colonizar sitios distantes y extraños en el cuerpo. Estas células metastásicas sobreviven superando las restricciones que normalmente restringen la colonización celular en tejidos distintos. Por ejemplo, las células epiteliales mamarias típicas generalmente no crecerán ni sobrevivirán si se transplantan en el pulmón, aunque las metástasis pulmonares son una causa principal de morbilidad y mortalidad por cáncer de mama. Pruebas recientes sugieren que la diseminación de células metastásicas por el cuerpo se puede producir mucho antes de la 45 presentación clínica del tumor primario. Estas células micrometastásicas pueden permanecer latentes durante muchos meses o años tras la detección y eliminación del tumor primario. Por tanto, una comprensión mejor de los mecanismos que permiten el crecimiento y la supervivencia de las células metastásicas en un microambiente extraño es crucial para la mejora de los agentes terapéuticos diseñados para luchar contra el cáncer metastásico y el diagnóstico para la detección precoz y localización de metástasis,

Señalización de la célula cancerosa

El cáncer es una enfermedad de transducción aberrante de la señal. La señalización celular aberrante supera las restricciones dependientes del anclaje sobre el crecimiento y la supervivencia celular (Rhim, y col., Critical Reviews in Oncogenesis 8:305, 1997; Patarca, Critical Reviews in Oncogenesis 7:343, 1996; Malik, y col., Biochimica et

Biophysica Acta 1287:73, 1996; Cance, y col., Breast Cancer Res Treat 35:105, 1995). La actividad de la tirosina quinasa es inducida por el anclaje de ECM y, de hecho, la expresión o la función de las tirosina quinasas normalmente están aumentada en las células malignas (Rhim, y col., Critical Reviews in Oncogenesis 8: 305,1997; Cance, y col., Breast Cancer Res Treat 35:105, 1995; Hunter, Cell 88:333, 1997). En base a las pruebas de que la actividad de la tirosina quinasa es necesaria para el crecimiento de las células malignas, se ha apuntado a las tirosinas quinasas con nuevos agentes terapéuticos (Levitzki, y col., Science 267:1782, 1995; Kondapaka, y col., Molecular & Cellular Endocrinology 117:53, 1996; Fry, y col., Current Opinion in BioTechnology 6: 662, 1995). Por desgracia, los obstáculos asociados con usar específicamente las células tumorales como dianas a menudo limitan la aplicación de estos fármacos. En particular, la actividad de tirosina quinasa a menudo es vital para la función y supervivencia de los tejidos benignos (Levitzki, y col., Science 267:1782, 1995). Para minimizar la toxicidad colateral, es crucial identificar y, después, apuntar a las tirosina quinasas que se sobreexpresan de forma selectiva en las células tumorales.

EphA2

EphA2 es una tirosina quinasa receptora de 130 kDa que se expresa en epitelios de adultos, en los que se encuentra a niveles bajos y está enriquecida en el interior de sirios de adhesión célula-célula (Zantek, y col., Cell Growth & Differentiation 10:629, 1999; Lindberg, y col., Molecular & Cellular Biology 10: 6316, 1990). Esta localización subcelular es importante porque EphA2 se une a los ligandos (conocidos como efrinas A1 a A5) que están anclados a la membrana celular (Eph Nomenclature Committee, 1997, Cell 90:403; Gale, y col., 1997, Cell & Tissue Research 290: 227). La principal consecuencia de la unión del ligando es la autofosforilación de EphA2 (Lindberg, y col., 1990, ant.). No obstante, al contrario que otras tirosina quinasas receptoras, EphA2 conserva la actividad enzimática en ausencia de la unión del ligando o contenido en fosfotirosina (Zantek, y col., 1999, supra). Eph2 está regulada por aumento en un gran número de células de carcinoma agresivo.

Terapia para el cáncer

Una barrera para el desarrollo de agentes anti-metástasis ha sido los sistemas de ensayo que se usan para diseñar y evaluar estos fármacos. Las terapias de cáncer más convencionales están dirigidas a las células en crecimiento rápido. No obstante, las células cancerosas no necesariamente crecen más rápido sino que sobreviven y crecen en condiciones que son no permisivas para las células normales (Lawrence y Steeg, 1996, World J. Urol. 14:124-130). Estas diferencias fundamentales entre los comportamientos de las células normales y malignas proporcionan oportunidades para el uso de terapias dirigidas. El paradigma de que los tumores micrometastásicos ya se han diseminado por el cuerpo subraya la necesidad de evaluar los posibles fármacos quimioterapéuticos en el contexto de un microentorno extraño y tridimensional. Muchos ensayos con fármacos convencionales para el cáncer miden el crecimiento de las células tumorales o la supervivencia en condiciones normales de cultivo celular (es decir, crecimiento en monocapa). No obstante, el comportamiento de las células en ensayos bidimensionales a menudo no predice de un modo fiable el comportamiento de las células tumorales *in vivo*.

Actualmente, la terapia para el cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o radioterapia para erradicar las células neoplásicas en un paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management," en Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, eds., Capítulo 12, Sección IV). Recientemente, la terapia para el cáncer también puede implicar terapia biológica o inmunoterapia. Todas estas estrategias pueden suponer inconvenientes significativos para el paciente. Por ejemplo, la cirugía puede estar contraindicada debido a la salud del paciente o puede ser inaceptable para el paciente. Adicionalmente, la cirugía puede no eliminar completamente el tejido neoplásico. La radioterapia sólo es eficaz cuando el tejido neoplásico exhibe una sensibilidad mayor a la radiación que el tejido normal, y la radioterapia puede también provocar a menudo efectos secundarios graves. La terapia hormonal rara vez se administra como agente único y, aunque puede ser eficaz, a menudo se usa para prevenir o retrasar la recurrencia del cáncer después de que otros tratamientos han eliminado la mayoría de las células cancerosas. Las terapias biológicas/inmunoterapias son escasas en número y, en general, cada terapia es eficaz para un tipo muy específico de cáncer.

Con respecto a la quimioterapia, se dispone de diversos agentes para el tratamiento del cáncer. Una mayoría significativa de quimioterapéuticos actúa inhibiendo la síntesis de ADN, bien directamente o bien indirectamente inhibiendo la biosíntesis de los precursores de desoxirribonucleótidos trifosfato, para evitar la replicación del ADN y la división celular concomitante (véase, por ejemplo, Gilman y col., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Light Ed. (Pergamon Press, New York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como nitrosourea, anti-metabolitos, tales como metotrexato e hidroxiurea, y otros agentes, tales como etopósidos, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, daunorubicina etc., aunque no necesariamente específicos del ciclo celular, matan las células durante la fase S por su efecto sobre la replicación del ADN. Otros agentes, específicamente la colchicina y los alcaloides vinca, tales como vinblastina y vincristina, interfieren con el ensamblaje de los microtúbulos y se produce la detención de la mitosis. En general, los protocolos de la quimioterapia implican la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos para incrementar la eficacia del tratamiento.

A pesar de la disponibilidad de diversos agentes quimioterapéuticos, la quimioterapia tiene muchos inconvenientes (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" in *Scientific American Medicine*, vol. 3, Ruben-stein y Federman, eds., ch. 12, sect. 10). Casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos y la quimioterapia produce efectos secundarios significativos y a menudo peligrosos, incluidos náuseas intensas, depresión de la médula ósea, inmunosupresión etc. Adicionalmente, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan resistencia a agentes quimioterapéuticos. De hecho, las células resistentes a los agentes quimioterapéuticos concretos usados en el protocolo de tratamiento a menudo son resistentes a otros fármacos, incluso a los agentes que actúan mediante mecanismos diferentes de los mecanismos de acción de los fármacos usados en el tratamiento específico; este fenómeno se denomina fármaco pleiotrópico o resistencia a múltiples fármacos. Por tanto, por la resistencia a fármacos, muchos cánceres son resistentes a los protocolos convencionales de tratamiento quimioterapéutico. Di divulga un procedimiento de tratar el cáncer que comprende administrar un anticuerpo agonista de EphA2.

Existe una necesidad significativa de tratamientos alternativos para el cáncer, particularmente de tratamiento de cáncer que se ha demostrado que es resistente a los tratamientos para el cáncer convencionales, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal. Además, es poco frecuente tratar el cáncer con solo un procedimiento. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer, y de combinaciones terapéuticas nuevas y más eficaces para el tratamiento del cáncer.

3. Sumario de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 1-26.

La EphA2 está sobreexpresada y alterada funcionalmente en un gran número de carcinomas malignos. La EphA2 es una oncoproteína y es suficiente para conferir potencial metastásico a las células cancerosas. La EphA2 también está asociada con otras células hiperproliferantes y está implicada en enfermedades causadas por la hiperproliferación celular. La EphA2 que se sobreexpresa en las células malignas exhibe actividad quinasa independiente de unión al ligando. Los presentes inventores han descubierto que una disminución de los niveles de EphA2 puede disminuir la proliferación y/o comportamiento metastásico de una célula. En particular, los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, los anticuerpos agonistas de EphA2, es decir que provocan la señalización de EphA2, realmente disminuyen la expresión de EphA2 e inhiben el crecimiento de las células tumorales y/o la metástasis. Aunque no se pretende quedar ligado por ningún mecanismo de acción, los anticuerpos agonistas pueden reprimir la hiperproliferación o el comportamiento de las células malignas induciendo la autofosforilación de EphA2, de modo que se produce la consiguiente degradación de EphA1 para regular por disminución la expresión. Por tanto, en una realización, los anticuerpos frente a EphA2 de la invención son agonistas de la señalización de EphA2 e incrementan la fosforilación de EphA2 ("anticuerpos agonistas de EphA2").

Además, las células cancerosas exhiben rasgos fenotípicos que difieren de los de las células no cancerosas, por ejemplo formación de colonias en un sustrato tridimensional, tal como agar blando, o la formación de redes tubulares o matrices de tipo res en una membrana basal tridimensional o preparación de matriz extracelular, tal como MATRIGEL™. Las células no cancerosas no forman colonias en agar blando y forman distintas estructuras similares a una esfera en la membrana basal tridimensional o preparaciones de matriz extracelular. De acuerdo con esto, la invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a EphA2 e inhiben uno o más fenotipos de célula cancerosa, tal como formación de colonias en agar blando o formación de red tubular en preparaciones tridimensionales de membrana basal o de matriz extracelular ("anticuerpos frente a EphA2 inhibidores del fenotipo de las células cancerosas"). La exposición de las células cancerosas a dichos anticuerpos frente a EphA2 inhibidores del fenotipo de las células cancerosas evita o disminuye la capacidad de las células para colonizar o formar redes tubulares en estos sustratos. Además, en ciertas realizaciones, la adición de dichos anticuerpos frente a EphA2 inhibidores del fenotipo de las células cancerosas a colonias ya establecidas de las células cancerosas causan una reducción o eliminación de una colonia de células cancerosas existente, es decir produce la muerte de células hiperproliferativas y/o metastásicas, por ejemplo a través de necrosis o apoptosis.

Las diferencias en la localización subcelular, las propiedades de unión a ligando o la organización proteica (p. ej., estructura, orientación en la membrana celular) puede además distinguir la EphA2 que está presente sobre las células cancerosas de la EphA2 que está sobre las células no cancerosas. En las células no cancerosas, la EphA2 se expresa a niveles bajos y se localiza en sitios de contacto célula-célula, donde puede atraer a sus ligandos anclados en la membrana. No obstante, en general, las células cancerosas exhiben menos contactos célula-célula, lo que puede disminuir la unión EphA2-ligando. Además, la sobreexpresión de EphA2 puede producir un exceso de EphA2 respecto al ligando que aumenta la cantidad de EphA2 no unido a ligando. En consecuencia, los cambios en la distribución subcelular o en la orientación en la membrana de EphA2 puede hacer que EphA2 se localice en sitios en una célula cancerosa en la que sea inaccesible al ligando. Adicionalmente, EphA2 puede tener propiedades alteradas de unión a ligando (p. ej., debido a una conformación alterada) en las células cancerosas, de modo que sea incapaz de producir interacciones estables con su ligando, esté o no localizado en la unión célula-célula. En cada caso, estos cambios pueden exponer ciertos epítopos sobre la EphA2 en las células cancerosas que no están

expuestas en las células no cancerosas. De acuerdo con esto, la invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a EphA2, pero, preferentemente, se unen al epítopo de EphA2 expuesto sobre las células cancerosas pero no sobre las células no cancerosas ("anticuerpos frente al epítopo expuesto en EphA2"). La exposición de las células cancerosas a dichos anticuerpos frente a EphA2 que preferentemente se unen a epítopos sobre EphA2 que se exponen de forma selectiva o aumentan en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas apunta al anticuerpo terapéutico/profiláctico frente a las células cancerosas y evita o disminuye la capacidad de las células para proliferar sin afectar a las células no cancerosas.

Los presentes inventores han descubierto que los anticuerpos que se unen a EphA2 con una tasa K_{off} muy baja son particularmente eficaces en la reducción de la expresión de EphA2 y/o en la inducción de la degradación de EphA2 y, por tanto, inhiben el crecimiento de las células cancerosas y/o la metástasis y/o proliferación de las células hiperproliferativas. De acuerdo con esto, la invención proporciona de este modo anticuerpos que se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y son agonistas de EphA2.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a EphA2 y son agonistas de EphA2, inhiben un fenotipo de célula cancerosa, se unen, preferentemente, a epítopos sobre EphA2 que están expuestos de forma selectiva o han aumentado sobre las células cancerosas, peor no en las células no cancerosas, y tienen una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, preferentemente anticuerpos monoclonales. En particular, los anticuerpos de la invención se unen al dominio extracelular de EphA2 y, preferentemente, producen señalización de EphA2 y autofosforilación de EphA2, inhiben un fenotipo de célula cancerosa, se unen, preferentemente, a un epítopo sobre EphA2 expuesto sobre las células cancerosas, peor no en las células no cancerosas, y tienen una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son Eph099B-102.147 (PTA-4572), Eph099B-208.261 (PTA-4573), Eph099B-210.248 (PTA-4574) y Eph099B-233.152 (PTA-5194). En una realización más preferida, los anticuerpos de la invención son humanos o humanizados. En una realización más preferida, los anticuerpos de la invención son Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248 y Eph099B-233.152 humanizados.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y regímenes profilácticos y terapéuticos diseñados para prevenir, tratar o gestionar una enfermedad asociada con la sobreexpresión de EphA2, particularmente cáncer, particularmente cáncer metastásico, en un sujeto, que comprende administrar uno o más anticuerpos que se unen específicamente a EphA2 y son agonistas de EphA2, inhiben un fenotipo celular de cáncer (tal como la formación de colonias en agar blando o la formación de red tubular en una preparación tridimensional de membrana basal o matriz extracelular, tal como MATRIGEL™), preferentemente se unen a epítopos sobre EphA2 que están expuestos de forma selectiva o incrementados en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas y tienen una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En realizaciones preferidas, el anticuerpo frente a EphA2 disminuye el tamaño de las colonias ya formadas en agar blando y/o reduce la extensión de la formación de red tubular en una preparación de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular. En una realización, el cáncer es de origen celular epitelial. En otra realización, el cáncer es un cáncer de piel, pulmón, colon, próstata, mama, vejiga urinaria o páncreas, o es un carcinoma de células renales o un melanoma. En una realización preferida, las células cancerosas en el cáncer que se va a prevenir, tratar o gestionar sobreexpresan EphA2. En una realización preferida, algo de EphA2 no se une al ligando, bien como resultado de la disminución de los contactos célula-célula, alteración de la localización subcelular o incrementos en la cantidad de EphA2 con respecto al ligando. En una realización preferida, los procedimientos de la invención se usan para prevenir, tratar o gestionar la metástasis de tumores. Los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una o más de otras terapias del cáncer. En particular, la presente invención proporciona procedimientos de prevenir, tratar o gestionar el cáncer en un sujeto, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más anticuerpos contra EphA2 de la invención en combinación con la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más quimioterapias, terapias hormonales, terapias biológicas/inmunoterapias y/o radioterapias, aparte de la administración de un anticuerpo frente a EphA2 de la invención o en combinación con cirugía.

En otras realizaciones, los anticuerpos frente a EphA2 de la invención se usan para tratar, prevenir y/o gestionar una enfermedad o trastorno no canceroso asociado con la hiperproliferación celular, tal como, entre otros, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, reestenosis (músculo liso y/o endotelial), psoriasis etc. En realizaciones preferidas, las células hiperproliferativas son epiteliales. En realizaciones preferidas, las células hiperproliferativas sobreexpresan EphA2. En una realización preferida, algo de EphA2 no se une al ligando, bien como resultado de la disminución de los contactos célula-célula, alteración de la localización subcelular o incrementos en la cantidad de EphA2 con respecto al ligando de EphA2.

Los procedimientos y composiciones de la invención son útiles, no solo en pacientes no tratados, sino también son útiles en el tratamiento de pacientes parcial o completamente resistentes a las actuales terapias del cáncer, convencionales y experimentales, incluidas, entre otras, quimioterapias, terapias hormonales, terapias biológicas, radioterapias y/o cirugía, así como para mejorar la eficacia de dichos tratamientos. En particular, la expresión de EphA2 se ha implicado en el incremento de los niveles de la citocina IL-6, que se ha asociado con el desarrollo de

resistencia de las células cancerosas a diferentes regímenes de tratamiento, tal como quimioterapia y terapia hormonal. Además, la sobreexpresión de EphA2 puede superar la necesidad de actividad del receptor de estrógenos, de modo que contribuye a la resistencia al tamoxifeno en las células de cáncer de mama. De acuerdo con esto, en una realización preferida, la invención proporciona procedimientos terapéuticos y profilácticos para el tratamiento o prevención del cáncer que se ha demostrado que es, o puede ser, resistente o no respondedor a otras terapias distintas a las que comprenden administración de los anticuerpos frente a EphA2 de la invención. En una realización específica, uno o más anticuerpos frente a EphA2 de la invención se administran a un paciente resistente o no respondedor a un tratamiento no basado en EphA2, particularmente al tratamiento con tamoxifeno o un tratamiento en el que la resistencia está asociada con un incremento de los niveles de IL-6, para hacer al paciente no resistente o respondedor. El tratamiento al que el paciente había sido anteriormente resistente o no respondedor se puede administrar con un efecto terapéutico.

Además, la presente invención describe procedimientos de detección selectiva para los anticuerpos frente a EphA2 de la invención. En particular, los anticuerpos se pueden someter a detección selectiva según la unión a EphA2, particularmente al dominio extracelular de EphA2, usando técnicas inmunológicas de rutina. En un área, para identificar los anticuerpos agonistas de EphA2, los anticuerpos frente a EphA2 pueden someterse a detección selectiva de la capacidad para producir señalización de EphA2, por ejemplo, el incremento de la fosforilación de EphA2 y/o la degradación de EphA2.

En otra realización, para identificar los anticuerpos que inhiben el fenotipo de las células cancerosas. Los anticuerpos anti-EphA2 se pueden someter a detección selectiva según la capacidad para prevenir o reducir la formación de colonias de células cancerosas en agar blando o reducir o inhibir la formación de red tubular en una preparación de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular, o cualquier otro procedimiento que detecte una disminución en un fenotipo del cáncer, por ejemplo cualquier ensayo que detecte un incremento de la inhibición por contacto de la proliferación celular (p. ej., reducción de la formación de colonas en un cultivo celular en monocapa). En realizaciones preferidas, los anticuerpos se someten a detección selectiva de su capacidad para disminuir el tamaño de las colonias existentes en agar blando o reducir la extensión de la formación de la matriz tubular en la preparación de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular, en particular induce necrosis o apoptosis celular (particularmente de células cancerosas, más particularmente de células cancerosas metastásicas, pero también incluidas otras células hiperproliferativas). Adicionalmente, los anticuerpos se pueden someter a detección selectiva de su capacidad para inhibir o reducir la formación de colonias en agar blando y/o la formación de red tubular en las preparaciones disminuir el tamaño de las preparaciones de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular, en presencia de otros agentes anti-cancerosos, por ejemplo agentes hormonales, quimioterápicos, biológicos u otros agentes anti-cancerosos.

En otra realización, para identificar anticuerpos que se unen, preferentemente, a un epítopo de EphA2 expuesto sobre células cancerosas pero no sobre células no cancerosas, los anticuerpos se pueden someter a detección selectiva de su capacidad para unirse preferentemente a EphA2 que no está unido a ligando, por ejemplo Efrina A1, y que no está localizado en los contactos célula-célula. Cualquier procedimiento conocido en la técnica para determinar la localización/unión del anticuerpo sobre una célula se puede usar para someter a los anticuerpos candidatos a detección selectiva de las propiedades de unión deseables. En una realización específica se usa microscopía por inmunofluorescencia o citometría de flujo para determinar las características de unión de un anticuerpo. En esta realización, los anticuerpos que se unen mal a EphA2 cuando está unida a su ligando y localizada en los contactos célula-célula pero que se unen bien a EphA2 libre sobre una célula entran dentro de la invención. En otra realización específica, los anticuerpos frente a EphA2 se seleccionan según su capacidad para competir con ligandos (p. ej., ligandos anclados en la célula o purificados) por la unión a EphA2 usando ensayos basados en células o ELISA.

En otra área, los anticuerpos se someten a detección selectiva usando ensayos de cinética de unión de anticuerpos bien conocidos en la técnica (p. ej., ensayos basados en resonancia de plasmón superficial, tal como el ensayo BIACORE™) para identificar los anticuerpos que tienen una tasa Koff inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

En otras realizaciones, la invención proporciona anticuerpos para tratar, prevenir o gestionar el cáncer administrando agentes terapéuticos, distintos a los anticuerpos frente a EphA2 de la invención, que reducen los niveles de la proteína EphA2, por ejemplo, pero no como limitación, ácidos nucleicos antisentido específicos de EphA2, ARN bicatenario de EphA2 que participa como ARN de interferencia en la expresión de EphA2, ribozimas anti-EphA2 etc., así como otros inhibidores de EphA2, por ejemplo inhibidores de molécula pequeña de EphA2.

Los presentes inventores también han descubierto que la mayor expresión de EphA2 se correlaciona con un incremento de la expresión de fibronectina. Además, los niveles altos de fibronectina exógena incrementan la capacidad de las células para formar colonias en agar blando, mientras que los inhibidores específicos de la fijación de fibronectina a la célula disminuyen la formación de colonias de células cancerosas derivadas de tumores en agar blando. Por tanto, la fibronectina parece adaptar la colonización de las células tumorales en entornos extraños, por ejemplo la formación y crecimiento de metástasis distales. De acuerdo con esto, en una realización concreta, la

invención proporciona, sola o en combinación con anticuerpos frente a EphA2 de la invención, procedimientos de tratar, prevenir o gestionar el cáncer, particularmente la enfermedad metastásica administrando un agente que evite la unión de célula-fibronectina y/o la expresión de fibronectina.

- 5 La invención proporciona además usos diagnósticos usando los anticuerpos frente a EphA2 de la invención para evaluar la eficacia del tratamiento del cáncer, bien basados en EphA2 o no basados en EphA2. EN general, el incremento de la expresión de EphA2 se asocia con cánceres cada vez más invasivos y metastásicos. De acuerdo con esto, una reducción en la expresión de EphA2 con un tratamiento concreto indica que el tratamiento está reduciendo la capacidad de invasión y/o el potencial metastásico del cáncer. Los usos diagnósticos de la invención también se pueden usar para pronosticar o predecir la evolución del cáncer o los resultados de la terapia del cáncer.
- 10 En realizaciones concretas, los usos diagnósticos de la invención proporcionan usos de técnicas de imagen y localización de metástasis, y procedimientos de diagnóstico y pronóstico usando tejidos y fluidos distales al sitio del tumor primario (así como procedimientos que usan tejidos y fluidos del tumor primario), por ejemplo sangre entera, esputo, orina, suero, aspirados con agua fina (es decir, biopsias). En otras realizaciones, los usos diagnósticos de la invención proporcionan usos de técnicas de imagen y localización de metástasis, y procedimientos de diagnóstico y pronóstico *in vivo*. En dichas realizaciones, los tumores primarios metastásicos se detectan usando un anticuerpo de la invención, preferentemente un anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para análisis inmunohistoquímicos de células congeladas o fijadas o ensayos con tejidos. Además, los anticuerpos y procedimientos diagnósticos de la invención se pueden usar para diagnosticar, pronosticar o monitorizar la terapia (sea terapia basada en EphA2 o no basada en EphA2) de enfermedades hiperproliferativas no cancerosas (particularmente asociadas con la sobreexpresión de EphA2), por ejemplo, entre otras, asma, psoriasis, reestenosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica etc.)
- 15
- 20

En otra realización se proporcionan kit que comprenden las composiciones farmacéuticas o reactivos diagnósticos de la invención.

3.1 Definiciones

- 25 Como se usa en el presente documento, el término "agonista" se refiere a cualquier compuesto, incluidos una proteína, polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula grande o molécula pequeña (menor de 10 kD), que incremente la actividad, activación o función de otra molécula. Los agonistas de EphA2 producen un incremento de la fosforilación y degradación de la proteína EphA2. Los anticuerpos frente a EphA2 que actúan como agonistas de EphA2 pueden o no también inhibir el fenotipo de las células cancerosas (p. ej., formación de colonias en agar blando o formación de red tubular en una preparación de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular) y pueden o no unirse, preferentemente, a un epítopo de EphA2 que está expuesto en una célula cancerosa respecto a una célula no cancerosa y tienen una tasa K_{off} baja.
- 30

35 La expresión "anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un polipéptido de EphA2 o a un fragmento de un polipéptido de EphA2 y no se unen específicamente a otros polipéptidos que no son de EphA2. Preferentemente, los anticuerpos o fragmentos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 o a un fragmento del mismo no sufren reacción cruzada no específica con otros antígenos (p. ej., no puede competir por la unión con una proteína que no sea EphA2, por ejemplo BSA en un inmunoensayo adecuado). Los anticuerpos o fragmentos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 se pueden identificar mediante, por ejemplo, inmunoensayos u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, intracuerpos, anticuerpos multiespecíficos (incluidos anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos químicos, anticuerpos sintéticos, FVs de cadena sencilla (scFv) (incluidas las scFv biespecíficas), fragmentos Fab de anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos F(ab'), Fvs unidos por disulfuro (sdFv) y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos de la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de EphA2 (p. ej., una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-EphA2). Preferentemente, los anticuerpos agonistas, o fragmentos de los mismos, que se unen inmunoespecíficamente con un polipéptido de EphA2 o fragmento del mismo son agonistas de, preferentemente, EphA2 y no son agonistas significativamente de otras actividades.

40

45

50

55 Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una enfermedad en la que participan células que tienen el potencial de producir metástasis en sitios distales y exhiben rasgos fenotípicos que difieren de los de las células no cancerosas, por ejemplo formación de colonias en un sustrato tridimensional, tal como agar blando, o la formación de redes tubulares o matrices de tipo red en una preparación tridimensional de membrana basal o matriz extracelular, tal como MATRIGEL™. Las células no cancerosas no forman colonias en agar blando ni forman estructuras claras similares a esferas en preparaciones de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular.

Las células cancerosas adquieren un conjunto característico de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de varios mecanismos. Dichas capacidades incluyen evadir la apoptosis, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, invasión/metástasis tisular, potencial de replicación sin límite y angiogénesis sostenida. Con la expresión "célula cancerosa" se pretende abarcar las células cancerosas tanto premalignas como malignas.

Como se usa en el presente documento, la frase "que inhibe el fenotipo de la célula cancerosa" se refiere a la capacidad de un compuesto para prevenir o reducir la formación de colonias de células cancerosas en agar blando o la formación de redes tubulares en una preparación tridimensional de membrana basal o matriz extracelular, o cualquier otro procedimiento que detecte una reducción en el fenotipo de una célula cancerosa, por ejemplo ensayos que detecten un incremento de la inhibición por contacto de la proliferación celular (p. ej., reducción de la formación de colonias en un cultivo celular en monocapa). Los compuestos que inhiben el fenotipo de la célula cancerosa también pueden producir una reducción o eliminación de colonas cuando se añaden a las colonias establecidas de células cancerosas en agar blando o la extensión de la formación de la red tubular en una preparación tridimensional de membrana basal o matriz extracelular. Los anticuerpos frente a EphA2 que inhiben el fenotipo de la célula cancerosa también pueden o no ser agonistas de EphA2 y tener una tasa K_{off} baja.

El término "derivado", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 o un fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2, que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, delecciones o adiciones (es decir, mutaciones) de residuos aminoácidos. En algunas realizaciones, un derivado de anticuerpo o fragmento del mismo comprende sustituciones, delecciones o adiciones de residuos aminoácidos en una o más CDR. El derivado de anticuerpo puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión o peor unión cuando se compara con un anticuerpo no derivado. En realizaciones específicas, uno, dos o tres residuos aminoácidos de la CDR se han sustituido, delecionado o añadido (es decir, mutado). El término "derivado", como se usa en el presente documento, también se refiere a un polipéptido, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 o un fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2, que se ha modificado, es decir, mediante unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede modificar mediante, por ejemplo, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína etc. Un derivado de un polipéptido de EphA2, un fragmento de de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se pueden modificar mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina etc. Además, un derivado de un polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos. En una realización, un derivado polipeptídico posee una función similar o idéntica como un polipéptido de EphA2, un fragmento e un polipéptido de EphA2, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descritos en el presente documento. En otra realización, un derivado de polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tienen una actividad alterada en comparación con un polipéptido no alterado. Por ejemplo, un anticuerpo derivado o fragmento del mismo se puede unir a su epítopo más estrechamente o ser más resistente a la proteólisis.

El término "epítopo", como se usa en el presente documento, se refiere a una porción de un polipéptido de EphA2 que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero, y, más preferentemente, en un ratón o un ser humano. Un epítopo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido de EphA2 que produce una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítopo que tiene actividad antigénica es una porción de un polipéptido de EphA2 al que un anticuerpo se une inmunoespecíficamente, según se determina mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos. Los epítopos antigénicos no necesariamente tienen que ser inmunogénicos.

Los "fragmentos" descritos en el presente documento incluyen un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos aminoácidos contiguos o al menos 250 residuos aminoácidos contiguos de un polipéptido de EphA2 o un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2. Preferentemente, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de unión a epítopo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) que son anticuerpos químéricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de regiones hipervariables del receptor están sustituidos por residuos de regiones hipervariables de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la Región Estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para perfeccionar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana, que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2, que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, delecciones o adiciones (es decir, mutaciones) de residuos aminoácidos. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es un derivado. Dicho anticuerpo humanizado comprende sustituciones, delecciones o adiciones de residuos aminoácidos en una o más CDR no humanas. El derivado de anticuerpo humanizado puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión o peor unión cuando se compara con un anticuerpo humanizado. En realizaciones específicas, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos aminoácidos de la CDR se han sustituido, delecionado o añadido (es decir, mutado). Para detalles adicionales en los anticuerpos humanizados, véanse las patentes europeas nº EP 239.400, EP 592.106 y EP 519.596; las patentes internacionales nº los documentos WO 91/09967 y WO 93/17105; las patentes de EE.UU. nº 5.225.539, 5.530.101, 5.565.332, 5.585.089, 5.766.886 y 6.407.213; y Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka y col., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska y col., 1994, PNAS 91:969-973; Tan y col., 2002, J. Immunol. 169:1119-25; Caldas y col., 2000, Protein Eng. 13:353-60; Morea y col., 2000, Methods 20:267-79; Baca y col., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84; Roguska y col., 1996, Protein Eng. 9:895-904; Couto y col., 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto y col., 1995, Cancer Res. 55:1717-22; Sandhu, 1994, Gene 150:409-10; Pedersen y col., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73; Jones y col., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann y col., 1988, Nature 332:323-329; y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de una "Región Determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917). Los residuos de la CDR para Eph099B-208.261 y Eph099B-233.152 se enumeran en la Tabla 1. "Región Estructural" o residuos "FR" son los residuos del dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable como se ha definido en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso de la expresión "en combinación" no restringe el orden en el que los agentes profilácticos y/o terapéuticos se administran a un sujeto con un trastorno celular hiperproliferativo, especialmente cáncer. Un primer agente profiláctico y/o terapéutico se puede administrar antes (p. ej., 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), junto con o después (p. ej., 1 minuto, 5 minutos, minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de un segundo agente profiláctico y/o terapéutico a un sujeto que tenía, tiene o es susceptible a sufrir un trastorno celular hiperproliferativo, especialmente cáncer. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos se administran a un sujeto en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que el agente de la invención puede actuar junto con el otro agente para proporcionar un mayor beneficio del que se obtendría si se administraran de otro modo. Cualquier agente profiláctico o terapéutico adicional se puede administrar en cualquier orden con los otros agentes profilácticos o terapéuticos adicionales.

Como se usa en el presente documento, la frase "tolerancia baja" se refiere a un estado en el que el paciente sufre efectos secundarios por el tratamiento de modo que el paciente no se beneficia y/o no continúa la terapia porque los efectos adversos y/o el daño por los efectos secundarios supera el beneficio del tratamiento.

Como se usa en el presente documento, los términos "gestiona", "que gestiona" y "gestión" se refieren a los efectos

beneficiosos que un sujeto obtiene de la administración de un agente profiláctico o terapéutico, que no tiene como resultado una cura de la enfermedad. En ciertas realizaciones, a un sujeto se administra uno o más agentes profilácticos o terapéuticos para "gestionar" una enfermedad, de modo que se evite la progresión o empeoramiento de la enfermedad.

- 5 Como se usa en el presente documento, la frase "no respondedor/resistente" se usa para describir a los pacientes tratados con una o más terapias disponibles actualmente (p. ej., terapias para el cáncer), tal como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, particularmente un régimen terapéutico estándar para el cáncer concreto, en el que la terapia no es clínicamente adecuada para tratar a los pacientes de modo que estos pacientes necesitan una terapia efectiva adicional, por ejemplo permanecen no susceptibles a la terapia. La frase también puede describir pacientes que responden a la terapia pero que sufren efectos secundarios, recaídas, desarrollan resistencia etc. En varias realizaciones, "no respondedor/resistente" significa que al menos alguna porción significativa de las células cancerosas no se mueren o su división celular no se detiene. La determinación de si las células cancerosas son "no respondedoras/resistentes" se puede realizar *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para analizar la eficacia del tratamiento sobre las células cancerosas, usando los significados aceptados en la técnica de "resistente" en dicho contexto. En varias realizaciones un cáncer es "no respondedor/resistente" cuando el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente o ha aumentado durante el tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "potencia" se refiere a una mejora en la eficacia de un agente terapéutico a su dosis habitual o aprobada.

- 20 Como se usa en el presente documento, los términos "previene", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención del inicio, recurrencia o diseminación de una enfermedad en un sujeto resultante de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente profiláctico" se refiere a cualquier agente que se puede usar en la prevención del inicio, recurrencia o diseminación de una enfermedad o trastorno asociado con la sobreexpresión de EphA2 y/o una enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer. En ciertas realizaciones, la expresión "agente profiláctico" se refiere a un anticuerpo agonista de EphA2, un anticuerpo que inhibe el fenotipo de la célula cancerosa, un anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto o un anticuerpo que se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (p. ej., Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152). En otras ciertas realizaciones, la expresión "agente profiláctico" se refiere a quimioterápicos para cáncer, radioterapia, terapia hormonal, terapia biológica (p. ej., inmunoterapia) y/o anticuerpos frente a EphA2 de la invención. En otras realizaciones se pueden administrar más de un agente profiláctico en combinación.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a la cantidad de agente profiláctico suficiente para tener como resultado la prevención del inicio, recurrencia o diseminación de la enfermedad hiperproliferativa celular, preferentemente cáncer. Una cantidad profilácticamente eficaz puede hacer referencia a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir el inicio, recurrencia o diseminación de la enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, incluidos, entre otras, los predisponentes a enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo los predisponentes genéticamente al cáncer o los previamente expuestos a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz puede también hacer referencia a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad hiperproliferativa. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la invención significa la cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad hiperproliferativa. Usado en relación con una cantidad de un anticuerpo frente a EphA2 de la invención, la expresión puede abarcar una cantidad que mejore la profilaxis global o que potencie la eficacia profiláctica o produce sinergia con otro agente profiláctico

- 45 Como se usa en el presente documento, un "protocolo" incluye programas de dosificación y regímenes de dosificación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "efectos secundarios" abarca efectos indeseados y adversos de un agente profiláctico o terapéutico. Los efectos adversos son siempre indeseados, pero los efectos indeseados no necesariamente son adversos. Un efecto adverso de un agente profiláctico o terapéutico podría ser dañino o incómodo o suponer un riesgo. Los efectos secundarios producidos por la quimioterapia incluyen, entre otros, toxicidad gastrointestinal tal como, entre otros, diarrea de formación temprana y tardía, y flatulencia, náuseas, vómitos, anorexia, leucopenia, anemia, neutropenia, astenia, calambres abdominales, fiebre, dolor, pérdida de peso corporal, deshidratación, alopecia, disnea, insomnio, mareo, mucositis, xerostomía e insuficiencia renal, así como estreñimiento, efectos nerviosos y musculares, daños temporales o permanentes en los riñones y la vejiga urinaria, 55 síntomas similares a los de la gripe, retención de fluidos e infertilidad temporal o permanente. Los efectos secundarios por la radioterapia incluyen, entre otros, fatiga, sequedad de boca y pérdida de apetito. Los efectos secundarios por terapias biológicas/inmunoterapias incluyen, entre otros, exantemas o inflamaciones en el lugar de

la administración, síntomas similares a los de la gripe, tales como fiebre, escalofríos y fatiga, problemas en el tracto digestivo y reacciones alérgicas. Los efectos secundarios por las terapias hormonales incluyen, entre otros, náuseas, problemas de fertilidad, depresión, pérdida de apetito, problemas oculares, dolor de cabeza y fluctuación del peso. Los efectos indeseados adicionales normalmente experimentados por los pacientes son numerosos y conocidos en la técnica. Muchos se describen en el Physicians' Desk Reference (56^a ed., 2002).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. En general, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv 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, pp. 269-315 (1994). En realizaciones específicas, los scFv incluyen scFv biespecíficos y scFv humanizados.

Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable. Como se usa en el presente documento, un sujeto es, preferentemente, un mamífero, tal como un no primate (p. ej., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (p. ej., un mono y un ser humano), más preferentemente un ser humano.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a la erradicación, reducción o mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno, particularmente a la erradicación, eliminación, modificación o control de tejido canceroso primario, regional o metastásico que es el resultado de la administración de uno o más agentes terapéuticos. En ciertas realizaciones, dichos términos se refieren a la minimización o retraso de la diseminación del cáncer resultante de la administración de uno o más agentes terapéuticos a un sujeto con dicha enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que se puede usar en la prevención, tratamiento o gestión de una enfermedad o trastorno asociado con la sobreexpresión de EphA2 y/o enfermedades o trastornos hiperproliferativos, particularmente cáncer. En ciertas realizaciones, la expresión "agente terapéutico" se refiere a un anticuerpo agonista de EphA2, un anticuerpo que inhibe el fenotipo de la célula cancerosa, un anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto o un anticuerpo que se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (p. ej., Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152). En otras ciertas realizaciones, la expresión "agente terapéutico" se refiere a quimioterápicos para cáncer, radioterapia, terapia hormonal, terapia biológica/inmunoterapia y/o anticuerpo frente a EphA2 de la invención. En otras realizaciones se pueden administrar más de un agente terapéutico en combinación.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de agente terapéutico suficiente para tratar o gestionar una enfermedad o trastorno asociado con la sobreexpresión de EphA2 y/o una enfermedad hiperproliferativa celular y, preferentemente, la cantidad suficiente para destruir, modificar, controlar o eliminar el tejido de cáncer primario, regional o metastásico. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede hacer referencia a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar el inicio de la enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo retrasar o minimizar la diseminación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede también hacer referencia a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión del cáncer. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de la enfermedad hiperproliferativa o cáncer. Usado en relación con una cantidad de un anticuerpo frente a EphA2 de la invención, la expresión puede abarcar una cantidad que mejore la terapia global, reduce o evita efectos indeseados o que potencia la eficacia terapéutica o produce sinergia con otro agente terapéutico.

45 4. Descripción de las figuras

FIG.1: Eph099B-208.261 puede competir con EA2 por la unión a EphA2 en un ensayo de ELISA competitivo. La capacidad del anticuerpo monoclonal frente a EA2 marcado para unirse a EphA2-Fc se analizó mediante ELISA competitivo en presencia de anticuerpos monoclonales frente a EA2 no marcados o Eph099B-208.261. Las proporciones entre el anticuerpo no marcado y marcado usado en el ensayo se indican en el eje x. EA2 se indica con rombos y and Eph099B-208.261 se indica con cuadrados.

FIGS. 2A-2D: Los anticuerpos frente a EphA2 estimulan la fosforilación de la tirosina de EphA2 en células MDA-MB-231. Monocapas de células MDA-MB-231 se incubaron en presencia de una única dosis de 5 $\mu\text{g/ml}$ (A, C) de Eph099B-208.261 o (B, D) de EA2 para el tiempo indicado a 37 °C. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron después con un anticuerpo específico de EphA2, se resolvieron mediante SDS-PAGE y se sometieron a análisis de transferencia western con un anticuerpo específico de fosftotirosina (A, B). Las membranas se limpian y se volvieron a sonar con el anticuerpo específico de EphA2 usado en la inmunoprecipitación como control de carga (C,

D).

FIGS. 3A-3D: Los anticuerpos frente a EphA2 estimulan la degradación de EphA2 en células MDA-MB-231. Monocapas de células MDA-MB231 se incubaron en presencia de una única dosis de 5 µg/ml (**A, C**) de Eph099B-208.261 o (**B, D**) de EA2 para el tiempo indicado a 37 °C. Los lisados celulares se immunoprecipitaron después con un anticuerpo específico de EphA2, se resolvieron mediante SDS-PAGE y se sometieron a análisis de transferencia Western con un anticuerpo específico de EphA2 (**A, B**). Las membranas se limpian y se volvieron a sondar con el anticuerpo específico de β-catenina como control de carga (**C, D**).

FIGS. 4A-4B: El anticuerpo frente a EphA2 Eph099B-233.152 estimula la fosforilación de la tirosina de EphA2 y la degradación de EphA2 en células MDA-MB-231. Monocapas de células MDA-MB-231 se incubaron en presencia de una única dosis de 5 µg/ml de Eph099B-233.152 a 37 °C. Los lisados celulares se immunoprecipitaron después con D7 (un anticuerpo específico de EphA2), se resolvieron mediante SDS-PAGE y se sometieron a análisis de transferencia western con (**A**) un anticuerpo específico de fosftirosina o (**B**) un anticuerpo específico de EphA2.

FIG. 5: Los anticuerpos frente a EphA2 inhiben el crecimiento de células tumorales malignas en agar blando. Una única dosis de 5 µg/ml de Eph099B-208.261 (barra negra), anticuerpos frente a EphA2 purificados con EA2 (barra blanca) o un anticuerpo control negativo, 1A7 (barra gris) se incubaron con células tumorales MDA-MB-231 malignas durante el tiempo indicado a 37 °C en agar blando. Los resultados se indican como colonias por campo de potencia alta (HPF).

FIGS. 6A-6B: El anticuerpo frente a EphA2 Eph099B-233.152 inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo*. Las células MDA-MB-231 se implantaron subcutáneamente en ratones atípicos. Una vez que los tumores hubieron crecido hasta un volumen medio de 100 mm³, se administró a los ratones 6 mg/ml de Eph099B-233.152 o PBS control por vía intraperitoneal dos veces a la semana durante 3 semanas. (**A**) Crecimiento del tumor. El crecimiento del tumor se evaluó y expresó como una proporción del volumen del tumor dividido por el volumen del tumor inicial ((100 mm³). Los ratones control se indican con círculos y los ratones tratados con Eph099B-233.152 se indican con cuadrados. Las flechas indican el tiempo de administración de Eph099B-233.152 o PBS. (**B**) Supervivencia. El crecimiento tumoral se dejó progresar hasta que el volumen del tumor alcanzó 1000 mm³. La supervivencia de los ratones se evaluó puntuando el porcentaje de ratones que viven cada día después del tratamiento. Los ratones control se indican en gris y los ratones tratados con Eph099B-233.152 se indican en negro.

FIGS. 7A-2D: Los anticuerpos frente a EphA2 Eph099B-208.261 y Eph099B-233.152 inhiben el crecimiento de células tumorales *in vivo*. Las células MDA-MB-231 de cáncer de mama se implantaron (**A**) ortotópicamente o (**B**) subcutáneamente en ratones atípicos. (**C**) Las células de cáncer de pulmón A549 se implantaron subcutáneamente en ratones atípicos. Una vez que los tumores hubieron crecido hasta un volumen medio de 100 mm³, se administró a los ratones 6 mg/ml del anticuerpo indicado o el control negativo (PBS o anticuerpo 1A7) por vía intraperitoneal dos veces a la semana durante 3 semanas. El crecimiento del tumor se evaluó y expresó como una proporción del volumen del tumor dividido por el volumen del tumor inicial (100 mm³). (**D**) Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 se implantaron subcutáneamente en ratones atípicos. Una vez que los tumores hubieron crecido hasta un volumen medio de 100 mm³, se administró a los ratones 6 mg/ml del anticuerpo indicado o el control negativo por vía intraperitoneal dos veces a la semana durante 3 semanas. Después del sacrificio se determinó el volumen total del tumor. El control negativo es negro, EA2 es blanco, Eph099B-208.261 es gris claro y Eph099B-233.152 es gris oscuro.

FIGS. 8A-8B: La sobreexpresión de EphA2 incrementa de forma selectiva el crecimiento de células malignas. (**A**) 1×10^5 células control (barra blanca) o MCF-7^{EphA2} (barra negra) se suspendieron en agar blando en presencia de 1 mg/ml de 17β-estradiol durante 14 días antes de la evaluación microscópica. Las células transfeccionadas con EphA2 formaron más colonias (47 colonias/campo de potencia alta (HPF)) que los controles equivalentes (1 colonia/HPF; $P < 0,01$). (**B**) Los ensayos de crecimiento en monocapa no distinguieron entre el crecimiento de las células control (círculos blancos) y MCF-7^{EphA2} (cuadrados negros).

FIGS. 9A-9B: La sobreexpresión de EphA2 aumenta el potencial tumorigénico. (**A**) 1×10^6 células control (círculos blancos) o MCF-7EphA2 (cuadrados negros) se implantaron en la almohadilla mamaria de los ratones atípicos ($n=20$ ratones por grupo) en presencia de estrógenos suplementarios (17β-estradiol 1 µM). Los tumores formados por las células MCF-7^{EphA2} fueron significativamente más grandes que los tumores formados por los controles equivalentes ($P = 0,027$). (**B**) Cantidad iguales de lisado proteico, aislado de las células o de los tumores reseccionados (T) se evaluaron mediante análisis de transferencia western con un anticuerpo frente a EphA2 (D7). Las membranas se limpian y se volvieron a sondar con el anticuerpo específico de β-catenina como control de carga.

FIGS. 10A-10C: La sobreexpresión de EphA2 disminuye la dependencia de estrógenos. (**A**) 1×10^5 células control (barra blanca) o MCF-7^{EphA2} (barra negra) se suspendieron en agar blando en ausencia de estrógeno exógeno y la formación de colonias se evaluó microscópicamente tras 14 días. El crecimiento de la monocapa (B) y el potencial tumorigénico (**C**) de las células MCF-7^{EphA2} (cuadrado negro) se incrementaron con respecto a los controles

equivalentes (círculo blanco) en ausencia de estrógeno suplementario ($P<0,01$ and $P<0,004$, respectivamente).

FIGS. 11A-11B: La sobreexpresión de EphA2 disminuye la sensibilidad al tamoxifeno. (A) 1×10^5 células MCF-7 o MCF-7^{EphA2} se suspendieron en agar blando en presencia de tamoxifeno 1 μ M (TAM) y o 17 β -estradiol 1 μ M y la formación de colonias se evaluó microscópicamente tras 14 días. (B) Las células MCF-7 (círculos) o MCF-7^{EphA2} (cuadrados) se implantaron en la almohadilla mamaria (n= 15 ratones por grupo) en presencia de estrógenos suplementarios. El tratamiento con tamoxifeno se inició 17 días después de la implantación. El volumen tumoral de los animales tratados con tamoxifeno (círculos y cuadrados negros) y tratados con solución salina (círculos y cuadrados blancos) se midieron en el tiempo indicado. Obsérvese los menores efectos inhibidores de tamoxifeno sobre las células MCF-7^{EphA2} con respecto a las células control ($P = 0,01$).

FIGS. 12A-12F: El receptor de estrógenos se expresa, pero está funcionalmente alterado en las células MCF-7^{EphA2}. (A) los niveles de ER α y (B) ER β se evaluaron en las células MCF-7^{neo} control y las células MCF-7^{EphA2} mediante análisis de transferencia Western con el anticuerpo específico frente a EphA2 (D7). (C, D) Las membranas se limpian y se volvieron a sondar con el anticuerpo específico de β -catenina como control de carga. (E, F) La actividad del receptor de estrógenos se midió usando un sistema indicador de CAT, que reveló una actividad del receptor de estrógenos comparable en las células control y MCF-7^{EphA2}. Los resultados medios de tres experimentos se representan gráficamente en (F). E2 indica el tratamiento con estrógenos; TAM indica tratamiento con tamoxifeno; % de conversión indica la cantidad de sustrato convertido de sustrato no acetilado (no AC) en sustrato acetilado (AC) por la enzima CAT.

FIGS. 13A-13C: El anticuerpo EA2 agonista de EphA2 disminuye el crecimiento maligno. Las células MCF-7^{EphA2} se incubaron en presencia de 3 μ g/ml de EA2 durante el tiempo indicado antes de la extracción de la muestra y se realizaron análisis de transferencia Western con un anticuerpo específico de EphA2 (D7). (B) La membrana se limpian y se volvieron a sondar con el anticuerpo específico de β -catenina como control de carga. (C) 1×10^5 células control o MCF-7^{EphA2} se suspendieron en agar blando en presencia o ausencia de tamoxifeno (TAM 1 μ M) y el anticuerpo agonista de EphA2 (EA2, 10 μ g/ml). Obsérvese que EA2 aumentó la sensibilidad de las células MCF-7^{EphA2} a tamoxifeno.

FIGS. 14A-14B: Los menores niveles de la proteína EphA2 son suficientes para reducir la colonización por las células tumorales del agar blando. Las monocapas de células MDA-MB-231 se transfeccionaron con 2 μ g/ml de EphA2 antisentido u oligonucleótidos antisentido inversos (IAS) a 37 °C durante 24 horas. (A, B) El análisis de transferencia Western de los lisados de células enteras con el anticuerpo D7 específico de EphA2 confirma que la transfección con oligonucleótidos antisentido disminuye los niveles de proteína EphA2 (A). Las membranas se limpian y se volvieron a sondar con anticuerpos frente a paxilina como control de carga (B). La movilidad relativa de los patrones de masa molecular se muestra a la izquierda de los paneles A y B. (C) Las monocapas de células MDA-MB-231, tratadas con oligonucleótidos antisentido como se ha detallado anteriormente, se resuspendieron en agar blando durante 7 días antes del análisis microscópico de la formación de colonias. Obsérvese que la formación de colonias por las células MDA-MB-231 se vio significativamente alterada por los oligonucleótidos antisentido EphA2 en comparación con el control antisentido invertido ($P < 0,002$). Los resultados se indican como colonias por campo de potencia alta (HPF).

FIG. 15: Análisis cinético de anticuerpos monoclonales frente a EphA2. Se usaron ensayos BIACORE™ (basado en resonancia de plasmón superficial) para analizar la cinética de la unión del anticuerpo monoclonal frente a EphA2 a EphA2-Fc inmovilizado. Eph099B-208.261 se indica como una línea continua, Eph099B-233.152 se indica como una línea de puntos, EA2 se indica como una línea discontinua y el control negativo se indica con cuadrados.

FIGS. 16A-16D.: El anticuerpo EA2 frente a EphA2 se une preferentemente a células cancerosas. Células MCF-10A no transformadas (A, C) o MDA-MB-231 transformadas (B, D) se incubaron con 10 μ g/ml de Eph099B-233.152 (A, B) o EA2 (C, D) a 4 °C antes de la fijación e inmunomarcaje con IgG anti-ratón conjugada con fluoróforo.

FIGS. 17A-17D: El anticuerpo EA2 frente a EphA2 se une preferentemente a los epítopos de EphA2 expuestos disminuyendo los contactos célula-célula. (A, B) Las células MCF-10A no transformadas se marcaron con EA2 a 4°C antes (A) o después (B) del tratamiento con EGTA y antes de la fijación y el inmunomarcaje con IgG anti-ratón conjugado con fluoróforo. (C, D) Las células MCF-10A no transformadas (C) o MDA-MB-231 transformadas (D) se marcaron con EA2 antes (centro) o después (arriba) del tratamiento con EGTA. Las células control se incubaron con el anticuerpo secundario solo (parte inferior). La cantidad de unión EA2-EphA2 se midió usando citometría de flujo.

FIGS.18A-18B: El epítopo E2 de EphA2 es distinto del epítopo Eph099B-233.152 y el sitio de unión al ligando. (A) EphA2-F_c se incubó con Efrina A1-F_c inmovilizada y se unió a ella. La efrina A1-F_c marcada (negra), EA2 (blanco) o Eph099B-233.152 (gris) se incubaron con el complejo EphA2-Efrina A1-F_c y se midió la cantidad de unión. (B) EphA2-F_c se incubó con Efrina A1-F_c inmovilizada y se unió a ella. EA2 marcado se incubó después con el complejo EphA2-Efrina A1. El competidor sin marcar se incubó con el complejo EphA2-Efrina A1-EA2 en la cantidad indicada. Los competidores fueron Efrina A1-F_c (negro), EA2 (blanco) o Eph099B-233.152 (gris)

FIG.19: Secuencias de VL y VH de los anticuerpos frente a EphA2. Secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de Eph099B-208.261 **(A)** VL (SEC ID Nº 1 y 9, respectivamente) y **(B)** VH (SEC ID Nº 5 y 13, respectivamente); Eph099B-233.152 **(C)** VL (SEC ID Nº 17 y 25, respectivamente) y **(D)** VH (SEC ID Nº 21 y 29, respectivamente); y EA2 **(E)** VL (SEC ID Nº 33 y 41, respectivamente) y **(F)** VH (SEC ID Nº 37 y 45, respectivamente). Se indican las secuencias de las CDR.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los inventores de que los anticuerpos monoclonales EphA2 pueden inhibir la proliferación de las células cancerosas y la capacidad de invasión reduciendo los niveles de expresión de EphA2 en estas células cancerosas. La menor actividad de EphA2 inhibe de forma selectiva el crecimiento de células cancerosas malignas. En particular, dichos menores niveles de EphA2 se pueden conseguir con anticuerpos monoclonales agonistas de EphA2. Sin pretender quedar ligado a mecanismo de acción alguno, esta inhibición del crecimiento y/o metástasis celular se consigue estimulando (es decir, mediante agonismo) la señalización de EphA2, produciendo de este modo fosforilación de EphA2 que conduce a la degradación de EphA2. El crecimiento de las células cancerosas disminuye debido a la disminución de los niveles de EphA2 y, por tanto, a la disminución de la señalización de EphA2 independiente de ligando. La menor actividad de EphA2 también se puede conseguir con anticuerpos que inhiben el fenotipo de las células cancerosas EphA2 o anticuerpos que se unen preferentemente a un epítopo de EphA2 expuesto sobre las células cancerosas pero no sobre las células no cancerosas. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a EphA2 con una K_{off} baja (p.ej., menor que menor que $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) también pueden disminuir los niveles de EphA2.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a anticuerpos y composiciones que proporcionan el tratamiento, inhibición y gestión de enfermedades y trastornos asociados con la sobreexpresión de EphA2 y/o las enfermedades o trastornos hiperproliferativos. Un aspecto concreto de la invención se refiere a anticuerpos y composiciones que contienen compuestos que inhiben la proliferación e invasión de células cancerosas, particularmente las células cancerosas que sobreexpresan EphA2. La presente invención se refiere además a anticuerpos y composiciones para el tratamiento, inhibición o gestión de metástasis de cánceres de origen en células epiteliales, especialmente cánceres humanos de mama, pulmón, piel, próstata, vejiga urinaria y páncreas, y carcinomas de células renales y melanomas. Otras composiciones y anticuerpos de la invención incluyen otros tipos de principios activos en combinación con los anticuerpos frente a EphA2 de la invención. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para tratar, prevenir o gestionar otras enfermedades o trastornos asociados con hiperproliferación celular, por ejemplo, entre otros, asma, psoriasis, reestenosis, EPOC etc.

La presente invención también se refiere a anticuerpos para el tratamiento, inhibición y gestión del cáncer u otro trastorno o enfermedad de células hiperproliferativas que se ha convertido en parcial o completamente resistente al tratamiento para el cáncer actual o convencional, tal como quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y terapia biológica.

La invención proporciona además usos diagnósticos usando los anticuerpos frente a EphA2 de la invención, particularmente los anticuerpos frente al epítopo de EphA2 expuesto para evaluar la eficacia del tratamiento del cáncer, bien basado en EphA2 o no basado en EphA2. Los usos diagnósticos de la invención también se pueden usar para pronosticar o predecir la evolución del cáncer. En realizaciones concretas, los usos diagnósticos de la invención proporcionan usos de técnicas de imagen y localización de metástasis, y usos de diagnóstico y pronóstico usando tejidos y fluidos distales al sitio del tumor primario (así como procedimientos que usan tejidos y fluidos del tumor primario). En otras realizaciones, los usos diagnósticos de la invención proporcionan usos de técnicas de imagen y localización de metástasis, y procedimientos de diagnóstico y pronóstico *in vivo*.

En un área adicional, la invención describe procedimientos de detección selectiva de agentes anticancerosos, particularmente agentes anti-cáncer metastásico, realizando detección selectiva de agentes por la capacidad para disminuir la colonización celular en agar blando y/o la formación de redes tubulares en preparaciones de membrana basal tridimensional y de matriz extracelular, tal como MATRIGEL™. En otras áreas, la invención describe procedimientos de detección selectiva de agentes para el tratamiento y prevención de enfermedades y trastornos hiperproliferativos analizando la capacidad para reducir la extensión de la colonización celular existente en agar blando y/o la formación de redes tubulares en la membrana basal tridimensional. Los presentes inventores han descubierto que la inhibición de la colonización celular en agar blando y/o la formación de redes tubulares en MATRIGEL™ es una indicación mucho mejor de actividad antimetastásica y puede identificar posibles agentes antimetastásicos que no se habrían podido identificad con ensayos de cultivo celular convencionales.

5.1 Anticuerpos

Como se ha tratado anteriormente, la invención abarca la administración de anticuerpos (preferentemente anticuerpos monoclonales) o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente, y mediante agonismo, la señalización de EphA2 ("anticuerpos agonistas de EphA2"), inhiben un fenotipo de células cancerosas, por

ejemplo inhiben la formación de colonias en agar blando o la formación de redes tubulares en una preparación de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular, tal como MATRIGEL™ ("anticuerpos que inhiben el fenotipo de células cancerosas"), que se unen preferentemente a epítopos sobre EphA2 que están expuestos de forma selectiva o incrementados en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas ("anticuerpos frente a epítopo de EphA2 expuesto") y que se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En una realización, el anticuerpo se une al dominio extracelular de EphA2 y actúa como agonista de EphA2, por ejemplo aumenta la fosforilación de EphA2 y, preferentemente, causa la degradación de EphA2. En otra realización, el anticuerpo se une al dominio extracelular de EphA2 y, preferentemente, también inhibe y, todavía más preferentemente, reduce la extensión (p. ej., mediante mecanismos de muerte celular tales como necrosis y apoptosis) de la formación de colonias en agar blando o la formación de redes tubulares en una preparación de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular. En otras realizaciones, los anticuerpos inhiben o reducen un fenotipo de célula cancerosa en presencia de otro agente anti-cáncer, al como un agente hormonal, biológico, quimioterapéutico o de otro tipo. En otra realización, el anticuerpo se une al dominio extracelular de EphA2 en un epítopo que está expuesto en una célula cancerosa pero oculto en una célula no cancerosa. En una realización específica, el anticuerpo no es EA2. En otra realización, el anticuerpo se une al dominio extracelular de EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, más preferentemente inferior a $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En otras realizaciones, el anticuerpo se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-3} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-4} s^{-1} , inferior a $9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-5} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-6} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-7} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-8} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-9} s^{-1} , o inferior a 10^{-10} s^{-1} .

En una realización más preferida, el anticuerpo es Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152. En otra realización, el anticuerpo se une a un epítopo unido por Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152 y/o compite por la unión a EphA2 con Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, por ejemplo como se analiza mediante ELIS u otro inmunoensayo adecuado. En otras realizaciones, el anticuerpo de la invención se une inmunoespecíficamente, y mediante agonismo, a la señalización de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto de forma selectiva o incrementado en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas y tiene una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y puede o no competir por la unión con un ligando de EphA2, por ejemplo la Efrina A1.

Los hibridomas que producen Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, and Eph099B-210.248 se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) el 7 de agosto de 2002 bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimientos de Patentes, y se les asignaron los números de registro PTA-4572, PTA-4573, y PTA-4574, respectivamente. Un hibridoma productor de Eph099B-233.152 se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) el 12 de mayo de 2003 bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimientos de Patentes, y se le asignó el número de 5194. Las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de VL y VH de Eph099B-208.261 and Eph099B-233.152 se muestran en las FIGS. 19A-19D. Las secuencias de las CDR de Eph099B-208.261 and Eph099B-233.152 se indican en la Tabla 1. En una realización más preferida, el anticuerpo es humano o se ha humanizado.

Los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos de forma recombinante, intracuerpos, anticuerpos multiespecíficos (incluidos anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos químicos, anticuerpos sintéticos, FVs de cadena sencilla (scFv) (incluidas las scFv biespecíficas), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos usados en los procedimientos de la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a EphA2 y es un agonista de EphA2, inhibe o reduce el fenotipo de célula cancerosa, preferentemente se une a un epítopo de EphA2 expuesto sobre las células cancerosas pero no sobre las células no cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p.ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos usados en los procedimientos de la invención pueden ser de cualquier origen animal, incluidos aves y mamíferos (p. ej., de ser humano, murino, burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo). Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de ratones o de otros animales que expresan anticuerpos a partir de genes humanos.

Los anticuerpos usados en los procedimientos de la presente invención pueden ser monoestéticos, biespecíficos,

tríespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse inmunoespecíficamente a diferentes epítopos de un polipéptido de EphA2 o pueden unirse inmunoespecíficamente tanto a polipéptido de EphA2 como a un epítopo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, y WO92/05793; Tutt, y col., 1991, J. Immunol. 147:60-69; las patentes de EE.UU. nº 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920 y 5.601.819; y Kostelný y col., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

En una realización específica, un anticuerpo usado en la presente invención es Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, o un fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos de la invención mencionados anteriormente; véase, por ejemplo, la Tabla 1)). En otra realización, un anticuerpo agonista usado en los procedimientos de la presente invención se une al mismo epítopo que Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, o compite con Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152 por la unión a EphA2, por ejemplo en un ensayo ELISA.

CDR1 de VL es la SEC ID Nº 2 o 18; la CDR2 de VL es la SEC ID Nº 3 o 19; y la CDR3 de VL es la SEC ID Nº 4 o 20 (véase, por ejemplo, la Tabla 1). En una realización más específica, la CDR1 de VH es la SEC ID Nº 6; la CDR2 de VH es la SEC ID Nº 7; la CDR3 de VH es la SEC ID Nº 8; la CDR1 de VL es la SEC ID Nº 2; la CDR2 de VL es la SEC ID Nº 3; y la CDR3 de VL es la SEC ID Nº 4. En otra realización más específica, la CDR1 de VH es la SEC ID Nº 22; la CDR2 de VH es la SEC ID Nº 23; la CDR3 de VH es la SEC ID Nº 24; la CDR1 de VL es la SEC ID Nº 18; la CDR2 de VL es la SEC ID Nº 19; y la CDR3 de VL es la SEC ID Nº 20. La invención también abarca cualquiera de los anteriores con uno, dos o tres sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos que se unen a EphA2.

En una realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 6 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 2. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 6 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 3. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 6 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 4.

En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonista de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 22 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 18. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonista de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 22 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 19. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonista de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 22 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 20.

En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 2. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 3. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 4.

En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonista de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 23 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 18. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonista de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 23 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 19. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonista de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 23 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 20.

En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 8 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 2. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 8 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 3. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 8 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 4.

En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonistas de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 24 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 18. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonista de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 24 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 19. En otra realización, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a EphA2, y actúa como agonista de EphA2, inhibe un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se une a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 24 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 20.

Los anticuerpos usados en los procedimientos de la invención incluyen derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado mediante, por ejemplo, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

La presente invención también proporciona anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos, que comprenden una región estructural conocida para los expertos en la técnica. Preferentemente, el anticuerpo de la invención o fragmento del mismo es humano o humanizado. En una realización específica, el anticuerpo de la invención o fragmento del mismo comprende una o más CDR de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152 (o cualquier otro anticuerpo agonista de EphA2 o anticuerpo que inhibe el fenotipo de célula cancerosa de EphA2 o un anticuerpo frente a EphA2 que se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), se une a EphA2 y actúa como agonista de EphA2 y/o inhibe un fenotipo de célula cancerosa y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

La presente invención abarca anticuerpos de dominio único, incluidos anticuerpos de dominio único de camélido (véase, p. ej., Muyldermans y col., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall y col., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann y Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25; publicación internacional nº WO 94/04678 y WO 94/25591; la patente de EE.UU. nº 6.005:079. En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos de dominio único que comprenden dos dominios VH que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VH de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, (o cualquier otro anticuerpo agonista de EphA2, anticuerpo que inhibe el fenotipo de célula cancerosa de EphA2, anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto y un anticuerpo frente a EphA2 que se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), con modificaciones de modo que se forman anticuerpos de dominio único. En otra realización, la presente invención también proporciona anticuerpos de dominio único que comprenden dos dominios VH que comprenden una o más de las CDR de VH de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, (o cualquier otro anticuerpo agonista de EphA2, anticuerpo que inhibe el fenotipo de célula cancerosa de EphA2, anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto y un anticuerpo frente a EphA2 que se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

Los procedimientos la presente invención también abarcan el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen semivididas (p. ej., semivididas en suero) en un mamífero, preferentemente un ser humano, superiores a 15 días, preferentemente superiores a 20 días, superiores a 25 días, superiores a 30 días, superiores a 35 días, superiores a

40 días, superiores a 45 días, superiores a 2 meses, superiores a 3 meses, superiores a 4 meses o superiores a 5 meses. Las mayores semividas de los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos en un mamífero, preferentemente un ser humano, tienen como resultado un mayor título en suero de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en el mamífero, y, por tanto, reducen la frecuencia de la administración de dichos

5 anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y/o reducen la concentración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se va a administrar. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen mayores semividas *in vivo* se pueden generar mediante técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con mayores semividas *in vivo* se pueden generar modificando (p. ej., sustituyendo, delecionando o añadiendo) residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio 10 Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 97/34631 y WO 02/060919). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen mayores semividas *in vivo* se pueden generar uniendo a dichos 15 anticuerpos o fragmentos de anticuerpos moléculas poliméricas, tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular. El PEG se puede unir a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con o sin un ligador multifuncional, bien mediante conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o mediante grupos epsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Se usará derivación de polímero lineal o ramificado que tiene como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se monitorizará estrechamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar una conjugación adecuada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG mediante, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

20 La presente invención también abarca el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de uno o ambos dominios variables de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, (p. ej., una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones variables. Preferentemente, las mutaciones en estas o más sustituciones de aminoácidos en las regiones variables. Preferentemente, las mutaciones en estos anticuerpos mantienen o potencian la avidez y/o la afinidad de los 25 anticuerpos por el(s) antígeno(s) concreto(s) al(s) que se unen inmunoespecíficamente. Las técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica (p. ej., inmunoensayos) se pueden usar para analizar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno concreto.

30 Las técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica se pueden usar para introducir mutaciones en la secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluidas mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR, que tienen como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos, con respecto al anticuerpo original o fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservadoras hechas en uno o más 35 de los residuos aminoácidos no esenciales predichos.

40 La presente invención también abarca anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2, y actúan como agonistas de EphA2, y/o inhiben un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se unen a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable que es al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable y/o de la cadena pesada variable Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera variable que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a las SEC ID Nº 1 o 17. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a 45 EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a las SEC ID Nº 5 o 21. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera variable que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a las SEC ID Nº 1 o 17 y una cadena pesada variable que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a las SEC ID Nº 5 o 21.

50 La presente invención abarca además anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente

5 a EphA2, y actúan como agonistas de EphA2, y/o inhiben un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se unen a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a las SEC ID Nº 2, 3 o 4. En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a las SEC ID Nº 18, 19 o 20. En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a las SEC ID Nº 6, 7 u 8. En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a las SEC ID Nº 22, 23 o 24.

25 La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede realizar mediante cualquier procedimiento conocido para un experto en la técnica, incluidas las búsquedas de proteínas en BLAST,

30 La presente invención abarca además anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2, y actúan como agonistas de EphA2, y/o inhiben un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se unen a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos una CDR VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que comprenden sustituciones, delecciones o adiciones de residuos aminoácidos en comparación con las SEC ID Nº 2, 3, 4, 6, 7, 8, 18, 19, 20, 22, 23, o 24. El anticuerpo que comprende la una o más CDR que comprenden sustituciones, delecciones o adiciones de residuos aminoácidos puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión o pero unión cuando se compara con un anticuerpo que comprende una o más CDR sin sustituciones, delecciones o adiciones de residuos aminoácidos. En realizaciones específicas, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos aminoácidos de la CDR se han sustituido, deletreado o añadido (es decir, mutado).

40 La presente invención también abarca el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2, y actúan como agonistas de EphA2 y opcionalmente inhiben un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se unen a epítopos sobre EphA2 que están expuestos de forma selectiva o incrementados en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas y se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, en el que dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos están codificados por una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, en condiciones rigurosas. En una realización, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2, y actúan como agonistas de EphA2 y opcionalmente inhiben un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se unen a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto de forma selectiva en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas y se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos una cadena ligera variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152. En una realización preferida, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una cadena ligera variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 9 o 25. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y actúan como agonistas de EphA2 u, opcionalmente, inhiben un fenotipo de célula cancerosa, preferentemente se unen a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto de forma selectiva o incrementado en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas y se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos una cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152. En una realización preferida, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a

EphA2 y comprenden una cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 13 o 29. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una cadena ligera variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 9 o 25 y una cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 13 o 29.

5 En otra realización, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2, y actúan como agonistas de EphA2 y/o inhiben un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se unen a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto sobre células cancerosas pero no en las 10 células no cancerosas y/o se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de una o más CDR de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152.

15 En una realización preferida, los anticuerpos o fragmentos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una CDR codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº 10, 11 o 12. En otra realización preferida, los anticuerpos o fragmentos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una CDR codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 26, 27 O 28. En otra realización preferida, los anticuerpos o fragmentos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una CDR codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 14, 15 o 16. En otra realización preferida, los anticuerpos o fragmentos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y comprenden una CDR codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 30, 31 o 32.

25 Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, entre otros, hibridación a ADN unido a filtro en 6x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC/0,1 % de SDS a aproximadamente 50-65 °C, condiciones altamente rigurosas tales como hibridación a ADN unido a filtro en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,22X SSC/0,2 % de SDS a aproximadamente 60 °C, o cualquier otra condición de hibridación rigurosa conocidas para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y 30 John Wiley and Sons, Inc., NY páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

35 La presente invención abarca además anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2, y actúan como agonistas de EphA2, y/o inhiben un fenotipo de células cancerosas, preferentemente se unen a un epítopo sobre EphA2 que está expuesto en las células cancerosas y se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos de una o más CDR que comprende sustituciones, delecciones o adiciones de residuo ácido nucleico e comparación con las SEC ID Nº 10, 11, 12, 14, 15, 16, 26, 27, 28, 30, 31, o 32. El anticuerpo que comprende la una o más CDR que comprenden sustituciones, delecciones o adiciones de residuo ácido nucleico puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión o peor unión cuando se comparó con un anticuerpo que comprende una o más CDR son sustituciones, delecciones o adiciones de residuo ácido nucleico. En realizaciones específicas, uno, dos o tres residuos de la CDR se han sustituido, delecionado o añadido (es decir, mutado). Las sustituciones de ácido nucleico pueden o no cambiar la secuencia de aminoácidos de la CDR mutada.

TABLA 1

Anticuerpo	Cadena V	CDR	SEC ID Nº (aminoácido)	SEC ID Nº (ácido nucleico)	Nº de depósito en la ATCC
Eph099B-208,261					PTA-4573
	VL		1	9	
		VL1	2	10	
		VL2	3	11	
		VL3	4	12	
	VH		5	13	
		VH1	6	14	
		VH2	7	15	
		VH3	8	16	
Eph099B-233,152					PTA-5194
	VL		17	25	
		VL1	18	26	
		VL2	19	27	
		VL3	20	28	
	VH		21	29	
		VH1	22	30	
		VH2	23	31	
		VH3	24	32	
EA2					PTA-4380
	VL		33	41	
		VL1	34	42	
		VL2	35	43	
		VL3	36	44	
	VH		37	45	
		VH1	38	46	
		VH2	39	47	
		VH3	40	48	

5.1.1 Conjugados de anticuerpo

La presente invención abarca el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos condensados de forma recombinante o conjugados químicamente (incluidas las conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a un agente heterólogo, para generar una proteína de fusión. El agente heterólogo puede ser un polipéptido (o porción del mismo, preferentemente un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos), ácido nucleico, molécula pequeña (menos de 1000 dalton) o compuesto inorgánico u orgánico. La fusión no necesariamente tiene que ser directa, pero se puede producir mediante secuencias ligadoras. Los anticuerpos condensados o conjugados con agentes heterólogos pueden usarse *in vivo* para detectar, tratar, gestionar o monitorizar la progresión de un trastorno usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 93/21232; EP 439,095; Naramura y col., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; la patente de EE.UU. 5.474:981; Gillies y col., 1992, PNAS 89:1.428-1432; y Fell y col., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452. En algunas realizaciones, el trastorno que se va a detectar, tratar, gestionar o monitorizar es cáncer maligno que sobreexpresa EphA2. En otras realizaciones, el trastorno que se va a detectar, tratar, gestionar o monitorizar es una afección precancerosa asociada con células que sobreexpresan EphA2. En realizaciones específicas, la afección precancerosa es una neoplasia intraepitelial prostática (PIN) de alto grado, fibroadenoma de mama, enfermedad fibroquística o nevos compuestos.

La presente invención incluye además composiciones que comprenden agentes heterólogos condensados o

conjugados a fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos se pueden condensar o conjugar con un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab) o una porción de los mismos. En la técnica se conocen procedimientos para condensar o conjugar polipéptidos. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, and 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; las publicaciones internacionales nº WO 96/043 88 y WO 91/06570; Ashkenazi y col., 1991, PNAS 88: 10535-10539; Zheng y col., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vi1 y col., 1992, PNAS 89: 11337-11341.

5 Proteínas de fusión adicionales, por ejemplo de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152 o cualquiera de los anticuerpos enumerados en la Tabla 6 (o cualquier anticuerpo agonista de EphA2 o anticuerpo que inhibe el fenotipo de la célula cancerosa de EphA2 o anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto o anticuerpo que se une a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) puede generarse mediante las técnicas de lanzamiento génico, lanzamiento de motivo, lanzamiento de exones y/o lanzamiento de codón (en conjunto denominados "intercambio de ADN"). El intercambio de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (p. ej., anticuerpos o fragmentos de los mismos con mayores afinidades y menores tasas de disociación). Véase, en general, las patentes de EE.UU. Nº 5.605.793; 10 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten y col., 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 15 1998, Trends Biotechnol. 16:76; Hansson, y col., 1999, J. Mol. Biol. 287:265; y Lorenzo and Blasco, 1998, BioTechniques 24:308. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos se pueden alterar sometiéndolos a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a error, inserción aleatoria de nucleótidos u otros procedimientos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido 20 que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en el que las porciones se unen inmunoespecíficamente a EphA2 se pueden recombinar con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos etc. de uno o más agentes heterólogos.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos o variantes de los mismos se conjugan a 25 una secuencia marcadora, tal como un péptido, para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz y col., 1989, PNAS 86: 821, por ejemplo, la hexahistidina proporciona 30 una purificación cómoda de la proteína de fusión. Otras marcas peptídicas útiles para la purificación incluyen, entre otros, la marca de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y co1984, Cell 37:767) y la marca "flag".

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos o variantes de los mismos se conjugan a 35 un agente diagnóstico o detectable. Dichos anticuerpos pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el desarrollo o progresión de un cáncer como parte de un procedimiento de análisis clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia concreta. Adicionalmente, dichos anticuerpos pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el desarrollo o progresión de una afección precancerosa asociada con células que sobreexpresan EphA2 (p. ej., neoplasia intraepitelial prostática (PIN) de alto grado, fibroadenoma de mama, enfermedad fibroquística o nevos compuestos). En una realización, un anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto se conjuga con un agente 40 diagnóstico o detectable. En otra realización, el anticuerpo no es EA2.

Dicho diagnóstico y detección se pueden conseguir acoplando el anticuerpo a sustancias detectables, incluidas, 45 entre otras, varias enzimas, tales como, entre otras, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa, grupos prostéticos, tales como, entre otros, estreptavidina/biotina y avidina/biotina, materiales fluorescentes, tales como, entre otros, umbelifera, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, díclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, entre otros, luminol, materiales bioluminiscentes, tales como, entre otros, luciferasa, luciferina y acuorina; materiales radioactivos, tales como, entre otros, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Gd), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodinio (^{142}Pr), prometeo (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{106}Rh), rutemio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{44}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Ti), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^{3}H), xenón (^{133}Xe), 50 yterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), ytrio (^{90}Y), cinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones usando varias tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos.

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos o variantes de los mismos, se 55 conjugan con un agente terapéutico, tal como una citotoxina, por ejemplo un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion de metal radioactivo, por ejemplo emisores de alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, epirubicina y ciclofosfamida y análogos u

homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos incluyen, entre otros, antimetabolitos (p. ej., metotrexato 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (p.ej., mecloretaamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdielodiamina platino(II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (e.g., daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.ej., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitamicina y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (p.ej., vincristina y vinblastina).

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos o variantes de los mismos se conjugan a un agente terapéutico o resto farmacológico que modifica una respuesta biológica dada. Los agentes terapéuticos o restos farmacológicos no deben interpretarse como limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento neural, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo TNF- α , TNF- β , AIM I (véase la publicación internacional nº WO 97/33899), AIM II (véase la publicación internacional nº WO 97/34911), ligando de Fas (Takahashi y col., 1994, J. Immunol., 6:1567), y VEGI (véase la publicación internacional nº WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antinangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina; o un modificador de la respuesta biológica, tal como, por ejemplo, una linfoquina (p. ej., interleuquina-1 "IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF")), o un factor de crecimiento (p.ej., hormona de crecimiento ("GH")).

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos o variantes de los mismos, se conjugan con un agente terapéutico, tal como materiales radioactivos o quelantes macrocíclicos útiles para la conjugación de radiometales (véase anteriormente ejemplos de materiales radioactivos). En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaci-ciclododecano-N,N',N",N"-tetraacético (DOTA), que se puede unir al anticuerpo mediante una molécula ligadora. Dichas moléculas ligadoras se conocen habitualmente en la técnica y se describen en Denardo y col., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson y col., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman y col., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

En una realización específica, el anticuerpo conjugado es un anticuerpo frente a EphA2 que se une, preferentemente, a un epítopo de EphA2 expuesto sobre las células cancerosas pero no sobre las células no cancerosas (es decir, anticuerpos frente al epítopo expuesto en EphA2). En otra realización específica, el anticuerpo conjugado no es EA2.

Las técnicas para conjugar restos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas. Los restos se pueden conjugar con anticuerpos mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos, entre otros, enlace aldehído/Shiff, enlace sulfhidrilo, enlace ácidolábil, enlace cis-acotinilo, enlace hidrazona, enlace degradable enzimáticamente (véase, en general, Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216). Técnicas adicionales para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y col. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery," en Controlled Drug Delivery (2^a Ed.), Robinson y col. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents en Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y col. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y col. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y col., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. En la técnica se conocen procedimientos para condensar o conjugar anticuerpos con restos polipeptídicos. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; el documento EP 307.434; el documento EP 367.166; las publicaciones internacionales nº WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi y col., 1991, PNAS 88: 10535-10539; Zheng y col., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil y col., 1992, PNAS 89:11337-11341. La condensación de un anticuerpo con un resto no necesariamente tiene que se directa, sino que se puede producir a través de secuencias ligadoras. Dichas moléculas ligadoras se conocen habitualmente en la técnica y se describen en Denardo y col., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson y col., 1999, Bioconjug. Chem. 10: 553; Zimmerman y col., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50; Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216).

Como alternativa, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjuguado de anticuerpo como describe Segal en la patente de EE.UU. nº 4.676.980.

Los anticuerpos también se pueden fijar a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, entre otros, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

5.1.2 Procedimientos de producción de anticuerpos

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden producir por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular mediante síntesis química o, preferentemente, mediante técnicas de expresión recombinante.

5 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, incluido el uso de tecnologías de expresión en fagos, hibridoma y recombinante, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma, incluidas las conocidas y enseñadas en la técnica, por ejemplo en Harlow y col, "Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, y col., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981).

10 La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria, no está limitada a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un clon sencillo, incluido un clon eucariota, procariota o de fago, y no el procedimiento por el cual se produce.

15 Los procedimientos para producir y realizar detección selectiva de anticuerpos específicos usando tecnología de hibridomas son rutinarios y bien conocidos en la técnica. Brevemente, se puede inmunizar a ratones con EphA2 (bien la proteína de longitud completa o un dominio de la misma, por ejemplo el dominio extracelular o el dominio de unión a ligando) y, una vez detectada una respuesta inmunitaria, por ejemplo una vez se detecten anticuerpos específicos de EphA2 en el suero de ratón, se extrae el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos 20 se condensan después mediante técnicas bien conocidas con células de mieloma adecuadas, por ejemplo las células de la línea celular SP20 disponible en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y clonian mediante dilución límite. Después, los clones de hibridoma se analizan mediante procedimientos conocidos en la técnica para células capaces de secretar anticuerpos capaces de unirse al polipéptido de la invención. Se puede generar fluido ascítico, que generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

25 De acuerdo con esto, los anticuerpos monoclonales se pueden generar cultivando una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención, en el que, preferentemente, el hibridoma se genera condensando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con EphA2 o fragmento del mismo con células de mieloma y, después, a través de detección selectiva de los hibridomas resultantes de la condensación para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a EphA2.

30 Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos de EphA2 se pueden generar mediante cualquier técnica conocida para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos Fab y F(ab')2 de la invención mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')2). Los fragmentos F(ab')2 contienen la 35 región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Además, los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar usando varios procedimientos de expresión en fagos conocidos en la técnica.

40 En los procedimientos de expresión en fagos, los dominios de anticuerpo funcional se expresan sobre la superficie de las partículas del fago que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VK se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (p. ej., bibliotecas de ADNc de ser humano o murino de tejidos linfoides). El ADN que codifica los dominios VH y VL se recombinan junto con un ligador de scFv mediante PCR y se clonian en un vector fagomido (p. ej., pCANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector se somete a electroporación en *in E. coli* y *E. coli* se infecta con el fago colaborador. El fago usado en estos procedimientos es, normalmente, un fago filamentoso, incluidos fd y M13, y los dominios Vh y Vd. están, normalmente, condensados de forma recombinante a gen III o el gen VIII del fago. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al epítopo de EphA2 de interés, se pueden seleccionar o identificar con el antígeno, por ejemplo usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado por una superficie sólida o esfera. Ejemplos de procedimientos de expresión en fagos que se pueden usar para fabricar los anticuerpos de la presente invención incluyen los divulgados en Brinkman y col., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames y col., 1995, J. Immunol. Methods 184:177; Kettleborough y col., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic y col., 45 1997, Gene 187:9; Burton y col., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; la solicitud internacional nº PCT/GB91/01134; las publicaciones internacionales WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, y WO97/13844; y las patentes de EE.UU. nº 5.698.426, 5.223.409, 5.443.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.521.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.655.727, 5.733.743 y 5.969.108.

55 Los fagos se pueden someter a detección selectiva para detectar la unión a EphA2, particularmente del dominio extracelular de EphA2. También se puede realizar detección selectiva de la actividad agonista de EphA2 (p. ej.,

incremento de la fosforilación de EphA2, reducción de los niveles de EphA2) o actividad inhibidora del fenotipo de células cancerosas (p. ej., reducción de la formación de colonias en agar blando o la formación de redes tubulares en una preparación tridimensional de membrana basal o matriz extracelular, tal como MATRIGEL™) o, preferentemente, la unión a un epítopo de EphA2 expuesta sobre células cancerosas pero no sobre células no cancerosa (p. ej., que se unen mal a EphA2 unido al ligando en los contactos célula-célula, mientras que se unen bien a EphA2 que no está unido a ligando o en contactos célula-célula).

Como se ha descrito en las referencias anteriores, tras la selección del fago se pueden aislar del fago las regiones que codifican el anticuerpo y usar para generar anticuerpos enteros, incluidos anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresar en cualquier huésped deseado, incluidas células de mamífero, 5 células de insecto, células de plantas, levaduras y bacterias, por ejemplo como se describe con detalle más adelante. También se pueden emplear técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando 10 procedimientos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación internacional nº WO 92/22324; Mullinax y col., 1992, BioTechniques 12:864; Sawai y col., 1995, AJRI 34:26; y Better y col., 1988, Science 240:1041.

Para generar anticuerpos enteros se pueden usar cebadores de PCR, incluidas secuencias nucleotídicas de VH y 15 VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción, para amplificar las secuencias de VH y VL en los clones de scFv. Usando técnicas de clonación conocidas para los expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante de VH, por ejemplo, la región constante 4 gamma humana, y los dominios VL amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante de VL, por ejemplo regiones constantes kappa o lambda humanas. 20 Preferentemente, los vectores para expresar los dominios VH o VL comprenden un promotor de EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable, el dominio constante, y un marcador de selección, tal como, neomicina. Los dominios VH o VL también se pueden clonar en un vector que exprese las necesarias regiones constantes. Después, los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena ligera se co-transfieren a líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresen 25 anticuerpos de longitud completa, por ejemplo IgG, usando técnicas conocidas para los expertos en la técnica.

Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos humanos o químéricos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluidos procedimientos de expresión en fagos descritos 30 en lo que antecede usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también las patentes de EE.UU. nº 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones internacionales nº WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WHO 96/33735 y WO 91110741.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar 35 inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos del gen de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana se pueden introducir aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad se puede introducir en células madre embrionarias de ratón, además de los genes de las cadenas ligera y pesada humanas. Los genes de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina de ratón se pueden hacer no funcionales por separado o simultáneamente a la introducción de loci 40 de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región J_H previene la producción endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocitos para producir ratones químéricos. Los ratones químéricos se crían después para producir descendencia homocigota que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan del modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los 45 anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener a partir de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B y, después, sufren un cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una revisión de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y 50 Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 98/24893, WO 96/34096, y WO 96/33735; y las patentes de EE.UU. nº 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598.

Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) se pueden comprometer 55 para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita en lo que antecede.

Un anticuerpo químérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina, tales como que tienen una región variable derivada de un anticuerpo no humano y

una región constante de inmunoglobulina humana. En la técnica se conocen los procedimientos para producir anticuerpos químéricos. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi y col., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies y col., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; y las patentes de EE.UU. nº 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397. Los anticuerpos químéricos que comprenden una o más CDR de una especie no humana y

5 regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluidas, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239,400; publicación internacional nº WO 91/09967; y patentes de EE.UU. nº 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (documentos EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka y col., 1994, *Protein Engineering* 7:805; y Roguska y col., 1994, *PNAS* 91:969), e intercambio de cadenas (patente de EE.UU. nº 5.565.332). En una realización, un anticuerpo químérico de la invención se une inmunoespecíficamente a EphA2 y comprende uno, dos o tres CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152 en las regiones estructurales humanas. En una realización específica, un anticuerpo químérico de la invención se une inmunoespecíficamente a EphA2 y comprende una CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2, 3, 4, 18, 19, o 20. En

10 otra realización, un anticuerpo químérico de la invención se une inmunoespecíficamente a EphA2 y comprende uno, dos o tres CDR de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VH de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248 o Eph099B-233.152 en las regiones estructurales humanas. En una realización específica, un anticuerpo químérico de la invención se une inmunoespecíficamente a EphA2 y comprende una CDR de VH que tienen una secuencia de aminoácidos SEC ID Nº 6, 7, 8, 22, 23 o 24. En una realización

15 preferida, un anticuerpo químérico de la invención se une inmunoespecíficamente a EphA2 y comprende una, dos o tres CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, o Eph099B-233.152 y que además comprende una, dos o tres CDR de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VH de Eph099B-102.147, Eph099B-205.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152 en las regiones estructurales humanas.

20 En una realización específica preferida, un anticuerpo químérico de la invención se une inmunoespecíficamente a EphA2 y comprende una CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2, 3, 4, 18, 19 o 20 y además comprende una CDR de VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID Nº 6, 7, 8, 22, 23 o 24. En una realización más preferida, un anticuerpo químérico de la invención se une inmunoespecíficamente a EphA2 y comprende tres CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, o Eph099B-233.152 y tres CDR de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VH de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099E-210.248, Eph099B-233.152 en las regiones estructurales humanas. En una realización todavía más preferida, un anticuerpo químérico de la invención se une inmunoespecíficamente a EphA2 y comprende CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº 2, 3, 4, 18, 19, o 20 y además comprende CDR de VH que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 6, 7, 8, 22, 23 o 24.

35 A menudo, los residuos de la estructura en las regiones de estructura estarán sustituidos con el correspondiente residuo del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en la estructura se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica mediante, por ejemplo, modelización de las interacciones de los residuos de la CDR y la estructura para identificar los residuos de la estructura importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de las estructura inusuales en posiciones concretas. (Véase, p. el., la patente de EE.UU. Nº 5.585.089 y Riechmann y col., 1988, *Nature* 332:323).

40 Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo o su variante o fragmento del mismo que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región de estructura que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones de estructura son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado puede también comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Habitualmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como, al menos, el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4, de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado se puede seleccionar de cualquier tipo de inmunoglobulinas, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y de cualquier isotipo, incluidos IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Normalmente, el dominio constante es un dominio constante de fijación al complemento, en el que se desea que el anticuerpo humanizado exhiba actividad citotóxica, y la clase es, habitualmente, IgG₁. Cuando no se desea dicha actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de la clase IgG₂. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo y seleccionar dominios constantes concretos para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia en la técnica. Las regiones de estructura y CDR de un anticuerpo

humanizado no tienen que corresponder exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR donante o la estructura consenso pueden estar mutageneizadas mediante sustitución, inserción o delección de al menos un residuo, de modo que la CDR o el residuo de estructura en el punto no corresponde con el consenso o con el anticuerpo importado. No obstante, dichas mutaciones no serán extensas. Normalmente, al menos el 75 % de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias parentales, de la región estructural (FR) y CDR, con mayor frecuencia el 90 % y, más preferentemente, más del 95 %. Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando una variedad de técnicas conocidas en la materia, incluidas, entre otras, injerto de CDR (patente europea EP 239.400; publicación internacional WO 91/09967; y las patentes de EE.UU. nº 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (patentes europeas nº EP 592,106 y EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka y col., 1994, Protein Engineering 7:805-814; y Roguska y col., 1994, PNAS 91:969-973), intercambio de cadenas (patente de EE.UU. nº 5.565.332) y técnicas divulgadas en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 407,213, 5,766,886, 5,585,089, la publicación internacional nº WO 9317105, Tan y col., 2002, J. Immunol. 169:1119-25, Caldas y col., 2000, Protein Eng. 13:353-60, Morea y col., 2000, Methods 20:267-79, Baca y col., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska y col., 1996, Protein Eng. 9:895-904, Couto y col., 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s, Couto y col., 1995, Cancer Res. 55:1717-22; Sandhu, 1994, Gene 150:409-10; Pedersen y col., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73; Jones y col., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann y col., 1988, Nature 332:323; y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596. A menudo, los residuos estructurales en las regiones estructurales estarán sustituidos con el correspondiente residuo del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones en la estructura se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica mediante, por ejemplo, modelización de las interacciones de los residuos de la CDR y la estructura para identificar los residuos de la estructura importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de las estructuras inusuales en posiciones concretas. (Véase, p. ej., Queen y col., la patente de EE.UU. Nº 5.585.089 y Riechmann y col., 1988, Nature 332:323).

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención pueden usarse, a su vez, para generar anticuerpos antiidiotípico usando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Greenspan & Bona, 1989, FASEB J. 7:437-444; y Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147:2429-2438). La invención proporciona procedimientos empleando el uso de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo.

5.1.3 Polinucleótidos que codifican un anticuerpo

Los procedimientos de la invención también abarcan polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación muy rigurosas, de rigurosidad intermedia o baja, por ejemplo, como se ha definido anteriormente, polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención.

Se pueden obtener los polinucleótidos y determinar la secuencia nucleotídica de los polinucleótidos por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Ya que se conocen las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos, las secuencias nucleotídicas que codifican estos anticuerpos se puede determinar usando procedimientos bien conocidos en la técnica, es decir codones de nucleótidos que se sabe que codifican aminoácidos concretos se ensamblan de tal modo que generan un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención. Dicho polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (p. ej., como se ha descrito en Kutmeier y col., 1994, BioTechniques 17:242), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y la unión de dichos oligonucleótidos y, después, la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo se puede generar a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no se dispone de un clon que contenga un ácido nucleico que codifica un anticuerpo concreto, pero se conoce la secuencia de la molécula del anticuerpo (p. ej., véase la FIG. 19), un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de una fuente adecuada (p. ej., una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o un ácido nucleico, preferentemente ARN poliA+, aislado de, cualquier tejido o célula que exprese el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas de modo que expresen un anticuerpo de la invención, por ejemplo los clones depositados en la ATCC como PTA-4572, PTA-4573, y PTA-4574) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda oligonucleotídica específica de la secuencia génica concreta para identificar, por ejemplo, un clone de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. A continuación, los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR se pueden clonar en vectores de clonación replicables usando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo se puede manipular usando procedimientos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR etc. (véase, por ejemplo, las

técnicas descritas en Sambrook y col., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel y col., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos.

- 5 En una realización específica, una o más de las CDR se inserta dentro de las regiones estructurales usando técnicas de ADN recombinante de rutina. Las regiones estructurales pueden ser regiones estructurales naturales o de consenso y, preferentemente, regiones estructurales humanas (véase, por ejemplo, Chothia y col., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para un listado de regiones estructurales humanas). Preferentemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones estructurales y las CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a EphA2.
- 10 Preferentemente, como se ha tratado anteriormente, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones estructurales y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, dichos procedimientos se pueden usar para realizar sustituciones o delecciones de aminoácidos de una o más residuos de cisteína en la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. La presente invención abarca otras alteraciones en el polinucleótido y están dentro de la experiencia de la técnica.
- 15

5.1.4 Expresión recombinante de un anticuerpo

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, derivado, análogo o fragmento del mismo, (p. ej., una cadena ligera o pesada de un anticuerpo de la invención o una porción del mismo o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención), requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, una porción del mismo (que preferentemente, aunque no necesariamente, contiene el dominio variable de la cadena pesada o ligera), de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, en el presente documento se describen procedimientos para preparar una proteína que expresa un polinucleótido que contiene un anticuerpo, que codifica una secuencia nucleotídica. Se pueden usar procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican anticuerpos y las señales adecuadas de control de la transcripción y la traducción. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por tanto, la invención proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una CDR de la cadena pesada o ligera, operablemente unida a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 86/05807 y WO 89/01036; y las patentes de EE.UU. nº 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo pueden clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o las cadenas pesada y ligera completas.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y, después, las células transfeccionadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Por tanto, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o una porción del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención, operablemente unido a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden co-expresar en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, como se detalla más adelante.

Para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención se pueden usar numerosos sistemas de huésped-vector de expresión (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.807.715). Dichos sistemas huésped-expresión representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias de codificación de interés y, posteriormente, se pueden purificar, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfeccionan con las secuencias nucleotídicas codificadoras adecuadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, entre otros, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión ADN de bacteriófago recombinante, de ADN plasmídico o de ADN de cónsimo, que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; levaduras (*Saccharomyces Pichia*) transformadas con vectores de expresión recombinante de levaduras que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión recombinante de virus (p. ej., baculovirus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión en virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión en plásmidos recombinante (p. ej., plásmido Ti) que

contienen secuencias de codificación de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinante que contiene promotores derivados del genoma de células de mamífero (p. ej., promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus, el promotor 7,5 K del virus vaccinia). Preferentemente, las células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, y, más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinante completas, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tal como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking y col., 1986, Gene 45:101; y Cockett y col., 1990, BioTechnology 8:2). En una realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y son agonistas de EphA2, inhiben un fenotipo de célula cancerosa, se unen, preferentemente, a epítopos sobre EphA2 que están expuestos de forma selectiva o han aumentado sobre las células cancerosas, peor no en las células no cancerosas, y/o tienen una K_{off} inferior a 3×10^{-3} s⁻¹, está regulada por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido.

En los sistemas bacterianos, de forma ventajosa se pueden seleccionar numerosos vectores de expresión en función del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se exprese. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles elevados de productos proteicos de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, entre otros, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., 1983, EMBO 12:1791), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede estar unida individualmente en el vector dentro del marco de la región de codificación lacZ, de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante adsorción y unión en una matriz de perlas de glutatión-agarosa, seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se han diseñado para que incluyan trombina o sitios de escisión por la proteasa del factor Xa de modo que el producto del gen diana clonado se pueda liberar de la fracción GST.

En un sistema de insectos, como vector para expresar genes extraños se usa el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV). El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (p. ej., el gen de la poliedrina) del virus y se coloca bajo el control de un promotor de AcNPV, por ejemplo el promotor de la poliedrina.

En células huésped de mamífero se puede usar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación de anticuerpo de interés se puede unir a un complejo de adenovirus de control de la transcripción/traducción, por ejemplo el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Después, este gen químérico se puede insertar en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p. ej., región E1 o E3) tendrá como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (p. ej., véase, Logan & Shenk, 1984, PNAS 81:355-359). También se pueden requerir señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de las secuencias de codificación de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación tiene que estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales exógenas de control de la traducción y los codones de iniciación pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados, terminadores de la transcripción etc. (véase, por ejemplo, Bittner y col., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

Además, se puede escoger una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de las proteínas. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación posttraduccional de proteínas y productos génicos. Las líneas celulares o sistemas de huéspedes adecuados se pueden escoger de modo que se asegure una correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Con este fin se pueden usar células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen, entre otras, células CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O, NS1 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7030 y HsS78Bst.

Para la producción a largo plazo y con un rendimiento alto de proteínas recombinantes se prefiere la expresión

estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable la molécula anticuerpo de pueden someter a ingeniería. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado mediante elementos de control de la expresión adecuados (p. ej., promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, las células sometidas a ingeniería se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y, después, se pasan a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en las líneas celulares. Este procedimiento puede usarse de forma ventajosa para someter las líneas celulares que expresan la molécula anticuerpo a ingeniería. Dichas líneas celulares sometidas a ingeniería pueden ser particularmente útiles en la detección selectiva y la evaluación de composiciones que interaccionan directa o indirectamente con la molécula anticuerpo.

Se pueden usar numerosos sistemas de selección, incluidos, entre otros, los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., 1977, Cell 11:223), glutamina sintetasa, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:202), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., 1980, Cell 22:8-17) se pueden emplear en las células tk-, gs-, hgprt- o apt, respectivamente. Asimismo, se puede usar resistencia antimetabolito como la base de la selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y col., 1980, PNAS 77:357; O'Hare y col., 1981, PNAS 78:1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofénólico (Mulligan & Berg, 1981, PNAS 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3:87; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573; Mulligan, 1993, Science 260:926; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191; May, 1993, TIB TECH 11:155-); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y col., 1984, Gene 30:147). Los procedimientos habitualmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante se pueden aplicar de forma rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado y dichos procedimientos se describen en, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., 1981, J. Mol. Biol. 150:1.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo de pueden aumentar mediante amplificación en vector (para una revisión, véase Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el incremento del nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse y col., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula huésped se puede co-transfeccionar con dos vectores de expresión de la invención, en el que el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifica, y es capaz de expresa, ambos polipéptidos, de la cadena pesada y de la cadena ligera. En estas situaciones, la cadena ligera se debería colocar antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; y Kohler, 1980, PNAS 77:2197). Las secuencias codificadoras de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención mediante expresión recombinante, se puede purificar por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo mediante cromatografía (p. ej., cromatografía en columna de intercambio iónico, de afinidad, particularmente de afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos se pueden condensar con secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica por que facilitan la purificación.

5.2 Usos profilácticos/terapéuticos

La presente invención abarca procedimientos para tratar, prevenir o gestionar una afección o trastorno asociado con la sobreexpresión de EphA2 y/o trastornos de hiperproliferación celular, preferentemente cáncer, en un sujeto, que comprende administrar uno o más anticuerpos agonistas de EphA2 que se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ y que son, opcionalmente, anticuerpos que inhiben el fenotipo de célula cancerosa de EphA2 o anticuerpos frente a epítopo en EphA2, preferentemente uno o más anticuerpos monoclonales (o anticuerpos de alguna otra fuente de una especie de anticuerpo sencillo) agonistas de EphA2 que se unen a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ y que son, opcionalmente, anticuerpos que inhiben el fenotipo de célula cancerosa de EphA2 o anticuerpos frente a epítopo en EphA2. En una realización específica, el trastorno que se va a tratar, prevenir o gestionar es cáncer maligno. En otra realización específica, el trastorno que se va a tratar, prevenir o gestionar es una afección precancerosa asociada con células que sobreexpresan EphA2. En realizaciones más específicas, la afección precancerosa asociada es una neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN), fibroadenoma de mama, enfermedad fibroquística o nevo compuesto.

En una realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles en el tratamiento, prevención o gestión de enfermedades o trastornos asociados con la sobreexpresión de EphA2, trastornos hiperproliferativos y/o cáncer. En ciertas realizaciones, uno más anticuerpos frente a EphA2 de la invención se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, de forma concurrente con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer. La expresión "de forma concurrente" no se limita a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos exactamente a la vez, sino que en su lugar se quiere decir que los anticuerpos frente a EphA2 de la invención y el otro agente se administran a un sujeto en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos de la invención puedan actuar junto con el otro agente para proporcionar un mayor beneficio que si se administraran por separado. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico se puede administrar a la vez o secuencialmente en cualquier orden a diferentes puntos de tiempo; no obstante, si no se administran a la vez, deberán administrarse lo suficientemente cercanos en el tiempo que proporcionen el efecto profiláctico o terapéutico deseado. Cada agente terapéutico se puede administrar por separado en cualquier forma adecuada y por cualquier vía adecuada. En otras realizaciones, los anticuerpos frente a EphA2 de la invención se administran antes, de forma concurrente o después de la cirugía. Preferentemente, la cirugía elimina completamente los tumores localizados o reduce el tamaño de los tumores grandes. La cirugía también se puede realizar como medida preventiva o para aliviar el dolor.

En realizaciones preferidas, el uno o más anticuerpos frente a EphA2 de la invención consisten en Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248 y Eph099B-233.152. En una realización más preferida, los anticuerpos consisten en Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, que se han humanizado. En otras realizaciones se proporcionan variantes de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, por ejemplo con una o más sustituciones de aminoácidos, particularmente en el dominio variable, que tienen mayor actividad, capacidad de unión etc. en comparación con Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152.

En otra realización específica, los procedimientos profilácticos o terapéuticos de la invención comprenden la administración de un inhibidor de la expresión de EphA2, tales como, entre otros, ácidos nucleicos antisentido específicos de EphA2, ARN bicatenario de EphA2 que participa en ARNi, ribozimas anti-EphA2 etc. (véase la Sección 5.4, más adelante) o un agonista de la actividad de EphA2 distinto a un anticuerpo frente a EphA2, tales como inhibidores de molécula pequeña o agonistas de la actividad de EphA2.

En otras realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran separados por menos de 1 hora, separados por aproximadamente 1 hora, separados por aproximadamente de 1 hora a aproximadamente 2 horas, separados por aproximadamente de 2 horas a aproximadamente 3 horas, separados por aproximadamente de 3 horas a aproximadamente 4 horas, separados por aproximadamente de 4 horas a aproximadamente 5 horas, separados por aproximadamente de 5 horas a aproximadamente 6 horas, separados por aproximadamente de 6 horas a aproximadamente 7 horas, separados por aproximadamente de 7 horas a aproximadamente 8 horas, separados por aproximadamente de 8 horas a aproximadamente 9 horas, separados por aproximadamente de 9 horas a aproximadamente 10 horas, separados por aproximadamente de 10 horas a aproximadamente 11 horas, separados por aproximadamente de 11 horas a aproximadamente 12 horas, separados por no más de 24 horas o separados por no más de 48 horas. En realizaciones preferidas, dos o más componentes se administran en la misma visita del paciente.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en el presente documento entran dentro de las expresiones terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosificación y la frecuencia variarán además habitualmente de acuerdo con factores específicos para cada paciente en función de los agentes profilácticos o terapéuticos administrados, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y el historial médico del paciente. Un experto en la técnica puede seleccionar regímenes adecuados considerando dichos factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones indicadas en la

literatura y recomendadas en el Physician's Desk Reference (56 ed., 2002).

5.2.1 Población de pacientes

La invención proporciona anticuerpos para tratar, prevenir o gestionar una afección o trastorno asociado con la sobreexpresión de EphA2 y/o trastornos de hiperproliferación celular, particularmente cáncer, administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más anticuerpos frente a EphA2 de la invención. En otra realización, los anticuerpos frente a EphA2 de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. El sujeto es, preferentemente, un mamífero, tal como un no primate (p. ej., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (p. ej., un mono, tal como un mono cinomolgo, y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Ejemplos específicos de cánceres que se pueden tratar mediante los anticuerpos abarcados por la invención incluyen, entre otros, cánceres que sobreexpresan EphA2: En una realización adicional, el cáncer es de origen epitelial. Ejemplos de estos cánceres son cáncer de pulmón, de colon, de próstata, de mama y de piel. Otros cánceres incluyen cáncer de la vejiga urinaria y de páncreas, y cáncer de carcinoma de células renales y melanoma. Cánceres adicionales se enumeran a modo de ejemplo, y no como limitación, en la sección siguientes 5.2.1.1. En realizaciones concretas, los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar y/o, prevenir metástasis de tumores primarios.

Los anticuerpos y composiciones de la invención comprenden la administración de uno o más anticuerpos frente a EphA2 de la invención a sujetos/pacientes que sufren, o se prevé que vayan a sufrir, cáncer, por ejemplo que tienen una predisposición genética para un tipo concreto de cáncer, han estado expuestos a un carcinógeno o están en remisión de un cáncer concreto. Como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a cánceres primarios o metastásicos. Dichos pacientes pueden o no haber recibido tratamiento previo para cáncer. Los anticuerpos y composiciones de la invención se pueden usar como tratamiento de primera línea o de segunda línea para el cáncer. En la invención también se incluye el tratamiento de pacientes sometidos a otras terapias para el cáncer y los anticuerpos y composiciones de la invención se pueden usar antes de que se produzca algún efecto adverso o intolerancia a estas otras terapias de cáncer. La invención también abarca anticuerpos para administrar para tratar o mejorar los síntomas en pacientes resistentes. En una realización concreta, que un cáncer sea resistente a una terapia significa que al menos una porción significativa de las células cancerosas no se mueren o su división no se detiene. La determinación de si las células cancerosas son resistentes se puede realizar *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para analizar la eficacia del tratamiento sobre las células cancerosas, usando los significados aceptados en la técnica de "resistente" en dicho contexto. En varias realizaciones, un cáncer es resistente cuando el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente o ha aumentado. La invención también abarca uno o más anticuerpos agonistas de EphA2 para prevenir el inicio o recurrencia del cáncer en pacientes predispuestos a sufrir cáncer. Preferentemente, el anticuerpo monoclonal es uno o más de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152.

En realizaciones concretas, los anticuerpos frente a EphA2 de la invención, u otras terapéuticas que reducen la expresión de EphA2, se administran para invertir la resistencia o la menor sensibilidad de las células cancerosas a ciertos agentes hormonales, radiación o quimioterapéuticos, de modo que se resensibilizan las células cancerosas a uno o más de estos agentes, que se pueden administrar después (o continuar administrándose) para tratar o gestionar el cáncer, incluido prevenir la metástasis. En una realización específica, los anticuerpos frente a EphA2 de la invención se administran a pacientes con mayores niveles de la citocina IL-6, que se ha asociado con el desarrollo de resistencia de las células cancerosas a diferentes regímenes de tratamiento, tal como quimioterapia y terapia hormonal. En otra realización específica, los anticuerpos frente a EphA2 de la invención se administran a pacientes que sufren cáncer de mama que tienen una capacidad de respuesta disminuida o son resistentes al tratamiento con tamoxifeno. En otra realización específica, los anticuerpos frente a EphA2 de la invención se administran a pacientes con mayores niveles de la citocina IL-6, que se ha asociado con el desarrollo de resistencia de las células cancerosas a diferentes regímenes de tratamiento, tal como quimioterapia y terapia hormonal.

En realizaciones alternativas, la invención proporciona anticuerpos para tratar pacientes con cáncer administrando uno o más anticuerpos frente a EphA2 de la invención en combinación con cualquier otro tratamiento o pacientes con resistencia demostrada a otros tratamientos, pero que ya no están recibiendo estos tratamientos. Preferentemente, el anticuerpo frente a EphA2 es uno o más de Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152. En ciertas realizaciones, los pacientes en tratamiento con los anticuerpos de la invención son pacientes ya tratados con quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes se encuentran pacientes resistentes y aquéllos con cáncer a pesar del tratamiento con las terapias existentes para el cáncer. En otras realizaciones, los pacientes han sido tratados y no tienen actividad de la enfermedad, y se administran uno o más anticuerpos agonistas de la invención para prevenir la recurrencia del cáncer.

En realizaciones preferidas, el tratamiento existente es quimioterapia. En realizaciones concretas, el tratamiento existente incluye administración de quimioterapias que incluyen, entre otros, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina,

5 dacarbazina, procarbizina, etopósidos, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, etc. Entre estos pacientes se encuentran los pacientes tratados con radioterapia, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos, estos pacientes son aquéllos que han sido sometidos a cirugía para el tratamiento del cáncer.

Como alternativa, la invención también abarca anticuerpos para calentar pacientes que están recibiendo, o han recibido, radioterapia. Entre estos, se encuentran los pacientes en tratamiento o previamente tratados con quimioterapia, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia. También estos pacientes se encuentran aquéllos que han sido sometidos a cirugía para el tratamiento del cáncer.

10 En otras realizaciones, la invención abarca anticuerpos para tratar pacientes que están recibiendo, o han recibido, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos, se encuentran los pacientes en tratamiento o previamente tratados con quimioterapia, y/o radioterapia. También estos pacientes se encuentran aquéllos que han sido sometidos a cirugía para el tratamiento del cáncer.

15 Adicionalmente, la invención también proporciona anticuerpos para el tratamiento del cáncer como una alternativa a la quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, en los que se ha demostrado o se puede demostrar que la terapia es demasiado tóxica, es decir resultados con efectos secundarios inaceptables o insopportables, para el sujeto que está siendo tratado. El sujeto que se está tratando con los anticuerpos de la invención pueden recibir, opcionalmente, otros tratamientos para el cáncer, tal como cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica, en función de qué tratamiento era inaceptable o insopportable.

20 En otras realizaciones, la invención proporciona la administración de uno o más anticuerpos monoclonales agonistas de la invención sin ninguna otra terapia para el cáncer, pero que se ha demostrado que es resistente a dichos tratamientos. En realizaciones específicas, a los pacientes resistentes a otras terapias para el cáncer se administra uno o más anticuerpos monoclonales agonistas en ausencia de terapias para el cáncer.

25 En otras realizaciones, se puede administrar a los pacientes con una afección precancerosa asociada con células que sobreexpresan EphA2 anticuerpos de la invención para tratar el trastorno y disminuir la probabilidad de que progrese a cáncer maligno. En realizaciones específicas, la afección precancerosa es una neoplasia intraepitelial prostática (PIN) de alto grado, fibroadenoma de mama, enfermedad fibroquística o nevos compuestos.

30 En otras realizaciones más, la invención proporciona anticuerpos para tratar, prevenir y gestionar trastornos de hiperproliferación celular no cancerosos, particularmente los asociados con sobreexpresión de EphA2, incluidos, entre otros, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), reestenosis (músculo liso y/o endotelial), psoriasis etc. Estos procedimientos incluyen procedimientos análogos a los descritos anteriormente para tratar, prevenir y gestionar cáncer, por ejemplo, administrando los anticuerpos frente a EphA2 de la invención, así como agentes que inhiben la expresión de EphA2, terapia de combinación, administración a pacientes resistentes a tratamientos concretos etc.

35 **5.2.1. Cánceres**

40 Los cánceres y trastornos relacionados que se pueden tratar, prevenir o gestionar mediante procedimientos y composiciones de la presente invención incluyen, entre otros, cánceres de origen celular epitelial. Ejemplos de dichos cánceres incluyen los siguientes: Leucemias, tales como, entre otras, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemias mieloblasticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monolíticas y eritroleucemia, y síndrome mielodisplásico; leucemias crónicas, tales como, entre otras, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células peludas; policitemia vera; linfomas, tales como, entre otros, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de no Hodgkin-, mielomas múltiples, tales como, entre otros, mieloma múltiple indolente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammopatía monoclonal de significado indeterminado; gammopatía monoclonal benigna; enfermedad de las cadenas pesadas; sarcomas de tejidos óseo y conjuntivo, tales como, entre otros sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma óseo, cordoma, sarcoma periósteo, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemmoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales, tales como, entre otros, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendrogioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama, incluidos, entre otros, carcinoma ductal, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, tales como, entre otros, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides, tales como, entre otros, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas, tales como, entre

otros, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, y tumor carcinoide o de las células del islote; cánceres hipofisarios, tales como, entre otros, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalía y diabetes insípida; cánceres oculares, tales como, entre otros, melanoma ocular, tales como melanoma de iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales, tales como, cánceres de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, tal como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicales, tales como, entre otros, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres de útero, tales como, entre otros, carcinoma endometrial y sarcoma de útero; cánceres de ovario, tales como, entre otros, carcinoma ovárico epitelial, tumor límite, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres esofágicos, tales como, entre otros, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma cístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago, tales como, entre otros, adenocarcinoma, linfoma maligno fungoide (polipoide), ulceroso, superficial en diseminación, en diseminación difusa, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres hepáticos, tales como, entre otros, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vesícula biliar, tales como, entre otros, adenocarcinoma; colangiocarcinomas, tales como, entre otros, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón, tales como cáncer de pulmón amicrocítico, carcinoma de células escamosas (carcina epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón microcítico; cánceres de testículos, tales como, entre otros, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, teratoma carcinoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata, tales como, entre otros, neoplasia prostática intraepitelial, adenocarcinoma, leiomiosarcoma y rabdomiosarcoma; cánceres del pene; cánceres orales, tales como, entre otros, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de la glándula salivar tales como, entre otros, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide, y carcinoma adenoidecístico; cánceres de faringe, tales como, entre otros, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel, tales como, entre otros, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres renales, tales como, entre otros, carcinoma de células renales, adenocarcinoma, hipernefroma, fibrosarcoma, cáncer de células transiionales (renal pelvis y/o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga urinaria, tales como, entre otros, carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de dichos trastornos, véase, Fishman y col., 1985, Medicine, 2^a Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia y Murphy y col., 1997, Informed Decisions The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America)

De acuerdo con esto, los anticuerpos y composiciones de la invención también son útiles en el tratamiento o prevención de diversos cánceres u otras enfermedades de proliferación anormal, incluidas (entre otras), las siguientes: carcinoma, incluido el de vejiga urinaria, de mama, de colon, renal, hepático, pulmonar, de ovarios, de páncreas, de estómago, de cuello uterino, de tiroides y de piel; incluido carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluida leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt'; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma y rabdomioscarcoma; otros tumores, incluidos melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluidos melanoma, xeroderma pigmentosum, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres causados por aberraciones en la apoptosis también se tratarían mediante los procedimientos y composiciones de la invención. Dichos cánceres pueden incluir, entre otros, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovarios, y lesiones precancerosas, tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, los cambios a malignidad o de alteración de la proliferación (tales como metaplasias y displasias) o trastornos hiperproliferativos se tratan o previenen en la piel, pulmones, colon, mama, próstata, de vejiga urinaria, de riñón, de páncreas, de ovarios o de útero. En otras realizaciones específicas, el sarcoma, el melanoma o la leucemia se tratan o previenen.

En algunas realizaciones, el cáncer es maligno y sobreexpresa EphA2. En otras realizaciones, el trastorno que se va a tratar es una afección precancerosa asociada con células que sobreexpresan EphA2. En realizaciones específicas, la afección precancerosa es una neoplasia intraepitelial prostática (PIN) de alto grado, fibroadenoma de mama, enfermedad fibroquística o nevos compuestos.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos y composiciones de la invención se usan para el tratamiento y/o la prevención de cánceres de mama, de colon, de ovarios, de pulmón y de próstata, y se proporcionan

más adelante como ejemplo y no como limitación.

5.2.1.2. Tratamiento del cáncer de mama

En realizaciones específicas, se administra a los pacientes con cáncer de mama una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes útiles para la terapia del cáncer de mama, incluidos, entre otros: doxorubicina, epirubicina, la combinación de doxorubicina y ciclofosfamida (AC), la combinación de ciclofosfamida, doxorubicina y 5-fluorouracilo (CAF), la combinación de ciclofosfamida, epirubicina y 5-fluorouracilo (CEF), herceptina, tamoxifeno, la combinación de tamoxifeno y quimioterapia citotóxica, taxanos (tales como docetaxel y paclitaxel). En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se pueden administrar con taxanos más doxorubicina y ciclofosfamida estándar para tratamiento adyuvante de cáncer de mama localizado con ganglio positivo.

En una realización específica, se administra a los pacientes con fibroadenoma precanceroso de la mama o enfermedad fibroquística un anticuerpo frente a EphA2 de la invención para tratar el trastorno y disminuir la probabilidad de que progrese a cáncer de mama maligno. En otra realización específica, se administra a los pacientes resistentes al tratamiento, particularmente terapia hormonal, más particularmente terapia con tamoxifeno, un anticuerpo frente a EphA2 de la invención para tratar el cáncer y/o convertir al paciente en no resistente o respondedor.

5.2.1.3. Tratamiento del cáncer de colon

En realizaciones específicas, se administra a los pacientes con cáncer de colon una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes útiles para la terapia del cáncer de colon, incluidos, entre otros: la combinación de 5-FU y leucovorina, la combinación de 5-FU y levamisol, irinotecán (CPT-11) la combinación de irinotecán, 5-FU y leucovorina (IFL).

5.2.1.4. Tratamiento del cáncer de próstata

En realizaciones específicas, se administra a los pacientes con cáncer de próstata una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes útiles para la terapia del cáncer de próstata, incluidos, entre otros: radioterapia de haz externo, implantación intersticial de radioisótopos (es decir, ¹²⁵I, paladio, iridio), leuprorelina, y otros agonistas de LHRH, antiandrógenos no esteroideos (flutamida, nilutamida, bicalutamida), antiandrógenos esteroideos (acetato de ciproterona), la combinación de leuprorelina y flutamida, estrógenos, tales como DES, clorotriานiseno, etinilestradiol, estrógenos conjugados U.S.P., DES-difosfato, radioisótopos, tales como estroncio-89, la combinación de radioterapia de haz externo y estroncio-89, terapias hormonales de segunda línea, tales como aminoglutetimida, hidrocortisona, retirada de flutamida, progesterona y quetoconazol, prednisona a dosis bajas u otros regímenes de quimioterapia que producen mejoras subjetivas de los síntomas y reducción de los niveles de PSA, incluidos docetaxel, paclitaxel, estramustina/docetaxel, estramustina/etopósido, estramustina/vinblastina y estramustina/paclitaxel.

En una realización específica, se administra a los pacientes con neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) precancerosa un anticuerpo frente a EphA2 de la invención para tratar el trastorno y disminuir la probabilidad de que progrese a cáncer de mama maligno.

5.2.1.5. Tratamiento del melanoma

En realizaciones específicas, se administra a los pacientes con melanoma una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes útiles para la terapia del melanoma, incluidos, entre otros: dacarbazine (DTIC), nitrosoureas tales como carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), agentes con actividad modesta de un solo agente, incluidos alcaloides de la vinca, compuestos de platino y taxanos, el régimen de Dartmouth (cisplatino, BCNU y DTIC), interferón alfa (IFN-A) e interleuquina-2 (IL-2). En una realización específica, se puede administrar una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales agonistas de la invención en combinación con perfusión límbica hipertérmica aislada (ILP) con melfalán (L-PAM), con o sin factor-alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa) a los pacientes con múltiples metástasis cerebrales, metástasis óseas y compresión de la médula espinal, para conseguir alivio de los síntomas y algún encogimiento del tumor con radioterapia.

En una realización específica, se administra a los pacientes con nevos compuestos precancerosos un anticuerpo frente a EphA2 de la invención para tratar el trastorno y disminuir la probabilidad de que progrese a melanoma maligno.

5.2.1.6. Tratamiento del cáncer de ovarios

En realizaciones específicas, se administra a los pacientes con cáncer de ovarios una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes útiles para la terapia del cáncer de ovarios, incluidos, entre otros: radioterapia intraperitoneal, tal como terapia con P32, radioterapia abdominal y pélvica total, cisplatino, la combinación de paclitaxel (Taxol) o docetaxel (Taxotere) y cisplatino o carboplatino, la combinación de ciclofosfamida y cisplatino, la combinación de ciclofosfamida y carboplatino, la combinación de 5-FU y leucovorina, etopósido, doxorubicina liposomal, gemcitabina o topotecán. Se contempla que una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales agonistas de la invención se administra en combinación con la administración de Taxol para pacientes con enfermedad resistente al platino. Se incluye el tratamiento de pacientes con cáncer de ovarios resistente, incluida la administración de: ifosfamida en pacientes con enfermedad resistente a platino, hexametilmelamina (HMM) como quimioterapia de rescate tras el fallo de los regímenes de combinación basados en cisplatino, y tamoxifeno en pacientes con niveles detectables de receptores de estrógenos citoplásmicos en sus tumores.

5.2.1.7. Tratamiento de cánceres de pulmón

En realizaciones específicas, se administra a los pacientes con cáncer de pulmón microcítico una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes útiles para la terapia del cáncer de pulmón, incluidos, entre otros: radioterapia torácica, cisplatino, vincristina, doxorubicina y etopósido, solos o en combinación, la combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina/etopósido y cisplatino (CAV/EP), paliación local con terapia láser endobronquial, endoprótesis endobronquiales y/o braquioterapia.

En otras realizaciones específicas, a los pacientes con cáncer de pulmón microcítico se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes adicionales útiles para la terapia del cáncer de pulmón, incluidos, entre otros: radioterapia paliativa, la combinación de cisplatino, vinblastina y mitomicina, la combinación de cisplatino y vinorelbina, paclitaxel, docetaxel o gemcitabina, la combinación de carboplatino y paclitaxel, radioterapia intersticial para lesiones endobronquiales y radiocirugía estereotáctica.

5.2.2 otros agentes profilácticos/terapéuticos

En algunas realizaciones, la terapia mediante administración de uno o más anticuerpos monoclonales se combina con la administración de una o más terapias, tales como, entre otras, quimioterapias, radioterapias, terapias hormonales y/o terapias biológicas/inmunoterapias. Los agentes profilácticos/terapéuticos incluyen, entre otros, moléculas proteináceas, incluidas, entre otras, péptidos, polipéptidos, proteínas, incluidas proteínas modificadas postraduccionalmente, anticuerpos etc.; o moléculas pequeñas (menores de 1000 dalton), compuestos inorgánicos u orgánicos; o moléculas de ácido nucleico, incluidas, entre otras, ADN bicatenario o monocatenario, o ARN bicatenario o monocatenario, así como moléculas de ácido nucleico de triple hélice. Los agentes profilácticos/terapéuticos pueden derivar de cualquier organismo conocido (incluidos, entre otros, animales, plantas, bacterias, hongos y protistas, o virus) o de una biblioteca de moléculas sintéticas.

En una realización específica, los procedimientos de la invención abarcan la administración de un anticuerpo de la invención en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/terapéuticos que son inhibidores de quinasas, tales como, entre otros, ABL, ACK, AFK, AKT (p.ej., AKT-1, AKT-2, y AKT-3), ALK, AMP-PK, ATM, Aurora1, Aurora2, bARK1, bArk2, BLK, BMX, BTK, CAK, CaM quinasa, CDC2, CDK, CK, COT, CTD, DNA-PK, EGF-R, ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4, ERK (p.ej., ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7), ERT-PK, FAK, FGR (p.ej., FGF1R, FGF2R), FLT (p.ej., FLT-1, FLT-2, FLT-3, FLT-4), FRK, FYN, GSK (p.ej., GSK1, GSK2, GSK3-alfa, GSK3-beta, GSK4, GSK5), quinasas receptoras acopladas a proteína G (GRK), HCK, HER2, HKII, JAK (p.ej., JAK1, JAK2, JAK3, JAK4), JNK (p.ej., JNK1, JNK2, JNK3), KDR, KIT, receptor de IGF-1, IKK-1, IKK-2, INSR (receptor de insulina), IRAK1, IRAK2, IRK, ITK, LCK, LOK, LYN, MAPK, MAPKAPK-1, MAPKAPK-2, MEK, MET, MFPK, MHCK, MLCK, MLK3, NEU, NIK, receptor alfa de PDGF, receptor beta de PDGF, PHK, PI-3 quinasa, PKA, PKB, PKC, PKG, PRK1, PYK2, p38 quinasas, p135tyk2, p34cdc2, p42cdc2, p42mapk, p44mpk, RAF, RET, RIP, RIP-2, RK, RON, RS quinasa, SRC, SYK, S6K, TAK1, TEC, TIE1, TIE2, TRKA, TXK, TYK2, UL13, VEGFR1, VEGFR2, YES, YRK, ZAP-70, y todos los subtipos de estas quinasa (véase, por ejemplo, Hardie y Hanks (1995) The Protein Kinase Facts Book, I and II, Academic Press, San Diego, Calif.). En realizaciones preferidas, un anticuerpo de la invención se administra en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/terapéuticos que son inhibidores de las quinasas del receptor de Eph (p. ej., EphA2, EphA4). En una realización más preferida, un anticuerpo de la invención se administra en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/terapéuticos que son inhibidores de EphA2.

En otra realización específica, los procedimientos de la invención abarcan la administración de un anticuerpo de la

invención en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/terapéuticos que son inhibidores de la angiogénesis, tales como, entre otros: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; Angiozyme; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartílago (CDI); CAI; fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinasas; fragmento de heparina hexasacárida; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; Interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); Interleuquina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de metaloproteinasa (TIMP); 2-Metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); AcMo IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de ribonucleasa placentaria; inhibidor del activador de plasminógeno; Factor-4 de las plaquetas (PF4); Prinomastat; fragmento de prolactina de 16kD; proteína relacionada con proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastat; esqualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahidrocortisol-S; tretiamolibdato; talidomida; Trombospondina 1 (TSP-1); TNP-470; factor beta transformante del crecimiento (TGF- β); Vasculostatina; Vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD6474; inhibidores de la farnesil transferasa (FTI); y bisfosfonatos.

En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo de la invención en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/terapéuticos que son agentes anti-cáncerosos, tales como, entre otros: acivicina, aclarubicina, acodazol clorhidrato, acronina, adozelesina, aldesleukina, altretamina, ambomicina, acetato de ametantrona, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, antramicina, asparaginasa, asperlina, azacitidina, azetepa, azotomicina, batimastat, benzodepa, bicalutamida, bisantreno clorhidrato, bisnafida dimesilato, bizelesina, sulfato de bleomicina, brequinar sódico, bropirimina, busulfán, cactinomicina, calusterona, caracemida, carbetimer, carboplatino, carmustina, carubicina clorhidrato, carzelesina, cedefingol, clorambucilo, cirolemicina, cisplatino, cladribina, mesilato de crisnatol, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina clorhidrato, decarbazina, decitabina, dexormaplatino, dezaguamina, mesilato de dezaguamina, diaziquona, docetaxel, doxorubicina, doxorubicina clorhidrato, droloxfeno, citrato de droloxfeno, propionato de dromostanolona, duazomicina, edatrexato, eflornitina clorhidrato, elsamitrucina, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina clorhidrato, erbuluzol, esorubicina clorhidrato, estramustina, fosfato de estramustina sódica, etanidazol, etopósido, etopósido fosfato, etoprina, fadrozol clorhidrato, fazarabina, fenretinida, floxuridina, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flurocitabina, fosquidona, fostriecina sódica, gemcitabina, gemcitabina clorhidrato, hidroxiurea, idarubicina clorhidrato, ifosfamida, ilmofosina, interleuquina 2 (incluida interleuquina 2 recombinante o rIL2), interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón alfa-n3, interferón beta-1 a, interferón gamma-1 b, iproplatino, irinotecán clorhidrato, acetato de lanreótida, letrozol, acetato de leuprorelina, liarozol clorhidrato, lometrexol sódico, lomustina, losoxantrona clorhidrato, masoprocol, maitansina, meclorethamina clorhidrato, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalán, menogaril, mercaptoperina, metotrexato, metotrexato sódico, metoprina, meturedepa, mitindomida, mitocarcin, mitocromin, mitogilin, mitomalcina, mitomicina, mitosper, mitotano, mitoxantrona clorhidrato, ácido micofenólico, nitrosoureas, nocodazol, nogalamicina, ormaplatino, oxisuran, paclitaxel, pegaspargaso, peliomicina, pentamustina, sulfato de peplomicina, perfosfamida, pipobroman, piposulfán, piroxantrona clorhidrato, plicamicina, plomestano, porfimer sódico, porfiromicina, prednimustina, procarbazina clorhidrato, puromicina, puromicina clorhidrato, pirazofurina, riboprina, rogletimida, safingol, safingol clorhidrato, semustina, simtrazeno, esparfosato sódico, esparsomicina, espirogermanio clorhidrato, espiromustina, espiroplatino, estreptonigrina, estreptozocina, sulofenur, talisomicina, tecogalan sódico, tegafur, teloxantrona clorhidrato, temoporfin, tenipósido, teroxirona, testolactona, tiamiprina, tioguanina, tiotepa, tiazofurina, tirapazamina, citrato de toremifeno, acetato de trestolona, fosfato de triciribina, trimetrexato, glucuronato de trimetrexato, triptoreolina, tubulozol clorhidrato, mostaza de uracilo, uredepa, vapreotida, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de vilneurosina, sulfato de vinorelbina, sulfato de vinrosidina, sulfato de vinzolidina, vorozol, zeniplatino, zinostatina, zorubicina clorhidrato. Otros fármacos anticáncerosos incluyen, entre otros: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3, 5-etiniluracilo, abiraterona, aclarubicina, acifulveno, adecipenol, adozelesina, aldesleukina, antagonistas de ALL-TK, altretamina, ambamustina, amidox, amifostina, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelido, anastrozol, andrografólido, inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelax, proteína 1 morfogenética anti-dorsalizante, antiandrógenos, antiestrógenos, antineoplaston, glicinato de afidicolina, moduladores del gen de la apoptosis, reguladores de la apoptosis, ácido apurínico, ara-CDP-DL-PTBA, arginina desaminasa, asulacrina, atamestano, atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina 3, azasetron, azatoxina, azatirosina, derivados de bacatina III, balanol, batimastat, antagonistas de BCR/ABL, benzoclorinas, benzoilestaurosorina, derivados de beta lactámidos, betaalaletina, betaclamicina B, ácido betulínico, inhibidor de bFGF, bicalutamida, bisantreno, bisaziridinilespermina, bisnafida, bistrateno A, bizelesina, breflato, bropirimina, budotitano, butionina sulfoximina, calcipotriol, calfostina C, derivados de camptotecina, IL-2 de canarypox, capecitabina, carboxamida-amino-triazol, carboxiamidotriazol, CaRest M3, CARN 700, inhibidor derivado de cartílago, carzelesina, inhibidores de caseína quinasa (ICOS), castanospermina, cecropina B, cetrorelix, cloroquinoxalina sulfonamida, cicaprost, cisporfirina, cladribina, análogos de clomifeno clotrimazol, colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogo de combretastatina, conagénina, crambescidina 816, crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentanquinonas, cicloplatam, cipemicina, ocfosfato de citarabina, factor citolítico, citostatina, dacliximab,

5 decitabina, dehidrodidemnina B, desloretilina, dexametasona, dexifosfamida, dexrazoxano, dexverapamilo, diaziquona, didemnina B, didox, dietilnorspermina, dihidro-5-azacitidina, dihidrotaxol, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxifluridina, droloxfeno, dronabinol, duocarmicina SA, ebselen, ecomustina, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, elemeno, emitefur, epirubicina, epristerida, análogo de estramustina, agonistas de estrógenos, antagonistas de estrógenos, etanidazol, etopósido fosfato, exemestano, fadrozol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol, flezelastina, fluasterona, fludarabina, fluorodaunorunicina clorhidrato, forfenimex, formestano, fostriecina, fotemustina, gadolinio texafirina, nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de gelatinasa, gemicitabina, inhibidores de glutatión, hepsulfam, heregulian, hexametilen bisacetamida, hipericina, ácido ibandrónico, idarubicina, idoxifeno, idramantona, ilmofosina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod, péptidos inmunoestimulantes, inhibidor del receptor del factor-1 de crecimiento similar a la insulina, agonistas de interferón, interferones, interleuquinas, iobenguano, iododoxorubicina, ipomeanol, iroplact, irsogladina, isobengazol, isohomohalicondrina B, itasetrón, jasplakinolida, kahalalida F, lamellarin-N triacetato, lanreótida, leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinan, leptolstatina, letrozol, factor inhibidor de leucemia, interferón-alfa leucocitario, leuprorelina+estrógeno+progesterona, leuprorelina, levamisol, liarozol, análogo de poliamina lineal, péptido disacárido lipófilo, compuestos lipófilos de platino, lisosclinamida 7, lobaplatino, lombricina, lometrexol, lonidamina, losoxantrona, lovastatina, loxoribina, lurtotecan, texafirina de luteo, lisofilina, péptidos líticos, maitansina, mannostatina A, marimastat, masoprolol, maspina, inhibidores de matrilisina, inhibidores de la matriz metaloproteína, menogaril, merbarona, meterelina, metioninasa, metoclopramida, inhibidor de MIF, mifepristona, miltefosina, mirimostim, ARN bicatenario con apareamientos erróneos, mitoguazona, mitolactol, análogos de mitomicina, mitonafida, mitotoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina, mitoxantrona, mofaroteno, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana, monofosforilo lípido A+sk de parec celular micobacteriana, moidamol, inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos, terapia basada en supresor 1 de múltiples tumores, agente anticanceroso de mostaza, micaperóxido B, extracto de pared celular micobacteriana, miriaporona, N-acetildinalina, benzamidas N-sustituidas, nafareolina, nagrestip, naloxona+pentazocina, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatino, nemorubicina, ácido neridrónico, endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores del óxido nítrico, antioxidante de nitróxido, nitrulina, O6-benzilguanina, octreotida, okicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetron, ondansetron, oracina, inductor de citocina oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoilrizoxina, ácido pamidrónico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, pentosan polisulfato sódico, pentostatina, pentrozol, perflubron, perfosfamida, alcohol perillílico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa picibanil, pilocarpina clorhidrato, pirarubicina, piritrexim, placetina A, placetina B, inhibidor del activador del plasminógeno, coplejo de platino, compuestos de platino, complejo de platino-triamina, porfímero sódico, porfiromicina, prednisona, propilbisacridona, prostaglandina J2, inhibidores de proteasoma, modulador inmunitario basado en la proteína A, inhibidor de la proteína quinasa C, inhibidores de la proteína quinasa C, microalgal, 35 inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa, inhibidores de la purina nucleósido fosforilasa, purpurinas, pirazoloacridina, hemoglobina piridoxilada conjugado de polioxetileno, antagonistas de raf, raltitrexed, ramosetrón, inhibidores de la ras farnesil proteína transferasa, inhibidores de ras, inhibidor de ras-GAP, retelliptinase dsemetilada, etidronato de renio Re 186, rizoxina, ribozimas, RII retinamida, rogletimida, rohitukina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxilo, safingol, saintopina, SarCNU, sarcofitol A, sargamostim, mimétidos de Sdi 1, semustina, 40 inhibidor 1 derivado de senescencia, oligonucleótidos sentido, inhibidores de la transducción de señal, moduladores de la transducción de señal, proteína de unión a antígeno de cadena sencilla, sizofiran, sobuzoxano, borocaptat sódico, fenilacetato sódico, solverol, proteína de unión a somatomedina, soánermina, ácido esparfósico, espicamicina D, espiromustina, esplenopentina, espongistatina 1, esqualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de células madre, estipiamida, inhibidores de estromelisina, sulfmosina, antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsoniae, glucosaminoglucanos sintéticos, talimustina, tamoxifeno metyoduro, taurumustina, taxol, tazaroteno, tecogalan sódico, tegafur, telurapirilílio, inhibidores de telomerasa, temoporquina, temozolomida, tenipósido, tetraclorodecaóxido, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiocoralina, tioguanina, trombopoyetina, mimético de trombopoyetina, timalfasina, agonista del receptor de timopoyetina, timotrinan, hormona estimulante del tiroides, etiletiopurpurina de estafano, tirapazamina, bicloruro de titanoceno, topsentina, toremifeno, factor de células madre totipotenciales, inhibidores de la traducción, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, trimetrexato, triptorelina, tropisetrón, turosterida, inhibidores de la tirosina quinasa, tirofostinas, inhibidores de UBC, ubenimex, factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de uroquinasa, vapreótida, variolina B, sistema vector, terapia génica con eritrocitos, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, vinorelbina, vinxaltina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb y 55 zinostatina estimalámero. Fármacos anticancerosos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.

60 En realizaciones más concretas, la presente invención también comprende la administración de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención en combinación con la administración de una o más terapias, tales como, entre otros, agentes anti-cancerosos tales como los divulgados en la Tabla 2, preferentemente para el tratamiento de los cánceres de mama, de ovarios, melanoma, de próstata, de colon y de pulmones, como se ha descrito anteriormente.

TABLA 2

Agente terapéutico	Administración	Dosis	Intervalos
Doxorubicina clorhidrato (Adriamycin RDF® y Adriamycin PFS®)	intravenosa	60 - 75 mg/m ² del día 1	Intervalos de 21 días
Epirubicina clorhidrato (Ellence)	intravenosa	100 - 120 mg/m ² del día 1 de cada ciclo o divididos igualmente y administrados los días 1 - 8 del ciclo	Ciclos de 3-4 semanas
Fluorousacilo	intravenosa	Suministrado: Viales de 5 ml y 10 ml (que contienen 250 y 500 mg de fluorouracilo, respectivamente)	
Docetaxel (Taxotere®)	intravenosa	60 - 100 mg/m ² en 1 hora	Una vez cada 3 semanas
Paclitaxel (Taxol®)	intravenosa	175 mg/m ² en 3 horas	Cada 3 semanas durante 4 ciclos (administrados secuencialmente a quimioterapia de combinación que contiene doxorubicina)
Citrato de tamoxifeno (Nolvadex®)	Oral (comprimidos)	20 - 40mg, las dosis superiores a 20 mg se administrarán en dosis divididas (por la mañana y por la noche)	A diario
Leucovorina cárlica para inyección	Intravenosa o inyección intramuscular	Suministrado: Vial de 350 mg	La dosis no está clara en el texto. PDR 3610
Acetato de leuprórido (Lupron®)	Una inyección subcutánea	1 mg (0,2 ml o 20 marca de unidad)	Una vez al día
Flutamida (Eulexin®)	Oral (cápsulas)	250 mg (las cápsulas contienen 125 mg de flutamida cada una)	3 veces al día a intervalos de 8 horas (dosis diaria total de 750 mg)
Nilutamida (Nilandron®)	Oral (comprimidos)	300 mg o 150 mg (los comprimidos contienen 50 o 150 mg de nilutamida cada uno)	300 mg una vez al día durante 30 días, seguido de 150 mg una vez al día
Bicalutamida (Casodex®)	Oral (comprimidos)	50 mg (los comprimidos contienen 50 mg de bicalutamida cada una)	Una vez al día
Progesterona	Inyección	USP en aceite de sésamo, 50 mg/ml	
Ketoconazol (Nizoral®)	Crema	Crema al 2 % aplicada una o dos veces al día en función de los síntomas	
Prednisona	Oral (comprimidos)	La dosis inicial puede variar de 5 mg a 60 mg al día en función de la entidad patológica específica que se esté tratando.	

Fosfato de estramustina sódica (Emcyt®)	Oral (cápsulas)	14 mg/kg de peso corporal (Es decir, una cápsula de 140 ng por cada 10 kg o 22 lb de peso corporal)	A diario, administrado en 3 o 4 dosis divididas
Etopósido o VP-16	intravenosa	5 ml de la solución de 20 mg/ml (100 mg)	
Dacarbazina (DTIC - Dome®)	intravenosa	2 - 4,5 mg/kg	Una vez al día durante 10 días. Puede repetirse a intervalos de 4 semanas
Polifeprosan 20 con implante de carmustina (BCNU) (nitrosourea) (Gliadel®)	Oblea introducida en la cavidad de resección	8 obleas, cada una con 7,7 mg de carmustina, para un total de 61,6 mg, si el tamaño y la forma de la cavidad de resección lo permiten	
Cisplatino	Inyección	Suministrado: Solución de 1 mg/ml en viales multidosis de 50 ml y 100 ml	
Mitomicina	Inyección	Suministrado en viales de 5 mg y 20 mg (que contienen 5 mg y 20 mg de mitomicina)	
Gemcitabina HCl (Gemzar®)	intravenosa	Para el CPNMC- se han investigado 2 programas y el programa óptimo no se ha determinado. Programa de 4 semanas, administración intravenosa a 1000 mg/m ² en 30 minutos, programa de 3 semanas- Gemzar administrado por vía intravenosa a 1250 mg/m ² en 30 minutos,	Programa de 4 semanas- Días 1,8 y 15 de cada ciclo de 28 días. Cisplatino intravenoso a 100 mg/m ² el día 1 tras la infusión de Gemzar. Programa de 2 semanas- Días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. Cisplatino a dosis de 100 mg/m ² administrados por vía intravenosa tras la administración de Gemzar el día 1.
Carboplatino (Paraplatin®)	intravenosa	Terapia con un solo agente: 360 mg/m ² I.V. el día 1 (infusión de 15 minutos o más prolongada). Otros cálculos de la dosis: Terapia de combinación con ciclofosfamida, Recomendaciones de ajuste de dosis, fórmula de dosificación, etc.	Cada 4 semanas

Ifosamida (Ifex®)	intravenosa	1,2 g/m ² al día	5 días consecutivos. Repetir cada 3 semanas o tras la recuperación de la toxicidad hematológica.
Topotecán clorhidrato (Hycamtin®)	intravenosa	1,5 mg/m ² mediante infusión intravenosa en 30 minutos diariamente	5 días consecutivos, comenzando el día 1 de un ciclo de 21 días

La invención también abarca la administración de los anticuerpos frente a EphA2 de la invención en combinación con radioterapia, que comprende el uso de rayos x, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir las células cancerosas. En realizaciones preferidas, el tratamiento de radiación se administra como radiación con haz externo o teleterapia, en la que la radiación está dirigida desde una fuente remota. En otras realizaciones preferidas, el tratamiento de radiación se administra como terapia interna o braquioterapia, en la que se introduce una fuente radioactiva dentro del cuerpo cerca de las células cancerosas o de una masa tumoral.

Las terapias para el cáncer y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en dicha literatura como el Physician's Desk Reference (56^a ed., 2002).

5.3 Identificación de los anticuerpos de la invención

5.3.1 Anticuerpos agonistas

Los anticuerpos de la invención pueden actuar como agonistas, preferentemente (es decir, producir la fosforilación de EphA2), así como unirse inmunoespecíficamente al receptor de EphA2. Cuando se le une un agonista, EphA2 se fosforila y, después, se degrada posteriormente. Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para analizar el nivel de fosforilación de EphA2, actividad o expresión, para analizar los anticuerpos frente a EphA2 candidatos para determinar su actividad agonista (véase, por ejemplo, la Sección 6.2, más adelante).

5.3.2 Anticuerpos que se unen preferentemente a epítopos de EphA2 expuestos sobre células cancerosas

Los anticuerpos de la invención pueden unirse, preferentemente, a los epítopos de EphA2 expuestos sobre las células cancerosas (p. ej., células que sobreexpresan EphA2 y/o células con EphA2 sustancial que no está unido a ligando) pero no sobre células no cancerosas o células en las que EphA2 está unido al ligando. En esta realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos dirigidos a un epítopo frente a EphA2 no expuesto sobre las células no cancerosas pero expuesto sobre las células cancerosas (véase, p. ej., la Sección 6.8, más adelante). Las diferencias en la distribución en la membrana de EphA2 entre las células no cancerosas y las células cancerosas exponen ciertos epítopos sobre las células cancerosas que no están expuestos en las células no cancerosas. Por ejemplo, normalmente el EphA2 está unido a su ligando, la efrinaA1, y se localiza en las zonas de contactos célula-célula. No obstante, en general, las células cancerosas exhiben menos contactos célula-célula, además de sobreexpresar EphA2 en exceso con respecto a su ligando. Por tanto, en las células cancerosas hay una mayor cantidad de EphA2 no unido que no está localizado en los contactos célula-célula. Como tal, en una realización, un anticuerpo que se une preferentemente a EphA2 no unida no localizada es un anticuerpo de la invención.

Cualquier procedimiento conocido en la técnica para determinar la localización/unión del anticuerpo frente a EphA2 candidato sobre una célula se puede usar para someter a los anticuerpos candidatos a detección selectiva de las propiedades de unión deseables. En una realización se usa microscopia por inmunofluorescencia para determinar las características de unión de un anticuerpo. Se pueden usar técnicas estándar para comparar la unión de un anticuerpo de unión a células cultivadas *in vitro*. En una realización específica, la unión del anticuerpo a células cancerosas se compara con la unión del anticuerpo a células no cancerosas. Un anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto se une mal a las células no cancerosas pero se une bien a las células cancerosas. En otra realización específica, la unión del anticuerpo a células no cancerosas disociada (p. ej., tratadas con un quelante de calcio, tal como EGTA) se compara con la unión del anticuerpo a células no cancerosas que no se han disociado. Un anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto se une mal a las células no cancerosas que no se han disociado pero se une bien a las células cancerosas disociadas.

En otra realización se usa citometría de flujo para determinar las características de unión de un anticuerpo. En otra realización, EphA2 puede o no estar reticulado con su ligando, Efrina A1. Un anticuerpo frente al epítopo de EphA2 expuesto se une mal a EphA2 reticulada pero se une bien a EphA2 no reticulada.

En otra realización se usan ensayos basados en células o inmunoensayos para determinar las características de unión de un anticuerpo. En esta realización, los anticuerpos pueden competir con un ligando de EphA2 (p. ej., Efrina A1) por la unión a EphA2 para desplazar la efrina A1 de EphA2. El ligando de EphA2 usado en este ensayo puede

ser una proteína soluble (p. ej., expresada de forma recombinante) o expresarse sobre una célula de modo que esté anclado a la célula.

5.3.3 Anticuerpos que inhiben el fenotipo de célula cancerosa

Los anticuerpos de la invención pueden inhibir, preferentemente (y preferentemente reducir) la formación de colonias de células cancerosas en, por ejemplo, agar blando o la formación de redes tubulares en una preparación tridimensional de membrana basal o matriz extracelular, así como unirse inmunoespecíficamente al receptor de EphA2. Un experto en la técnica puede analizar los anticuerpos frente a EphA2 candidatos para determinar su capacidad para inhibir dicho comportamiento (véase, por ejemplo, la Sección 6.2, más adelante). Las células de tumores metastásicos suspendidas en agar blando forman colonias, mientras que las células de los tumores

benignos no lo hacen. La formación de colonias en agar blando se puede analizar como se describe en Zelinski y col. (2001, *Cancer Res.* 61:2301-6). Los anticuerpos que se van a analizar por su actividad agonista se pueden incluir en las soluciones de agar inferior y superior. Las células de tumores metastásicos se pueden suspender en agar blando y dejar crecer. Los anticuerpos frente a EphA2 que inhiben el fenotipo de célula cancerosa inhibirán la formación de colonias.

Otro comportamiento específico de las células metastásicas que se puede usar para identificar los anticuerpos que inhiben el fenotipo de célula cancerosa es la formación de redes tubulares en un microentorno tridimensional, tal como MATRIGEL™. Normalmente, las células cancerosas se ensamblan rápidamente en redes tubulares que invaden de forma progresiva toda la MATRIGEL™. En presencia de un anticuerpo frente a EphA2 inhibidor del fenotipo de células cancerosas, las células cancerosas se ensamblan en estructuras esféricas que simulan el comportamiento de células no cancerosas diferenciadas. De acuerdo con esto, los anticuerpos frente a EphA2 inhibidores del fenotipo de células cancerosas se pueden identificar por su capacidad para inhibir la formación de redes tubulares de las células cancerosas.

También se puede usar cualquier otro procedimiento que detecte un incremento en la inhibición por contacto de la proliferación celular (p. ej., reducción de la formación de colonias en un cultivo celular en monocapa) para identificar los anticuerpos inhibidores del fenotipo de células cancerosas.

Además de la formación de colonias de células cancerosas, los anticuerpos inhibidores del fenotipo de células cancerosas también pueden producir una reducción o eliminación de las colonias cuando se añaden a colonias ya establecidas de células cancerosas al morir las células mediante, por ejemplo, necrosis o apoptosis. Los procedimientos para analizar la necrosis y la apoptosis son bien conocidos en la técnica.

5.3.4 Anticuerpos con tasas K_{off} bajas

La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal de la invención a EphA2 o un fragmento del mismo y la tasa off de una interacción anticuerpo monoclonal-EphA2 se puede determinar mediante ensayos de unión competitiva.

Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de EphA2 marcada (p. ej., ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo monoclonal de interés en presencia de cantidades crecientes de EphA2

sin marcar y la detección del anticuerpo monoclonal unido a EphA2 marcada. La afinidad de un anticuerpo monoclonal por una EphA2 y las tasas off de unión se pueden determinar a partir de datos mediante análisis del gráfico del trazado. La competición con un segundo anticuerpo monoclonal también se puede determinar usando radioinmunoensayos. En este caso, se incuba EphA2 con un anticuerpo monoclonal conjugado con un compuesto marcado (p. ej., ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo monoclonal no marcado.

En una realización preferida, un anticuerpo frente a EphA2 candidato se puede analizar usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial conocido en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la interacción EphA2-anticuerpo frente a EphA2. En la presente invención se puede usar cualquier instrumento SPR disponible comercialmente, incluidos, entre otros, instrumentos BIACORE, disponibles en Biacore AB (Uppsala, Suecia); instrumentos IAlys disponibles en Affinity Sensors (Franklin, MA.); el sistema IBIS disponible en Windsor

Scientific Limited (Berks, Reino Unido), sistemas SPR-CELLIA disponibles en Nippon Laser y Electronics Lab (Hokkaido, Japón), y SPR Detector Spreeta disponible en Texas Instruments (Dallas, TX). Para una revisión de la tecnología basada en SPR, véase Mullet y col., 2000, *Methods* 22: 77-91; Dong y col., 2002, *Review in Mol. Biotech.*, 82: 303-23; Fivash y col., 1998, *Current Opinion in Biotechnology* 9: 97-101; Rich y col., 2000, *Current Opinion in Biotechnology* 11: 54, todos los cuales se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia en su totalidad. Adicionalmente, cualquiera de los instrumentos SPR y los procedimientos basados en SPR para medir las interacciones proteína-proteína descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125 se contemplan en los procedimientos de la invención.

Brevemente, los ensayos basados en SPR implican inmovilizar un miembro de un par de unión sobre una superficie y monitorizar su interacción con el otro miembro del par de unión en solución. SPR se basa en medir el cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que se produce tras la formación o disociación del complejo. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es en circuito sensor, que está en el corazón de la tecnología

5 SPR; consiste en una superficie de cristal recubierta con una capa fina de oro y forma la base de una gama de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. Diversos circuitos sensores están disponibles comercialmente, especialmente en las empresas indicadas anteriormente, todos los cuales se pueden usar en los procedimientos de la invención. Ejemplos de circuitos sensores incluyen los disponibles en BIACore AB, Inc., por ejemplo Sensor Chip CMS, SA, NTA, y HPA. Una molécula de la invención se puede inmovilizar sobre la superficie de un circuito sensor usando cualquiera de los procedimientos de inmovilización y químicas conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, acoplamiento covalente directo mediante grupos amina, acoplamiento covalente directo mediante grupos sulfidrilo, fijación de biotina a superficie recubierta con avidina, acoplamiento de aldehído a grupos de hidratos de carbono y unión a través de la cola de histidina con circuitos NTA.

10 10 En una realización más preferida, el análisis cinético BIACORE™ se usa para determinar la unión y las tasas off de los anticuerpos monoclonales a EphA2 (véase, por ejemplo, la Sección 6.7, más adelante). El análisis cinético BIACORE™ comprende analizar la unión y la disociación de un anticuerpo monoclonal de circuitos con EphA2, o un fragmento del mismo, inmovilizada sobre su superficie.

15 Una vez que se ha recogido todo el conjunto de datos, las curvas de unión resultantes se ajustan globalmente usando algoritmos informáticos suministrados por el fabricante BIACore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan las tasas K_{on} y K_{off} , a partir de las cuales se deduce la constante de unión en el equilibrio aparente, K_D , como la proporción entre las dos constantes (es decir, K_{off}/K_{on}). Tratamientos más detallados sobre cómo se obtienen las tasas constantes individuales se pueden encontrar en BIACore Evaluation Software Handbook (BIACore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos generados se puede realizar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Para una revisión de los diversos procedimientos de interpretación de los datos cinéticos generados, véase Myszka, 1997, Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher y col., 1994, Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken y col., 1992, Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Morton y col., 1995, Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy y col., 1996, Analytical Biochemistry 236: 275-83. La invención abarca anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y tienen una

20 25 tasa K_{off} (anticuerpo (Ac) + antígeno (Ag) Koff (Ac-Ag) inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, más preferentemente inferior a $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen inmunoespecíficamente a EphA2 y tienen una K_{off} inferior a $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-3} s^{-1} , inferior a $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-4} s^{-1} , inferior a $9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-5} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-6} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-7} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-8} s^{-1} , inferior a $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, inferior a 10^{-9} s^{-1} , o inferior a 10^{-10} s^{-1} .

30 35 Por tanto, la invención describe procedimientos de análisis y detección selectiva de anticuerpos frente a EphA2 de la invención incubando anticuerpos que se unen específicamente a EphA2, particularmente que se unen al dominio extracelular de EphA2, con células que expresan EphA2, particularmente células cancerosas, preferentemente células cancerosas metastásicas, que sobreexpresan EphA2 (respecto a las células no cancerosas del mismo tipo celular) y, después, analizar el incremento en la fosforilación de EphA2 y/o degradación de EphA2 (por anticuerpos agonistas) o reducción de la formación de colonas en agar blando o formación de redes tubulares en una preparación tridimensional de membrana basal o matriz extracelular (para los anticuerpos que inhibe el fenotipo de célula cancerosa) o incremento de unión del anticuerpo a células cancerosas en comparación con las células no cancerosas mediante, por ejemplo, inmunofluorescencia (para los anticuerpos frente al epítopo de EphA2 expuesto), de modo que se identifica un anticuerpo frente a EphA2 de la invención.

5.5 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica o profiláctica

40 45 La toxicidad y la eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DE_{50}/DL_{50} . Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que exhiben índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden usar agentes profilácticos y/o terapéuticos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se deberán tomar precauciones para diseñar un sistema de liberación que dirija dichos agente al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar los posibles daños en las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

50 55 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales se pueden usar en la formulación de intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para uso humano. Las dosis de tales agentes están, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada. Para cualquier agente usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Una dosis se puede formular en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la

IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición semimáxima de los síntomas según se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar después para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir mediante, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

- 5 La actividad anticancerosa de las terapias usadas de acuerdo con la presente invención también se puede determinar usando varios modelos animales experimentales para el estudio del cáncer, tal como el modelo de ratón SCID o ratones transgénicos, en los que la EphA2 de ratón es sustituida por EphA2 de ser humano, ratones atípicos con xenoinjertos humanos, modelos animales descritos en la Sección 6 más adelante o cualquier modelo animal (incluidos hámsteres, conejos etc.) conocidos en la técnica y descritos en Relevance of Tumor Models for Anticancer
- 10 Drug Development (1999, eds. Fiebig and Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher).

5.5.1 Demostración de la utilidad terapéutica o profiláctica

- 15 Los protocolos y composiciones de la invención se analizan, preferentemente, *in vitro* y, después, *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes del uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* que se pueden usar para determinar si está indicada la administración de un protocolo terapéutico específico incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que una muestra de tejido del paciente se cultiva en cultivo y se expone a, o, de otro modo, se administra un, protocolo y el efecto de dicho protocolo sobre la muestra de tejido se observa, por ejemplo incremento de la fosforilación/degradación de EphA2, inhibición o disminución del crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de red tubular en preparaciones de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular. Un nivel menor de proliferación o supervivencia de las células en contacto indica que el agente terapéutico es eficaz para tratar la afección en el paciente. Como alternativa, en lugar de cultivar las células de un paciente, agentes terapéuticos y procedimientos se pueden someter a detección selectiva usando las células de un tumor o una línea celular maligna. Se pueden usar muchos ensayos estándar para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento, por ejemplo, la proliferación celular se puede analizar midiendo la incorporación de ^{3}H -timidina, mediante recuento celular directo, detectando los cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos, tales como protooncogenes (p. ej., fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede analizar mediante tinción con azul triptán, la diferenciación se puede evaluar visualmente en base a los cambios en la morfología, incremento de la fosforilación/degradación de EphA2, disminución del crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de red tubular en preparaciones de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular etc.
- 20
- 25
- 30

Los compuestos para usar en la terapia se pueden analizar en sistemas de modelos animales adecuados antes de analizar en seres humanos, incluidos, entre otros, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámster etc., por ejemplo los modelos animales descritos anteriormente. Los compuestos se pueden usar en los ensayos clínicos adecuados.

- 35 Además, se puede usar cualquier ensayo conocido para los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinadas divulgadas en el presente documento para el tratamiento o prevención del cáncer.

5.6 Composiciones Farmacéuticas

- 40 Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármacos útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (p. ej., composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que se pueden usar en la preparación de formas de dosificación unitaria. Dichas composiciones comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico divulgado en el presente documento o una combinación de dichos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos frente a EphA2 de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable o un agente que reduce la expresión de EphA2 (p. ej., oligonucleótidos antisentido) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la composición de la invención comprende además un agente terapéutico adicional, por ejemplo anticanceroso.
- 45

- 50 En una realización específica, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante (p. ej., adyuvante de Freund (completo e incompleto) o, más preferentemente, el adyuvante MF59C.1 disponible en Chiron, Emeryville, CA), excipiente o vehículo con el que se administra la terapéutica. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Un vehículo preferido es agua, cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa.
- 55

Como vehículos líquidos se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

En general, los ingredientes de las composiciones de la invención son suministrados por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria como, por ejemplo, polvo liofilizado seco o concentrado sin agua, en un contenedor sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con un bote de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Las composiciones de la invención se pueden formular como formas salinas o neutras. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico etc., y las formadas con cationes, tales como los que derivan de sodio, potasio, amoniaco, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-ethylaminoetanol, histidina, procaína etc.

Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden usar para administrar un anticuerpo monoclonal agonista de la invención o la combinación de un anticuerpo monoclonal agonista de la invención y un agente profiláctico o un agente terapéutico útil para prevenir o tratar el cáncer, por ejemplo encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu, y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus u otro vector etc.

Los procedimientos de administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, entre otros, la administración parenteral (p. ej., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (p. ej., las vías intranasal, inhalada y oral). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica u oral.

En una realización específica puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente en el área que necesita el tratamiento; esto se puede conseguir mediante, por ejemplo y sin limitaciones, infusión local, mediante inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas las membranas, tales como membranas sialísticas o fibras.

En otra realización más, el agente profiláctico o terapéutico se puede liberar en un sistema de liberación controlada o sostenida. En una realización se puede usar una bomba para conseguir la liberación controlada o sostenida (véase, Langer, ant.; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed Eng.* 14:20; Buchwald, y col., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek, y col., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización se pueden usar materiales poliméricos para conseguir la liberación controlada o sostenida de los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (véase, p. ej., *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Macromol. Chem.* 23:61; véase también Levy y col., 1985, *Science* 228:190; During y col., 1989, *Ann. Neural.* 25: 351; Howard y col., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105); las patentes de EE.UU. nº 5.679.377; 5.916.597; 5.912.015; 5.989.463; 5.128.326; las publicaciones internacionales nº WO 99/15154 and WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, entre otros, poli(2-hidroxietimetacrilato), poli(metilmetacrilato), poli (ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metaacrílico), poliglicólicos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(lactida-co-glicólicos) (PLGA) y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en la formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviadas, estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable. En otra realización más, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede colocar cerca de la diana profiláctica o terapéutica, de modo que sólo se requiera una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, ant., vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se tratan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)). Se puede usar cualquier técnica conocida para los expertos en la técnica, para producir formulaciones de liberación

sostenida que comprende uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.526.938, las publicaciones internacionales nº WO 91/05548 and WO 96/20698; Ning y col., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song y col., 1995, PEA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek y col., 1997, Pyro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam y col., 1997, Proc. 5 Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

5.6.2 Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la presente invención se pueden formular de un modo convencional usando uno o más excipientes o vehículos fisiológicamente aceptables.

Por tanto, los anticuerpos agonistas de EphA2 de la invención u otros agentes anti-EphA2 (p.ej., ácidos nucleicos 10 antisentido y de otro tipo) o sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para administración mediante inhalación o sedación (bien por boca o por la nariz) o administración oral, parenteral o mucosa (tal como bucal, vaginal, rectal, sublingual) En una realización preferida se usa la administración parenteral local o sistémica.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o 15 cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa), cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio), lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de maíz o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las 20 preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o 25 grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sónico). Las preparaciones pueden también contener sales tampones, aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea adecuado.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de 30 forma convencional.

Para la administración mediante inhalación, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la 35 presente invención se liberan de forma conveniente en forma de presentación en pulverizador en aerosol a partir de envases o un nebulizador presurizados con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula la cual administra una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para usar en un inhalador o insuflador de modo que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden formular para administración parenteral mediante inyección en, 40 por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en monodosis en, por ejemplo, ampollas o envases con múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, por ejemplo agua apirógena estéril, antes de usar.

Los agentes profilácticos o terapéuticos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo que contienen bases de suppositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los agentes profilácticos o terapéuticos pueden también 50 formularse como una preparación depot. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados escasamente solubles, por ejemplo en forma de una sal escasamente soluble.

La invención también proporciona que un agente profiláctico o terapéutico se envasa en un contenedor herméticamente sellado, como un ampolla o sobre, indicando la cantidad. En una realización, el agente profiláctico o terapéutico se suministra como un polvo liofilizado esterilizado en seco o un concentrado sin agua en un contenedor herméticamente sellado y se puede reconstituir, por ejemplo con agua o solución salina, en la concentración adecuada para administrar a un sujeto.

En una realización preferida de la invención, la formulación y la administración de varios agentes quimioterapéuticos, biológicos/inmunoterapéuticos y hormonales se conocen en la técnica y a menudo se describen en el Physician's Desk Reference, 56^a ed. (2002). Por ejemplo, en ciertas realizaciones específicas de la invención, los agentes terapéuticos de la invención se pueden formular y suministrar como se indica en la Tabla 2.

10 En otras realizaciones de la invención, los agentes de radioterapia, tales como isótopos radioactivos, se pueden administrar por vía oral como líquidos en cápsulas o como una bebida. Los isótopos radioactivos también se pueden formular para inyecciones intravenosas. El oncólogo experto puede determinar la formulación y la vía de administración preferidas.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales agonistas de la invención se formulan a 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, y 25 mg/ml para inyecciones intravenosas, y a 5 mg/ml, 10 mg/ml y 80 mg/ml para administración subcutánea repetida e inyección intramuscular.

20 Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contiene el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, papel de aluminio de metal o plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para administración.

5.6.3 Dosificaciones

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento, prevención o gestión de cáncer se puede determinar mediante técnicas de investigación estándar. Por ejemplo, la dosificación de la composición que será eficaz en el tratamiento, prevención o gestión de cáncer se puede determinar administrando la composición a un modelo animal, tal como, por ejemplo, los modelos animales divulgados en el presente documento o conocidos para los expertos en la técnica. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos.

30 Un experto en la técnica puede determinar la selección de la dosis eficaz preferida (p. ej., mediante ensayos clínicos) en base a la consideración de varios factores que serán conocidos para un experto en la técnica. Estos factores incluyen la enfermedad que se va a tratar o prevenir, los síntomas implicados, la masa corporal del paciente, el estado inmunitario del paciente y otros factores conocidos por el experto en la técnica para reflejar la precisión de las composiciones farmacéuticas administradas.

35 La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad del cáncer y se decidirá de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo con modelos animales o *in vitro*.

40 Para los anticuerpos, la dosificación administrada a cada paciente suele ser de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosis administrada a un paciente está entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente o, más preferentemente, de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos y humanizados tienen una semivida mayor en el cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies, debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Por tanto, a menudo es posible usar dosis menores de anticuerpos humanos y administrar con menor frecuencia.

45 Para otros agentes terapéuticos para el cáncer administrados a un paciente, las dosis típicas de varias terapéuticos para el cáncer conocidas en la técnica se proporcionan en la Tabla 2. Dada la invención, ciertas realizaciones preferidas abarcarán la administración de dosis en regímenes de tratamiento de combinación menores que las dosis recomendadas para la administración de los agentes solos.

50 La invención proporciona cualquier procedimiento de administración de dosis menores de agentes profilácticos o terapéuticos conocidos que lo que previamente se pensó que era eficaz para la prevención, tratamiento, gestión o mejora del cáncer. Preferentemente, se administran dosis menores de terapias anticancerosas en combinación con dosis menores de los anticuerpos monoclonales agonistas de la invención.

5.7 Kits

La invención proporciona un paquete o kit farmacéutico, que comprende uno o más contenedores llenos con un anticuerpo monoclonal de la invención. Adicionalmente, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el

tratamiento de un cáncer también pueden incluirse en el paquete o kit farmacéutico. La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprenden uno o más contenedores cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociados opcionalmente con dicho(s) contenedor(es) puede adjuntarse una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, en la que se refleja la aprobación de la agencia de la fabricación, uso o venta del producto para administración en seres humanos.

La presente invención proporciona kit que se pueden usar en los procedimientos anteriores. En una realización, un kit comprende uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, un kit además comprende uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más contenedores.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal de la invención es Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, Eph099B-233.152, o cualquiera de los anticuerpos indicados en la Tabla 6. En ciertas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es un terapéutico biológico u hormonal.

6. EJEMPLOS

6.1 Preparación de anticuerpos monoclonales

Inmunización y fusión

Los anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de EphA2 se generaron usando la proteína de fusión EphA2-Fc. Esta proteína de fusión estaba compuesta por el dominio extracelular de EphA2 humana unida a inmunoglobulina humana para facilitar la secreción de la proteína de fusión.

En dos grupos de 5 ratones cada uno (ratones Balb/c (grupo A) o ratones SJL (grupo B)) se inyectó 5 µg de EphA2-Fc en adyuvante TiterMax (volumen total 100 µl) en la región metatarsiana izquierda los días 0 y 7. Los días 12 y 14 se inyectó a los ratones 10 µg de EphA2-Fc en PBS (volumen total 100 µl) en la región metatarsiana izquierda. El día 15, se extrajeron las células de los ganglios linfáticos poplíteo e inguinal de la pata izquierda y la ingle y se condensaron somáticamente (usando PEG) con células P3XBc1-2-13.

Los hibridomas productores de anticuerpos Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, y Eph099B-233.152 se aislaron de las fusiones de los ganglios linfáticos de ratones SJL inmunizados.

Detección selectiva de anticuerpos

Los sobrenadantes de hibridomas de cultivos en masa se sometieron a detección selectiva para determinar la inmunorreactividad contra EphA2 (Tabla 6, columna 4) usando técnicas de biología molecular estándar (p. ej., inmunoensayo ELISA). Los sobrenadantes se sometieron después a detección selectiva para determinar la capacidad para inhibir la unión de un anticuerpo monoclonal frente a EphA2 (EA2; ATCC, depósito nº PTA-4380; véase la solicitud de patente de EE.UU. pendiente de tramitación nº de serie __, titulada "Anticuerpos monoclonales agonistas de EphA2 y procedimientos de uso de los mismos", presentada el 12 de mayo de 2003 con número de registro 10270-107-999) a EphA2. Brevemente, la capacidad EA2 marcado para unirse a EphA2-Fc se analizó mediante ELISA competitivo en presencia de EA2 no marcados o Eph099B-208.261 no marcados (FIG.1). Ambos anticuerpos pudieron disminuir la cantidad de unión de EA2 marcado a EphA2-Fc con la adición de concentraciones crecientes de anticuerpo sin marcar. Adicionalmente, muchos de los otros anticuerpos pudieron inhibir la unión de EA2 a EphA2 también (Tabla 6, columna 3).

6.2 Los anticuerpos monoclonales frente a EphA2 disminuyen las propiedades metastásicas de las células tumorales

6.2.1 Fosforilación y degradación de EphA2

Los anticuerpos frente a EphA2 estimularon la fosforilación de la tirosina u la degradación de EphA2 en células MDA-MB-231. Monocapas de células se incubaron en presencia de anticuerpos agonistas frente a EphA2 o control a 37 °C. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico de EphA2 (D7, adquirido en Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NY y depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 8 de diciembre de 200 y con un número ATCC asignado PTA 2755), se resolvieron mediante SDS-PAGE y se sometieron a análisis de transferencia Western con un anticuerpo específico de fosftotirosina (PY20 o 4G10, adquiridos en Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NY), Eph099B-208.261, EA2 (FIGS. 2A-2B), y Eph099B-233.152 (FIG. 4A) aumentaron la fosforilación de EphA2. Las membranas se limpian y se volvieron a sondar con el anticuerpo específico de EphA2 usado en la inmunoprecipitación (D7) como control de carga (FIGS. 2C-2D). Adicionalmente, también se descubrió que otros anticuerpos frente a EphA2 de la invención aumentaban la fosforilación de EphA2 (Tabla 6, columna 5), incluidos Eph099B-102.147 y Eph099B-210.248 (datos no mostrados).

Monocapas de células MDA-MB231 se incubaron en presencia de anticuerpos agonistas frente a EphA2 a 37 °C. Los

- lisados celulares se resolvieron después mediante SDS-PAGE y se sometieron a análisis de transferencia Western con un anticuerpo específico de EphA2 (D7). Eph099B-208.261, EA2 (FIGS. 3A-3B), y Eph099B-233.152 (FIG. 4B) disminuyeron el nivel proteico de EphA2. Algunas membranas se limpiaron y volvieron a sondar con el anticuerpo específico de β -catenina como control de carga (FIGS. 3C-3D). Adicionalmente, también se descubrió que otros anticuerpos frente a EphA2 de la invención disminuían los niveles de la proteína EphA2 4 horas y/o 24 horas después del tratamiento con anticuerpos (Tabla 6, columnas 6 y 7), incluidos Eph099B-102.147 y Eph099B-210.248 (datos no mostrados). La disminución de la expresión de EphA2 se debe, en parte, a la disminución de los niveles de expresión de ARNm en respuesta a la degradación de la proteína EphA2 causada por la unión del anticuerpo agonista (datos no mostrados).
- 5 Los análisis de transferencia western y las inmunoprecipitaciones se realizaron como se ha indicado anteriormente (Zantek y col., 1999, CellGrowth Diff. 10:629-38, que se incorpora como referencia en su totalidad). Brevemente, los extractos con detergente de las monocapas celulares se extrajeron en solución salina tamponada con Tris que contiene 1% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO). Después de medir las concentraciones de proteína (BioRad, Hercules, CA), 1,5 mg del lisado celular se inmunoprecipitaron, se resolvieron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa (PROTRAN™, Schleicher y Schuell, Keene, NH). La unión del anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia potenciada (Pierce, Rockford, IL) y autoradiografía (Kodak X-OMAT; Rochester, NY).
- 10 15

6.2.2 Crecimiento en agar blando

- La capacidad de los anticuerpos de la invención para inhibir la formación de células cancerosas en agar blando se analizó tal como se describe en Zelinski y col. (2001, Cancer Res. 61:2301-6). Brevemente, las células se suspendieron en agar blando durante 7 días a 37 °C en presencia de anticuerpo purificado o solución control (PBS). Los anticuerpos se administraron en el momento de la suspensión en las soluciones de agar tanto inferior como superior. La formación de colonas se puntuó microscópicamente usando un microscopio de contraste de fase inversa Olympus CK-3 equipado con un objetivo 40x. Los grupos que contenían al menos tres células se clasificaron como positivos. Tanto Eph099B-208.261 como EA2 inhibieron el crecimiento de colonias en agar blando (FIG. 5). Adicionalmente, otros anticuerpos de la invención pueden inhibir la formación de colonias en agar blando (Tabla 6, columna 9), incluidos Eph099B-102.147 y Eph099B-210.248 (datos no mostrados).

- 20 25 30
- Se analizó La capacidad de los anticuerpos de la invención para eliminar las colonias de células cancerosas ya formadas en agar blando. Los procedimientos de ensayo fueron similares a los descritos anteriormente, a excepción de que los anticuerpos no se añadieron a las células cancerosas hasta el tercer día de crecimiento en agar blando. Algunos de los anticuerpos de la invención pueden matar células cancerosas ya en crecimiento en colonias en agar blando, mientras que otros anticuerpos pueden ralentizar o reducir el crecimiento de colonias de células cancerosas en agar blando (Tabla 6, columna 10), incluidos Eph099B-102.147, Eph099B-208.261, Eph099B-210.248, y Eph099B-233.152 (datos no mostrados).

6.2.3 Formación de red tubular en MATRIGEL™

- 35 El comportamiento de las células tumorales en un microentorno tridimensional, como MATRIGEL™, puede predecir de forma fiable el estado de diferenciación y el nivel de agresividad de las células epiteliales de mama. Cultivos en monocapa de células epiteliales de mama benignas (MCF-10A) o malignas (MDA-MB-231) se incuban en MATRIGEL™ en presencia de anticuerpos frente a EphA2 (10 μ g/ml) o solución control (PBS). El comportamiento de las células en MATRIGEL™ se analiza como se describe en Zelinski y col. (2001, Cancer Res. 61:2301-6).
- 40 Brevemente, placas de cultivo tisular se revisten con MATRIGEL™ (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) a 37 °C antes de añadir 1×10^5 de células MDA-MB-231 o MCF-10A incubadas previamente en hielo durante 1 hora con el anticuerpo frente a EphA2 o la solución control (PBS). Las células se incuban con MATRIGEL™ durante 24 horas a 37° C y el comportamiento celular se evalúa usando un microscopio de luz inversa Olympus IX-70. Todas las imágenes se registran en una película de 35 mm T-Max-400. Kodak, Rochester, NY).

45 6.2.4 Crecimiento *in vivo*

- Se analizó la capacidad de los anticuerpos de la invención para inhibir el crecimiento de cáncer tumoral *in vivo*. Eph099B-233.152 puede inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo* y prolongar el tiempo de supervivencia de ratones portadores de tumor. Brevemente, 5×10^6 células de cáncer de mama MDA-MB231 se implantaron subcutáneamente en ratones atípicos. Una vez que los tumores hubieron crecido hasta un volumen medio de 100 mm^3 , se administró a los ratones 6 mg/ml de Eph099B-233.152 o PBS control por vía intraperitoneal dos veces a la semana durante 3 semanas. El crecimiento del tumor se evaluó y expresó como una proporción del volumen del tumor dividido por el volumen del tumor inicial (100 mm^3). Tras 30 días, los ratones a los que se administró Eph099B-233.152 tenían tumores más pequeños que los ratones a los que se administró PBS (FIG.6A). El crecimiento tumoral se dejó progresar hasta que el volumen del tumor alcanzó 1000 mm^3 . La supervivencia de los ratones se evaluó puntuando el porcentaje de ratones que viven cada día después del tratamiento. Un porcentaje mayor de ratones sobrevivió en cada punto de tiempo investigado en el grupo al que se administró Eph099B-233.152

(FIG. 6B). Para el día 36, todos los ratones del grupo control habían muerto, en contraste con sólo el 70 % de la mezcla de ratones Eph099B-233.152.

Adicionalmente, EA2 y Eph099B-208-261 también pueden inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*. 5x10⁶ células MDA-MB-231 de cáncer de mama se implantaron ortotópicamente o subcutáneamente y 5x10⁶ células A549 de cáncer de pulmón se implantaron subcutáneamente en ratones atípicos. Una vez que los tumores hubieron crecido hasta un volumen medio de 100 mm³, se administró a los ratones 6mg/kg del anticuerpo agonista EphA2 o el control negativo (PBS o anticuerpo 1A7) por vía intraperitoneal dos veces a la semana durante 3 semanas. En general, se sacrificó a los animales al menos dos semanas después del último tratamiento o cuando los tumores superaron los 2000 mm³. El crecimiento del tumor se evaluó y expresó bien como una proporción del volumen del tumor dividido por el volumen del tumor inicial (100 mm³) o como el volumen total del tumor. El crecimiento de las células MDA-MB-231 implantadas ortotópicamente se inhibió con EA2 (FIG. 7A). El crecimiento de las células MDA-MB-231 implantadas subcutáneamente se inhibió con EA2, Eph099B-208.261, y Eph099B-233.152 (FIG. 7B, D). El crecimiento de las células A549 implantadas subcutáneamente se inhibió con EA2 o Eph099B-208.261 (FIG. 7C).

6.3 Dependencia de estrógenos en las células de cáncer de mama

Células de cáncer de mama sensible a estrógenos, células MCF-7, se transfeccionaron con, y sobreexpresaron de forma estable, EphA2 humano (MCF-7^{EphA2}) (pNeoMSV-EphA2 proporcionado por el Dr. T. Hunter, Scripps Institute). Los análisis de transferencia Western confirmaron la sobreexpresión ectópica de EphA2 en las células transfeccionadas con respecto a los controles equivalentes (datos no mostrados).

La sobreexpresión de EphA2 incrementó el crecimiento de células malignas (FIGS. 8A-8B). Los ensayos de crecimiento se realizaron del siguiente modo. Células MCF-7^{neo} (células control) o MCF7^{EphA2} se sembraron en placas de 96 pocillos. El crecimiento celular se midió con azul Alamar (Biosource International, Camarillo, CA) siguiendo las sugerencias del fabricante. La formación de colonias en agar blando se realizó como se ha descrito anteriormente (Zelinski y col., 2001, Cancer Res. 61:2301-6) y se puntuaron microscópicamente, definiendo los grupos de al menos tres células como positivos. Los datos representan la media de diez campos microscópicos distintos de alta potencia de cada muestra y representativos de al menos tres experimentos distintos. Las barras de error representan el error estándar de la media de al menos tres experimentos distintos, determinado usando el software Microsoft Excel.

Aunque las células control MCF-7 fueron en gran medida incapaces de colonizar el agar blando (una media de 0,1 colonias/campo), las células MCF-7^{EphA2} formaron colonias más grandes y más numerosas (4,7 colonias/campo; P < 0,01) que persistieron durante al menos tres semanas (FIG. 8A y datos no mostrados). A pesar de la mayor colonización del agar blando, el crecimiento de células MCF-7^{EphA2} en cultivo en monocapa no difirió del de los controles equivalentes (FIG. 8B), lo que indica que las actividades estimulantes del crecimiento de EphA2 eran más evidentes usando las condiciones experimentales que el modelo de crecimiento celular (maligno) independiente del anclaje.

Consistente con la mayor colonización del agar blando, las células MCF-7^{EphA2} implantadas ortotópicamente formaron tumores más grandes y de crecimiento más rápido *in vivo*. Se adquirieron ratones atípicos (un/un) de seis a ocho semanas de edad en Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN). Cuando estaba indicado se inyectó una pastilla de liberación controlada de estradiol (0,72 mg, 17 β -estradiol, formulación de 60 días) por vía subcutánea con un trócar estéril de 2 mm 24 horas antes de la implantación del tumor y las pastillas se sustituyeron cada 60 días para los experimentos con una separación de > 60 días en la duración. 1x10⁶ células MCF-7^{neo} o MCF7^{EphA2} se inyectaron en la almohadilla grasa mamaria con visualización directa. Cuando estaba indicado, se administró tamoxifeno (1 mg) mediante sonda oral 6 días a la semana.

En presencia de estrógeno suplementario (17 β -estradiol adquirido en Stigma), las células MCF-7^{EphA2} mostraron un incremento de dos veces el volumen tumoral con respecto a los controles equivalentes (FIG. 9A). Los tumores que sobreexpresaron EphA2 diferían fenotípicamente de los tumores control en que eran más vasculares y localmente invasivos en el momento de la resección (datos no mostrados). Para confirmar que estos tumores expresaban EphA2, los lisados de células enteras de tumores reseccionados se sometieron a análisis de transferencia western con anticuerpos específicos de EphA2 (FIG. 9B). Las membranas se limpiaron y se volvieron a sondar con anticuerpos frente a β -catenina para verificar la misma carga de la muestra. La cantidad relativa de EphA2 fue mayor en las muestras de tumor que en las células iniciales (antes de la implantación), lo que sugiere que los tumores provenían de células con niveles altos de EphA2. Hallazgos comparables con los modelos *in vivo* e *in vitro* indican que la sobreexpresión de EphA2 da como resultado un fenotipo más agresivo.

Se realizaron estudios paralelos en ausencia de estrógeno exógeno. La privación experimental de estrógeno amplificó las diferencias entre los comportamientos celulares de las células control y MCF-7^{EphA2}. Aunque las células MCF-7^{EphA2} siguieron colonizando el agar blando con mayor eficacia que los controles equivalentes (FIG. 10A), estas células sí crecieron en ausencia de estrógeno exógeno (FIG. 10B). En contraste, se requirió estrógeno

suplementario para el crecimiento en monocapa de las células control (FIG. 10B). Adicionalmente, las células MCF-7^{EphA2} conservaron el potencial tumorigénico en ausencia de estrógeno suplementario. Aunque las células control MCF-7 rara vez formaban tumores palpables, las células MCF-7^{EphA2} formaban tumores que persistían durante 12 semanas (FIG. 10C y datos no mostrados). Por tanto, los sistemas de ensayo tanto *in vitro* como *in vivo* confirman que la sobreexpresión de EphA2 disminuye la necesidad de estrógeno exógeno.

5 Se midió la sensibilidad de las células MCF-7^{EphA2} al tamoxifeno. El tamoxifeno (4-hidroxi tamoxifeno adquirido en Sigma) redujo la colonización en agar blando de las células control MCF-7 en al menos un 60%. Las acciones inhibidoras de tamoxifeno sobre las células MCF-7^{EphA2} eran menos pronunciadas (25 % de inhibición, FIG. 11A). Es notable el hecho de que el exceso de estradiol superaba los efectos inhibidores del tamoxifeno, lo que proporcionó 10 pruebas adicionales de la especificidad de este hallazgo (FIG. 11A). De forma similar, el potencial tumorigénico de las células MCF-7^{EphA2} era menos sensible al tamoxifeno en comparación con las células control (MCF-7neo) (FIG. 11B).

15 Ya que la sensibilidad al tamoxifeno a menudo se refiere a la expresión del receptor de estrógenos, se analizó la expresión del receptor de estrógenos y su actividad en MCF-7^{EphA2}. Los análisis de transferencia western revelaron niveles comparables de ER α y ER β en células control y MCF-7^{EphA2} (FIGS. 12A-12B) (los anticuerpos ER α y ER β se adquirieron en Chemicon, Temecula, CA). Además, se detectaron niveles comparables de actividad del receptor de estrógenos en las células control y MCF-7^{EphA2} y esta actividad enzimática permaneció sensible al tamoxifeno (FIGS. 20 12E-12F). La actividad del receptor de estrógenos se midió usando el vector ERE-TK-CAT (que codifica un ERE sencillo; un generoso regalo del Dr. Nakshatri, Indiana University School of Medicine) en estado sin estimular, tras la estimulación con estradiol (10^{-8} M) e inhibición con tamoxifeno (10^{-6} M). Las células se sembraron en suero con carbono sin rojo fenol durante 2 días y se transfeccionaron con ERE-TK-CAT (5 μ g) usando el procedimiento con fosfato cálcico. El vector de expresión de β galactosidasa RSV/ β -galactosidasa (2 μ g, regalo del Dr. Nakshatri) se cotransfeccionó como un control. 24 horas después de la transfección se añadió medio fresco, incluida la selección adecuada de fármacos. Las células se recogieron tras 24 horas y la actividad CAT se evaluó como se ha descrito (Nakshatri et al., 1997, Mol. Cell. Biol. 17:3629-39). Estos resultados indican que el receptor de estrógenos se expresa en las células MCF-7^{EphA2} y permanece sensible al tamoxifeno, lo que sugiere que el defecto que hace de las células MCF-7^{EphA2} menos dependientes de estrógenos reside después en la señalización del estrógeno.

25 El crecimiento de las células MCF-7^{EphA2} que había disminuido la expresión de EphA2 se analizó en agar blando. El anticuerpo monoclonal frente a EphA2 EA2 indujo la activación de EphA2 y la posterior degradación. Se observaron menores niveles de expresión de EphA2 en dos horas de tratamiento con EA2 y EphA2 permaneció indetectable 30 durante al menos las siguientes 24 horas (FIG. 13A). La colonización del agar blando de las células control MCF-7 fue sensible al tamoxifeno (FIG. 13C) y EA2 no alteró más esta respuesta (ya que estas células carecen de EphA2). Las células MCF-7^{EphA2} eran menos sensibles al tamoxifeno (25% de inhibición por tamoxifeno) en comparación con los controles equivalentes (75% de inhibición por tamoxifeno). Mientras que EA2 disminuía la colonización de agar blando (en un 19 %), la combinación de EA2 y tamoxifeno produjo una disminución mucho más espectacular (> 80 %) de la colonización del agar blando. Por tanto, el tratamiento con EA2 restableció un fenotipo que era comparable 35 con las células control MCF-7. Estos hallazgos sugieren que dirigir el anticuerpo EphA2 puede servir para volver a sensibilizar las células de tumor de mama al tamoxifeno.

40 Todos los análisis estadísticos se realizaron usando la t de Student usando Microsoft Excel (Seattle, WA), definiendo la P ≤ 0,05 como significativa. Se realizaron análisis de crecimiento *in vivo* usando el software GraphPad (San Diego, CA).

6.4 Expresión de EphA2 en la neoplasia intraepitelial prostática

La inmunorreactividad de EphA2 distinguía las células epiteliales prostáticas neoplásicas de sus homólogas no neoplásicas. Se obtuvieron noventa y tres casos de prostatectomía retropúbica radical de los archivos de anatomía patológica quirúrgica de Indiana University Medical Center. Los pacientes tenían de 44 a 77 años de edad (media =63 años). Los tumores primarios de las muestras de prostatectomía radical se graduaron de acuerdo con el sistema de Gleason (Bostwick "Neoplasms of the prostate" en Bostwick y Eble, eds., 1997, Urologic Surgical Pathology St. Louis: Mosby página 343-422; Gleason y Mellinger, 1974, J. Urol. 111:58-64). El grado de Gleason varió de 4 a 10. El estado patológico se evaluó de acuerdo con el patrón TNM de 1997 (tumor, ganglios linfáticos y metástasis) (Fleming y col., 1997, AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia: Raven and Lippincott). Los estadios patológicos fueron T2a (n= 9 pacientes), T2b (n= 43), T3a (n= 27), T3b (n=14). Trece pacientes tenían metástasis en los ganglios linfáticos en el momento de la cirugía.

Para la tinción inmunofluorescente se usaron secciones en serie de 5 μm de espesor de láminas fijadas en formalina de muestras de prostatectomía radical. Se seleccionaron los bloques tisulares que contenían la cantidad máxima de tumor y el grado de Gleason más elevad. Se analizó una porta representativo de cada caso. Los portas se desparafinaron en xileno dos veces durante 5 minutos y se rehidrataron con etanoles graduados hasta agua destilada. La recuperación del antígeno se llevó a cabo calentando las secciones en EDTA (pH 8,0) durante 30 minutos. La actividad de peroxidasa endógena se inactivó mediante incubación en 3 % de H_2O_2 durante 15 minutos. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon usando Protein Block (DAKO) durante 20 minutos. Despues, las secciones de tejido se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra EphA2 humana (IgG1, dilución 1:100) durante la noche a temperatura ambiente, seguido por anticuerpo secundario biotinilado (DAKO corporation, Carpintera, CA) y estreptavidina marcada con peroxidasa y se usó 3,3-diaminobenzidina como cromógeno en presencia de peróxido de hidrógeno. En cada lote se introdujeron controles positivos y negativos en paralelo.

La extensión e intensidad de la tinción se evaluaron en el epitelio benigno, neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) y adenocarcinoma del mismo porta para cada caso. Los campos microscópicos con el grado más alto de inmunorreactividad se escogieron para el análisis. En cada caso se analizaron al menos 1000 células. El porcentaje de células que exhibían tinción en cada caso se evaluó semicuantitativamente en una escala incremental del 5 % que varía de 0 a 95 %. Una puntuación de intensidad numérica se establece de 0 a 3 (0, ausencia de tinción, 1, tinción leve; 2, tinción moderada; y 3 tinción fuerte) (Jiang y col., 2002, Am. J. Pathol. 160:667-71; Cheng y coll, 1996, Am J. Pathol. 148:1375-80).

El porcentaje medio de células inmunorreactivas en epitelio benigno, PIN de alto grado y adenocarcinoma se compararon usando la prueba de rangos firmados pareados de Wilcoxon. La intensidad de la tinción para EphA2 en epitelio benigno, PIN de alto grado y adenocarcinoma se comparó usando las pruebas de Cochran-Mantel-Haenszel para datos categóricos ordenados correlacionados. Se realizaron comparaciones pareadas si el ANOVA reveló diferencias significativas. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo y tofos los valores o fueron bilaterales.

La inmunorreactividad de EphA2 se observó en todos los casos de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN), pero no en las células epiteliales benignas. Por ejemplo, la expresión de EphA2 (tanto el porcentaje medio de células inmunorreactivas como la intensidad de la tinción) aumentó tanto en la PIN de grado alto como el los cánceres relacionados con células epiteliales benignas (Tablas 3 y 4). De forma similar, la inmunorreactividad de EphA2 (tanto el porcentaje medio de células inmunorreactivas como la intensidad de la tinción) aumentó en los carcinomas prostáticos en comparación con la PIN de grado alto (Tablas 3 y 4). Esta inmunorreactividad fue evidente en la membrana y el citoplasma de las células epiteliales neoplásicas (datos no mostrados). En contraste, no se observó inmunorreactividad de EphA2 en células estromales proximales a tumores. En el grupo de PIN de alto grado, el 22 % mostró intensidad de tinción de grado 1, el 73 % mostró intensidad de tinción de grado 2 y el 5 % mostró intensidad de tinción de grado 3 (Tabla 3). En el grupo de adenocarcinoma, el 13% de los casos mostró intensidad de tinción de grado 1, el 50% mostró intensidad de tinción de grado 2 y el 37% mostró intensidad de tinción de grado 3. En contraste, el grupo de epitelio normal mostró intensidad de tinción de grado 1 en el 66 % de los casos, mostrando los casos restantes ausencia de inmunorreactividad para EphA2 (intensidad de tinción de grado 0) (Tabla 3). El porcentaje medio de células inmunorreactivas de EphA2 fue del 12 % en las células epiteliales normales, el 67 % en la PIN de grado alto y el 85 % en el adenocarcinoma prostático (Tabla 4).

Aunque niveles altos de EphA2 podían distinguir las células epiteliales prostáticas neoplásicas de las benignas, EphA2 no se correlacionó con otros parámetros histológicos y patológicos de la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, se observaron niveles altos de EphA2 en la mayoría de los carcinomas prostáticos y no se relacionaron con el grado de Gleason, el estadio patológico, la metástasis en ganglios linfáticos, la extensión extraprostática, los márgenes quirúrgicos, la invasión vascular, la invasión perineural o la presencia de otras áreas de la próstata con PIN de grado alto (Tabla 5).

TABLA 3

Tipo de célula	Grado de intensidad de la tinción			
	0	1	2	3
Epitelio benigno	31(33%)	61(66%)	1 (1%)	0 (0%)
PIN de grado alto ^a	0 (0%)	20 (22%)	68 (73%)	5 (5%)
Adenocarcinoma ^{a,b}	0 (0%)	12 (13%)	47(50%).	34 (37%)

^aIndica que el porcentaje de intensidad de la tinción era estadísticamente menor en comparación con el de las células normales con un valor $P= 0,0001$ usando una prueba de rangos firmados pareados de Wilcoxon.

La intensidad de la tinción fue significativamente mayor en comparación con la PIN de grado alto ($P< 0,01$, Cochran-Mantel-Henszel).

TABLA 4

Tipo de célula	% Medio de tinción celular \pm SD	Intervalo (%)
Células normales	12 \pm 17	0 - 90
PIN de grado alto	67 \pm 18 ^a	5 - 95
Adenocarcinoma	85 \pm 12 ^{a,b}	30 -95

^aIndica que el porcentaje de intensidad de la tinción era estadísticamente menor en comparación con el de las células normales con un valor $P= 0,0001$ usando una prueba de rangos firmados pareados de Wilcoxon.

^bLa intensidad de la tinción fue significativamente mayor en comparación con la PIN de grado alto ($P< 0,01$, ANOVA).

TABLA 5

Característica del paciente	% de pacientes totales (n=93)	% Medio de tinción celular c/anticuerpo frente a EphA2 (\pm SD)	Intensidad media de la tinción con anticuerpo frente a EphA2 (\pm SD)
Grado primario de Gleason			
2	12	83 \pm 2	2,0 \pm 0,6
3	43	86 \pm 10	2,3 \pm 0,7
4	23	84 \pm 16	2,3 \pm 0,7
5	15	86 \pm 11	2,3 \pm 0,6
Grado secundario de Gleason			
2	15	82 \pm 16	2,30,5
3	29	85 \pm 15	2,10,6
4	35	85 \pm 9	2,30,7
5	14	88 \pm 8	2,40,8
Suma de Gleason			
< 7	28	83 \pm 12	2,2 \pm 0,6
7	35	85 \pm 14	2,2 \pm 0,7
> 7	30	87 \pm 10	2,4 \pm 0,7
clasificación T			
T2a	9	89 \pm 6	2,3 \pm 0,5
T2b	43	84 \pm 12	2,2 \pm 0,7
T3a	37	84 \pm 15	2,2 \pm 0,7
T3b	14	63 \pm 10	2,4 \pm 0,6
Metástasis en ganglios linfáticos			
Positiva	13	88 \pm 9	2,3 \pm 0,6
Negativa	80	84 \pm 13	2,2 \pm 0,7
Extensión extraprostática			
Positiva	53	86 \pm 11	2,3 \pm 0,7
Negativa	40	84 \pm 14	2,2 \pm 0,7
Margen quirúrgico			
Positivo	50	86 \pm 11	2,1 \pm 0,6
Negativo	43	84 \pm 13	2,4 \pm 0,7
Invasión vascular			
Positiva	30	85 \pm 11	2,1 \pm 0,8
Negativa	63	86 \pm 13	2,3 \pm 0,6
Invasión perineural			
Positiva	82	82 \pm 15	2,4 \pm 0,5
Negativa	11	85 \pm 12	2,2 \pm 0,7
PIN DE GRADO ALTO			
	89	85 \pm 12	2,3 \pm 0,7
	4	85 \pm 9	2,0 \pm 0,8

6.5 Tratamiento de pacientes con cáncer metastásico

Se diseñó un estudio para evaluar la farmacocinética y seguridad de los anticuerpos monoclonales de la invención en pacientes con cáncer de mama metastásico. Los pacientes de cáncer reciben actualmente Taxol o Taxotere. Los pacientes que actualmente estaban recibiendo el tratamiento podrán continuar tomando estas medicaciones.

A los pacientes se administra una única dosis IV de un anticuerpo monoclonal de la invención y, después, comenzando 4 semanas después, se analizan tras la administración de dosis IV semanales repetidas a la misma dosis durante un periodo de 12 semanas. La seguridad del tratamiento con el anticuerpo monoclonal de la invención

se evalúa, además de los posibles cambios en la actividad de la enfermedad durante 26 semanas de dosificación IV. Se trata a diferentes grupos de pacientes y se evalúan de forma similar, pero reciben dosis de 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, o 8 mg/kg.

5 Los anticuerpos monoclonales de la invención se formulan a 5 mg/ml y 10 mg/ml para inyección IV. Se requiere una formulación de 80 mg/ml para la administración subcutánea repetida. Los anticuerpos monoclonales de la invención también se formulan a 100 mg/ml para administrar para los fines del estudio.

Los cambios se miden o determinan mediante la progresión del crecimiento tumoral.

6.6 Disminución de los niveles de EphA2 usando oligonucleótidos antisentido de EphA2

10 Se desarrolló un enfoque basado en oligonucleótidos que disminuyó la expresión de EphA2 en células tumorales independientes de la activación de EphA2. Para disminuir los niveles de la proteína EphA2, las células de carcinoma de mama MDA-MB-23 se transfeccionaron transitoriamente con oligonucleótidos antisentido modificados con fosfororioato que correspondían a una secuencia que se descubrió que era única de EphA2, según se determinó usando una evaluación de secuencia de GenBank (5'-CCAGCAGTACCGCT-TCCTGCCCTGCGGCCG-3'; SEC ID Nº 49) Como control se proporcionó oligonucleótidos antisentido invertidos (5'-GCCGCGTCCCCTTCAC-CATGACGACC-3'; SEC ID Nº 50). Las células se transfeccionaron con oligonucleótidos (2 μ g/ml) usando Lipofectamine PLUS Reagent (Life Technologies, Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección se dividieron las células. La mitad de las células se sembraron en agar blando y las células restantes se extrajeron y sometieron a análisis de transferencia western.

20 El análisis de transferencia western y las inmunoprecipitaciones se realizaron como se ha descrito anteriormente (Zantek y col., 1999, Cell Growth Diff. 10:629-38). Brevemente, extractos de detergente de monocapas celulares se extrajeron en solución salina tamponada con Tris que contenía 1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO). Después de medir las concentraciones de proteína (BioRad, Hercules, CA), 1,5 mg del lisado celular se inmunoprecipitaron, se resolvieron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa (PROTRAN™, Schleicher y Schuell, Keene, NH). La EphA2 se detectó con un anticuerpo específico de EphA2 (D7, adquirido de Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NY). Las membranas se limpiaron y se volvieron a sondar con anticuerpos frente a paxilina (regalo del Dr. . Burridge de la University of North Carolina) como control de carga de la muestra. La unión del anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia potenciada (Pierce, Rockford, IL) y autoradiografía (Kodak X-OMAT; Rochester, NY).

25 Los análisis de transferencia western confirmaron que los oligonucleótidos antisentido disminuían selectivamente la expresión de EphA2 en células MDA-MB-231, mientras que un control antisentido invertido (IAS) no lo hizo (FIGS. 14A-14B).

30 Las células MDA-MB-231 se suspendieron en agar blando. La formación de colonias en agar blando se realizó como se describe en Zelinski y col. (2001, Cancer Res. 61:2301-6), que se incorpora en su totalidad por referencia. Los anticuerpos o una solución control (PBS) se incluyeron en las soluciones de agar inferior y superior. La formación de colonas se puntuó microscópicamente usando un microscopio de contraste de fase inversa Olympus CK-3 equipado con un objetivo 40x. Los grupos que contenían al menos tres células se clasificaron como positivos. Se muestra el número medio de colonias por campo de potencia alta. En cada experimento se realizó la media de diez campos microscópicos distintos de alta potencia y los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos distintos

35 Los oligonucleótidos antisentido de EphA2 disminuyeron la colonización en agar blando en al menos un 60 % en comparación con los controles equivalentes (FIG. 14C). Los resultados consistentes con los anticuerpos frente a EphA2 y los oligonucleótidos antisentido indican que la disminución de la expresión de EphA2 es suficiente para disminuir el crecimiento de las células tumorales.

6.7 Análisis cinético de los anticuerpos frente a EphA2.

40 Para medir la tasa de K_{off} de los anticuerpos monoclonales de la invención se usó un ensayo BIACORE™ basado en resonancia de plasmón superficial. La IgG presente en el sobrenadante del hibridoma se usó para la medición. Los anticuerpos con K_{off} aproximadamente inferiores a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ tienen tasas de K_{off} lentas. Los anticuerpos con K_{off} aproximadamente inferiores a $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ tienen tasas de K_{off} muy lentas. Los anticuerpos con K_{off} aproximadamente inferiores a $9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ tienen tasas de K_{off} ultralentas.

Inmovilización de EphA2

45 EphA2-Fc se inmovilizó en una superficie de un circuito sensor CM5 usando una química de acoplamiento de amina estándar (70 μ l de una mezcla 1:1 de NHS/EDC) Brevemente, una solución de 400 nM de EphA2-Fc en NaOAc 10mM a pH 4 se inyectó después sobre la superficie activada a una densidad de 1000-1100 UR. Los ésteres reactivos no usados se "recubrieron" posteriormente con una inyección de 70 μ l de Et-NH2 1M. De forma similar, se

preparó una superficie control “recubierta” y activada sobre el mismo circuito sensor sin proteína, para servir como superficie de referencia.

Experimentos de unión

5 Se realizó una inyección de 250 μ l de los sobrenadantes del hibridoma de EphA2 sobre las superficies de EphA2-Fc y control, y se registraron las respuestas de unión. Estos sobrenadantes se usaron sin diluir. Tras cada inyección se recogieron datos de al menos 10 minutos de la fase de disociación. El anticuerpo monoclonal frente a EphA2 purificado EA2 se preparó para servir un control positivo (a 1 μ g, 5 μ g y 25 μ g por 250 μ l de medio de crecimiento). También se preparó un anticuerpo monoclonal control negativo que no se une a EphA2 a 5 μ g/250 μ l de medio de crecimiento. También se realizaron inyecciones control de medio de crecimiento en esta superficies. Tras cada ciclo 10 de unión se regeneró la superficie de EphA2-Fc con un único pulso de 1 minuto (inyección) de NaCl 1M – NaOH 50Mm.

Evaluación de los datos

15 Los datos de unión se corrigieron restando el ruido de artefactos (inyecciones blanco de medio) y la unión inespecífica (superficie control) en una técnica conocida como “doble referenciado”. Por tanto, las superposiciones del sensograma representan las curvas de unión “netas”. Eph099B-208.261 and Eph099B-233.152 (véase la Tabla 6) tienen tasas de K_{off} más lentas que EA2 (FIG. 15). Adicionalmente, otros anticuerpos de la invención tienen tasas K_{off} lentas (Tabla 6, columna 8), incluidos Eph099B-102.147 y Eph099B-210.248 (datos no mostrados).

La Tabla 6 resume la caracterización de los anticuerpos monoclonales frente a EphA2 como se describe en el presente documento.

Clon	Subclon	Especificidad	Fosforilación de EphA2	Degradación de EphA2 4 h en agar blando	Degradación de EphA2 24 h	Destase	Inhibición de las colonias en agar blando agar blando	Eliminación de las colonias en agar blando uniones
		Inhibe la unión de EA2	Se une a EphA2					
Grupo A								
101	Sí	nd	moderada	nd	muy lenta	nd	nd	
102	sí	nd	baja-mod.	nd	muy lenta	nd	nd	
201	sí	nd	no	nd	lenta	nd	nd	
Grupo B								
101	nd	sí	débil	moderada	no	nd	fuerte	nd
102	sí	sí	sí	Fuerte	fuerte	ultralenta	fuerte	mod-fuerte
103	sí	sí	débil	Fuerte	fuerte	nd	moderada-fuerte	nd
108	nd	sí	nd	baja-mod	nd	nd	fuerte	nd
201	sí	sí	nd	no	nd	muy lenta	fuerte	baja
203	sí	sí	nd	baja-mod	nd	nd	fuerte	nd
204	sí	sí	fuerte	fuerte	fuerte	nd	ninguna	moderada
208	sí	sí	sí	fuerte	nd	nd	moderada	moderada
103			nd	fuerte	fuerte	nd	nd	fuerte
108			nd	fuerte	nd	nd	nd	nd
117			nd	fuerte	fuerte	nd	nd	muy fuerte
177			nd	fuerte	nd	nd	nd	nd
205			nd	fuerte	no	nd	nd	nd
222			nd	fuerte	nd	nd	nd	nd
234			nd	fuerte	nd	nd	nd	nd
235			nd	fuerte	moderada	nd	nd	nd
238			nd	fuerte	nd	nd	nd	nd

(continuación)

209	nd	sí	nd	baja	nd	nd	fuerte	nd
210	sí	sí	sí	fuerte	no	nd	fuerte	moderada
211	no	sí	nd	no	nd	moderada	fuerte	nd
219	sí	sí	nd	baja	nd	lenta	fuerte	nd
220	sí	sí	nd	no	nd	ultralenta	fuerte	muy fuerte
221	sí	sí	nd	no	nd	ultralenta	fuerte	muy fuerte
223	sí	sí	fuerte	fuerte	moderada	lenta	ninguna	moderada
229	sí	sí	nd	no	nd	muy lenta	fuerte	nd
230	sí	sí	nd	no	nd	muy lenta	fuerte	nd
231	sí	sí	sí	fuerte	no	muy lenta	fuerte	moderada
233	sí	sí	débil	fuerte	fuerte	muy lenta	ninguna	moderada
301	no	sí	nd	no	nd	muy lenta	fuerte	ninguna
302	no	sí	nd	baja	nd	nd	fuerte	nd
307	no	sí	débil	moderada	no	lenta	fuerte	nd
308	no	sí	nd	baja	nd	nd	fuerte	nd
309	sí	sí	nd	no	nd	ultralenta	fuerte	muy fuerte
310	nd	sí	nd	no	nd	nd	fuerte	nd
311	sí	sí	nd	baja	nd	muy lenta	fuerte	nd
312	no	sí	nd	baja-moderada	nd	nd	fuerte	nd
313	sí	sí	nd	baja	nd	muy lenta	fuerte	nd
314	sí	sí	nd	baja	nd	ultralenta	fuerte	moderada
315	sí	sí	nd	baja	nd	ultralenta	fuerte	moderada
316	sí	sí	nd	no	nd	muy lenta	fuerte	nd
317	sí	sí	nd	no	nd	lenta	fuerte	nd
401	no	sí	nd	no	nd	nd	fuerte	nd
402	nd	sí	nd	baja	nd	nd	fuerte	nd
404	nd	sí	sí	moderada	no	nd	nd	nd
406	no	sí	nd	no	nd	nd	nd	nd
407	no	sí	nd	no	nd	lenta	nd	nd

(continuación)						
408	no	sí	nd	no	nd	lenta
409	nd	sí	nd	no	nd	nd
410	no	sí	fuerte	moderada	no	rápida

6.8 Análisis del epítopo de los anticuerpos frente a EphA2.

Se caracterizaron los anticuerpos frente a EphA2. Células MCF-10A no transformadas o MDA-MB-231 transformadas se incubaron con 10 µg/ml de Eph099B-233.152 o EA2 a 4°C durante 30 minutos antes de la fijación en una solución de 3 % de formalina e inmunomarcaje con IgG anti-ratón conjugada con fluoróforo. EA2 se une, preferentemente a EphA2 sobre las células transformadas (FIG. 16D). En contraste con ello, Eph099B-233.152 se une a EphA2 expresado sobre las células transformadas y no transformadas (FIGS. 16A-16B). El tratamiento con las células MCF-10A no transformadas con EGTA 4 mM durante 20 minutos disoció las células. El EA2 unido a EphA2 sobre EGTA disoció las células, pero no las células no tratadas (FIGS. 17A-17B).

Se realizó un experimento equivalente usando células MCF-10A o MDA-MB-231. La cantidad de unión EA2-EphA2 se midió usando citometría de flujo (FIGS. 17C-17D). Las células se trataron mediante incubación en EGTA 4 mM durante 10-15 minutos en hielo (panel superior) o no se trataron con EGTA (panel central) antes de la incubación con 10 µg/ml de EA2. Las células se fijaron después con 3% de formalina y se marcaron con IgG anti-ratón de burro marcada con fluoróforo. Las células control se incubaron únicamente con anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de burro marcada con fluoróforo) en ausencia de anticuerpo primario (EA2) (panel inferior). Después, las muestras se evaluaron usando citometría de flujo (Becton Dickinson FACStar Plus). El tratamiento con EGTA no afectó a la unión de EA2 a las células transformadas (FIG. 17D, paneles superior y central). En contraste, la unión de EA2 a las células no transformadas se incrementó mediante incubación en EGTA (FIG. 17C, paneles superior y central).

Una placa de microtitulación se revistió con 10 mg/ml de efrina A2-Fc durante la noche a 4 °C. Una proteína de fusión consistente en el dominio extracelular de EphA2 unida a la región constante de IgG₁ humana (EphA2-F) se incubó y unió a la efrina A1-Fc inmovilizada.

La efrina A1-Fc biotinilada, EA2 (blanco) o Eph099B-233.152 se incubaron con el complejo EphA2-Ephrin A1-Fc y se midió la cantidad de unión. Muy poca Efrina A1-Fc adicional se unió al complejo EphA2-Efrina A1-Fc, mientras que, en contraste, niveles considerables de EA2 y Eph099B-233.152 se unieron al complejo EphA2-Efrina A1-Fc (FIG. 18A).

El complejo EphA2-Efrina A1-Fc se preparó como se ha descrito en lo que antecede. Después, el EA2 biotinilado (10 µg/ml) se incubó con el complejo durante 30 minutos, el competidor sin marcar se incubó con el complejo EphA2-Efrina A1-Fc-EA2 en la cantidad indicada. EA2 no marcada podía desplazar a la EA2 marcada a concentraciones de 100 ng/ml o mayores. Eph099B-233.152 y Efrina A1-Fc sin marcar fueron similares en lo que respecta a su capacidad para desplazar la EA2 marcada (FIG 18B).

7. EQUIVALENTES

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán contribuir usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descrita en la presente memoria descriptiva.

LISTADO DE SECUENCIAS

35

<110> MedImmune, Inc.

Kinch, Michael

Carles-Kinch, Kelly

Kiener, Peter

40 Langermann, Solomon

<120> Anticuerpos monoclonales frente a EphA2 y procedimientos de uso de los mismos

<130> 10271-097-228

45

<140>

<141>

<150> 60/379,322

5 <151> 2002-05-10

<150> 60/418,213

<151> 2002-10-14

10 <150> 60/418,213

<151> 2003-04-03

<160> 48

15 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 373 715 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

10 <210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 3

Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 4

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr
1								
								5

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400>

5

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1															15

Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
20															30

Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
35															45

Gly	Met	Ile	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
50															60

Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65															80

Met	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
															95

Ala	Arg	Gly	Gly	Asn	Met	Val	Gly	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
														110

Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser
					115

ES 2 373 715 T3

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 7

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

<210> 8

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Gly Asn Met Val Gly Gly Gly Tyr
1 5

20

<210> 9

<211> 318

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <400> 9

caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccaaga 120
tcctccccca aaccctggat ttatctcaca accaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180

	ttcagtggca gtgggtctgg gacctttac tcttcacaa tcagcagcat ggaggctgaa	240
	gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgaaa	300
	acaaagttgg aaataaga	318
	<210> 10	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 10	
	gccagctcaa gtgttaaggta catgtac 27	
	<210> 11	
	<211> 21	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 11	
	ctcacaacca acctggcttc t 21	
	<210> 12	
15	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 12	
	cagcagtggta gtagtaaccc attcacg 27	
20	<210> 13	
	<211> 354	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 13	
	cagggtccaaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg	60
	tcctgcaagg cttctggcta cactttcacc agctactgga tgcactgggt gaaacaaagg	120
	cctggacaag gccttgagtg gattggatg attcatccta atagtggtag tactaactac	180
	aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgttagaca aatcctccag cacagcctac	240
	atgcgactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggggggt	300
	aacatggtag gggggggcta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca	354

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<400> 14
ggctacactt tcaccagcta ctggatgcac 30
<210> 15
<211> 51
10 <212> ADNA
<213> Homo sapiens
<400> 15
atgattcatc ctaatagtgg tagtactaac tacaatgaga agttcaagag c 51
<210> 16
15 <211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 16
agaggggta acatggtagg ggggggctac 30
20 <210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17

ES 2 373 715 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Asn Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 18

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

<210> 19

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser
1 5

15 <210> 20

<211> 9

<212> PRT

ES 2 373 715 T3

<213> Homo sapiens

<400> 20

 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

5 <210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95

 Tyr Cys Val Arg Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

10

 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 373 715 T3

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met Asn
1 5 10

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 23

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 24
10 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24

Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser
1 5

15
<210> 25
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens
20 <400> 25

gatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagcgtcaat 60
cttcctgca gggccagcca aagtattagc aacaacctac actggtatca acaaaaatca 120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gtttccagt ccatctctgg gatccccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcaactctca gtatcaacag tgtggagact 240
gaagattttg gaatgtatcc ctgtcaacag agtaacagct ggccgctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 26
 <211> 27
 <212> ADNA
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 agccaaagta ttagcaacaa cctacac 27
 <210> 27
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 tatgtttcc agtccatctc t 21
 <210> 28
 15 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 caacagagta acagctggcc gctcacg 27
 20 <210> 29
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 gaggtgaagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtaacagc ctgggggttc tctgagtctc 60
 tcctgtgcag cttctggatt caccttcaact gattactcca tgaactgggt ccgccagcct
 ccagggaaagg cacttgagtg gttgggtttt attagaaaca aagctaatac ttacacaaca 180
 gagttacagtg catctgtgaa gggtcggttc accatctcca gagataattc ccaaaggatc 240
 ctcttatcttc aaatgaatgc cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtgttaaga 300
 25 tacccttaggt atcatgctat ggactcctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

 <210> 30
 <211> 30

<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 30
ggattcacct tcactgatta ctccatgaac 30
5 <210> 31
<211> 57
<212> ADNA
<213> Homo sapiens
<400> 31
10 tttattagaa acaaagctaa tgattacaca acagagtaca gtgcacatgtt gaagggt 57
<210> 32
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15 <400> 32
tacccttaggt atcatgctat ggactcc 27
<210> 33
<211> 107
<212> PRT
20 <213> Homo Sapiens
<400> 33

ES 2 373 715 T3

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 34

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 34

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 35

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 35

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

15 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

ES 2 373 715 T3

<400> 36

Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 37

5 <211> 115

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 37

10

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Glu Ala Ile Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 38

15 <211> 10

<212> PRT

ES 2 373 715 T3

<213> Homo Sapiens

<400> 38

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
1 5 10

<210> 39

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 39

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10 <210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 40

Glu Ala Ile Phe Thr Tyr
1 5

15

<210> 41

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 41

gacatcaaga tgacccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtca 60
atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aactattaa gctggttcca gcagaaacca 120
gggaaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtt 240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctgaaa tatgtatgagt ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 42

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 42

5 gcgagtcagg acattaataa ctatthaagc 30
 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 43
 cgtgcaaaca gattggtaga t 21
 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADNA

15 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 aaatatgatg agtttccgta c 21
 <210> 45
 <211> 345

20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 45

gacgtgaagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgaagc	ctggagggtc	cctgaaactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cacttcagt	agctataccca	tgtcttgggt	tcgccagact	120
ccggagaaga	ggctggagtg	ggtcgcaacc	attagtagtg	gtggtactta	cacctactat	180
ccagacagtg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaagaa	caccctgtac	240
ctgcaaatga	gcagtctgaa	gtctgaggac	acagccatgt	attactgtac	aagagaagct	300
atctttactt	actggggcca	agggactctg	gtcactgtct	ctgca		345

25 <210> 46
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 46

ggattcactt tcagtagcta taccatgtct 30

<210> 47

5 <211> 51

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 47

accatttagta gtggtggtac ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg c 51

10

<210> 48

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 48

agagaagcta tctttactta c 21

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a EphA2 con una K_{off} inferior a $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e induce fosforilación de la EphA2, en el que:
- 5 a. el anticuerpo compite por la unión de EphA2 con el anticuerpo Eph099B-102.147 producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y número de registro asignado PTA-4572;
- 10 b. el anticuerpo compite por la unión de EphA2 con el anticuerpo Eph099B-208.261 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4573;
- 15 c. el anticuerpo compite por la unión de EphA2 con el anticuerpo Eph099B-210.248 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4574;
- 20 d. el anticuerpo compite por la unión de EphA2 con el anticuerpo Eph099B-233.152 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-5194;
- 25 e. el anticuerpo es producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4572;
- 30 f. el anticuerpo es producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4573;
- 35 g. el anticuerpo es producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4574;
- 40 h. el anticuerpo es producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-5194;
- 45 i. el anticuerpo comprende una cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 5 o 21 y una cadena VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 1 o 17;
- 50 j. el anticuerpo comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2 o 18, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 3 o 19, una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 4 o 20, una CDR de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 6 o 22, una CDR2 de VH que tiene a secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 7 o 23 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 8 o 24; o
- 55 k. el anticuerpo comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2 o 18, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 3 o 19, una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 4 o 20, una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 6 o 22, una CDR2 de VH que tiene a secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 7 o 23 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 8 o 24, en el que una o más de las CDR tiene una, dos o tres mutaciones.
- 60 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la K_{off} es inferior a $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.
- 65 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es producido por un hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4572.
- 70 4. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es producido por un hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4573.
- 75 5. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es producido por un hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4574.
- 80 6. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es producido por un hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-5194.
- 85 7. El anticuerpo la reivindicación 1, en el que el anticuerpo compite por la unión de EphA2 con el anticuerpo Eph099B-102.147 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4572;
- 90 8. El anticuerpo la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo compite por la unión de EphA2 con el anticuerpo Eph099B-208.261 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4573;

9. El anticuerpo la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo compite por la unión de EphA2 con el anticuerpo Eph099B-210.248 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-4574.
10. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo compite por la unión de EphA2 con el anticuerpo Eph099B-233.152 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y número de registro asignado PTA-5194.
- 5 11. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 5 o 21.
12. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 1 o 17.
- 10 13. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 5 y una cadena VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 1.
14. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 21 y una cadena VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 17.
- 15 15. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 3 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 4.
16. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 6, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 7 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 8.
- 20 17. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 18, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 19 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 20.
- 25 18. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 22, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 23 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 24.
- 30 19. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 3, una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 4, una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 6, una CDR2 de VH que tiene secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 7 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 8.
- 35 20. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 18, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 9, una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 20, una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 22, una CDR2 de VH que tiene secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 23 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 24.
21. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 7 a 20, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un fragmento Fab, un anticuerpo químico, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento F(ab') o una Fv unida por disulfuro.
- 40 22. El anticuerpo de la reivindicación 1 o de 7 a 20, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
23. Un anticuerpo conjugado, que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes conjugado o condensado a un agente heterólogo.
24. El anticuerpo conjugado de la reivindicación 23, en el que el agente heterólogo es un agente diagnóstico o detectable.
- 45 25. El anticuerpo conjugado de la reivindicación 23, en el que el agente heterólogo es una citotoxina.
26. El anticuerpo conjugado de la reivindicación 23, en el que el agente heterólogo es un agente terapéutico o resto farmacológico.

27. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 6, 13, 14, 19, o 20.
28. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 27.
29. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 28.
- 5 30. Una célula huésped sometida a ingeniería para contener o expresar el ácido nucleico de la reivindicación 27.
31. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
32. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 31 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente, en el que el cáncer está asociado con la sobreexpresión de EphA2.
- 10 33. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo conjugado de la reivindicación 23, 24, 25 o 26.
34. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 33 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente, en el que el cáncer está asociado con la sobreexpresión de EphA2.
35. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente, en el que el cáncer está asociado con la sobreexpresión de EphA2.
- 15 36. Uso de del anticuerpo conjugado de la reivindicación 23, 25 o 26 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente, en el que el cáncer está asociado con la sobreexpresión de EphA2.
37. Uso de la reivindicación 35 o 36, en el que la composición comprende además un terapia adicional.
38. Un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico de cáncer en un paciente, que comprende:
- 20 a. poner en contacto células de dicho paciente con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 en las condiciones adecuadas para la unión de anticuerpo-EphA2; y
- b. medir la unión del anticuerpo frente a EphA2 a dichas células, en la que un nivel de unión del anticuerpo frente a EphA2 superior al control indica que el paciente tiene cáncer.
39. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 en la preparación de una composición para diagnosticar, pronosticar o monitorizar la eficacia de la terapia para el cáncer en un paciente, en el que el cáncer está asociado con la sobreexpresión de EphA2.
- 25 40. Uso del anticuerpo conjugado de la reivindicación 24 en la preparación de una composición para diagnosticar, pronosticar o monitorizar la eficacia de la terapia para el cáncer en un paciente, en el que el cáncer está asociado con la sobreexpresión de EphA2.
41. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, 39 o 40, en el que el cáncer es de origen celular epitelial.
- 30 42. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, 39 o 40, en el que el cáncer es un cáncer metastásico.
43. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, o 39 a 43, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas o un carcinoma de células renales.
- 35 44. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas o un carcinoma de células renales.
45. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que el cáncer es de un origen celular epitelial.
46. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que el cáncer es un cáncer metastásico.
47. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que las células son de sangre entera, esputo, orina, suero, o aspirados con aguja fina de tejido de células tumorales.
- 40 48. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, 39 o 40, en el que el paciente es un ser humano.
49. Uso de a reivindicación 48, en el que el ser humano es refractario a una primera terapia.

50. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que el paciente es un ser humano.
51. Un hibridoma depositado en la ATCC que tiene el número de registro PTA-4572.
52. Un hibridoma depositado en la ATCC que tiene el número de registro PTA-4573.
53. Un hibridoma depositado en la ATCC que tiene el número de registro PTA-4574.
54. Un hibridoma depositado en la ATCC que tiene el número de registro PTA-5194.

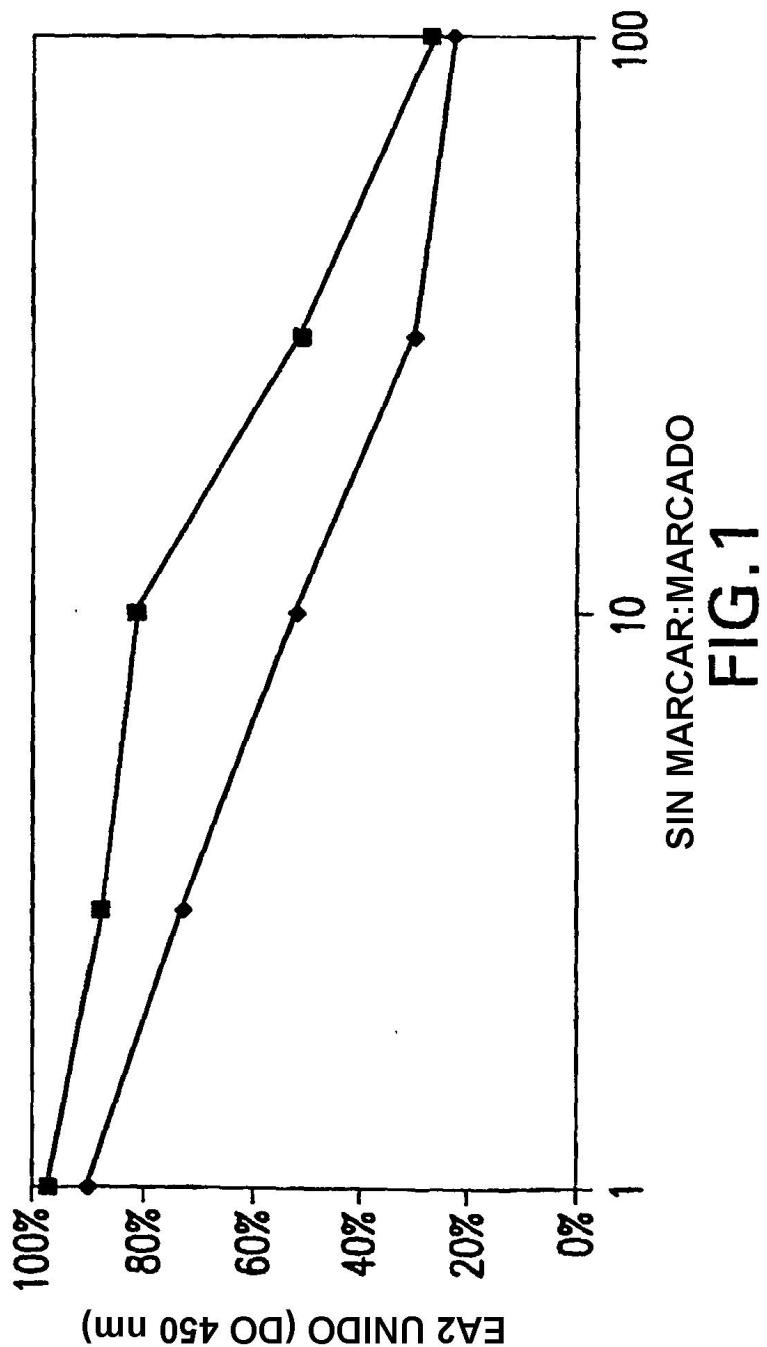


FIG. 1

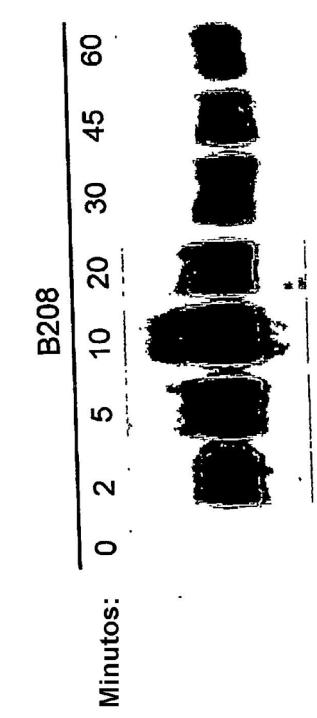


FIG.2A

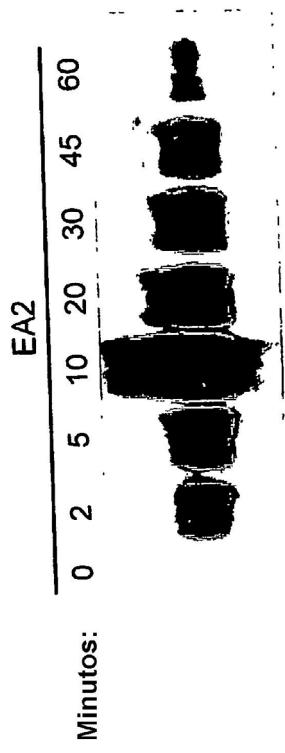


FIG.2B

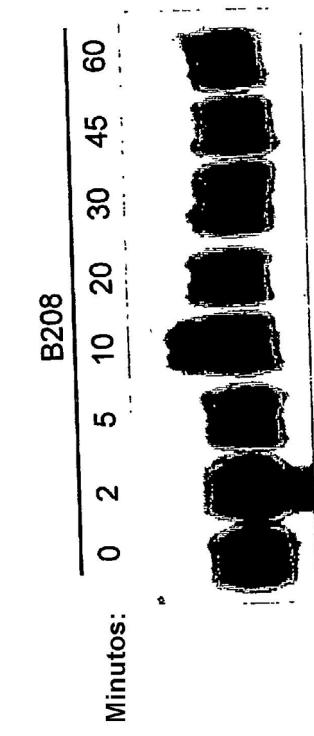


FIG.2C

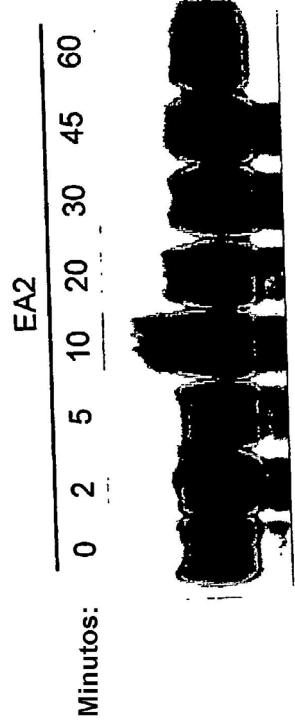


FIG.2D

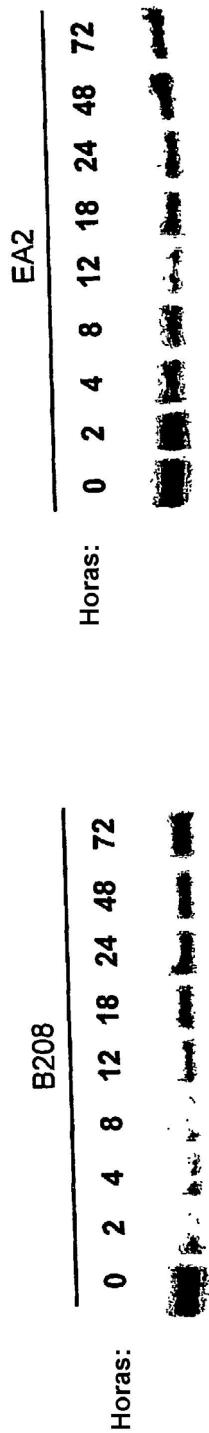


FIG. 3A

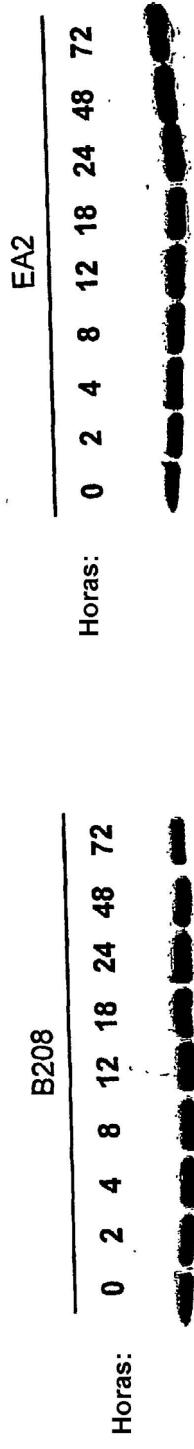


FIG.3D



FIG. 3B



FIG. 3D

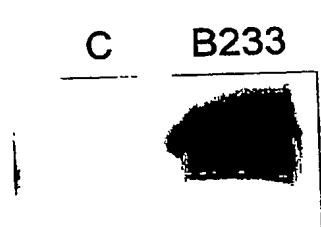
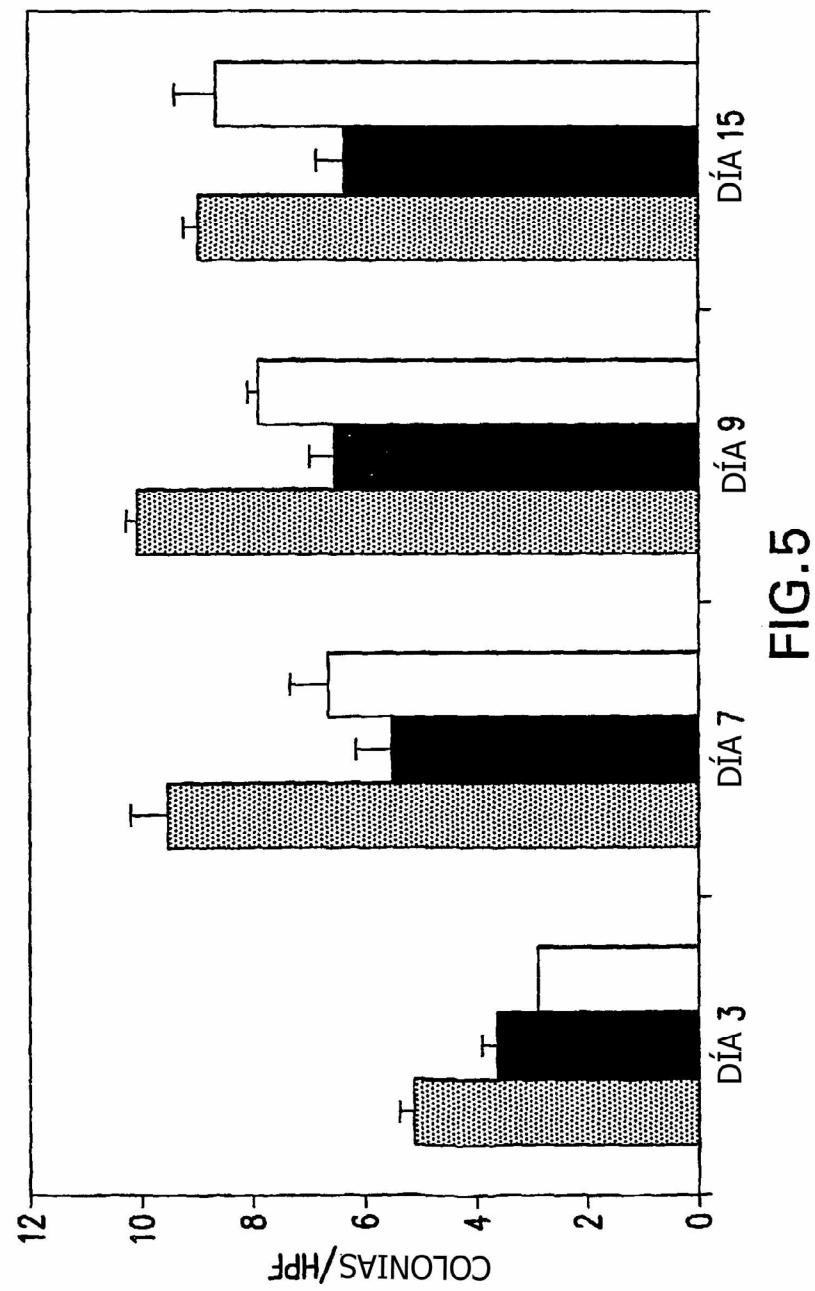


FIG.4A



FIG.4B



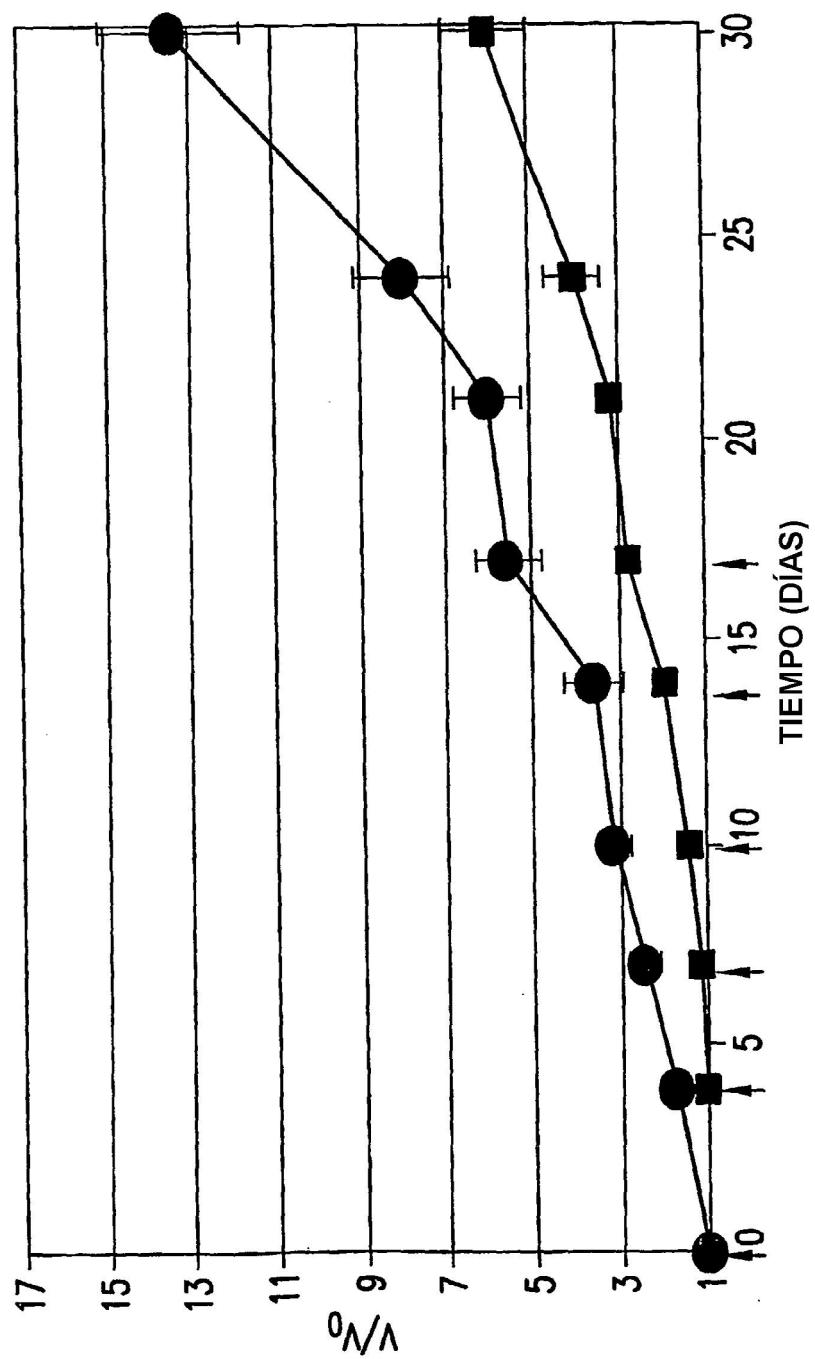


FIG. 6A

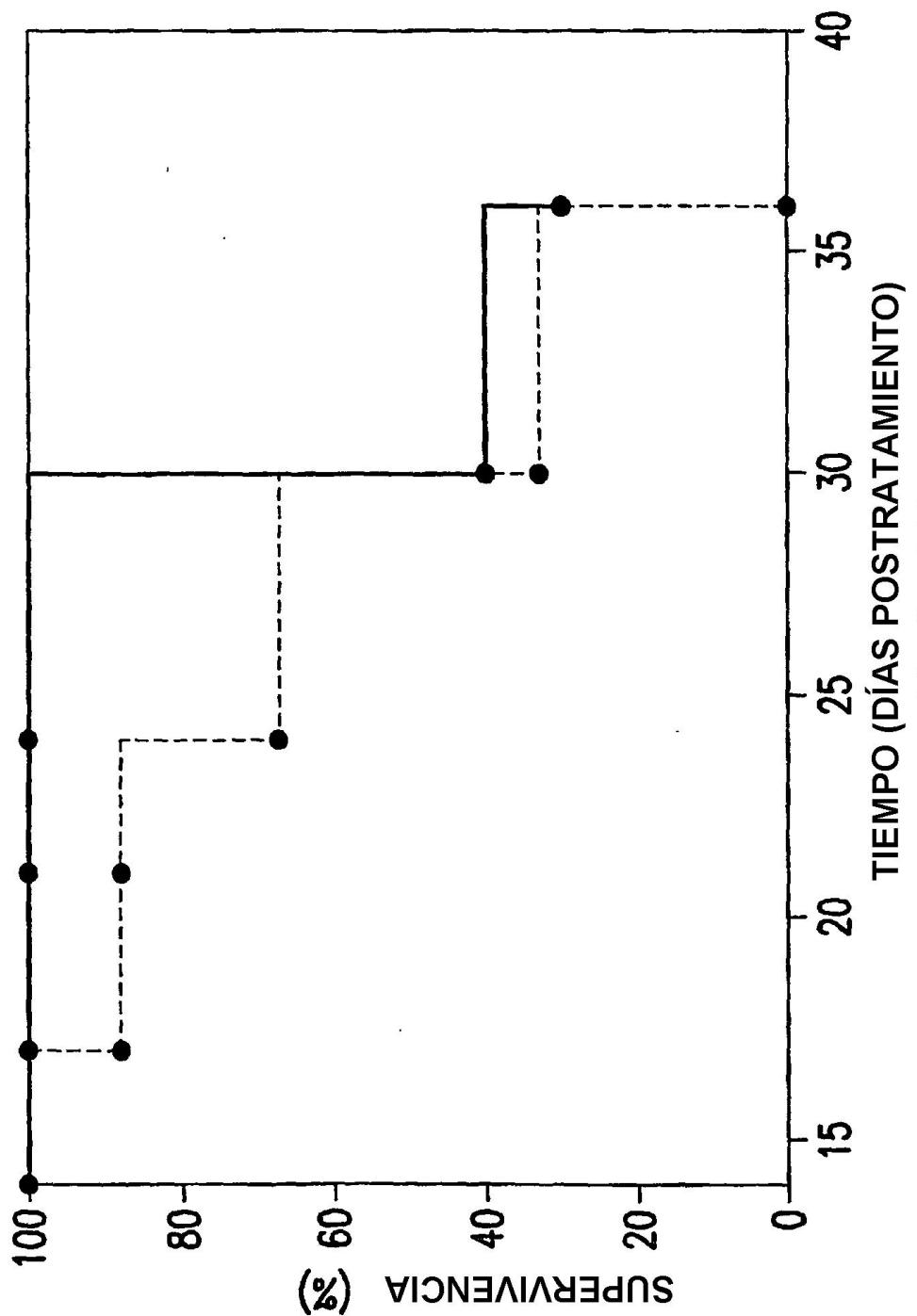
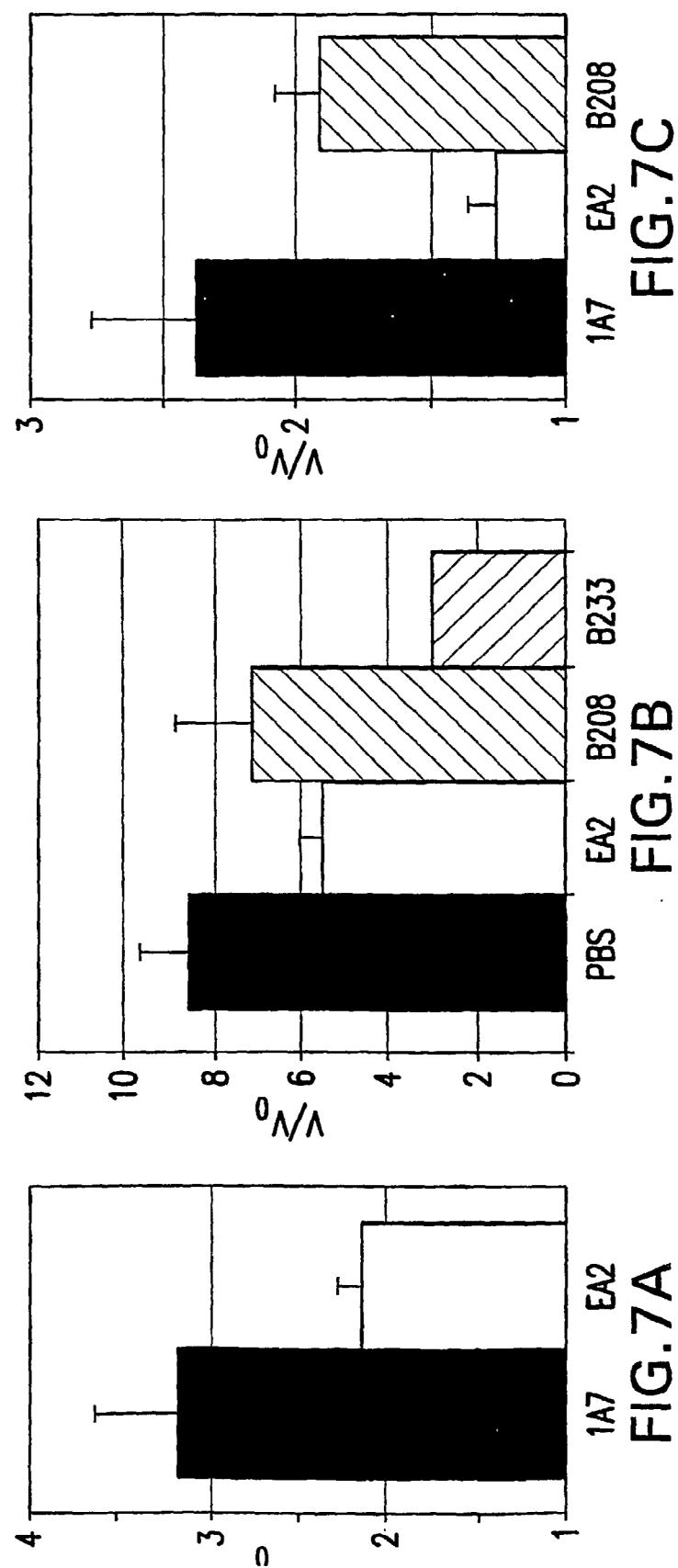
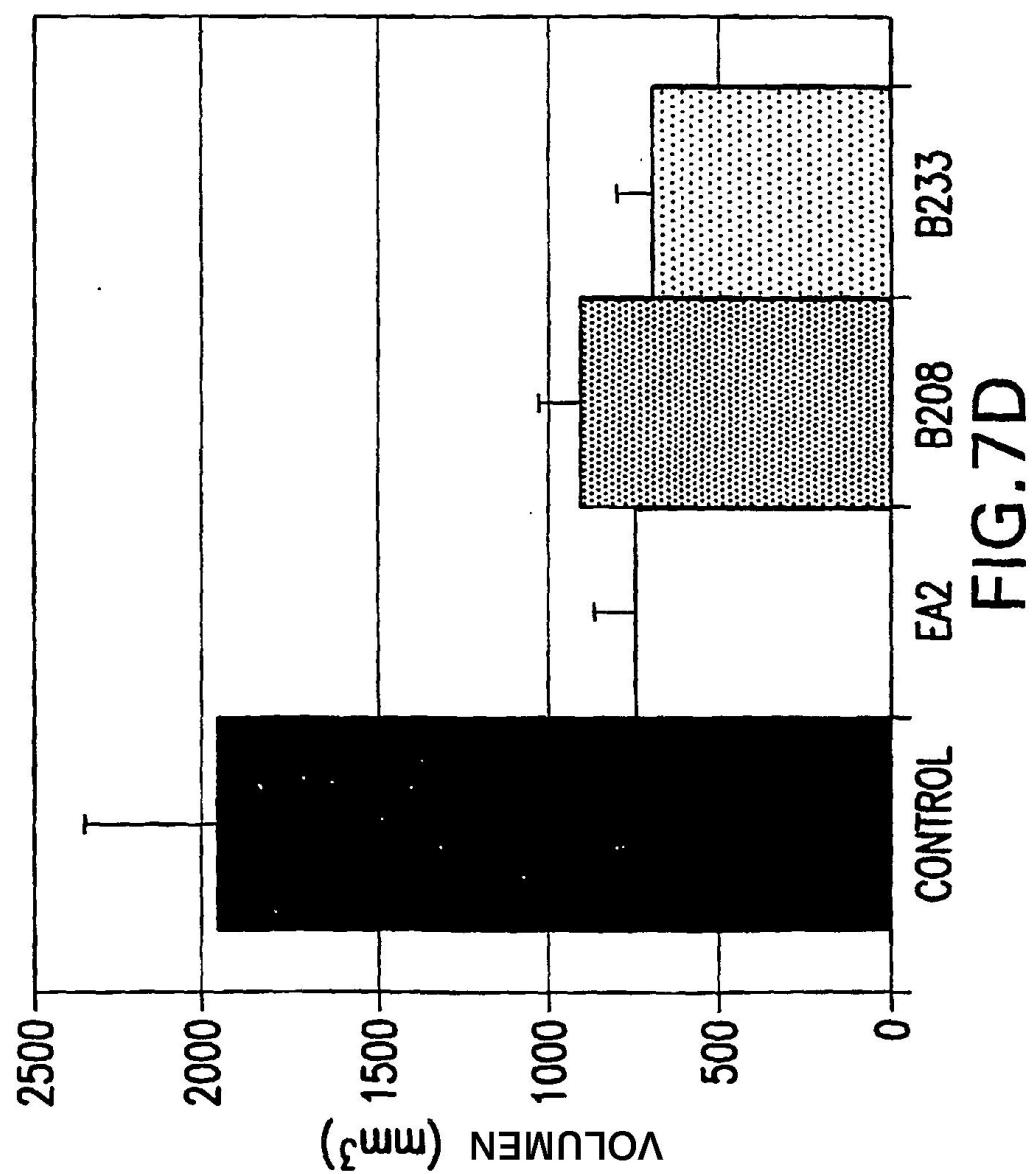


FIG. 6B





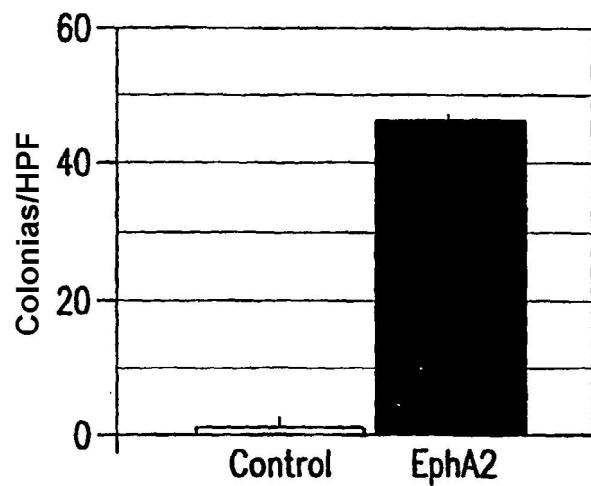


FIG.8A

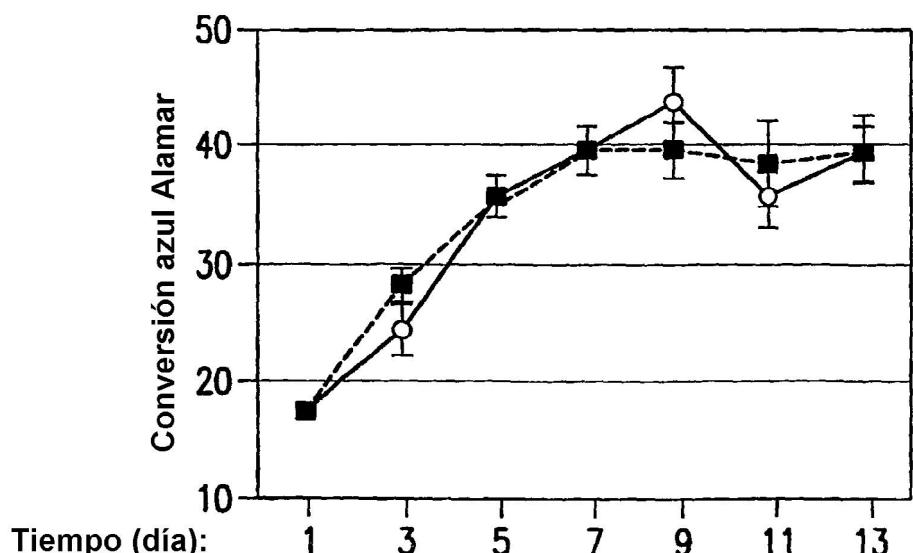


FIG.8B

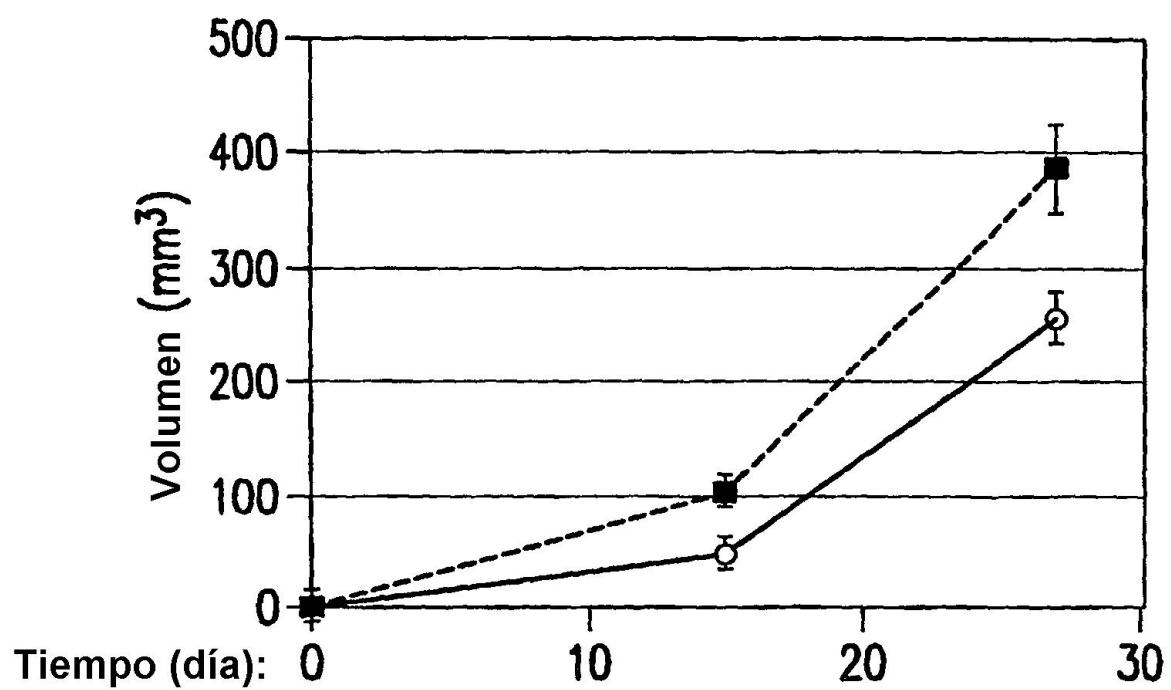


FIG.9A

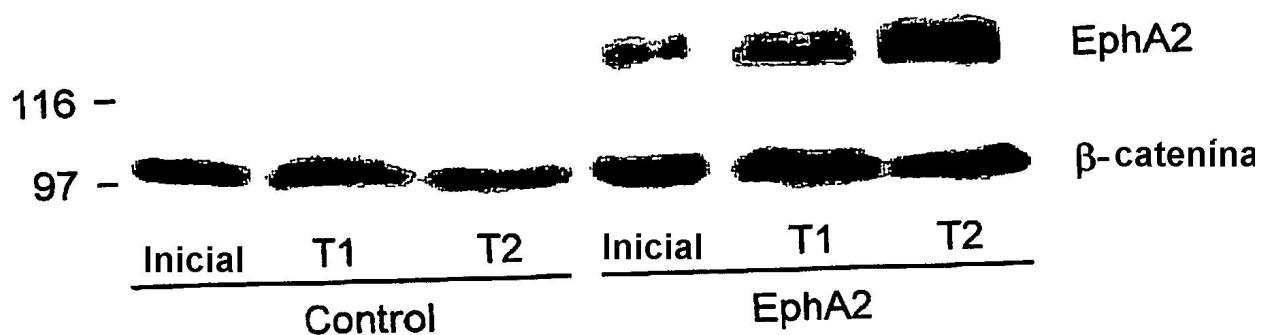


FIG.9B

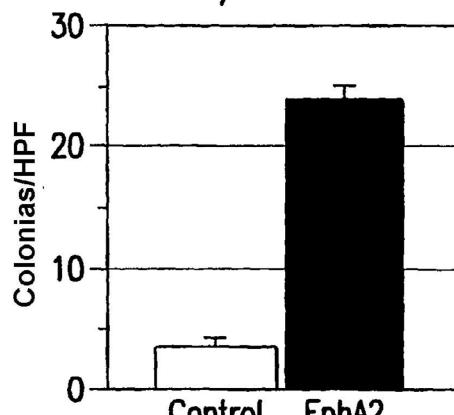


FIG.10A

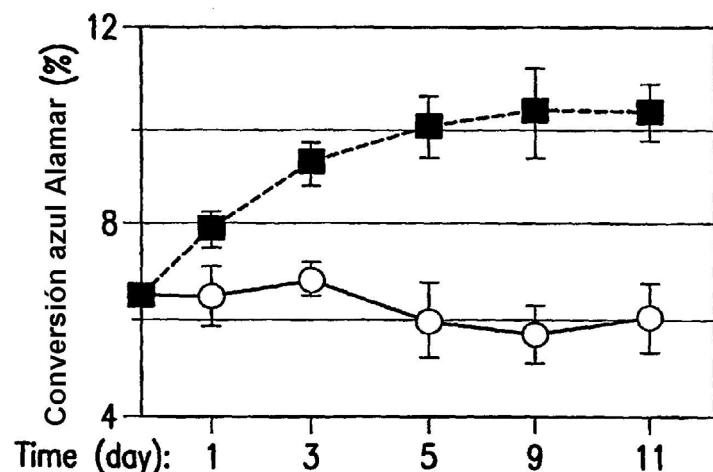


FIG.10B

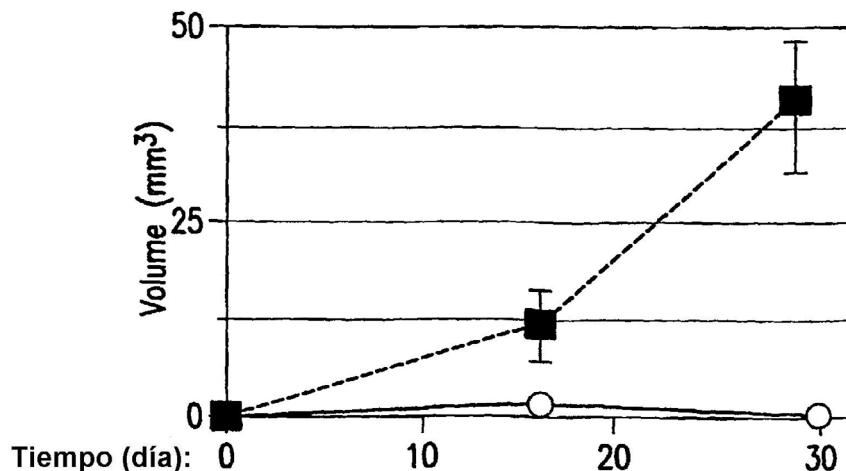


FIG.10C

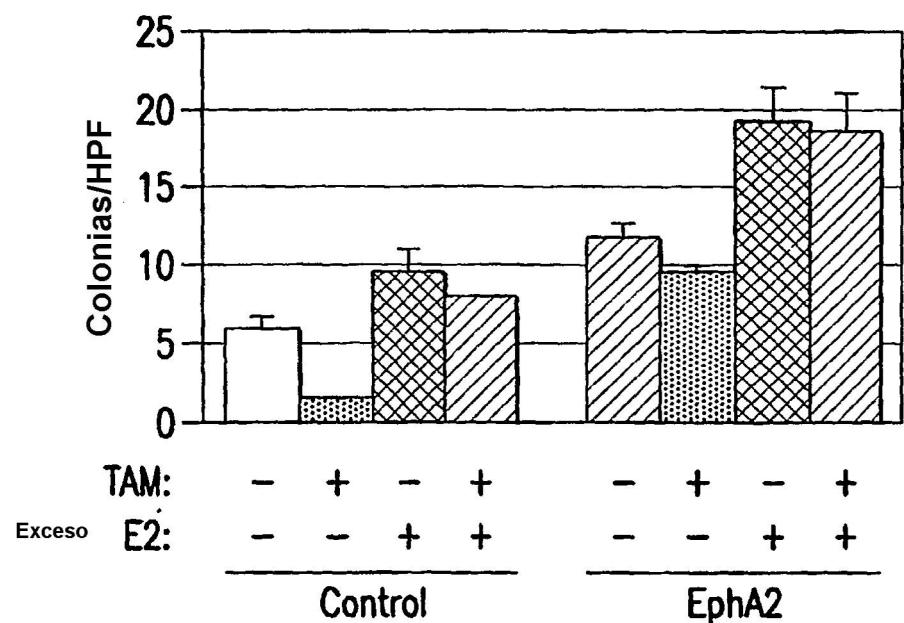


FIG. 11A

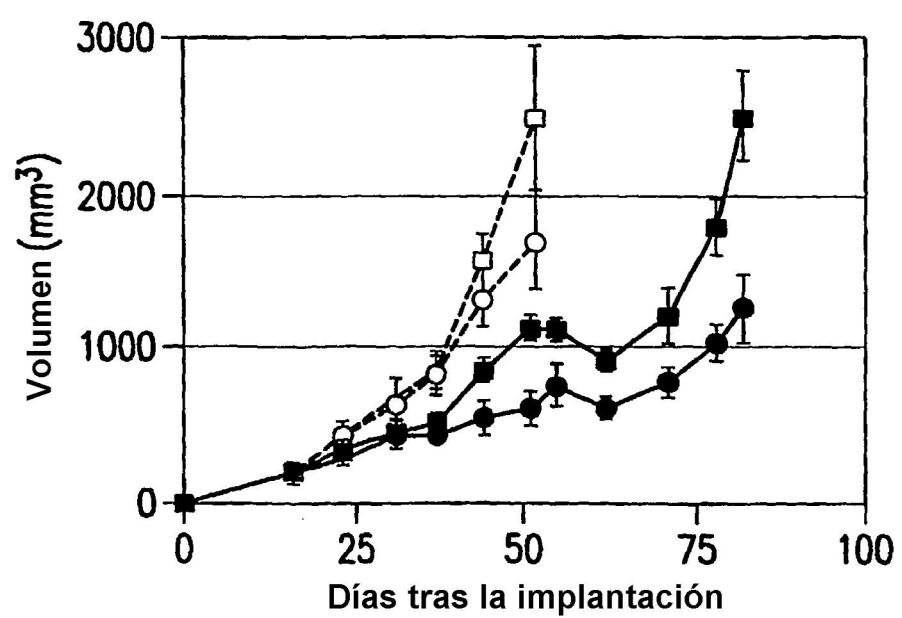


FIG. 11B

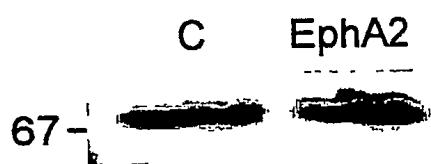


FIG.12A

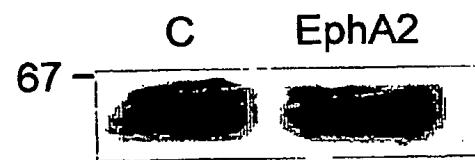


FIG.12B

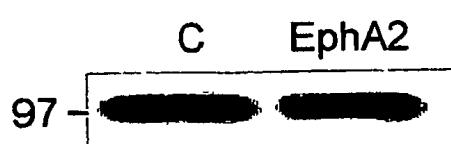


FIG.12C

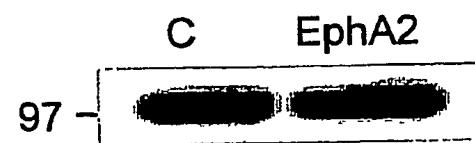


FIG.12D

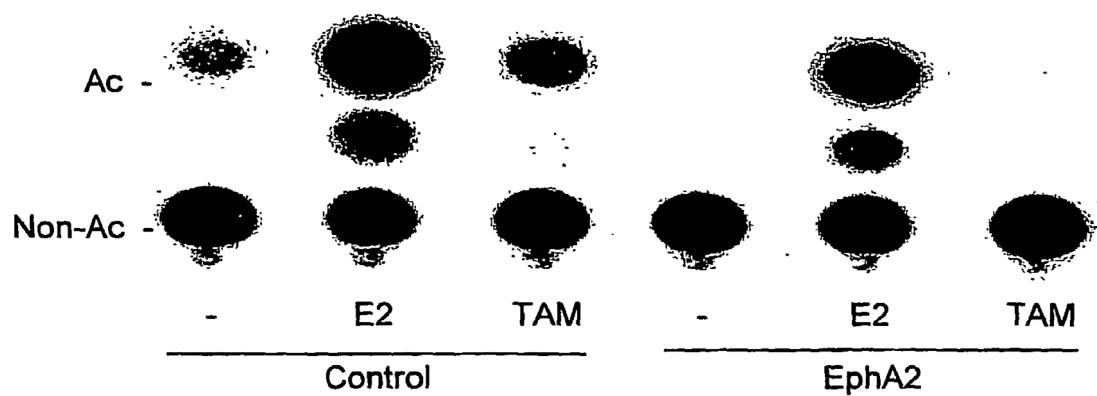


FIG.12E

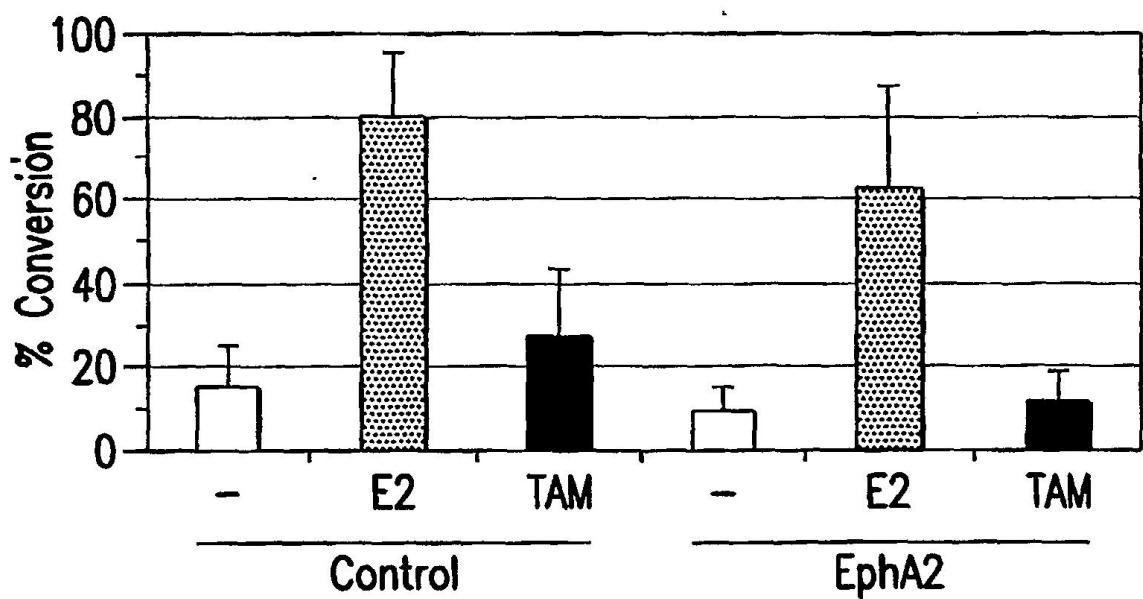


FIG. 12F



FIG.13A

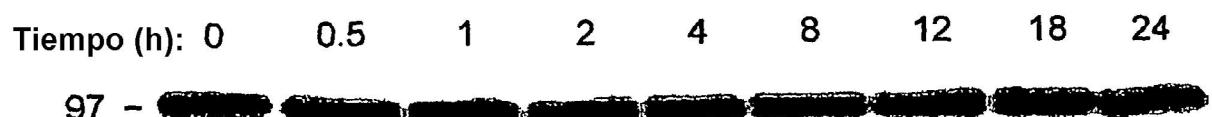


FIG.13B

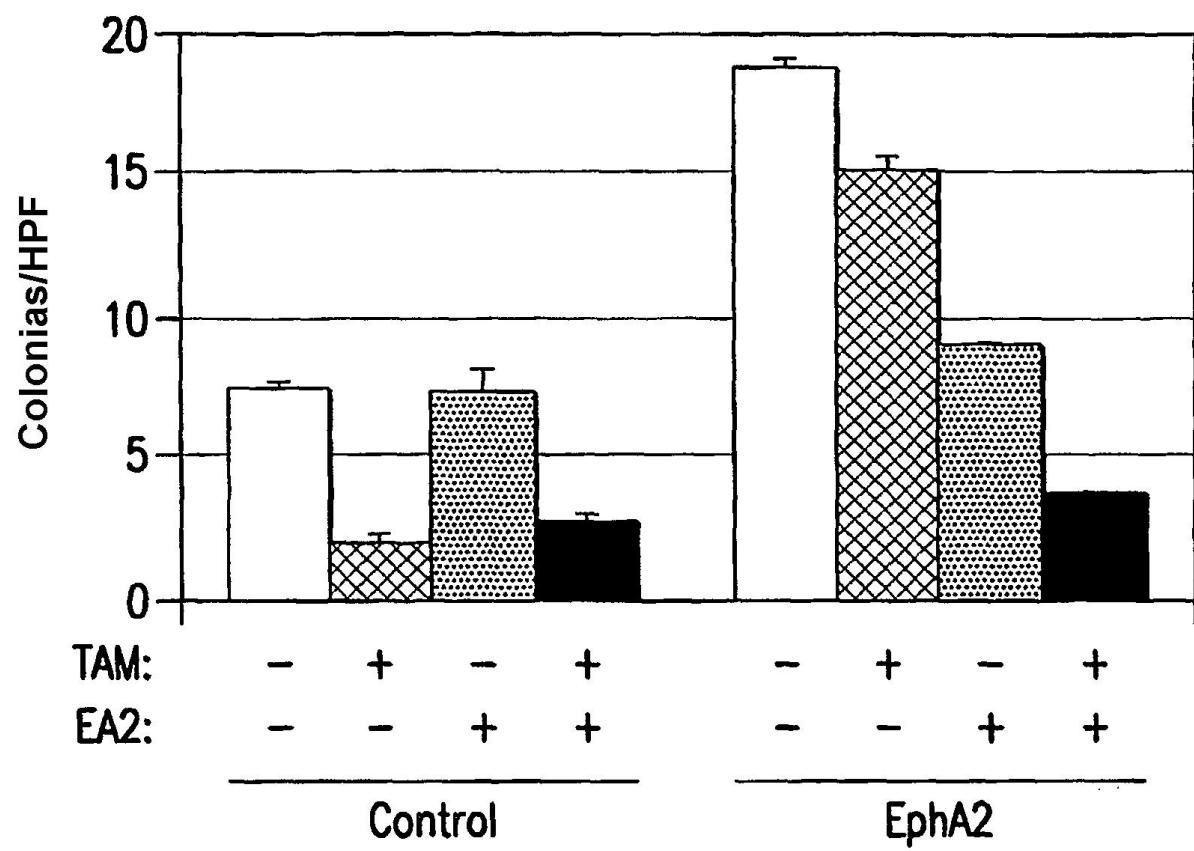


FIG. 13C

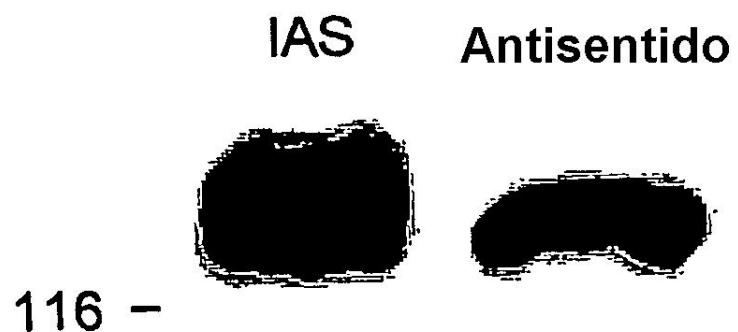


FIG.14A

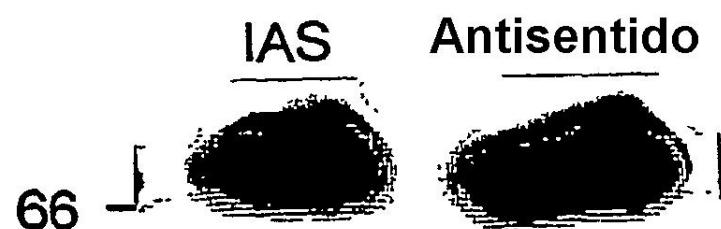


FIG.14B

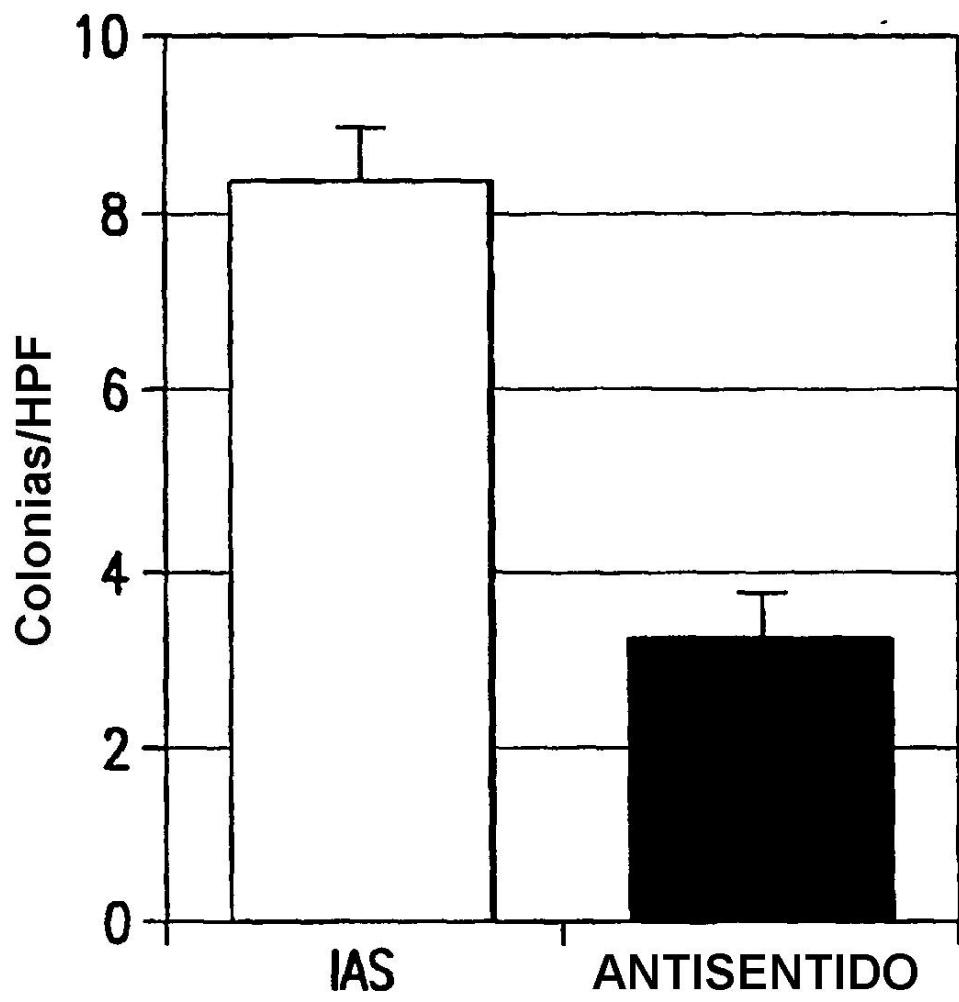


FIG. 14C

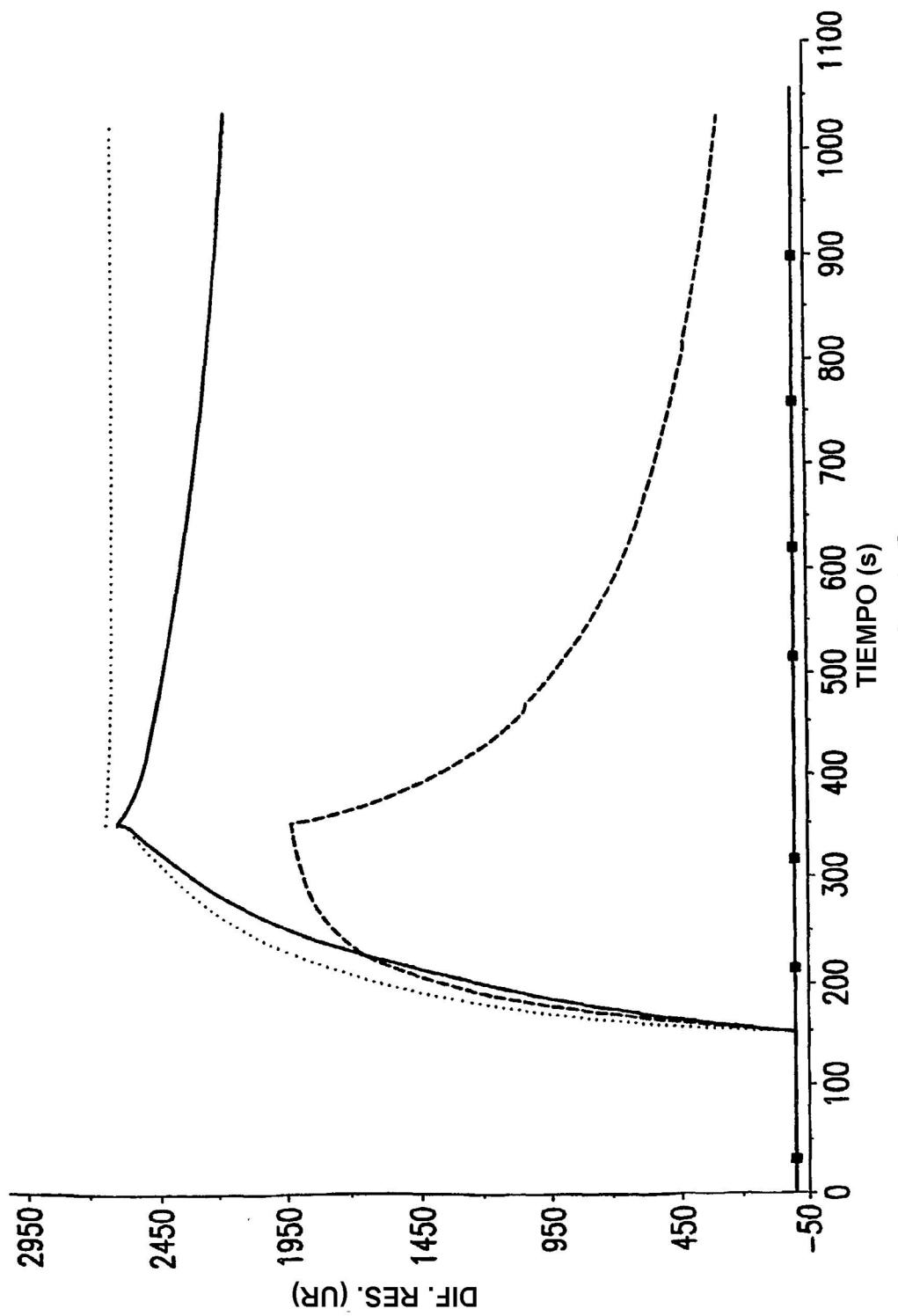


FIG. 15



FIG.16A



FIG.16B



FIG.16C



FIG.16D

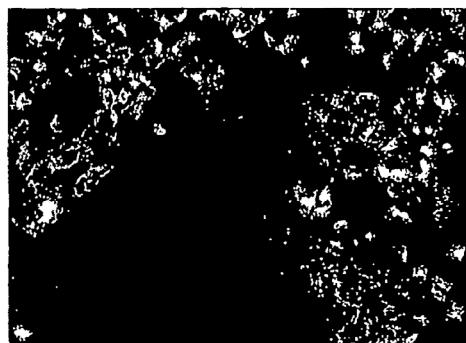


FIG.17A

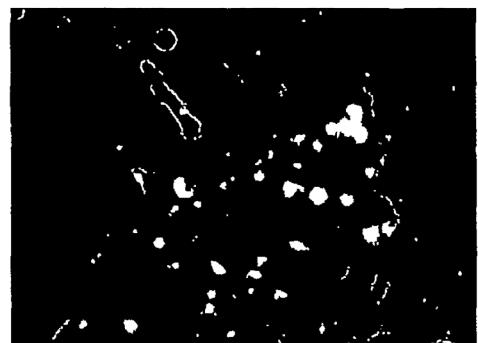
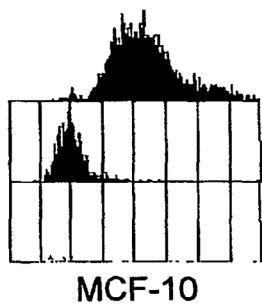
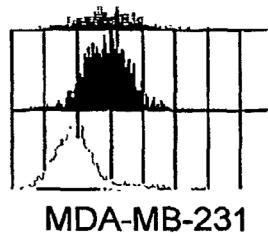


FIG.17B



MCF-10

FIG.17C



MDA-MB-231

FIG.17D

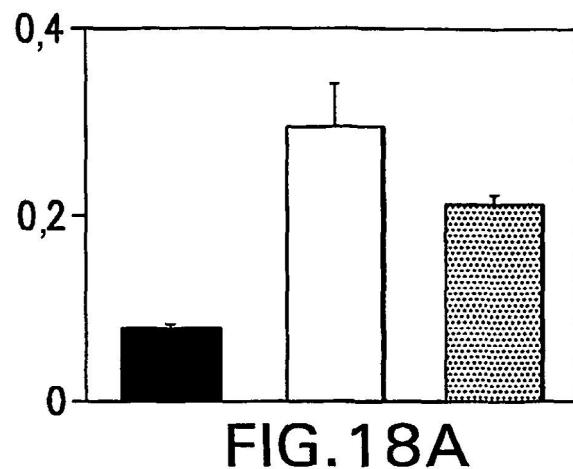


FIG. 18A

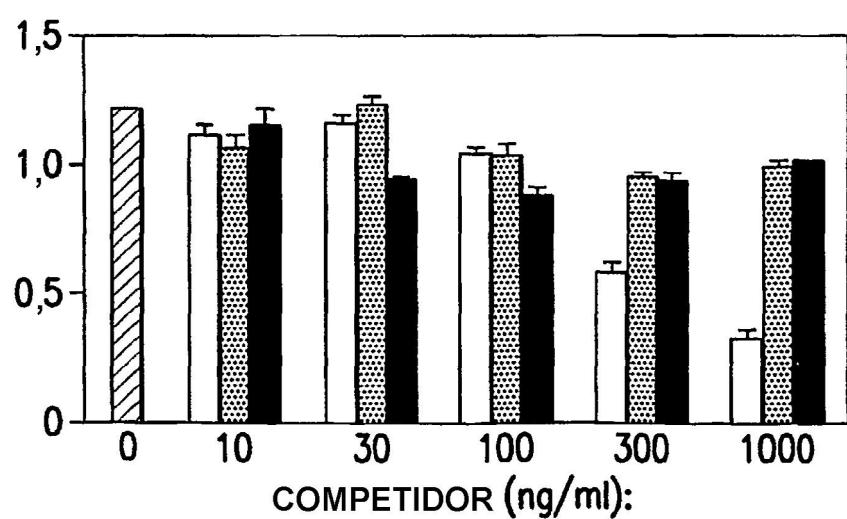


FIG. 18B

208 Cadena ligera variable

caa att gtt ctc acc cag tct cca gca ctc atg tct gca tct cca ggg	48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
<u>CDR1</u>	
gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tac atg	96
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met	
20 25 30	
<hr/>	
tac tgg tac cag cag aag cca aga tcc tcc ccc aaa ccc tgg att tat	144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr	
35 40 45	
<u>CDR2</u>	
ctc aca acc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt	192
Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
<hr/>	
ggg, tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa	240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu	
65 70 75 80	
<u>CDR3</u>	
gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg agt agt aac cca ttc acg	288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr	
85 90 95	
<hr/>	
ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aga	318
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg	
100 105	

FIG.19A

208 Cadena pesada variable

cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gta aag cct ggg gct	48	
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
1 5 10 15		
<u>CDR1</u>		
tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttc acc agc tac	96	
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
20 25 30		
<hr/>		
tgg atg cac tgg gtg aaa caa agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att	144	
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35 40 45		
<u>CDR2</u>		
ggg atg att cat cct aat agt ggt agt act aac tac aat gag aag ttc	192	
Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe		
50 55 60		
<hr/>		
aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	240	
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
<hr/>		
atg cga ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt	288	
Met Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
<u>CDR3</u>		
gca aga ggg ggt aac atg gta ggg ggg ggc tac tgg ggc caa ggc acc	336	
Ala Arg Gly Gly Asn Met Val Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100 105 110		
<hr/>		
act ctc aca gtc tcc tca	354	
Thr Leu Thr Val Ser Ser		
115		

FIG.19B

233 Cadena ligera variable

gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct gtg act cca gga	48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly	
1 5 10 15	
<u>CDR1</u>	
gat agc gtc aat ctt tcc tgc agg gcc agc caa agt att agc aac aac	96
Asp Ser Val Asn Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn	
20 25 30	
<hr/>	
cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca agg ctt ctc atc	144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	
<u>CDR2</u>	
aag tat gtt ttc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc agg ttc agt ggc	192
Lys Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
<hr/>	
agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac agt gtg gag act	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr	
65 70 75 80	
<u>CDR3</u>	
gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac agc tgg ccg ctc	288
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu	
85 90 95	
<hr/>	
acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa	321
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
100 105	

FIG.19C

233 Cadena pesada variable

gag gtg aag ctg gtg gag tct gga gga ggc ttg gta cag cct ggg ggt 48
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

CDR1

tct ctg agt ctc tcc tgt gca gct tct gga ttc acc ttc act gat tac 96
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

tcc atg aac tgg gtc cgc cag cct cca ggg aag gca ctt gag tgg ttg 144
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

CDR2

ggt ttt att aga aac aaa gct aat gat tac aca aca gag tac agt gca 192
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

tct gtg aag ggt cggtt acc atc tcc aga gat aat tcc caa agc atc 240
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

ctc tat ctt caa atg aat gcc ctg aga gct gag gac agt gcc act tat 288
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95

CDR3

tac tgt gta aga tac cct agg tat cat gct atg gac tcc tgg ggt caa 336
 Tyr Cys Val Arg Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 360
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

FIG. 19D

EA2 Cadena ligera variable

gac atc aag atg acc cag tct cca tct tcc atg tat gca tct cta gga	48
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
<u>CDR1</u>	
gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac att aat aac tat	96
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr	
20 25 30	
<u> </u>	
tta agc tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct aag acc ctg atc	144
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile	
35 40 45	
<u>CDR2</u>	
tat cgt gca aac aga ttg gta gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc	192
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
<u> </u>	
agt gga tct ggg caa gat tat tct ctc acc atc agc agc ctg gag tat	240
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr	
65 70 75 80	
<u>CDR3</u>	
gaa gat atg gga att tat tat tgt ctg aaa tat gat gag ttt ccg tac	288
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr	
85 90 95	
<u> </u>	
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa	321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

FIG.19E

EA2 Cadena pesada variable

gac gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg	48
Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
<u>CDR1</u>	
tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat	96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
<hr/>	
acc atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc	144
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
<u>CDR2</u>	
gca acc att agt agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg	192
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
50 55 60	
<hr/>	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
<hr/>	
ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
<u>CDR3</u>	
aca aga gaa gct atc ttt act tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act	336
Thr Arg Glu Ala Ile Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
100 105 110	
<hr/>	
gtc tct gca	345
Val Ser Ala	
115	

FIG.19F