



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 296**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00955686 .1**

96 Fecha de presentación : **17.08.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1210603**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra EphA2 como un diagnóstico de cáncer.**

30 Prioridad: **17.08.1999 US 149259 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.04.2011

73 Titular/es: **PURDUE RESEARCH FOUNDATION
1291 Cumberland Avenue
West Lafayette, Indiana 47906, US
The University of North Carolina at Chapel Hill y
GLAXO GROUP LIMITED**

72 Inventor/es: **Kinch, Michael, Scott;
Zantek, Nicole, Dodge y
Kilpatrick, Katherine, E**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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).

DESCRIPCION

Anticuerpos dirigidos contra epha2 como un diagnóstico de cáncer.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al diagnóstico de una enfermedad metastásica. Más concretamente, la presente invención se refiere a reactivos que pueden detectar una tirosina cinasa específica de células epiteliales. Más concretamente, la presente invención se refiere a reactivos que se unen a la tirosina cinasa de células epiteliales y al uso de estos reactivos para el diagnóstico de cáncer.

Antecedentes y resumen de la invención

10 La metástasis de células cancerosas requiere capacidad celular para 1) separarse de un tumor primario, 2) migrar e invadir tejidos locales, 3) translocar a lugares lejanos del cuerpo (a través de la linfa o la sangre), 4) colonizar un lugar extraño y 5) crecer y sobrevivir en este entorno extraño. Todos estos comportamientos están relacionados con las adhesiones celulares. Las adhesiones celulares controlan las interacciones físicas de las células con su microentorno. Las adhesiones celulares también inician señales que dictan el crecimiento, muerte y diferenciación de las células tumorales.

15 Se sabe que diversas células cancerosas, incluyendo las células de cáncer de mama, presentan una adhesión celular alterada. En comparación con los epitelios de mama normales, las células epiteliales de mama humanas transformadas han disminuido los contactos célula-célula y aumentado las interacciones con la matriz extracelular circundante. Estos cambios facilitan una mayor separación y migración de células cancerosas lejos de las colonias celulares y están directamente relacionados con la alteración de la fosforilación de la tirosina de las proteínas de la membrana celular. La fosforilación de la tirosina es una potente forma de transducción de señales celulares y se cree que
20 la alteración de los niveles de fosforilación de la tirosina es importante para la invasividad de las células tumorales. Por tanto, la regulación de la fosforilación de la tirosina representa un objetivo prometedor para la intervención terapéutica frente al cáncer metastásico. La fosforilación de la tirosina está controlada por las tirosina cinasas de la membrana celular y se sabe que, en las células cancerosas metastásicas, se produce una mayor expresión de las tirosina cinasas.

25 La identificación de una mayor expresión de las tirosina cinasas de la membrana celular ayudaría en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metastásicas. Una de tales tirosina cinasas es la EphA2. Miembro de la familia Eph de tirosina cinasas conocidas como efrinas, la EphA2 es un receptor transmembrana de la tirosina cinasa con un ligando unido a la célula. Aunque se clonaron hace una década, véase Lindberg, R.A. y Hunter, T., "cDNA Cloning and Characterization of Eck, an Epithelial Cell Receptor Protein-tyrosine Kinase in the Eph/elk Family of Protein Kinases," Mol. Cell. Biol. 10 (12), 6316-6324 (1990), se sabe bastante poco sobre la función de la EphA2, en gran parte debido a que, en
30 el pasado, los anticuerpos específicos de EphA2 han sido difíciles de generar.

El documento de Zantek y col. (Noviembre, 1998), Mol. Biol. Cell vol. 9 (supl.), página 134A, desvela que, en los epitelios de mama, la EphA2 se expresa, fosforilada y enriquecida en los contactos célula-célula en células normales; no se expresa en células cancerosas poco invasivas; está expresada y no fosforilada en las ondulaciones de la membrana en células metastásicas.

35 Para facilitar la investigación sobre la EphA2, se ha desarrollado un procedimiento mejorado para generar un panel de anticuerpos monoclonales específicos de proteínas fosforiladas en la tirosina. Usando este procedimiento, se ha generado una multiplicidad de anticuerpos monoclonales que reconocen la EphA2. Estos anticuerpos se han usado para mostrar que la EphA2 está expresada en exceso en células metastásicas de mama, pulmón, colon y próstata. Debido a que la EphA2 se expresa de forma diferente en células normales y metastásicas, los anticuerpos específicos de EphA2
40 son útiles en el diagnóstico de una enfermedad metastásica. Los anticuerpos producidos por un hibridoma concreto reconocen un epítipo intracelular de la EphA2 y han mostrado que son muy específicos al unirse a la EphA2.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 34. También se desvela un procedimiento para generar anticuerpos que reconocen epítopos intracelulares de la EphA2. Otro aspecto de la presente invención es el uso de anticuerpos específicos de EphA2 en el diagnóstico de una enfermedad metastásica.
45 También se desvela un reactivo diagnóstico específico para detectar la EphA2, cualquier fragmento de la misma o ADN o ARN que codifican la proteína la EphA2. Un aspecto adicional de la presente invención es un kit que comprende un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un epítipo de la EphA2 y que sirve para detectar la unión anticuerpo-EphA2.

Serán evidentes características adicionales de la presente invención para los expertos en la materia tras el estudio de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas que son ejemplos del mejor modo de llevar a cabo la invención como se considera actualmente.
50

Breve descripción de los dibujos

las figs. 1A-C muestran una serie de transferencias western que muestran la expresión de la EphA2 en líneas celulares derivadas de células humanas de próstata;

la fig. 1A es una transferencia western que muestra la expresión de la EphA2 en diversas líneas de células

cancerosas de próstata humanas;

- la fig. 1B es una transferencia western que muestra la expresión de la EphA2 en la línea de células epiteliales prostáticas humanas MLC y la expresión en esa línea celular tras su transformación mediante el oncogén K-Ras o irradiación de rayos X;
- 5 la fig. 1C es similar a la Fig. 1B, excepto porque muestra la expresión en la línea de células epiteliales prostáticas humanas 267B1 y la expresión en esa línea celular tras su transformación mediante el oncogén K-Ras o irradiación de rayos X;
- la fig. 2 es una transferencia western que muestra la expresión de la EphA2 en diversas líneas de células epiteliales de mama humanas;
- 10 las figs. 3A-B muestran la localización de la EphA2 en las membranas celulares de diversas líneas de células epiteliales de mama, como se observa mediante microscopía de inmunofluorescencia;
- la fig. 3A muestra la localización de la EphA2 en sitios de adhesión celular en células MCF-10A normales; y
- la fig. 3B muestra la redistribución de la EphA2 en células malignas.

Descripción detallada de la invención

- 15 Se han aislado anticuerpos específicos de EphA2 mediante un procedimiento mejorado. El procedimiento usado está diseñado para una mayor sensibilidad y diversidad de hibridomas sensibles. Según este procedimiento, las proteínas fosforiladas en la tirosina de células epiteliales humanas transformadas con Ras se aíslan por cromatografía de afinidad usando anticuerpos específicos de fosfotirosina existentes. Las proteínas fosforiladas en la tirosina se usan entonces como un inmunogen para producir anticuerpos monoclonales. Se inyectan cantidades en bajas dosis de proteínas fosforiladas en la tirosina cerca de los ganglios linfáticos, días alternos, durante un periodo de diez días (la estrategia de RIMMS). Las células B de los ganglios linfáticos congestionados se aíslan y fusionan entonces con un mieloma que expresa en exceso Bcl-2, para minimizar la apoptosis tras la fusión. Este procedimiento tiene como resultado mayor diversidad, especificidad y rentabilidad de producción de hibridomas. Los hibridomas se criban primero para identificar aquellos hibridomas que producen anticuerpos capaces de distinguir células cancerosas normales y malignas. Hasta la fecha, se han identificado al menos 450 de tales hibridomas.

- Se han seleccionado los hibridomas que son específicos de EphA2. El uso de la estrategia de RIMMS ha dado como resultado la producción de diversos anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la EphA2. De los cuatro primeros hibridomas caracterizados, dos reconocen epítomos independientes de la EphA2. El primero, D7, reconoce un epítipo intracelular. El segundo, B2D6, se une a un epítipo extracelular. El D7 ha demostrado ser muy específico para un epítipo intracelular de la EphA2 y esta especificidad proporciona gran parte de la base actual para el diagnóstico de tumores metastásicos.

- En la técnica se conoce el uso de anticuerpos para detectar la presencia o expresión en exceso de una proteína específica. Debido a que la EphA2 se expresa en exceso en las células metastásicas, los anticuerpos específicos de EphA2 de la presente invención se pueden usar para detectar esta expresión en exceso y, por tanto, detectar una enfermedad metastásica. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, transferencia western, inmunotransferencia, precipitación, aglutinación, ensayos ELISA, inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, citometría de flujo en distintos tejidos o fluidos corporales y distintos ensayos tipo sandwich. Estas técnicas son muy conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.876.949, incorporada al presente documento a modo de referencia. Cuando se usan anticuerpos específicos para un epítipo intracelular de la EphA2, las células se tienen que lisar e incubar con el anticuerpo. Las técnicas anteriores se pueden realizar en lisados de células completas o se puede separar la EphA2 para su ensayo, tal como mediante inmunoprecipitación. Los anticuerpos D7 de la presente invención son muy específicos para un epítipo intracelular de la EphA2 y han mostrado que son sensibles a la expresión diferencial de la EphA2 en células metastásicas. Otras técnicas, tales como la tinción inmunohistológica, requieren células completas y pueden requerir adicionalmente capas de células de una densidad celular concreta. Tales ensayos requieren un anticuerpo específico para un epítipo extracelular de la EphA2.

- Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para detectar una enfermedad metastásica en una gran variedad de muestras de tejidos. Por ejemplo, la investigación usando anticuerpos específicos de EphA2 ha revelado que la expresión alterada de la EphA2 se produce en células de mama, riñón, próstata, pulmón y colon, y se cree que la expresión alterada de la EphA2 se produce en otros tipos de metástasis celulares, concretamente en neoplasias malignas epiteliales. Los anticuerpos específicos de EphA2 se pueden usar para detectar metástasis en un tejido tumoral sometido a biopsia. Además, se pueden ensayar muestras de distintas muestras de fluidos corporales, tales como sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva y orina, con los anticuerpos de la presente invención. La expresión alterada de la EphA2 en estas muestras indica la presencia de una enfermedad metastásica.

- Adicionalmente, se pueden usar otros anticuerpos en combinación con los anticuerpos de la presente invención para proporcionar información adicional relativa al estado de la enfermedad metastásica. Por ejemplo, la EphA2 de células metastásicas exhibe una fosforilación de la tirosina alterada. En células epiteliales de mama normales, la EphA2 se

expresa y está fosforilada en la tirosina. Sin embargo, en células epiteliales de mama metastásicas, la EphA2 se expresa en exceso y la EphA2 no está fosforilada en la tirosina. Debido a que un ensayo que cuantifica la expresión de la EphA2 a veces puede conducir a un resultado ambiguo, puede ser deseable determinar la fosforilación de la tirosina así como la magnitud de la expresión de la EphA2. Por tanto, un procedimiento de diagnóstico usando los anticuerpos de la presente invención en combinación con anticuerpos específicos para fosfotirosina proporciona datos para determinar el estado de una enfermedad metastásica.

Además, los anticuerpos específicos de EphA2 de la presente invención se pueden aprovechar para detectar cambios en la localización de la EphA2 que están asociados con la metástasis. En células epiteliales de mama y próstatas normales, los lugares de adhesión celular están enriquecidos en EphA2. Por el contrario, en células de próstata metastásicas, la EphA2 se distribuye de forma difusa y, en células de cáncer de mama metastásicas, la EphA2 se redistribuye en las ondulaciones de la membrana. Técnicas tales como la tinción inmunohistológica o la microscopía inmunofluorescente son muy conocidas en la materia y se pueden usar para visualizar la distribución de la EphA2. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.514.554, incorporada al presente documento a modo de referencia. La expresión de la EphA2 se puede detectar usando anticuerpos capaces de detectar toda la EphA2 o fragmentos de la proteína EphA2. Otros procedimientos de detección de expresión alterada de la EphA2 incluyen detectar secuencias de ADN o ARN que codifican la proteína EphA2.

Para detectar la expresión en exceso o una distribución alterada de la EphA2, los anticuerpos específicos de EphA2 se pueden marcar covalentemente o no covalentemente con cualquiera de los diferentes marcadores detectables conocidos, tales como sustancias fluorescentes, radioactivas o enzimáticas, como se sabe en la materia. Alternativamente, un anticuerpo secundario específico para los anticuerpos de la presente invención se marca con un marcador detectable conocido y se usa para detectar los anticuerpos específicos de EphA2 en las técnicas anteriores.

Marcadores preferidos incluyen colorantes cromógenos. Entre los más comúnmente usados están 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB). Éstos se pueden detectar usando microscopía óptica. También son preferibles marcadores fluorescentes. Entre los compuestos de marcado fluorescentes más comúnmente usados se encuentran isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. También se pueden usar compuestos quimioluminiscentes y bioluminiscentes tales como luminol, isoluminol, éster teromático de acridinio, imidazol, sal de acridinio, éster de oxalato, luciferina, luciferasa y aequorina. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente se expone a luz de longitud de onda adecuada, su presencia se puede detectar debido a su fluorescencia.

También son preferibles marcadores radioactivos. Isótopos radioactivos que son especialmente útiles para marcar los anticuerpos de la presente invención incluyen ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{32}P y ^{14}C . El isótopo radioactivo se puede detectar mediante medios tales como un contador gamma, un contador de centelleo o mediante auto-radiografía.

Otro procedimiento en el que los anticuerpos se pueden marcar de forma detectable es uniendo los anticuerpos a un enzima y, posteriormente, usando los anticuerpos en un ensayo inmunoenzimático (EIA) o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El enzima, cuando se expone a continuación a su sustrato, reacciona con el sustrato y genera un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, mediante un medio espectrofotométrico, fluorométrico o visual. Enzimas que se pueden usar para marcar de forma detectable anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococo, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Otros procedimientos de marcado y detección de anticuerpos son conocidos en la materia y están dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Los anticuerpos producidos por el hibridoma D7 se usan para detectar la expresión diferencial de la EphA2 entre células epiteliales de próstata normales y células metastásicas. La Fig. 1 muestra la expresión de la EphA2 en diversas líneas de células de próstata humanas. En referencia en primer lugar a la Fig. 1A, se ensayan los niveles de expresión de la EphA2 de tres líneas celulares metastásicas, LNCAP, DU145 y PC3. Se sabe que, de estas tres líneas celulares, LNCAP es la menos invasiva, DU145 es algo más invasiva y PC3 es la más invasiva. La expresión de la EphA2 se determina mediante transferencia western con anticuerpos D7. Como se puede observar en la Fig. 1A, la expresión de la EphA2 se correlaciona positivamente con la invasividad.

En la Fig. 1B, se usan anticuerpos D7 para ensayar la expresión de la EphA2 en células MLC normales en comparación con la expresión en células transformadas. Se estudian células MLC normales, células MLC que han sido transformadas mediante K-Ras y células MLC que han sido transformadas mediante irradiación de rayos X. Como se puede observar en la Fig. 1B, la EphA2 se expresa en exceso en ambas líneas celulares transformadas. La Fig. 1C muestra resultados similares a la Fig. 1B, excepto porque la línea de células normales es 267B1. Al igual que en la Fig. 1B, la Fig. 1C muestra que la EphA2 se expresa en exceso en las células transformadas. En resumen, la Fig. 1 demuestra que los anticuerpos específicos de EphA2 detectan cambios en las células metastásicas y que los ensayos que usan estos anticuerpos indican el nivel de invasividad metastásica.

Ejemplo 2

Se usan anticuerpos contra EphA2 para detectar la expresión de la EphA2 alterada en células de mama metastásicas. La EphA2 se expresa en células epiteliales de mama normales. La Fig. 2 ilustra la expresión de la EphA2 alterada en líneas de células tumorales de mama. Como se puede observar en la Fig. 2, la transferencia western de lisados de células completas usando anticuerpos D7 revela que la expresión de la EphA2 está completamente ausente en células derivadas de tumores de mama no metastásicos (ZR75-1, BT474, SKBR3, MDA-MB-435). Por el contrario, la EphA2 se expresa en exceso en líneas de células cancerosas de mama metastásicas (MDA-MB-435, MDA-MB-231). Por tanto, los anticuerpos contra EphA2 detectan la expresión de EphA2 alterada en células cancerosas de mama, lo que se puede usar para diagnosticar metástasis. Además, en células epiteliales de mama no metastásicas, la pérdida de EphA2 se produce más temprano durante la enfermedad y el ensayo con anticuerpos específicos de EphA2 proporciona información relevante respecto a la invasividad incluso cuando otros marcadores conocidos permanecen normales. Por tanto, los anticuerpos D7 son útiles como un diagnóstico, incluso en etapas tempranas de enfermedad.

Ejemplo 3

Se usan anticuerpos contra EphA2 en combinación con otros anticuerpos para detectar alteraciones adicionales en la expresión de la EphA2. Como se analizó anteriormente en el Ejemplo 2, la transferencia western usando D7 puede distinguir entre tumores no metastásicos y metastásicos, no expresando la EphA2 los tumores no metastásicos y las células metastásicas expresan en exceso EphA2. Sin embargo, se obtienen resultados diferentes cuando se estudia la fosforilación de la tirosina. Usando un anticuerpo específico de fosfotirosina, se ha descubierto que la EphA2 se fosforila en células normales, pero que no se fosforila en células metastásicas. Por tanto, aunque los anticuerpos específicos de EphA2 pueden detectar cualitativamente una diferencia entre las células tumorales de mama metastásicas y no metastásicas, los diagnósticos que incorporan tanto un anticuerpo específico de EphA2 como un anticuerpo específico de fosfotirosina proporcionan un ensayo sensible para distinguir entre células de mama normales, no metastásicas y metastásicas.

Ejemplo 4

Los anticuerpos para la EphA2 marcados de forma inmunofluorescente detectan la re-distribución de la expresión de la EphA2 en células transformadas. Los anticuerpos específicos de EphA2 usados en este ejemplo se producen mediante una línea celular conocida como B2D6 y estos anticuerpos son específicos para un epítipo extracelular de la EphA2. Como se observa en la Fig. 3A, la inmunofluorescencia con B2D6 demuestra que la EphA2 se encuentra en lugares de contacto célula-célula en células normales. Sin embargo, en células transformadas, mostradas en la Fig. 3B, la EphA2 se re-distribuye. Además, en células metastásicas, la EphA2 se encuentra en las ondulaciones de la membrana. De forma similar, en células epiteliales de próstata normales, se encuentra en lugares de adhesión célula-célula, pero, en células epiteliales de próstata metastásicas, la EphA2 se expresa en exceso y la expresión está distribuida de forma difusa. Por tanto, la inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos de EphA2 proporciona un medio adicional para el diagnóstico de la transformación y estado metastásico de células tumorales.

Como se muestra en los Ejemplos 1-4, la expresión en exceso, redistribución y fosforilación de la EphA2 en células metastásicas proporciona diversas bases para el diagnóstico de tumores metastásicos usando anticuerpos específicos de EphA2. La inmunohistoquímica o inmunotransferencia tipo western blot se pueden usar para monitorizar el cambio en la expresión de la EphA2 en muestras sometidas a biopsia de tejido de mama, tejido de próstata o tejido de otros tumores del paciente. Adicionalmente, se pueden usar D7 y otros anticuerpos específicos de EphA2 para monitorizar plasma, orina y otros fluidos corporales para detectar una expresión alterada de la EphA2, lo que indicaría metástasis. La detección de una fosforilación de la tirosina de la EphA2 alterada en combinación con información relativa a una alteración de la expresión de la EphA2 ayuda adicionalmente en el diagnóstico de una enfermedad metastásica.

Aunque la invención se ha descrito detalladamente en referencia a realizaciones preferidas, existen variaciones y modificaciones dentro del alcance de la invención tal como se describe y define en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* de detección de la presencia de células cancerosas metastásicas en una población de células seleccionada que comprende:
 - 5 ensayar al menos una porción de la población de células seleccionada respecto a la expresión en exceso de la EphA2, en el que la expresión en exceso es indicativa de la presencia de una célula cancerosa metastásica en la población de células seleccionada.
 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además determinar el estado de una enfermedad metastásica en la población de células.
 3. El procedimiento *in vitro* de la reivindicación 1, que comprende
 - 10 (a) incubar las células con
 - (i) un reactivo capaz de unirse específicamente a la EphA2; o
 - (ii) un reactivo capaz de unirse específicamente a un ARN que codifica al menos una porción de una proteína EphA2 para posibilitar la unión del reactivo a la EphA2 o al ARN;
 - (b) detectar el reactivo que se une a la EphA2 o al ARN; y
 - 15 (c) detectar la expresión en exceso de la EphA2, en el que la expresión en exceso de la EphA2 es indicativa de la presencia de células metastásicas o potencialmente metastásicas en la población de células.
 4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además lisar al menos una porción de la población de células antes de la incubación con el reactivo.
 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo es un anticuerpo.
 - 20 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo intracelular de la EphA2.
 7. El procedimiento de la reivindicación 5 ó 6, en el que el anticuerpo es producido por la línea celular de hibridomas D7.
 - 25 8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo extracelular de la EphA2.
 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es producido por la línea celular del hibridoma B2D6.
 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que el reactivo se marca con al menos un marcador detectable y la etapa de detección incluye detectar el marcador.
 - 30 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo constituido por un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador cromogénico y un radiomarcador.
 12. El procedimiento de las reivindicaciones 3 a 11, en el que la etapa de detección incluye un procedimiento de diagnóstico seleccionado del grupo constituido por ensayos ELISA y citometría de flujo.
 - 35 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que las etapas de incubación y detección comprenden metodología de transferencia western.
 14. El procedimiento de la reivindicación 13, que comprende además las etapas de proporcionar un segundo anticuerpo que tiene especificidad por la fosfotirosina y transferencia western con el segundo anticuerpo.
 - 40 15. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la unión con el reactivo proporciona un complejo de unión que comprende una célula completa.
 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que detectar la unión con el reactivo comprende someter el complejo de unión a tinción inmunohistoquímica.
 17. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además la etapa de fijar las células a un porta y la etapa de detección comprende tinción inmunofluorescente.
 - 45 18. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la población de células comprende células seleccionadas del grupo constituido por células de mama, células de riñón, células de próstata, células de pulmón y

células de colon.

19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la población de células comprende células epiteliales.
- 5 20. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la población de células comprende células seleccionadas del grupo constituido por células cancerosas de mama, células cancerosas de riñón, células cancerosas de próstata, células cancerosas de pulmón y células cancerosas de colon.
21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la población de células comprende células cancerosas epiteliales.
- 10 22. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células cancerosas metastásicas comprenden células seleccionadas del grupo constituido por células cancerosas de mama, células cancerosas de riñón, células cancerosas de próstata, células cancerosas de pulmón y células cancerosas de colon.
23. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células cancerosas metastásicas comprenden células cancerosas epiteliales.
- 15 24. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la población de células comprende células de una biopsia tisular.
25. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la población de células comprende células de una biopsia tisular de mama o próstata.
26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 23, en el que la población de células comprende células de un fluido corporal.
- 20 27. El procedimiento de la reivindicación 26, en el que las células se recogen de un fluido corporal seleccionado del grupo constituido por sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva y orina.
28. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que ensayar la población de células comprende incubar al menos una porción de la población de células cancerosas con un reactivo capaz de unirse a la EphA2 para posibilitar la unión del reactivo a la EphA2; y detectar la unión al reactivo.
- 25 29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que el reactivo es un anticuerpo.
30. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que el anticuerpo es producido por el hibridoma D7 o B2D6.
31. Uso de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un epítipo de la EphA2 y medios para detectar dicha unión anticuerpo-epítipo para detectar la presencia de células metastásicas en un población de células.
- 30 32. El uso de la reivindicación 31, en el que el medio para detectar la unión anticuerpo-epítipo es un marcador unido al anticuerpo.
33. El uso de la reivindicación 31 ó 32, que comprende además un anticuerpo que tiene especificidad por la fosfotirosina.
- 35 34. Un procedimiento para distinguir entre cánceres metastásicos y no metastásicos, que comprende determinar la expresión de la EphA2 con anticuerpos dirigidos contra EphA2, en el que la expresión en exceso de la EphA2 indica que el cáncer es metastásico y la ausencia de expresión de la EphA2 indica que el cáncer es no metastásico.



FIG. 1A

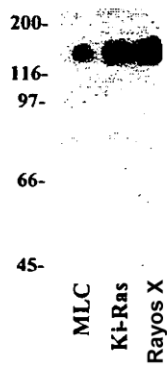


FIG. 1B



FIG. 1C

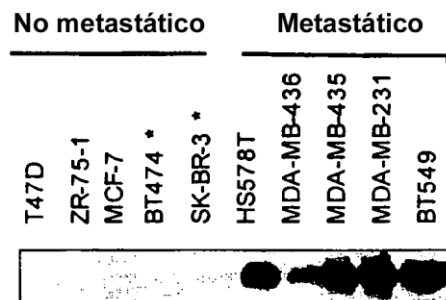


Fig. 2



FIG. 3A



FIG.3B