



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 432**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 5/20** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05730286 .1**

96 Fecha de presentación : **11.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1730196**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54

Título: **Anticuerpos que se unen a EphB4 para inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral.**

30

Prioridad: **12.03.2004 US 800350**  
**23.09.2004 US 949720**  
**23.09.2004 US 612908 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.05.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.05.2011**

73

Titular/es: **VASGENE THERAPEUTICS, Inc.**  
**1929 Zonal Avenue**  
**Los Angeles, California 90033, US**

72

Inventor/es: **Krasnoperov, Valery;**  
**Zozulya, Sergey;**  
**Kertesz, Nathalie;**  
**Reddy, Ramachandra y**  
**Gill, Parkash**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 432 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

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo que se une a un epítipo situado dentro de los aminoácidos 16-198 de la secuencia EphB4 de la Figura 1, que inhibe la interacción entre EphB4 y EfrinaB2, y que promueve la apoptosis en una célula tumoral.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

EphB4, algunas veces mencionada como el receptor de efrina B4 o quinasa de transmembrana de hepatoma (HTK), pertenece a una familia de receptores de transmembrana de proteína tirosina quinasa. EphB4 tiene un dominio extracelular compuesto del dominio de unión al ligando (también denominado como dominio globular), un dominio rico en cisteína, y un par de repeticiones de fibronectina tipo III (por ejemplo, ver Figura 5). El dominio citoplásmico consiste en una región de yuxtamembrana que contiene dos residuos de tirosina conservados; un dominio de proteína tirosina quinasa; un motivo  $\alpha$  estéril (SAM) y un motivo de unión al dominio PDZ. EphB4 interactúa con el ligando de unión a membrana Efrina B2 (Sakano, S. et al Oncogene. 1996 Aug 15; 13(4):813-22; Brambilla R. et al EMBO J. 1995 Jul 3;14(13):3116-26). EphB4, como otros miembros de la familia Eph, está activada por la unión de ligandos de efrina unidos a membrana agrupados (Davis S et al, Science. 1994 Nov 4;266(5186):816-9), lo que indica que el contacto entre las células que expresan el receptor y las células que expresan el ligando es necesario para la activación del receptor de Eph. Tras la unión con el ligando, un receptor de EphB4 se dimeriza y autofosforila los residuos de tirosina de yuxtamembrana para lograr la activación completa.

Se ha considerado generalmente que cuando una célula que expresa EphB4 encuentra una célula que expresa EfrinaB2, la interacción de EphB4-EfrinaB2 y la agregación desencadena la señalización en ambas células.

La señalización de EphB4-EfrinaB2 se ha implicado en la angiogénesis (Wang et al. Cell. 1998 May 29; 93(5):741-53; Gerety et al. Mol Cell. 1999 Sep;4(3): 403-14). La angiogénesis, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos del endotelio de una vasculatura preexistente, es un proceso crítico en el crecimiento, progresión y metástasis de tumores sólidos dentro del huésped. Durante la angiogénesis fisiológicamente normal, las interacciones autocrinas, paracrinas, y anficrinas del endotelio vascular con sus componentes estromáticos circundantes son estrictamente reguladas tanto en forma espacial como temporal. En forma adicional, los niveles y actividades de las citoquinas proangiogénicas y angiostáticas y los factores de crecimiento se mantienen en equilibrio. En contraste, la angiogénesis patológica necesaria para el crecimiento del tumor activo es sostenida y persistente, lo que representa una desregulación del sistema angiogénico normal. Los tipos de tumor sólido y hematopoyético son particularmente asociados con un alto nivel de angiogénesis anormal.

En la técnica previa, WO 95/27061 desvelan anticuerpos que se unen a la porción extracelular de HpTK5 (EphB4). WO 2004/080425 y WO 2004/024773 son parte de la técnica previa de acuerdo con el artículo 54(3)EPC y desvelan la producción de los anticuerpos de unión a EphB4.

Se piensa generalmente que el desarrollo de un tumor consiste en etapas sucesivas e interrelacionadas que llevan a la generación de un clon autónomo con potencial crecimiento agresivo. Estas etapas incluyen el crecimiento sostenido y la auto-renovación no limitada. Las poblaciones celulares en un tumor se caracterizan generalmente por autosuficiencia de la señal de crecimiento, disminución de la sensibilidad para las señales supresoras del crecimiento y resistencia a la apoptosis. Los eventos genéticos o citogenéticos que inician el crecimiento aberrante sostienen las células en un estado "listo" prolongado al evitar la apoptosis.

Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar agentes y tratamientos terapéuticos para inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

### SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos que se unen a y afectan a EphB4 de maneras particulares. Como se demuestra en a presente, EphB4 y EfrinaB2 participan en varios estados de enfermedad, que incluyen cánceres y enfermedades relacionadas con la angiogénesis no deseada o excesiva. Por consiguiente, los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos desvelados en la presente se pueden usar para tratar tales enfermedades. Además, se ha hallado que EphB4 y/o EfrinaB2 se expresan, a menudo en niveles altos, en una variedad de tumores. En consecuencia, los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos que regulan por disminución la función de EphB4 o EfrinaB2 pueden afectar los tumores por un efecto directo sobre las células tumorales así como un efecto indirecto sobre los procesos angiogénicos reclutados por el tumor. Se puede proporcionar la identidad de los tipos tumorales particularmente adecuados para el tratamiento con un agente que regula por disminución la función de EphB4 o EfrinaB2.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o la porción de

unión al antígeno del mismo que se une a un epítope situado dentro de los aminoácidos 16-198 de la secuencia de EphB4 de la Figura 1, que inhibe la interacción entre EphB4 y Efrina B2, y que promueve la apoptosis en una célula tumoral.

5 Por ejemplo, el epítope se puede situar dentro del dominio globular (GD) de EphB4 que se une a EfrinaB2. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo pueden inhibir la unión de EphB4 a la porción extracelular de EfrinaB2.

10 El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo pueden inhibir la dimerización o multimerización de EphB4 y opcionalmente puede inhibir la autofosforilación de EphB4 estimulada por EfrinaB2. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo puede inhibir la formación de tubos por las células endoteliales cultivadas, la vascularización de un tejido in vivo, la vascularización del tejido implantado en la córnea de un animal, la vascularización de un tapón de tejido de Matrigel implantado en un animal, y/o el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón. Los anticuerpos preferidos que se unen a un epítope situado dentro de los aminoácidos 16-198 de la secuencia de EphB4 de la Figura 1 incluyen los anticuerpos indicados en la presente como Núm. 001, 15 Núm. 023, Núm. 035, y Núm. 079.

20 La divulgación proporciona versiones humanizadas de cualquiera de los anticuerpos desvelados en la presente, así como los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos que comprenden al menos una porción de CDR derivada de un anticuerpo desvelado en la presente, en particular la CDR3. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que es inmunocompatible con el individuo al que se va a administrar, y preferentemente es clínicamente aceptable para la administración a un ser humano.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo desvelado en la presente, y en particular un hibridoma que produce un anticuerpo indicado en la presente como Núm. 023.

25 Los hibridomas que producen el anticuerpo Núm. 023 (epítope dentro de los aminoácidos 16-198), anticuerpo Núm. 091 (anticuerpo de activación de quinasa; epítope dentro de los aminoácidos 324-429), anticuerpo Núm. 098 (epítope dentro de los aminoácidos 430-537), anticuerpo Núm. 131 (epítope dentro de los aminoácidos 324-429), y anticuerpo Núm. 138 (epítope dentro de los aminoácidos 430-537) se depositaron en el American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. La designación del depósito de ATCC Números para el anticuerpo Núm. 023, Núm. 091, 30 Núm. 098, Núm. 131, y Núm. 138 son PTA- 6208, PTA-6209, PTA-6210, PTA-6214, y PTA-6211, respectivamente.

En consecuencia, ciertos aspectos específicos de la invención proporcionan una célula del hibridoma que tiene designación del depósito de ATCC Núm. PTA-6208.

35 De modo sorprendente, los anticuerpos que inhiben la unión al ligando, los anticuerpos que inhiben la activación de la EphB4 quinasa y los anticuerpos que activan la actividad de quinasa de EphB4 inhiben los eventos mediados por EphB4 en los bioensayos. Por consiguiente, la presente invención proporciona el anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la invención para usar en medicamentos. El anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo se puede usar para tratar cáncer 40 en un paciente.

45 Opcionalmente el paciente ha sido diagnosticado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en carcinoma de colon, tumor de mamas, mesotelioma, tumor de próstata, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, y leucemia. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo se pueden administrar en forma sistémica o local. De modo alternativo, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo se pueden usar para inhibir la angiogénesis en un paciente. Opcionalmente, el paciente está diagnosticado con degeneración macular. La invención también proporciona el uso de un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer en un paciente o tratar la angiogénesis en un paciente.

50 En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado o porción de unión al antígeno del mismo de la invención, así como el uso de tales anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos para obtener una preparación farmacéutica para tratar cáncer. Opcionalmente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de colon, tumor de mamas, mesotelioma, tumor de próstata, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, y leucemia.

55 En ciertos aspectos, los anticuerpos desvelados en la presente se pueden unir covalentemente (o asociarse en forma estable de otro modo con) un resto funcional adicional, tal como una marca o un resto que confiere propiedades farmacocinéticas deseables. Los ejemplos incluyen los que son adecuados para la detección por un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en procedimientos de detección por fluorescencia, procedimientos de detección por tomografía de emisión de

positrones y procedimientos de detección por resonancia magnética nuclear. Las marcas, por ejemplo, se pueden seleccionar del grupo que consiste en una marca fluorescente, una marca radiactiva y una marca que tiene una característica de resonancia magnética nuclear distintiva. Los restos tales como un resto de polietilenglicol (PEG) se pueden fijar a un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo para aumentar la vida media sérica.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una secuencia de aminoácidos del precursor de la proteína EphB4 humana (SEQ ID NO: 1).

La Figura 2 muestra una secuencia de nucleótidos de ADNc de la proteína de EphB4 humana.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína B4ECv3 (se muestra la secuencia predicha del precursor que incluye el péptido líder EphB4 no escindido).

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de B4ECv3NT (se muestra la secuencia predicha del precursor que incluye el péptido líder EphB4 no escindido).

La Figura 5 muestra los anticuerpos monoclonales generados contra EphB4 y el mapeo de epítopo de estos anticuerpos. Se muestra la topología del dominio extracelular de EphB4, que incluye un dominio globular (G), un dominio rico en cisteína (C), y dos dominios tipo III de fibronectina (F1 y F2).

La Figura 6 muestra los efectos de los anticuerpos policlonales de EfrinaB2 y los anticuerpos policlonales de EphB4 sobre el crecimiento de las células tumorales. A) línea celular H28; B) línea celular H2373; y C) línea celular H2052.

La Figura 7 muestra los resultados de las pruebas de afinidad de los Anticuerpos monoclonales EphB4. Se muestra el orden de afinidad (de la más débil a la más fuerte).

La Figura 8 muestra en ensayo de microbolsa corneal de ratón con un ejemplo de anticuerpo EphB4 (Núm. 138) en presencia o ausencia de bFGF.

La Figura 9 muestra que los anticuerpos EphB4 inhiben el crecimiento de los tumores por xenoinjerto de SCC15.

La Figura 10 muestra que los anticuerpos EphB4 causan apoptosis, necrosis y disminución de la angiogénesis en SCC15, tipo de tumor de carcinoma de cabeza y cuello.

La Figura 11 muestra que la administración sistémica de los anticuerpos EphB4 lleva a la regresión tumoral.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

#### *I. Anticuerpos EphB4 y otros polipéptidos de unión*

Las porciones definidas de la molécula EphB4 pueden ser localizadas selectivamente por los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos.

Los agentes de unión al polipéptido de EphB4 descritos en la presente se pueden usar para tratar una variedad de trastornos, en particular cánceres y trastornos relacionados con la angiogénesis no deseada. La divulgación proporciona anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos que inhiben una o más funciones mediadas por EphB4, tales como unión de EfrinaB2 o actividad quinasa de EphB4. Tales agentes de unión se pueden usar para inhibir la función de EphB4 in vitro e in vivo, y preferentemente para tratar cáncer o trastornos asociados con angiogénesis no deseada. La divulgación también proporciona anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos que activan la actividad quinasa de EphB4 (normalmente medida por la evaluación del estado de fosforilación de EphB4). De modo sorprendente, tales anticuerpos también inhiben las funciones de EphB4 en ensayos basados en células e in vivo. Por consiguiente, tales agentes de unión se pueden usar para inhibir la función de EphB4 in vitro e in vivo, y preferentemente para tratar cáncer o trastornos asociados con la angiogénesis no deseada. Sin estar limitado a ningún mecanismo particular, se espera que estos anticuerpos estimulen no solo la actividad quinasa de EphB4, sino también la eliminación de EphB4 de la membrana, de este modo disminuyen los niveles de EphB4 totales.

EphB4 pertenece a una familia de receptores de transmembrana de proteína tirosina quinasa. La porción extracelular de EphB4 está compuesta del dominio de unión al ligando (también denominado como dominio globular), un dominio rico en cisteína, y un par de repeticiones de fibronectina tipo III (por ejemplo, ver Figura 1). El dominio citoplásmico consiste en una región de yuxtamembrana que contiene dos residuos de tirosina conservados; un dominio de proteína tirosina quinasa; un motivo  $\alpha$  estéril (SAM) y un motivo de unión al dominio PDZ. EphB4 interactúa con el ligando de unión a membrana Efrina B2

(Sakano, S. et al 1996; Brambilla R. et al 1995). EphB4 está activada por la unión de ligandos de efrina unidos a membrana agrupados (Davis S et al, Science. 1994 Nov 4;266(5186):816-9), lo que indica que el contacto entre las células que expresan el receptor y las células que expresan el ligando es necesario para la activación del receptor de Eph. Tras la unión con el ligando, un receptor de EphB4 se dimeriza y autofosforila los residuos de tirosina de yuxtamembrana para lograr la activación completa.

Como se usa en la presente, el término "EphB4" se refiere a un polipéptido de EphB4 de un mamífero que incluye los seres humanos. En una realización, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se dirigen contra un EphB4 de mamífero aislado y/o recombinante o porción de esta (por ejemplo, péptido) o contra una célula huésped que expresa EphB4 de mamífero recombinante. En ciertos aspectos, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a un dominio extracelular de una proteína de EphB4 (denominada en la presente como un polipéptido soluble de EphB4). Por ejemplo, un polipéptido soluble de EphB4 comprende un dominio globular y es capaz de unirse a Efrina B2. Un ejemplo de los polipéptidos solubles de EphB4 se proporciona en la Figura 2. Como se usa en la presente, los polipéptidos solubles de EphB4 incluyen fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas del polipéptido soluble de EphB4.

Una "inmunoglobulina" es una molécula tetramérica. En una inmunoglobulina natural, cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par que tiene una cadena "liviana" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas livianas humanas se clasifican en cadenas livianas kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Ver, en general, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Las regiones variables de cada par de cadena liviana/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo de modo que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de unión. Las inmunoglobulinas se pueden organizar en estructuras de orden superior. IgA es generalmente un dímero de dos tetrámeros. IgM es generalmente un pentámero de cinco tetrámeros.

Las cadenas de la inmunoglobulina exhiben la misma estructura global, que comprende regiones estructurales relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por las regiones estructurales, lo que permiten la unión a un epítopo específico. Desde N-terminal a C-terminal, las cadenas livianas y pesadas comprenden los dominios, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

Un "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una porción de unión al antígeno de esta que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Las porciones de unión al antígeno se pueden producir por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dAb, y fragmentos de regiones determinantes de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena simple (scFv), anticuerpos de dominio único, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión al antígeno específico al polipéptido. Los términos "anticuerpo anti-EphB4" y "anticuerpo EphB4" se usan en forma indistinta en la presente.

Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que consiste en los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub>; un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, es un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub>; un fragmento Fv consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de una rama sola de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989) consiste en un dominio V<sub>H</sub>.

Un anticuerpo de cadena simple (scFv) es un anticuerpo en el que una región de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se aparean para formar moléculas monovalentes por medio de un ligador sintético que permite obtenerlos como una cadena de proteína única (Bird et al., Science 242: 423-426, 1988 y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se expresan sobre una cadena polipeptídica única, pero por medio de un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre dos dominios de la misma cadena, en consecuencia se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y

crear dos sitios de unión al antígeno (ver por ejemplo, Holliger, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993, y Poljak, R. J., et al., Structure 2:1121-1123, 1994). Una o más CDR se pueden incorporar en una molécula en forma covalente o no covalente.

5 Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina humana natural normalmente tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo de cadena simple o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes.

10 El término "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina humana. En una realización preferida, todos los dominios variables y constantes derivan de las secuencias de inmunoglobulina humana (un anticuerpo completamente humano). Estos anticuerpos se pueden preparar de una variedad de maneras, como se describe a continuación.

15 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de uno o más anticuerpos diferentes. En una realización preferida, una o más de las CDR derivan de un anticuerpo anti-EphB4 humano. En una realización más preferida, todas las CDR derivan de un anticuerpo anti-EphB4 humano. En otra realización preferida, las CDR de más de un anticuerpo anti-EphB4 humano se mezclan y porean en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena liviana de un primer anticuerpo anti-EphB4 humano que se puede combinar con una CDR2 y una CDR3 de la cadena liviana de un segundo anticuerpo anti-EphB4 humano, y las CDR de la cadena pesada de un tercer anticuerpo anti-EphB4. Además, las regiones estructurales pueden derivar de los mismos anticuerpos anti-EphB4, de uno o más anticuerpos diferentes, tal como un anticuerpo humano, o de un anticuerpo humanizado.

25 Un "anticuerpo neutralizante" es un anticuerpo que inhibe la unión de EphB4 a EfrinaB2 cuando un exceso del anticuerpo anti-EphB4 reduce la cantidad de EphB4 (soluble) unido a EfrinaB2 en al menos aproximadamente 20% y preferentemente en al menos 40%, más preferentemente 60%, aun más preferentemente 80%, o aun más preferentemente 85%. La reducción de unión puede ser medida por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, medido en un ensayo de unión competitiva in vitro. Un ejemplo de medir la reducción de la unión se presenta a continuación en los Ejemplos.

30 Un "anticuerpo de activación de quinasa EphB4" es un anticuerpo que activa la actividad quinasa de EphB4 en al menos aproximadamente 20% cuando se añade a una célula, tejido u organismo que expresa EphB4. El anticuerpo puede activar la actividad quinasa de EphB4 en al menos 40%, más preferentemente 60%, aun más preferentemente 80%, o aun más preferentemente 85%. Normalmente la actividad de quinasa se mide como el estado de fosforilación de EphB4 mismo (autofosforilación de tirosina).

40 Como se usa en la presente, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En una realización, la marca es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o fijación a un polipéptido de los restos biotinilo que se pueden detectar por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar por procedimientos ópticos o colorimétricos). En otra realización, la marca o el marcador pueden ser terapéuticos, por ejemplo, un conjugado farmacológico o toxina. Se pueden usar varios procedimientos de marcación de polipéptidos y glicoproteínas conocidos en la técnica. Los ejemplos de marcas para los polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforo lantánido), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotinilo o epitopes polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informante secundario (por ejemplo, secuencias pares de cierre de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, etiqueta de epitope), agente magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como toxina de pertussis, taxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y sus análogos u homólogos. En algunas realizaciones, las marcas se unen por medio de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

55 Como se muestra en los siguientes Ejemplos, los solicitantes han generado numerosos anticuerpos monoclonales contra EphB4 así como líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales EphB4. Estos anticuerpos también se caracterizaron de muchas maneras, tales como, su capacidad de inhibir la interacción entre EphB4 y su ligando (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes de Efrina B2), su capacidad de inhibir la dimerización o multimerización del receptor de

EphB4, su capacidad de inducir la fosforilación de la tirosina de EphB4, su reactividad cruzada con otros elementos de la familia Eph, su capacidad de inhibir la angiogénesis, y su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral. Además los estudios de mapeo de epítipo revelan que estos anticuerpos EphB4 se pueden unir específicamente a una o más regiones de EphB4 (por ejemplo, un dominio globular, un dominio rico en cisteína, o un dominio de fibronectina tipo III). Por ejemplo, un anticuerpo EphB4 se puede unir a ambos dominios de fibronectina tipo III.

Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a un epítipo situado dentro de los aminoácidos 16-198 de un dominio extracelular (ECD) de una proteína de EphB4 (también denominada en la presente como un polipéptido soluble de EphB4). Un polipéptido soluble de EphB4 puede comprender una secuencia que abarca el dominio globular (G) (aminoácidos 29-197 de la SEQ ID NO: 1), y opcionalmente dominios adicionales, tales como el dominio rico en cisteína (aminoácidos 239-321 de la SEQ ID NO: 1), el primer dominio de fibronectina tipo 3 (aminoácidos 324-429 de la SEQ ID NO: 1) y el segundo dominio de fibronectina tipo 3 (aminoácidos 434-526 de la SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de polipéptidos solubles de EphB4 se proporcionan en las Figuras 3-4. Como se usa en la presente, los polipéptidos solubles de EphB4 incluyen fragmentos, variantes funcionales, y formas modificadas del polipéptido soluble de EphB4.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona los anticuerpos EphB4 Nos. 1, 23, 35, y 79, como se muestra en la Figura 5. Opcionalmente, las inmunoglobulinas pueden unir al EphB4 con una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$  o menos.

Los anticuerpos desvelados en la presente serán preferentemente específicos para EphB4, con unión mínima para otros miembros de las familias de Eph o Efrina. En otro aspecto de la invención, el anticuerpo anti-EphB4 demuestra selectividad para especie y molécula. En una realización, el anticuerpo anti-EphB4 se une a EphB4 humano, de cynomologous o rhesus. En una realización preferida, el anticuerpo anti-EphB4 no se une a EphB4 de ratón, rata, cobayo, perro o conejo. Opcionalmente, el anticuerpo no se une a múltiples EphB4 diferentes de especies diferentes, tales como ser humano y ratón. Siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, se puede determinar la selectividad de la especie para el anticuerpo anti-EphB4 por medio del uso métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar la selectividad de la especie por el uso de transferencia Western, FACS, ELISA o RIA. En una realización preferida se puede determinar la selectividad de la especie por el uso de transferencia Western. En otra realización, el anticuerpo anti-EphB4 tiene una tendencia para unirse a EphB4 que es al menos 50 veces mayor que su tendencia a unir otros miembros de la familia EphB de la misma especie, y preferentemente 100 o 200 veces mayor. Se puede determinar la selectividad por el uso de procedimientos bien conocidos en la técnica siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, se puede determinar la selectividad por el uso de transferencia Western, FACS, ELISA o RIA. En una realización preferida, se puede determinar la selectividad molecular por el uso de transferencia Western.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se unen al dominio globular de la EphB4. Por ejemplo, los anticuerpos EphB4 Nos. 1, 23, 35, y 79 se unen a un epítipo en la región que abarca los aminoácidos 16-198 de las secuencias de la Figura 1, que abarca el dominio globular. Los anticuerpos EphB4 Nos. 85L, 85H, 91, y 131 (que no son parte de la invención) se unen a un epítipo de la región que abarca los aminoácidos 324-429, que incluye el primer dominio de fibronectina tipo 3. Los anticuerpos EphB4 Nos. 47, 57, 85H, 98, 121, y 138 (que no son parte de la invención) se unen a un epítipo de la región que abarca los aminoácidos 430-537, que incluye el segundo dominio de fibronectina tipo 3. El anticuerpo EphB4 Núm. 85H (que no es parte de la invención) se pueden unir a al menos dos dominios de un EphB4 (Figura 5).

El anticuerpo anti-EphB4 puede ser una molécula de IgG, una IgM, una IgE, una IgA o una IgD. En una realización preferida, el anticuerpo es una IgG y es un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-EphB4 es de la subclase IgG2. La clase y la subclase de los anticuerpos EphB4 se pueden determinar por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo se pueden determinar por el uso de anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Tales anticuerpos están disponibles en el comercio. La clase y la subclase se pueden determinar por ELISA, transferencia Western así como otras técnicas. En forma alternativa, la clase y la subclase se pueden determinar por la secuenciación del total o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o liviana de los anticuerpos, para comparar sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de varias clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinar la clase y subclase de los anticuerpos. Para ilustrar, las clases y subclases de los ejemplos de anticuerpos EphB4 se muestran en la siguiente Tabla 1.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos, humanizados o primatizados (con CDR injertada), así como los anticuerpos de cadena simple quimérico o con CDR injertada, que comprenden porciones derivadas de especies diferentes, también están abarcados por la presente invención como porciones de unión al antígeno de un anticuerpo. Las diversas porciones de estos anticuerpos se pueden unir entre sí químicamente por técnicas convencionales, o se

pueden preparar como una proteína contigua por el uso de técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica una cadena quimérica o humanizada se puede expresar para producir una proteína contigua. Ver, por ejemplo, Cabilly et al., Patente U.S. Núm. 4.816.567; Cabilly et al., Patente Europea Núm. 0,125,023; Boss et al., Patente U.S. Núm. 4.816.397; Boss et al., Patente Europea Núm. 0.120.694; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., Patente Europea Núm. 0.194.276 B1; Winter, Patente U.S. Núm. 5.225.539; y Winter, Patente Europea Núm. 0.239.400 B1. Ver también, Newman, R. et al., BioTechnology, 10: 1455-1460 (1992), con respecto al anticuerpo primatizado. Ver, por ejemplo, Ladner et al., Patente U.S. Núm. 4.946.778; y Bird, R. E. et al., Science, 24 423-426 (1988)), con respecto a los anticuerpos de cadena simple.

Además, también se pueden producir fragmentos funcionales de los anticuerpos, que incluyen fragmentos de anticuerpos quiméricos, humanizados, privatizados o de cadena simple. Los fragmentos funcionales de los anticuerpos presentes retienen al menos una función de unión y/o función de modulación del anticuerpo de longitud completa del que derivan. Los fragmentos funcionales preferidos retienen la función de unión al antígeno de un correspondiente anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, especificidad para un EphB4). Ciertos fragmentos funcionales preferidos retienen la capacidad de inhibir una o más funciones características de un EphB4, tales como actividad de unión, una actividad de señalización, y/o estimulación de una respuesta celular. Por ejemplo, en una realización, un fragmento funcional de un anticuerpo EphB4 puede inhibir la interacción de EphB4 con uno o más de sus ligandos (por ejemplo, Efrina B2) y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por el receptor, tal como migración celular, proliferación celular, angiogénesis, y/o crecimiento tumoral.

Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a un receptor de EphB4 o porción de este, que incluyen, pero sin limitación, los fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> están abarcados por la invención. Dichos fragmentos se pueden producir por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar los fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente. Los anticuerpos también se pueden producir en una variedad de formas truncadas por el uso de genes del anticuerpo en los que se han introducido uno o más codones de detención corriente arriba del sitio de detención natural. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de cadena pesada F(ab')<sub>2</sub> se puede diseñar para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio de CH<sub>1</sub> y la región bisagra de la cadena pesada.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que deriva de una especie no humana, en la que ciertos aminoácidos de los dominios estructurales y constantes de las cadenas pesada y liviana han mutado de modo de evitar o anular una respuesta inmune en los seres humanos. De modo alternativo, un anticuerpo humanizado se puede producir por el uso de los dominios constantes de un anticuerpo humano en los dominios variables de una especie no humana. Los ejemplos de cómo obtener anticuerpos humanizados se pueden hallar en las Patentes U.S. Nos. 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293. Un anticuerpo humanizado puede comprender porciones de inmunoglobulinas de diferente origen, en las que opcionalmente al menos una porción es de origen humano. Pos consiguiente, la presente invención se refiere a una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión para una EphB4 (por ejemplo, EphB4 humana), dicha inmunoglobulina que comprende una región de unión al antígeno de origen no humano (por ejemplo, roedor) y al menos a porción de una inmunoglobulina de origen humano (por ejemplo, una región estructural humana, una región constante humana o porción de esta). Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones derivadas de una inmunoglobulina de origen no humano con la especificidad requerida, tales como una secuencia de inmunoglobulina de origen de ratón y humano (por ejemplo, una inmunoglobulina quimérica), unidas entre sí en forma química por técnicas convencionales (por ejemplo, sintética) o preparada como un polipéptido contiguo por el uso de técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, ADN que codifica las porciones de la proteína del anticuerpo quimérico se pueden expresar para producir una cadena polipeptídica contigua).

Otro ejemplo de una inmunoglobulina humanizada de la presente invención es una inmunoglobulina que contiene una o más cadenas de inmunoglobulina que comprenden una CDR de origen no humano (por ejemplo, uno o más CDR derivados de un anticuerpo de origen no humano) y una región estructural derivada de una cadena liviana y/o pesada de origen humano (por ejemplo, anticuerpos con CDR injertada con o sin cambios estructurales). En una realización, la inmunoglobulina humanizada puede competir con el anticuerpo monoclonal murino por la unión a un polipéptido de EphB4. Los anticuerpos de cadena simple quiméricos o con CDR injertada también están abarcados por el término inmunoglobulina humanizada.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas de EphB4. Como se describe en la presente, el término "anticuerpo antagonista" se refiere a un anticuerpo que puede inhibir una o más funciones de una EphB4, tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión al ligando) y una actividad de señalización (por ejemplo, agrupamiento o fosforilación de EphB4, estimulación de una respuesta celular, tal como estimulación de la migración celular o proliferación celular). Por ejemplo, un anticuerpo antagonista puede inhibir (reducir o evitar) la interacción de un receptor de EphB4 con un ligando natural (por ejemplo, Efrina B2 o fragmentos de esta). Preferentemente, los anticuerpos antagonistas dirigidos contra EphB4 pueden inhibir funciones mediadas por EphB4, que

incluyen migración de células endoteliales, proliferación celular, angiogénesis, y/o crecimiento tumoral. Opcionalmente, el anticuerpo antagonista se une a un dominio extracelular de EphB4.

Los anticuerpos activantes de EphB4 quinasa pueden aumentar la actividad quinasa de EphB4, incluso en forma independiente de la EfrinaB2. En algunos casos, tales anticuerpos se pueden usar para estimular EphB4. Sin embargo, los solicitantes indican que en la mayor parte de los ensayos basados en células e in vivo, tales anticuerpos de modo sorprendente se comportan como anticuerpos antagonistas. Tales anticuerpos parecen unirse a al menos uno de los dos dominios de fibronectina tipo III, en particular la región de los aminoácidos 324-429 de la Fig. 1.

En ciertas realizaciones, también se proporcionan anticuerpos anti-idiotípicos. Los anticuerpos anti-idiotípicos reconocen determinantes antigénicos asociados con el sitio de unión al antígeno de otro anticuerpo. Los anticuerpos anti-idiotípicos se pueden preparar contra un segundo anticuerpo por la inmunización de un animal de la misma especie, y preferentemente de la misma cepa, que el animal usado para producir el segundo anticuerpo. Ver por ejemplo, la Patente U.S. Núm. 4.699.880. En una realización, los anticuerpos se originan contra el receptor o una porción de este, y estos anticuerpos se usan a su vez para producir un anticuerpo anti-idiotípico. Los anticuerpos anti-idiotípicos producidos de este modo pueden unir compuestos que se unen al receptor, tales como ligandos de la función receptora, y se pueden usar en un inmunoensayo para detectar o identificar o cuantificar tales compuestos. Tal anticuerpo anti-idiotípico también puede ser un inhibidor de un receptor de la función de EphB4, aunque no se una al receptor mismo. Tal anticuerpo anti-idiotípico también se puede llamar un anticuerpo antagonista.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona las líneas celulares del hibridoma, así como los anticuerpos monoclonales producidos por estas líneas celulares del hibridoma. Las líneas celulares de la presente invención tienen usos diferentes que para la producción de los anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, las líneas celulares de la presente invención se pueden fusionar con otras células (tales como mieloma humano adecuadamente marcado con fármaco, mieloma de ratón, heteromieloma humano-ratón o células linfoblastoideas humanas) para producir hibridomas adicionales. Además, las líneas celulares se pueden usar como una fuente de ácidos nucleicos que codifican las cadenas de inmunoglobulina anti-EphB4, que se pueden aislar y expresar (por ejemplo, después de la transferencia a otras células por el uso de cualquier técnica adecuada (ver por ejemplo, Cabilly et al., Patente U.S. Núm. 4.816.567; Winter, Patente U.S. Núm. 5.225.539)). Por ejemplo, los clones que comprenden una cadena liviana o pesada de anti-EphB4 reordenada se pueden aislar (por ejemplo, por PCR) o genotecas de ADNc se pueden preparar a partir de ARNm aislado de las líneas celulares, y se pueden aislar los clones de ADNc que codifican una cadena de inmunoglobulina anti-EphB4. En consecuencia, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y/o liviana de los anticuerpos o las porciones de estos se pueden obtener y usar de acuerdo con las técnicas de ADN recombinante para la producción de la inmunoglobulina específica, cadenas de inmunoglobulina, o variantes de estas (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas) en una variedad de células huésped o en un sistema de traducción in vitro. Por ejemplo, los ácidos nucleicos, que incluyen ADNc, o sus derivados que codifican las variantes tales como una inmunoglobulina humanizada o cadena de inmunoglobulina, se pueden colocar en vectores procarióticos o eucarióticos adecuados (por ejemplo, vectores de expresión) y se introducen en una célula huésped adecuada por un procedimiento adecuado (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), de modo tal que el ácido nucleico esté operativamente unido a uno o más elementos de control de expresión (por ejemplo, en el vector o integrado en el genoma de la célula huésped). Para la producción, las células huésped se pueden mantener en las condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia del inductor, medios adecuados suplementados con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc.), por el cual se produce el polipéptido codificado. Si se desea, la proteína codificada se puede recuperar y/o aislar (por ejemplo, de las células huésped o medio). Se apreciará que el procedimiento de producción abarca la expresión en una célula huésped de un animal transgénico (ver por ejemplo, WO 92/03918, GenPharm International, publicado el 19 de marzo de 1992).

## *II. Procedimientos de producción de anticuerpos*

La preparación de antígeno de inmunización y la producción de anticuerpo policlonal y monoclonal se pueden realizar como se describió en la presente, o por el uso de otras técnicas adecuadas. Una variedad de procedimientos se han descrito. Ver por ejemplo, Kohler et al., Nature, 256: 495-497 (1975) y Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein et al., Nature 266: 550-552 (1977); Koprowski et al., Patente U.S. Núm. 4.172.124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y.); Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Supplement 27, Summer'94), Ausubel, F. M. et al., Eds., (John Wiley & Sons: New York, N.Y.), Chapter 11, (1991). Generalmente, se puede producir un hibridoma por la fusión de una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como SP2/0) con las células productoras del anticuerpo. La célula productora de anticuerpo, preferentemente las del bazo o ganglios linfáticos se obtienen de los animales inmunizados con el antígeno de interés. Las células fusionadas

(hibridomas) se pueden aislar por el uso de condiciones de cultivo selectivo, y se clonan por dilución limitante. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada se pueden seleccionar con un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

5 Se pueden usar otros procedimientos adecuados de producir o aislar anticuerpos de la especificidad, que incluyen, por ejemplo, procedimientos que seleccionan el anticuerpo recombinante de una genoteca, o que dependen de la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos. Ver por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Lonberg et al., Patente U.S. Núm. 5.545.806; Surani et al., Patente U.S. Núm. 5.545.807.

10 Para ilustrar, los inmunógenos derivados de un polipéptido de EphB4 (por ejemplo, un polipéptido de EphB4 o un fragmento antigénico de este que es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo, o una proteína de fusión de EphB4) se pueden usar para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, un hámster o conejo. Ver, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988). Las técnicas para conferir inmunogenicidad en una proteína o péptido incluyen la conjugación a portadores u otras técnicas bien conocidas en la materia. Una porción inmunogénica de un polipéptido de EphB4 se puede administrar en presencia del adyuvante. El progreso de la inmunización se puede controlar por la detección de títulos de anticuerpo en plasma o suero. Se puede usar ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. En una realización, los anticuerpos de la invención son específicos para la porción extracelular de la proteína de EphB4 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) o los fragmentos de esta. En otra realización, los anticuerpos de la invención son específicos para la porción intracelular o la porción de membrana de la proteína de EphB4.

25 Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido de EphB4, se pueden obtener los antiseros y, si se desea, se pueden aislar los anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpo (linfocitos) se pueden recolectar de un animal inmunizado y fusionar por procedimientos de fusión celular somáticos estándares con células inmortalizadas tales como las células del mieloma para producir las células del hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de células B (Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72), y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Las células del hibridoma se pueden seleccionar inmunológicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de EphB4 y los anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende tales células del hibridoma.

35 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se pueden fragmentar por el uso de técnicas convencionales y los fragmentos se seleccionan para determinar la utilidad de la misma manera que se describió anteriormente para los anticuerpos enteros. Por ejemplo, los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> se pueden generar por el tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento de F(ab)<sub>2</sub> resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir los fragmentos de Fab.

40 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención también incluyen moléculas biespecíficas, cadena simple, y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad para un polipéptido de EphB4 conferida por al menos una región de la CDR del anticuerpo. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena simple (Patente US Núm. 4.946.778) también se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena simple. También, se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos que incluyen mamíferos para expresar los anticuerpos humanizados. Los procedimientos de generar estos anticuerpos son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Cabilly et al., Patente U.S. Núm. 4.816.567; Cabilly et al., Patente Europea Núm. 0.125.023; Queen et al., Patente Europea Núm. 0.451.216; Boss et al., Patente U.S. Núm. 4.816.397; Boss et al., Patente Europea Núm. 0.120.694; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., Patente Europea Núm. 0.194.276; Winter, Patente U.S. Núm. 5.225.539; winter, Patente Europea Núm. 0.239.400; Padlan, E. A. et al., Solicitud de Patente Europea Núm. 0.519.596 A1. Ver también, Ladner et al., Patente U.S. Núm. 4.946.778; Huston, Patente U.S. Núm. 5.476.786; y Bird, R. E. et al., Science, 242: 423-426 (1988)).

55 Tales inmunoglobulinas humanizadas se pueden producir por el uso de ácidos nucleicos sintéticos y/o recombinantes para preparar genes (por ejemplo, ADNc) que codifican la cadena humanizada deseada. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) que codifican regiones variables humanizadas se pueden construir por el uso de procedimientos de PCR por mutagénesis para alterar las secuencias de ADN que codifican una cadena humana o humanizada, tales como un molde de ADN proveniente de una región variable previamente humanizada (ver por ejemplo, Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res., 17: 5404 (1989)); Sato, K., et al., Cancer Research, 53: 851-856 (1993); Daugherty, B. L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476 (1991); y Lewis, A. P. y J. S. Crowe, Gene, 101: 297-302 (1991)). Por el uso de estos u otros procedimientos adecuados, también se pueden producir fácilmente las variantes. En una realización, las regiones variables clonadas se pueden

mutagenizar y se pueden seleccionar las secuencias que codifican las variantes con la especificidad deseada (por ejemplo, de una biblioteca de fago; ver por ejemplo, Krebber et al., Patente U.S. Núm. 5,514,548; Hoogenboom et al., WO 93/06213, publicado el 1 de abril de 1993)).

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos también se fijan a una marca que es capaz de ser detectada (por ejemplo, la marca puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o cofactor enzimático). El resto activo puede ser un agente radiactivo, tal como: metales pesados radiactivos tales como quelatos de hierro, quelatos radiactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrón de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, <sup>43</sup>K, <sup>52</sup>Fe, <sup>57</sup>Co, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>132</sup>I, o <sup>99</sup>Tc. Un agente de unión fijo a tal resto se puede usar como un agente de visualización de imagen y se administra en una cantidad efectiva para uso diagnóstico en un mamífero tal como un ser humano y posteriormente se detecta la localización y acumulación del agente de visualización de imagen. La localización y acumulación de agente de visualización de imagen se puede detectar por radiocentelleografía, imagen de resonancia magnética nuclear, tomografía computada o tomografía de emisión de positrón. La inmunocentelleografía mediante anticuerpos u otros polipéptidos dirigidos a EphB4 se puede usar para detectar y/o diagnosticar cánceres y vasculatura. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales contra el marcador de EphB4 marcado con <sup>99</sup>Tecnecio, <sup>111</sup>Indio, <sup>125</sup>Yodo se pueden usar efectivamente para tal estudio de imágenes. Como será evidente para los expertos, la cantidad de radioisótopo que se va a administrar es dependiente del radioisótopo. Los expertos en la técnica pueden formular fácilmente la cantidad de agente de visualización de imagen que se va a administrar que se basa en la actividad específica de un radionúclido determinado usado como resto activo. Normalmente, se administran 0,-100 milicurios por dosis de agente de visualización de imagen, preferentemente 1-10 milicurios, más frecuentemente 2-5 milicurios. En consecuencia, las composiciones de acuerdo con la presente invención útiles como agentes de visualización de imagen que comprenden un resto específico conjugado a un resto radiactivo comprenden 0,1-100 milicurios, en algunas realizaciones preferentemente 1-10 milicurios, en algunas realizaciones preferentemente 2-5 milicurios, en algunas realizaciones más preferentemente 1-5 milicurios.

En ciertas realizaciones preferidas, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal, y en ciertas realizaciones la invención obtiene procedimientos disponibles para generar nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un procedimiento para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de EphB4 puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de EphB4 efectivo para estimular una respuesta inmune detectable, obtener células productoras de anticuerpo (por ejemplo, células del bazo) del ratón y la fusión de las células productoras de anticuerpo con las células del mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpo, y analizar los hibridomas productores de anticuerpo para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido de EphB4. Una vez obtenido, un hibridoma se puede propagar en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo en las que las células derivadas del hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido de EphB4. El anticuerpo monoclonal se puede purificar del cultivo celular.

Además, las técnicas usadas para seleccionar anticuerpos a fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, un anticuerpo usado para ciertos fines terapéuticos preferentemente podrá dirigirse a un tipo de célula particular. Por consiguiente, para obtener anticuerpos de este tipo, puede ser conveniente seleccionar anticuerpos que se unen a las células que expresan el antígeno de interés (por ejemplo, por separación celular activada por fluorescencia). Asimismo, si un anticuerpo se usa para la unión a un antígeno en solución, puede ser conveniente analizar la unión en solución. Una variedad de técnicas diferentes está disponible para analizar las interacciones anticuerpo:antígeno para identificar anticuerpos particularmente convenientes. Tales técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión de resonancia del plasmón superficial (por ejemplo, el ensayo de unión Biacore, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos sándwich (por ejemplo, el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en una variedad de aplicaciones, que incluyen aplicaciones de investigación, diagnóstico y terapéutica. Por ejemplo, se pueden usar para aislar y/o purificar el receptor o porciones de este y estudiar la estructura (por ejemplo, conformación) y función del receptor.

### 55 *III. Aplicaciones diagnósticas*

En ciertos aspectos, los varios anticuerpos de la presente invención se pueden usar para detectar o medir la expresión del receptor de EphB4, por ejemplo, sobre las células endoteliales (por ejemplo, células endoteliales venosas), o en células transfectadas con un gen del receptor de EphB4. En consecuencia, también tienen utilidad en las aplicaciones tales como separación y estudios de imagen (por ejemplo, citometría de flujo y separación celular activada por fluorescencia), para fines de diagnóstico o investigación.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión del antígeno de los anticuerpos pueden estar marcados o no marcados para fines diagnósticos. Normalmente, los ensayos diagnósticos suponen detectar la formación de un complejo resultante de la unión de un anticuerpo al EphB4. Los anticuerpos se pueden marcar directamente. Se puede emplear una variedad de marcas, que incluyen, pero sin limitación, radionúclidos, agentes fluorescentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores de enzimas y ligandos (por ejemplo, biotina, haptenos). Numerosos inmunoensayos apropiados son conocidos por los expertos (ver, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654; y 4.098.876). Cuando no están marcados, los anticuerpos se pueden usar en ensayos, tales como ensayos de aglutinación. Los anticuerpos sin marcar también se pueden usar en combinación con otro reactivo adecuado (uno o más) que se puede usar para detectar el anticuerpo, tal como un anticuerpo marcado (por ejemplo, un segundo anticuerpo) reactivo con el primer anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos anti-idiotipo u otros anticuerpos que son específicos para la inmunoglobulina sin marcar) u otro reactivo adecuado (por ejemplo, proteína marcada A). Un anticuerpo EphB4 también se puede derivar con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la vida media sérica o aumentar la unión al tejido.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en inmunoensayos enzimáticos, en que los anticuerpos presentes, o segundos anticuerpos, se conjugan a una enzima. Cuando una muestra biológica que comprende una proteína de EphB4 se combina con los presentes anticuerpos, la unión se produce entre los anticuerpos y la proteína de EphB4. En una realización, una muestra que contiene las células que expresan una proteína de EphB4 (por ejemplo, células endoteliales) se combina con los presentes anticuerpos, y la unión se produce entre los anticuerpos y las células que portan una proteína de EphB4 que comprende un epítopo reconocido por el anticuerpo. Estas células unidas se pueden separar de los reactivos no unidos y se puede determinar la presencia del conjugado de anticuerpo-enzima específicamente unido a las células, por ejemplo, por el contacto de la muestra con un sustrato de la enzima que produce un color u otro cambio detectable cuando actúa sobre la enzima. En otra realización, los anticuerpos presentes pueden estar sin marcar, y se puede añadir un segundo anticuerpo marcado que reconoce el presente anticuerpo.

En ciertos aspectos, también se pueden preparar kits para usar en la detección de la presencia de una proteína de EphB4 en una muestra biológica. Tales kits incluirán un anticuerpo que se une a una proteína de EphB4 o porción de dicho receptor, así como uno o más reactivos auxiliares para detectar la presencia de un complejo entre el anticuerpo y EphB4 o la porción de este. Las composiciones de anticuerpo de la presente invención se pueden proporcionar en forma liofilizada, solo o en combinación con anticuerpos adicionales específicos para otros epítopes. Los anticuerpos, que pueden ser marcados o sin marcar, se pueden incluir en los kits con ingredientes adjuntos (por ejemplo, buffer, tales como Tris, fosfato y carbonato, estabilizantes, excipientes, biocidas y/o proteínas inertes, por ejemplo, albúmina sérica bovina). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden proporcionar como una mezcla liofilizada con los ingredientes adjuntos, o los ingredientes adjuntos se pueden proporcionar por separado para la combinación por parte del usuario. En general, estos materiales adjuntos estarán presentes en menos de aproximadamente 5% en peso sobre la base de la cantidad de anticuerpo activo, y usualmente estará presente en una cantidad total de al menos aproximadamente 0,001% en peso sobre la base de la concentración del anticuerpo. Cuando se emplea un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal, tal anticuerpo se puede proporcionar en el kit, por ejemplo en un vial o recipiente separado. El segundo anticuerpo, si está presente, normalmente está marcado, y se puede formular de una manera análoga con las formulaciones del anticuerpo descriptas anteriormente.

De modo similar, la presente invención también se refiere a un procedimiento de detectar y/o cuantificar la expresión de un EphB4 o porción del receptor por una célula, en el que una composición que comprende una célula o fracción de esta (por ejemplo, fracción de membrana) se pone en contacto con un anticuerpo que se une a una EphB4 o porción del receptor en condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo a este, y se controla la unión del anticuerpo. La detección del anticuerpo, indicativa de la formación de un complejo entre el anticuerpo y EphB4 o una porción de este, indica la presencia del receptor. La unión del anticuerpo a la célula se puede determinar por procedimientos estándares, tales como los que se describen en los ejemplos de trabajo. El procedimiento se puede usar para detectar la expresión de EphB4 sobre las células de un individuo. Opcionalmente, se puede evaluar una expresión cuantitativa de EphB4 sobre la superficie de las células endoteliales, por ejemplo, por citometría de flujo, y la intensidad de tinción se puede correlacionar con la sensibilidad, progresión o riesgo de la enfermedad.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de detectar la sensibilidad de un mamífero a ciertas enfermedades. Para ilustrar, el procedimiento se puede usar para detectar la sensibilidad de un mamífero a las enfermedades que progresan sobre la base de la cantidad de EphB4 presente en las células y/o el número de células positivas a EphB4 en un mamífero. En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para detectar la sensibilidad de un mamífero a un tumor. En esta realización, una muestra por analizar se pone en contacto con un anticuerpo que se une a un EphB4 o porción de este en condiciones apropiadas para la unión de dicho anticuerpo a este, en el que la muestra comprende células que expresan EphB4 en los individuos normales. Se detecta la unión del anticuerpo

y/o la cantidad de unión, que indica la sensibilidad del individuo a un tumor, en el que los niveles superiores del receptor se correlacionan con aumento de sensibilidad del individuo a un tumor. Los solicitantes y otros grupos han hallado que la expresión de EphB4 tiene una correlación con el crecimiento y progresión tumoral. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar para dilucidar adicionalmente la correlación de la expresión de EphB4 con la progresión de las enfermedades asociadas con la angiogénesis en un individuo.

#### IV. Aplicaciones terapéuticas

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones para inhibir la angiogénesis y para tratar enfermedades (o trastornos) asociados con angiogénesis. En otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones para inhibir o reducir el crecimiento tumoral o para tratar un individuo que sufre de cáncer. Estas involucran administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos EphB4 de la invención, y están destinados particularmente a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más particularmente, seres humanos.

Como se describe en la presente, enfermedades asociadas con angiogénesis incluyen, pero sin limitación, cáncer dependiente de la angiogénesis, que incluye, por ejemplo, tumores sólidos, tumores transmitidos por sangre tales como leucemias, y metástasis tumoral; tumores benignos, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas, y granulomas piogénicos; trastornos inflamatorios tales como inflamación inmune y no inmune; reumatismo articular crónico y psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo del injerto corneano, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolenticular, rubeosis; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización de placa; teleangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; y granulación de heridas y curación de heridas; teleangiectasia, psoriasis escleroderma, granuloma piogénico, colaterales coronarios, angiogénesis del miembro isquémico, rubeosis, artritis, neovascularización diabética, fracturas, vasculogénesis, hematopoyesis.

Se considera que las composiciones de la invención también son útiles para tratar cánceres (tumores) independientes de la angiogénesis. Como se usa en la presente, el término "cáncer independiente de la angiogénesis" se refiere a un cáncer (tumor) en que existe poca o ninguna neovascularización en el tejido tumoral.

En particular, los anticuerpos de la presente invención son útiles para tratar o prevenir un cáncer (tumor), que incluye, pero sin limitación, carcinoma de colon, cáncer de mamas, mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), sarcoma de Kaposi, y leucemia.

En ciertas realizaciones, uno o más anticuerpos EphB4 se pueden administrar juntos (simultáneamente) o en momentos diferentes (secuencialmente). Además, los anticuerpos se pueden administrar con otro agente para tratar cáncer o para inhibir la angiogénesis. En una realización específica, los presentes anticuerpos de la presente invención también se pueden usar con otras terapéuticas de anticuerpo (monoclonal o policlonal).

En ciertas realizaciones, los presentes anticuerpos de la invención se pueden usar solos. En forma alternativa, los presentes anticuerpos de la presente invención se pueden usar en combinación con otros abordajes terapéuticos anti-cáncer convencionales dirigidos al tratamiento o prevención de trastornos proliferativos (por ejemplo tumor). Por ejemplo, tales anticuerpos se pueden usar en la prevención del cáncer profiláctica, prevención de recurrencia del cáncer y metástasis después de la cirugía, y como un adyuvante de otra terapia de cáncer convencional. La presente invención reconoce que la efectividad de las terapias del cáncer convencionales (por ejemplo, quimioterapia, terapia de radiación, fototerapia, inmunoterapia, y cirugía) se puede aumentar mediante el uso de uno o más de los anticuerpos EpbB4 de la invención.

Una amplia colección de compuestos convencionales han demostrado tener actividades anti-neoplásicas. Estos compuestos se han usado como agentes farmacéuticos en la quimioterapia para reducir los tumores sólidos, prevenir metástasis y crecimiento adicional, o disminución de las células malignas en las neoplasias leucémicas o de médula ósea. Si bien la quimioterapia ha sido efectiva para tratar diversos tipos de neoplasias, muchos compuestos anti-neoplásicos inducen efectos secundarios no deseables. Se ha demostrado que cuando se combinan dos o más tratamientos diferentes, los tratamientos pueden actuar sinérgicamente y permitir la reducción de la dosis de cada uno de los tratamientos, de este modo se reducen los efectos secundarios perjudiciales ejercidos por cada compuesto a dosis más altas. En otros casos, las neoplasias que son refractarias a un tratamiento pueden responder a una terapia de combinación de dos o más tratamientos diferentes.

Cuando un presente anticuerpo EphB4 de la presente invención se administra en combinación con otro agente antineoplásico convencional, sea en forma concomitante o sucesiva, se muestra que tal

anticuerpo aumenta el efecto terapéutico del agente antineoplásico o supera la resistencia celular a tal agente antineoplásico. Esto permite la disminución de la dosis de un agente antineoplásico, de este modo se reducen los efectos secundarios indeseables, o restaura la efectividad de un agente antineoplásico en las células resistentes.

5 Los compuestos farmacéuticos que se pueden usar para la terapia antitumoral combinatoria incluye, solo para ilustrar: aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginasa, bcg, bicalutamida, bleomicina, busrelina, busulfano, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clodronato, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dienestrol, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estradiol, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteína, goserelina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón, irinotecano, ironotecano, letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalan, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, nocodazol, octreotide, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfimer, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, suramin, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecano, trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

Estos compuestos antitumorales quimioterapéuticos se pueden categorizar por su mecanismo de acción en, por ejemplo, los siguientes grupos: agentes anti-metabolitos/anti-cáncer, tales como análogos de pirimidina (5-fluorouracilo, floxuridina, capecitabina, gemcitabina y citarabina) y análogos de purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodeoxiadenosina (cladribina)); agentes antiproliferativos/antimitóticos que incluyen productos naturales tales como alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, y vinorelbina), disruptores de microtúbulos tales como taxano (paclitaxel, docetaxel), vincristina, vinblastina, nocodazol, eptilones y navelbina, epididodofilotoxinas (etopósido, tenipósido), agente de daño del ADN (actinomicina, amsacrina, antraciclinas, bleomicina, busulfano, camptotecina, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, citoxano, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, hexametilmelamineoxaliplatino, ifosfamida, melfalan, mercloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, plicamicina, procarbazona, taxol, taxotero, tenipósido, trietilentioposforamida y etopósido (VP16)); antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarrubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina; enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente L-asparagina y reduce las células que no tiene la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes antiplaquetarios; agentes antiproliferativos/alquilantes antimitóticos tales como mostazas de nitrógeno (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalan, clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), alquil sulfonatos, busulfan, nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina), trazenos - dacarbazina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/ antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato); complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxiurea, mitotán, aminoglutetimida; hormonas, análogos de hormona (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) e inhibidores de aromatasas (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sales de heparina sintética y otros inhibidores de trombina); agentes fibrinolíticos (tales como activador de plasminógeno de tejido, estreptoquinasa y uroquinasa), aspirina, dipyridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; agentes antimigratorios; agentes antisecretorios (breveldina); inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamicina), azatioprina, micofenolato de mofetilo); compuestos anti-angiogénicos (TNP-470, genisteína) e inhibidores del factor de crecimiento (inhibidores del factor de crecimiento endotelial (VEGF), inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)); bloqueador del receptor de angiotensina; dadores de óxido nítrico; oligonucleótidos antisentido; anticuerpos (trastuzumab); inhibidores del ciclo celular e inductores de la diferenciación (tretinoína); inhibidores de mTOR, inhibidores de topoisomerasa (doxorubicina (adriamicina), amsacrina, camptotecina, daunorrubicina, dactinomicina, enipósido, epirubicina, etopósido, idarrubicina y mitoxantrona, topotecano, irinotecano), corticoides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, y prenisolona); inhibidores de quinasa de la transducción de la señal de factor de crecimiento; inductores de disfunción mitocondrial y activadores de caspasa; y disruptores de cromatina.

En ciertas realizaciones, los compuestos farmacéuticos que se pueden usar para la terapia anti-angiogénica incluyen: (1) inhibidores de la liberación de "moléculas angiogénicas" tales como bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básicos); (2) neutralizadores de moléculas angiogénicas, tales como un anticuerpo anti-PbFGF; y (3) inhibidores de la respuesta celular endotelial a los estímulos angiogénicos, que incluyen inhibidor de colagenasa, inhibidores de recambio de membrana base, esteroides angiostáticos, inhibidores de angiogénesis derivados fúngicos, factor de plaquetas 4, trombospondina, fármacos de artritis tales como D-penicilamina y tiomalato de oro, análogos de vitamina D3, alfa-interferón, y similares. Para los inhibidores de angiogénesis propuestos adicionales, ver Blood et al., Bioch. Biofys. Acta., 1032:89-118 (1990), Moses et al., Science, 248:1408-1410 (1990), Ingber et al., Lab. Invest., 59: 44-51 (1988), y Patentes U.S. Nos. 5.092.885, 5.112.946, 5.192.744, 5.202.352, y 6573256. Además, existe una amplia variedad de compuestos que se pueden usar para inhibir la angiogénesis, por ejemplo, péptidos o agentes que bloquean la vía de angiogénesis mediada por VEGF,

proteína o derivados de endostatina, fragmentos de unión a lisina de angiostatina, melanina o compuestos promotores de melanina, fragmentos de plasminógeno (por ejemplo, Kringles 1-3 de plasminógeno), subunidades de troponina, antagonistas de vitronectina av3, péptidos derivados de Saposina B, antibióticos o análogos (por ejemplo, tetraciclina, o neomicina), composiciones que contienen dienogest, compuestos que comprenden un núcleo inhibidor de MetAP-2 acoplado a un péptido, el compuesto EM-138, chalcona y sus análogos e inhibidores de naaladasa. Ver, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 6.395.718, 6.462.075, 6.465.431, 6.475.784, 6.482.802, 6.482.810, 6.500.431, 6.500.924, 6.518.298, 6.521.439, 6.525.019, 6.538.103, 6.544.758, 6.544.947, 6.548.477, 6.559.126, y 6.569.845.

De acuerdo con la naturaleza de la terapia combinatoria, la administración de los anticuerpos de la invención puede continuar mientras se está administrando la otra terapia y/o a partir de ese momento. La administración de los anticuerpos se puede realizar en una dosis única, o en dosis múltiples. En algunos casos, la administración de los anticuerpos comienza al menos varios días antes de la terapia convencional, mientras que en otros casos, la administración comienza inmediatamente antes o en el momento de la administración de la terapia convencional.

#### V. Composiciones farmacéuticas y modos de administración

En ciertas realizaciones, los presentes anticuerpos de la presente invención se formulan con un portador farmacéuticamente aceptable. Tales anticuerpos se pueden administrar solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición). Los compuestos se pueden formular para la administración en cualquier modo conveniente para uso en medicina humana o veterinaria. Los agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes saborizantes y de perfume, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones.

Las formulaciones de los presentes anticuerpos incluyen los adecuados para administración oral, dietaria, tópica, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea), inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal o oral, gotas intranasales), rectal, y/o intravaginal. Otros procedimientos de administración adecuados también incluyen dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación lenta. Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden administrar como parte de una terapia combinatoria con otros agentes (sea en la misma formulación o en una formulación separada).

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitaria y se pueden preparar por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosis única variará de acuerdo con el huésped tratado, el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosis única generalmente será la cantidad de compuesto que produce un efecto terapéutico.

En ciertas realizaciones, los procedimientos de preparar estas formulaciones o composiciones incluyen combinar otro tipo de agente anti-tumoral o anti-angiogénesis y un portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se pueden preparar con un portador líquido, o un portador sólido finamente dividido o ambos, y posteriormente, si es necesario, moldear el producto.

Las formulaciones para la administración oral pueden estar en forma cápsulas, sellos, pastillas, comprimidos, comprimidos masticables (por medio del uso un base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (por medio del uso una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia), y/o como enjuagues bucales y similares, cada una que contiene una cantidad predeterminada de uno o más de los presentes anticuerpos como ingrediente activo.

En las formas de dosis sólidas para la administración oral (cápsulas, comprimidos, pastillas, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más anticuerpos de la presente invención se mezclan con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o alguno de los siguientes: o (1) rellenos o expansores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, (2) aglutinantes tales como, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidina, sacarosa, y goma de acacia, (3) humectantes tal como, glicerol, (4) agentes desintegrantes tal como, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o mandioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, (5) agentes retardadores de solución tal como, parafina, (6) aceleradores de absorción tal como, compuestos de amonio cuaternario, (7) agentes humectantes tal como, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (8) absorbentes tal como, caolín y arcilla bentonita, (9) lubricantes tal como, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio o sus mezclas y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y pastillas, las composiciones farmacéuticas pueden comprender agentes amortiguadores. Las

composiciones sólidas de tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina blanda y dura por medio del uso de excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

5 Las formas de dosis líquidas para administración oral incluyen, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosis líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tal como, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol; aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, 10 oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitanos, ciclodextrina y sus mezclas. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes, y conservantes.

15 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, tales como, alcoholes isotearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

20 Las composiciones de la invención se pueden administrar en forma tópica, sea en piel o las membranas mucosas tales como las del cuello uterino y vagina. Esto ofrece la mayor oportunidad para la administración directa al tumor con la más baja probabilidad de inducir efectos secundarios. Las formulaciones tópicas además incluyen uno o más de la amplia variedad de agentes conocidos como efectivos como potenciadores de la penetración en piel o estrato córneo. Los ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, dimetil sulfóxido, y azona. Los agentes adicionales se pueden incluir también obtener la 25 formulación cosméticamente aceptable. Los ejemplos de estas son grasas, ceras, aceites, colorantes, fragancias, conservantes, estabilizantes, y agentes activos de superficie. También se pueden incluir agentes queratolíticos tales como los conocidos en la técnica. Los ejemplos son ácido salicílico y azufre.

30 Las formas de dosis para administración transdérmica o tópica incluyen polvos, spray, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. Los presentes anticuerpos se pueden mezclar en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y/o cualquiera de los conservantes, amortiguadores o propelentes, según sea necesario. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un anticuerpo, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o sus mezclas.

35 Los polvos y spray pueden contener, además de un anticuerpo, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o las mezclas de estas sustancias. Los sprays contienen adicionalmente propelentes habituales tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

40 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más anticuerpos en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas, estériles y farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables, estériles inmediatamente antes de usar, que pueden contener antioxidantes, buffer, bacteriostáticos, solutos que convierten a la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o 45 espesantes. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y ciclodextrinas. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y por el uso de 50 tensioactivos.

55 Estas composiciones también contener adyuvante, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede asegurar por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. También puede ser conveniente incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede producir por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

60 Las formas inyectables en depósito se obtienen por la formación de matrices microencapsuladas de uno o más anticuerpos en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. De acuerdo con la relación del fármaco al polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen

poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones en depósito inyectables también se preparan por la captación del fármaco en los liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

5 Las formulaciones para administración intravaginal o rectal se pueden presentar como supositorios, que se pueden preparar por la mezcla de uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprende, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio o un salicilato que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura corporal y en consecuencia se funden en la cavidad corporal y liberan allí el agente activo.

### EJEMPLIFICACIÓN

10 A continuación la invención se describe en forma general, la que se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solo para fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la invención. Cabe mencionar que los anticuerpos 47, 57, 85L, 85H, 91, 98, 121, 131 y 138 no se incluyen dentro del ámbito de la invención.

#### Ejemplo 1. Efecto de anticuerpos policlonales de Efrina B2 y EphB4 sobre el crecimiento de las células tumorales

15 Dos anticuerpos policlonales EphB4 (H-200 y N-19) se adquirieron en Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). El anticuerpo H-200 (también llamado sc-5536) tiene una región epitópica que corresponde a los aminoácidos 201-400 dentro de un dominio extracelular del EphB4 humano, mientras que el anticuerpo N-19 (también llamado sc-7285) tiene una región epitópica dentro de un dominio extracelular N-terminal del EphB4 humano. Además, un anticuerpo policlonal Efrina B2 se adquirió en R&D Systems (Minneapolis, MN).

20 Tres líneas celulares de mesotelioma (H28, H2052, y H2373) se obtuvieron del ATCC (Manassas, VA) y se usaron para analizar las actividades anti-tumorales de estos anticuerpos policlonales EphB4 y Efrina B2. Estas células (aproximadamente 5.000 células/ pocillo) se sembraron en placas de 48 pocillos, y se trataron el día siguiente con diferentes concentraciones de cada anticuerpo. El ensayo de viabilidad celular (MTT) se realizó en el día 4. Los efectos de los anticuerpos policlonales EphB4 y Efrina B2 I sobre el crecimiento de las células tumorales se mostraron en la Figura 6.

#### Ejemplo 2. Efecto de los anticuerpos monoclonales EphB4 sobre la angiogénesis y el crecimiento tumoral

##### A. Generación y análisis funcional de los anticuerpos EphB4

30 Anticuerpos monoclonales anti-EphB4 se originaron en ratones contra el dominio extracelular (ECD) de EphB4. Un EphB4ECD (ver, por ejemplo, Figura 5) se clonó en los vectores de expresión (por ejemplo, pGEX) para generar las proteínas de fusión de EphB4ECD (por ejemplo, GST-ECD). La proteína de fusión de EphB4ECD expresada en E. coli BL21 se purificó por cromatografía de afinidad. En el caso de las proteínas de fusión GST, el dominio GST se escindió con trombina. El anticuerpo monoclonal se purificó a partir de los sobrenadantes del hibridoma por cromatografía de Proteína A.

35 Estos anticuerpos monoclonales incluyen los anticuerpos EphB4 Nos. 1, 23, 35, 47, 57, 79, 85L, 85H, 91, 98, 121, 131, y 138 (Figura 5). Los estudios de mapeo de anticuerpos mostraron el dominio epitópico para cada uno de estos anticuerpos (Figura 5). Se analizó la afinidad de unión de cada anticuerpo EphB4 y se mostró en la Figura 7.

40 Se realizaron otros experimentos para analizar las actividades funcionales de estos anticuerpos, que incluyen las capacidades para competir con su compañero de unión tal como Efrina B2, para activar la fosforilación de tirosina de EphB4, para inhibir la formación de tubos in vitro en HUAEC, para inhibir la angiogénesis in vivo por el ensayo del tapón de matrigel, para estimular la apoptosis o necrosis en células de tumor SCC15 y para inhibir el crecimiento del xenotrasplante de SCC15. Los resultados se sintetizan en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Una síntesis de actividades de los anticuerpos EphB4.

Núm. Ab.	Activación de fosforilación de tirosina de EphB4	Inhibición de la interacción de EphB4/ Efrina B2	Inhibición de la formación de tubos in vitro en HUAEC	Inhibición de la angiogénesis in vivo (ensayo del tapón de matrigel)	Estimulación de apoptosis o necrosis en células de tumor SCC15	Inhibición del crecimiento del xenotrasplante de SCC15	Subclase de Ab
1	--	+	+	Nd	N	Nd	IgG2b

23	--	+	+	+	A,N	--	IgG2b
35	--	+	+	Nd	A,N	--	IgG2b
47	--	--	+	--	Nd	+	IgG3
57	--	--	--	--	Nd	+	IgG3
79	--	+	--	Nd	A,N	--	IgG1
85L	+	--	--	--	Nd	--	IgG2b
85H	--	--	--	Nd	Nd	Nd	IgG2b
91	+	--	--	Nd	-	Nd	IgG2a
98	--	--	+	+	Nd	Nd	IgG2a
121	+	--	--	Nd	Nd	--	IgG1
131	+	--	+	Nd	Nd	+	IgG1
138	--	--	+	+	A,N	+	IgG2b

Nd = no determinado (no se proporcionan datos)

-- = sin efecto claro

+ = efecto claro

A = apoptosis

N = necrosis

A,N = apoptosis y necrosis

El efecto de estos anticuerpos sobre la angiogénesis se analizó adicionalmente en el ensayo de microbolsa de córnea de ratón. Por ejemplo, el anticuerpo EphB4 Núm. 138 inhibió significativamente la angiogénesis como se muestra en la Figura 8.

5 Un ejemplo representativo se muestra en la Figura 9 para ilustrar las actividades antitumorales de los anticuerpos EphB4 sintetizados en la Tabla 1. A los ratones desnudos BalbC se inyectaron por vía subcutánea  $2,5 \times 10^6$  células tumorales viables (SCC15, una línea de células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello). Los tumores se iniciaron en los ratones nu/un por la inyección de  $2,5-5 \times 10^6$  células premezcladas con matrigel y factores de crecimiento, y los Ab por vía subcutánea para iniciar los xenoinjertos del tumor. Los ratones se abrieron 14 días después de las inyecciones. SCC15 es una línea de células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello, B16 es una línea celular de melanoma, y MCF-7 es una línea celular de carcinoma de mamas. Las respuestas de los tumores a estos tratamientos se compararon con los ratones tratados con control, que recibieron inyecciones de PBS. Los animales se observaron diariamente en cuanto al crecimiento tumoral y los tumores subcutáneos se midieron por el uso de un calibre cada 2 días. Los anticuerpos #1 y #23 mostraron regresión significativa del tamaño del tumor SCC15 en comparación con el control, especialmente sin factor de crecimiento adicional añadido, lo que indica que los anticuerpos EphB4 inhibieron el crecimiento tumoral in vivo de las células SCC15.

20 Otro experimento representativo se muestra en la Figura 10 para ilustrar las actividades anti-tumorales y anti-angiogénesis de los anticuerpos EphB4 sintetizados en la Tabla 1. La angiogénesis se evaluó por inmunohistoquímica CD-31. Las secciones de tejido tumoral de los ratones tratados y no tratados se colorearon para CD31. La apoptosis se evaluó por TUNNEL inmunohistoquímica, y proliferación por el ensayo BrdU. Después de la extirpación quirúrgica, los tumores se cortaron inmediatamente en secciones seriadas de 2 mm y se incluyeron en parafina por medio del uso de procedimientos estándares. El tejido incluido se cortó en secciones de  $5 \mu\text{m}$ , se extrajo la cera y el tejido se rehidrató. Los tejidos rehidratados se irradiaron con microondas en solución de recuperación de antígeno. Las secciones se lavaron en PBS, y se añadieron la mezcla de reacción TUNNEL (solución de desoxinucleotidil transferasa terminal y nucleótido marcado con fluoresceína) y BrdU en una cámara húmeda completamente protegida de la luz. La solución de reacción TUNNEL y BrdU se retiraron a continuación, se lavaron las secciones y se añadió anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de la incubación y el lavado, se añadió 3,3'-diaminobenzidina. Se utilizó también Masson Tricrómica y Hematoxilina y Eosina para teñir las secciones a fin de visualizar la

5 morfología. Masson Tricrómica permite visualizar necrosis y fibrosis. El tumor recibe soporte sanguíneo de los márgenes tumor/piel, músculo. A medida que el tumor crece, las regiones interiores se agotan de nutrientes. Esto conduce a necrosis (muerte celular), preferentemente en el centro del tumor. Después de que las células mueren, el tejido (tumor) es reemplazado por tejido fibroblástico. Las secciones se visualizaron bajo magnificación de 20 veces con obtención de imágenes digitales. Se obtuvo una morfología diferente en los tumores de SCC con cada anticuerpo administrado. Ab #1 mostró un incremento en la necrosis y la fibrosis, pero no en la apoptosis. Ab #23 mostró un aumento en la apoptosis, necrosis y fibrosis y una disminución en la infiltración de los vasos. Ab #35 mostró un aumento en la necrosis y fibrosis, y un pequeño aumento en la apoptosis y una disminución en la infiltración de los vasos. Ab #79 mostró un gran aumento en la apoptosis, y necrosis y fibrosis. Ab #91 no mostró cambios en la apoptosis, pero un aumento en la proliferación. Y Ab #138 mostró un aumento en la apoptosis, necrosis, fibrosis y una disminución en la proliferación y la infiltración de los vasos. Los tumores tratados con PBS control mostraron la densidad tumoral abundante y una respuesta angiogénica robusta. Los tumores tratados con los anticuerpos EphB4 mostraron una disminución en la densidad de las células tumorales y una marcada inhibición de la angiogénesis del tumor en regiones con células tumorales viables, así como necrosis y apoptosis tumorales. Estos resultados muestran que los anticuerpos EphB4 causaron apoptosis, necrosis y disminución de la angiogénesis en carcinoma de cabeza y cuello tipo de tumor SCC15.

20 Otro experimento representativo se muestra en la Figura 11 para ilustrar la actividad antitumoral de los anticuerpos EphB4 sintetizados en la Tabla 1. El tratamiento de día alternado con el anticuerpo EphB4 monoclonal o un volumen igual de PBS como control se inició en el día 4, después de que los tumores se han establecido, y continuó durante 14 días. La administración sistémica se administró IP o SC sin diferencia significativa. Todos los experimentos se realizaron de una manera doble ciego para eliminar el sesgo del investigador. Los ratones se sacrificaron en la conclusión del período de tratamiento de dos semanas. Los tumores se recolectaron inmediatamente postmortem y se fijaron y procesaron por inmunohistoquímica. Se administraron anticuerpos EphB4 a razón de 40 mg por kg de peso corporal. El tratamiento con el anticuerpo EphB4 inhibió significativamente el crecimiento del tumor SCC humano en comparación con los ratones tratados con control ( $p < 0,05$ ). El tratamiento con el anticuerpo EphB4 inhibió significativamente el peso del tumor humano en comparación con los ratones tratados con control ( $p < 0,05$ ). Estos resultados muestran que la administración sistémica de los anticuerpos sobre los xenoinjertos llevó a la regresión del tumor en los xenoinjertos del tumor SCC15.

### Ejemplo 3. Materiales y procedimientos

#### 1) Inmunohistoquímica

35 Las secciones de tejido fijadas con formalina se desparafinaron y se incubaron con 10% de suero de cabra a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo EphB4 monoclonal  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la noche. La IgG de conejo específica del isotipo se usó como control. La inmunorreactividad para estos receptores fue revelada por el uso un kit de avidina-biotina de Vector Laboratories. La actividad de peroxidasa se reveló con la reacción histoquímica de diaminobenzidina (Sigma). Los portaobjetos posteriormente se tiñó con contraste con 0,12% de azul de metileno o H&E. Para las secciones congeladas, los tejidos incluidos en OCT se cortaron en secciones de  $5\text{ }\mu\text{m}$  y se fijaron en paraformaldehído 4% regulado con fosfato. Las secciones se lavaron durante  $3 \times 5\text{ min}$  en PBS y se bloqueó la peroxidasa endógena por incubación en 0,3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con anticuerpo Eph4 (C-16) (1:50) durante 1 h a temperatura ambiente seguido por tres lavados en PBS y la incubación con anticuerpo secundarios anti-cabra de burro (Santa Cruz Biotech.) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados en PBS, la actividad de peroxidasa se localizó por la incubación en solución de sustrato de DAB (Vector Laboratories, Inc. Burlingame CA) durante 10 min a temperatura ambiente. Las secciones se tiñeron por contraste con hematoxilina durante 20 s, se deshidrataron y montaron. El control negativo para la tinción fue la sustitución de suero de cabra normal para el anticuerpo primario.

#### 2) Transferencia Western

50 Los lisados de célula completa se prepararon por el uso de buffer de lisis celular (GeneHunter, Basgvukke TN) suplementado con el cóctel inhibidor de proteasa (Pierce, Rockford IL), a menos que se indique lo contrario. La proteína total se determinó por el uso del sistema de reactivo DC (Bio-Rad, Hercules CA). Normalmente,  $20\text{ }\mu\text{g}$  de lisado de célula completa se corrieron en un gel de gradiente 4-20% de Tris-Glicina. Las muestras se electro-transferieron a la membrana de PVDF y se bloqueó la unión no específica en el buffer TBST (0,5 mM de Tris-HCl, 45 mM de NaCl, 0,05% de Tween-20, pH 7,4) que contiene 5% de leche no grasa. Las membranas primero se probaron con anticuerpo primario durante toda la noche, se extrajeron con buffer de extracción de transferencia Western Restore™ (Pierce, Rockford IL) y se probaron nuevamente con  $\beta$ -actina para confirmar la carga equivalente y la transferencia de proteína. La señal se detectó por el uso de sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto (Pierce).

## 3) Análisis de fosforilación de la tirosina quinasa

Las células que crecen en placas de 60 mm se privaron de suero (1% de RPMI 1640 suplementado con FBS, 24 horas) o se cultivaron en condiciones normales (10% FBS) y posteriormente se trataron con o sin 1 µg/ml de efrina B2/Fc de ratón durante 10 min para activar el receptor de EphB4. Los lisados celulares clarificados se incubaron con el anticuerpo EphB4 monoclonal durante toda la noche a 4 °C. El complejo de antígeno-anticuerpo se inmunoprecipitó con la adición de 100 µl de Proteína G-Sefarosa en 20 mM de fosfato de sodio, pH 7,0 con incubación durante toda la noche a 4 °C. Los inmunoprecipitados se analizaron por Transferencia Western con anticuerpo específico de fosfotirosina (pTyr) (Upstate, clon 4G10) a una dilución de 1:1000 dilución seguido por la incubación con proteína G-HRP (Bio-Rad) a una dilución de 1: 5000. Para controlar la eficiencia de inmunoprecipitación, se probó una membrana duplicada con anticuerpo monoclonal específico de EphB4.

## 4) Cultivo celular

Las HUVEC normales se obtuvieron de Cambrex (BioWhittaker) y mantuvieron en medio EBM2 suplementado con 0,1 mg/ml de suplemento de crecimiento endotelial (extracto crudo de cerebro bovino), penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 U/ml), 2 mmol/l de glutamina y 0,1 mg/ml de heparina sódica. Las alícuotas de células se conservaron congeladas entre los pasajes 1 y 3. En todos los experimentos, se usaron HUVEC de los pasajes 4 o inferiores y se recolectaron de una placa confluyente.

Las líneas celulares de mesotelioma NCI H28 y NCI H2373 se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA). Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS; Life Technologies, Gaithersburg, MD) y antibióticos. Las células primarias se obtuvieron de la efusión pleural de pacientes con mesotelioma.

## 5) Ensayo de formación de tubo celular endotelial

Se colocó Matrigel (60 µl de 10 mg/ml; Collaborative Lab, Cat. Núm. 35423) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos enfriada en hielo. La placa se dejó asentar a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente se incubó a 37 °C durante 30 minutos para permitir la polimerización del Matrigel. Mientras tanto, se prepararon células endoteliales de la vena umbilical humana en EGM-2 (Clonetic, Cat. Núm. CC3162) a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml. Las células (500 µl) y el anticuerpo de ensayo EphB4 se mezclaron y 200 µl de esta suspensión se colocaron por duplicado sobre el Matrigel polimerizado. Después de 24 h de incubación, se tomaron fotos por triplicado para cada concentración por el uso de un sistema de análisis de imagen Bioquant. El efecto de la adición de proteína ( $IC_{50}$ ) se evaluó en comparación con los controles no tratados por la medición de la longitud de las cuerdas formadas y el número de uniones.

## 6) Ensayo de migración celular

Se evaluó la quimiotaxis de las HUVEC al VEGF por el uso de una cámara de Boyden modificada, dispositivos de filtro de membrana trans-pocillo en placas de 24 pocillos, 6,5 mm diámetro, 8 µm de tamaño de poro, matrigel revestido de 10 µm de espesor, membranas de policarbonato (BD Biosciences). Las suspensiones celulares de HUVEC ( $2 \times 10^5$  células/ml) en 200 µl de EBM se sembraron en la cámara superior y los anticuerpos EphB4 de ensayo se añadieron simultáneamente con estimulante (VEGF o bFGF) al compartimiento inferior de la cámara y se investigó su migración a través de un filtro de policarbonato en respuesta a 10-20 ng/ml de VEGF con o sin  $100 \text{ nM}^{-1} \mu\text{M}$  de compuesto de ensayo. Después de la incubación durante 4-24 horas a 37 °C, la superficie superior del filtro se raspó con el hisopo y los filtros se fijaron y se colorearon con Diff Quick. Se contaron 10 campos al azar a 200 x de aumento y los resultados se expresan como media # por campo. Los valores de control no estimulado negativo se sustrajeron del control estimulado y los valores de la muestra tratada con proteína y los datos se graficaron como promedio de células migradas  $\pm$  S.D. La  $IC_{50}$  se calculó a partir de los datos graficados.

## 7) Ensayo de inhibición de crecimiento

Se sembraron HUVEC ( $1,5 \times 10^3$  células) en una placa de 96 pocillos en 100 µl de EBM-2 (Clonetic, Cat. Núm. CC3162). Después de 24 horas (día 0), el anticuerpo EphB4 de ensayo se añade a cada pocillo a la concentración deseada en el medio EBM-2. En el día 0, una placa se tiñó con 0,5% de violeta cristal en 20% de metanol durante 10 minutos, se lavó con agua, y se secó al aire. Las placas restantes se incubaron durante 72 h a 37 °C. Después de 72 h, las placas se tiñeron con 0,5% de violeta cristal en 20% de metanol, se lavaron con agua, y se secaron al aire. La coloración se eluyó con 1:1 solución de etanol: 0,1 M de citrato de sodio (que incluye la placa del día 0), y se midió la absorbancia a 540 nm con un lector ELISA (Dynatech Laboratories). Se sustrajo la absorbancia del Día 0 de las placas de 72 horas y los datos se grafican como porcentaje de la proliferación del control (células tratadas con vehículo). El valor de  $IC_{50}$  se calculó a partir de los datos graficados.

## 8) Ensayo murino de angiogénesis con tapón de Matrigel

Se ensayó la angiogénesis in vivo en los ratones como crecimiento de vasos sanguíneos del tejido subcutáneo en una muestra de ensayo que contiene un tapón de Matrigel. Matrigel se forma rápidamente a partir de un gel sólido a temperatura corporal, que atrapa los factores para permitir la liberación lenta y la exposición prolongada a los tejidos circundantes. Matrigel (8,13 mg/ml, 0,5 ml) en forma líquida a 4 °C se mezcló con suplemento de crecimiento celular endotelial (ECGS), anticuerpos de ensayo EphB4 más ECGS o Matrigel más vehículo solo (PBS que contiene 0,25% de BSA). Se inyectó Matrigel (0,5 ml) en el tejido subcutáneo abdominal de ratones nu/nu hembra (6 semanas) a lo largo de la línea media peritoneal. Había 3 ratones en cada grupo. Los animales se cuidaron de acuerdo con las pautas institucionales y NIH. En el día 6, los ratones se sacrificaron y se recuperaron los tapones y se procesaron para histología. Normalmente, se extrajo la piel suprayacente, y los geles se cortaron por retención del revestimiento peritoneal para soporte, se fijaron en 10% de formalina regulada en PBS y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de 3 µm y se tiñeron con H&E o tinción tricrómica de Masson y se examinaron bajo microscopio óptico.

#### 9) Ensayo de microbolsa corneal en ratón

Se realizó el ensayo de microbolsa corneal en ratón de acuerdo con lo detallado por Kenyon et al., 1996. Brevemente, los pellets de hydron (polihidroxietilmetacrilato [poliHEMA], Interferon Sciences, New Brunswick, NJ, U.S.A.) que contiene 90 ng de bFGF (R&D) o 180 ng de VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.) y se prepararon 40 µg de sulfato de aluminio sacarosa (Sigma). Por el uso de un microscopio operativo, se realizó una queratotomía lineal estromática con un bisturí (Bard-Parker no. 15) paralelo a la inserción del músculo recto lateral de un animal anestesiado. Se diseccionó una microbolsa intraestromal mediante una cuchilla von Graefe modificada (2-30 mm). Se implantó un pellet único y se avanzó hacia el limbo corneal temporal (dentro de 0±7±1±0 mm para los pellet de bFGF y 0±5 mm para los pellet de VEGF). Se determinó que la diferencia en la localización del pellet para cada factor de crecimiento es necesaria dada la estimulación angiogénica relativamente más débil del VEGF en este modelo. El ungüento antibiótico (eritromicina) posteriormente se aplicó al ojo operado para evitar la infección y reducir las irregularidades de la superficie. Se midió la posterior respuesta vascular que se extiende desde la vasculatura del limbo hacia el pellet y la zona de la circunferencia contigua de neovascularización. Los datos y las fotos clínicas aquí presentados se obtuvieron en el día 6 después de la implantación del pellet, que se halló es el día de la máxima respuesta angiogénica.

#### 10) Ensayo de invasión in vitro

Los dispositivos de cultivos celular de 9 mmm revestidos de matriz "Matrigel" (tamaño de poro, 8 µm; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) se colocaron en una placa de 24 pocillos. Las células HUVEC se sembraron a una densidad de 5x10<sup>3</sup> células por pocillo en la capa superior del inserto de cultivo y se cultivaron con EBM libre de suero en presencia de los anticuerpos EphB4 de ensayo durante 24 h. El Grupo control se cultivó en el mismo medio sin anticuerpos EphB4. Posteriormente 0,5 ml de la línea celular SCC15 humana, en medio acondicionado se cargaron en la capa inferior del inserto de cultivo como una quimioatrayente. Las células se incubaron durante 24 h, posteriormente las células restantes de la capa superior se limpiaron con algodón y las células que penetran en la capa inferior se fijaron con 5% de glutaraldehído y se tiñeron con Diff Quick. La cantidad total de células que pasaron a través de la matriz de Matrigel y cada poro de µm del inserto del cultivo se contaron por medio del uso de microscopia óptica y se designó como un índice de invasión (número de células/área).

#### 11) Crecimiento del tumor SCC15 en los ratones

Se inyectan por vía subcutánea una línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en crecimiento logarítmico SCC15, a una densidad de 5X 10<sup>6</sup> células; con o sin el anticuerpo de ensayo EphB4 en presencia o ausencia de bFGF humano, en ratones desnudos atímicos Balb/c, junto con membrana basal sintética Matrigel (BD Bioscience) (1:1 v/v), y se examina los tumores dentro de 2 semanas. Los volúmenes del tumor en el grupo de anticuerpo de ensayo EphB4, en presencia y ausencia de factor de crecimiento después de la implantación fueron tres veces más pequeños que los del grupo vehículo. No hubo diferencia en el peso corporal entre los grupos. El examen inmunohistoquímico de las secciones transversales de los tumores extirpados y la apoptosis o necrosis positiva a TUNEL, se realizarán la inmunotinción CD34, y la velocidad de proliferación BrdU, después de desparafinar, rehidratar e inactivar la actividad de peroxidasa endógena, y después de 10 min de permeabilización con proteinasa K. También se realizará la evaluación cuantitativa de densidades vasculares. La administración intratumoral local o la administración IV del anticuerpo de ensayo EphB4 también se realizarán dos veces por semana.

Se inyectaron 30 ratones desnudos atímicos, BALB/c (nu/nu), con 1 x 10<sup>6</sup> células de melanoma B16 con 0,1 ml de PBS mezclado con 0,1 ml de matrigel o 1,5 x 10<sup>6</sup> células de SCC15 resuspendidas en 200 µl de medio libre de suero DMEM y se inyectaron por vía subcutánea en el día 0 en la región del hombro derecho de los ratones. Los anticuerpos de ensayo EphB4 se inyectaron por vía intravenosa o subcutánea, alrededor del tumor que comienza el día 1 a una dosis inicial de 4 µg/mg, con inyecciones

semanales de 2 µg/mg (10 µg/g, 50 µg/kg/día), y a 2 semanas pos-inoculación. Los ratones se sacrifican en el Día 14. Los ratones control recibieron 50 µl de PBS cada día.

12) Formación del tumor en ratones desnudos

5 Todos los animales se trataron con protocolos aprobados por los comités institucionales de cuidado de animales. Las células de cáncer ( $5 \times 10^6$ ) se inocularon por vía subcutánea en la piel dorsal de los ratones desnudos. Cuando el tumor había crecido a un tamaño de aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$  (usualmente tardó 12 días), se inyectó el anticuerpo de ensayo EphB4 por vía intraperitoneal o subcutánea una vez/día y la tumorigénesis se controló durante 2 semanas. El volumen del tumor se  
10 calculó de acuerdo con la fórmula  $a^2 \times b$ , en la que a y b son los diámetros menor y mayor, respectivamente. Se usó una prueba de Student para comparar los volúmenes del tumor, con  $P < 0,05$  considerada significativa

13) Cuantificación de densidad microvascular

15 Los tumores se fijaron en 4% de formaldehído, se incluyeron en parafina, cortaron en secciones de  $5 \mu\text{m}$ , y se tiñeron con hematoxilinaeosina. La densidad vascular se semicuantificó por medio del uso de un analizador de imagen basado en computadora (cinco campos por sección de tres ratones en cada grupo).

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo que se une a un epítopo situado dentro de los aminoácidos 16-198 de la secuencia de EphB4 de la Figura 1, que inhibe la interacción entre EphB4 y Efrina B2, y que promueve la apoptosis en una célula tumoral.
- 5 2. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, que inhibe la unión de EphB4 a la porción extracelular de EfrinaB2.
3. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, que inhibe la formación de dímeros o multímeros de EphB4
- 10 4. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, que inhibe la autofosforilación estimulada por EfrinaB2 de EphB4.
- 15 5. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, que inhibe la formación de tubos por las células endoteliales cultivadas, inhibe la vascularización de un tejido in vivo, inhibe la vascularización del tejido implantado en la córnea de un animal, inhibe la vascularización de un tapón de tejido de Matrigel implantado en un animal, y/o disminuye el crecimiento de un xenoinjerto tumoral humano en un ratón.
6. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, que es un anticuerpo humanizado.
- 20 7. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, que comprende al menos una porción de CDR derivada del anticuerpo 023 expresada por una célula huésped que tiene la designación de depósito de ATCC Núm. PTA-6208.
8. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, que es un anticuerpo monoclonal.
9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal es clínicamente aceptable para la administración a un ser humano.
- 25 10. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, que está unida de modo covalente a un resto funcional adicional.
11. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 10, en el que el resto funcional adicional es una marca.
- 30 12. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 11, en el que la marca es adecuada para la detección por un procedimiento seleccionado del grupo que consiste: procedimientos de detección por fluorescencia, procedimientos de detección por tomografía de emisión de positrones y procedimientos de detección por resonancia magnética nuclear.
13. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 12, en el que la marca se selecciona del grupo que consiste en una marca fluorescente, una marca radiactiva y una marca que tiene una característica de resonancia magnética nuclear distintiva.
- 35 14. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 10, en el que el resto funcional adicional confiere aumento de la vida media sérica del anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo.
15. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 14, en el que el resto funcional adicional comprende un resto de polietilenglicol (PEG).
- 40 16. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo es expresado por una célula huésped que tiene designación del depósito de ATCC Núm. PTA-6208.
17. Una preparación farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente.
- 45 18. Un anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para usar en medicina.
19. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 18 para usar en el tratamiento del cáncer de un paciente.
- 50 20. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 19, en el que el paciente está diagnosticado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en carcinoma de colon, tumor de mama, mesotelioma, tumor de próstata, carcinoma de células escamosas, sarcoma de

Kaposi, y leucemia.

21. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 19 o reivindicación 20, en el que el anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno del mismo es para la administración sistémica.

5 22. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 19 o reivindicación 20, en el que el anticuerpo aislado es para administración local.

23. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 18 para usar en la inhibición de la angiogénesis en un paciente.

10 24. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 23, en el que el paciente está diagnosticado con degeneración macular.

25. El uso de un anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del mismo que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer en un paciente o tratar la angiogénesis en un paciente.

15 26. El uso que se reivindica en la reivindicación 25, modificado por las características de cualquiera de las reivindicaciones 20-22 y 24.

27. Un hibridoma que produce un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

28. El hibridoma de la reivindicación 27, que tiene designación de depósito de ATCC Núm. PTA-6208.

Figura 1: secuencia y estructura del precursor del receptor de EphB4 humano

1 melrvllcwa slaaaleetl lntkletadl kwvtfpqvdg qweelsglde eqhsvrtyev  
 61 cdvqrapgga hwlrtgwvpr rgavhvyatl rftmleclsl pragrsket ftvfyyesda  
 121 dtataltpaw menpyikvdt vaaehltrkr pgaeatgkvn vktlrlgpls kagfylafqd  
 181 qgacmallsl hlfykkcaql tvnltrfpet vprelvvpva gscvvdavpa pppspglycr  
 241 edgqwaeqpv tgcscapgfe aaegntkera caqgtfkpls gegscqpcpa nshsntigsa  
 301 vcqcrvgyfr artdprgpc tppsaprsv vsrlngsslh lewsaplesg gredltyalr  
 361 crecrpggsc apcggdltfd ppprdlvepw vvrqlrpdf tytfvtafn gvsslatgpv  
 421 pfepvnttd revppavsdv rvtrsspssl slawavprap sgavldyevk yhekgaegps  
 481 svrflkten raelrglkrq asylvqvrar seagyqpfqg ehhsqtqlde segwreqlal  
 541 iagtavvgvv lvlvviwvav lclrkqsngr eaeysdkhgq ylighgkvy idpftyedpn  
 601 eavrefakei ~~advsyndeey lgagefgeve rgrlkapqkk esovaakalk ggytengre~~  
 661 ~~rlseasmgg fchpnrlr gvvtnsmpvm dlteimengal dsflrlndg qftvlgvcm~~  
 721 ~~lgrasgmy laemsyvhd laaralvns mlvckvsdfg lsrleesae dptyssldg~~  
 781 ~~kplrwtapekavabkrtusa sdawsyqym weymadgerp ywmdsnqdy naledgyrlp~~  
 841 ~~ppdcptsln qmldewqkurnarprpsy ysaldkmirn~~ paslkivare nggashplld  
 901 qrqphysafg svgewlraik mgryeesfaa agfgsfelvs qisaedllri gvtlaghqkk  
 961 ilasvqhmks qakpgtpggt ggpapqy

Figura 2: ARNm de EphB4

```

1  ctcgccccgg  cggcgcgagc  agagccactc  cagggagggg  gggagaccgc  gagcgccggg
61  ctcagccccc  gccaccgggg  gcgggacccc  gaggccccgg  agggaccca  actccagcca
121  cgtcttctgt  cgcgccccgc  cggcgcgccc  actgccagca  cgctccgggc  ccgccgcccg
181  cgcgcgcggc  acagacgcgg  ggccacactt  ggcgccggcg  cccgggtgcc  cgcacgctcg
241  catgggcccc  cgctgagggc  cccgacgagg  agtcccgcgc  ggagtatcgg  cgtccaaccg
301  cccagggaga  gtcagacctg  gggggggcag  ggcccccaa  actcagttcg  gatcctacc
361  gagtgagggc  gcgccatgga  gctccgggtg  cacaaaattg  gaaactgctg  atctgaagtg  ggtgacattc
421  ttggaagaga  ccctgctgaa  ccaaaaattg  gaaactgctg  atctgaagtg  ggtgacattc
481  cctcaggtgg  acgggcagtg  ggaggaactg  agcggcctgg  atgaggaaca  gcacagcgtg
541  cgcacctacg  aagtgtgtga  cgtgcagcgt  gccccgggcc  aggccactg  gcttcgcaca
601  ggttgggtcc  cacggcgggg  cgccgtccac  gtgtacgcca  cgctgcgctt  caccatgctc
661  gagtgcctgt  ccctgcctcg  ggctgggccc  tectgcaagg  agacctcac  cgtcttctac
721  tatgagagcg  atgcgacac  ggccacggcc  ctacgcccag  cctggatgga  gaaccctac
781  atcaaggtgg  acacggtggc  cgcggagcat  ctaccggga  agcgcctgg  ggcggagcc
841  accgggaagg  tgaatgtcaa  gacgctgcgt  ctgggaccgc  tcagcaagg  tggcttctac
901  ctggccttcc  aggaccaggg  tgccctgatg  gccctgctat  ccctgcacct  ctctacaaa
961  aagtgcgccc  agctgactgt  gaacctgact  cgattcccgg  agactgtgcc  tcgggagctg
1021  gttgtgcccg  tggccggtag  ctgcgtgggt  gatgccgtcc  ccgcccctgg  ccccagcccc
1081  agcctctact  gccgtgagga  tggccagtg  gccgaacagc  cggtcacggg  ctgcagctgt
1141  gctccggggg  tcgaggcagc  tgaggggaac  accaagtgcc  gagcctgtgc  ccagggcacc
1201  ttcaagcccc  tgtcaggaga  agggctcctg  cagccatgcc  cagccaatag  ccaactaac
1261  accattggat  cagccgtctg  ccagtgcgcg  gtccgggtact  tccgggcaag  cacagacccc
1321  cgggggtcac  cctgcaccac  ccctccttcg  gctccgcgga  gcgtggtttc  ccgctgaac
1381  ggctcctccc  tgcacctgga  atggagtgcc  cccctggagt  ctgggtggcg  agaggacctc
1441  acctagcccc  tccgctgccg  ggagtgcga  cccggaggct  cctgtgcgcc  ctgccccgga
1501  gacctgactt  ttgaccccgg  cccccgggac  ctggtggagc  cctgggtggt  ggttcgaggg
1561  ctacgtcctg  acttcaccta  tacctttgag  gtcactgcat  tgaacggggg  atcctcctta
1621  gccacggggc  ccgtccatt  tgagcctgtc  aatgtacca  ctgaccgaga  ggtacctcct
1681  gcagtgctct  acatccgggt  gaecgggtcc  tcaccagca  gcttgagcct  gcttgagggt
1741  gttccccggg  caccagtgg  ggctccttcg  gactacgagg  tcaaatacca  tgagaagggc
1801  cccgaggggt  ccagcagcgt  gcgggtcctg  aagacgtcag  aaaaccgggc  agagctgagg
1861  gggctgaagc  ggggagccag  ctacctgggt  caggtacggg  cgcgctctga  ggccggctac
1921  gggcccttcg  gccaggaaca  tcacagccag  acccaactgg  atgagagcga  gggctggcgg
1981  gagcagctgg  ccctgattgc  gggcacggca  gtcgtgggtg  tggctcctgg  cctgggtggtc
2041  attgtggctg  cagtctctct  cctcaggaag  cagagcaatg  ggagagaagc  agaataatcg
2101  gacaacacag  gacagtatct  catcggacat  ggtactaagg  tctacatoga  cccttcaact
2161  taatgagacc  tgtgagggaa  tgtgagggaa  tttgcaaaag  agatcgatgt  cctctacgtc
2221  aagattgaag  aggtgattgg  tgcaggtgag  ttggcgagg  tgtgccccgg  gcggtcaag
2281  gccccagggg  agaaggagag  ctgtgtggca  atcaagacc  tgaagggtgg  ctacacggag
2341  cggcagcggc  gtgagtttct  gagegagggc  tccatcatgg  gccagttcga  gcacccaat
2401  atcatccgcc  tggagggcgt  ggtaccaac  agcatgcccg  tcatgattct  cacagagtte
2461  atggagaacg  gcgccttgg  ctocctcctg  cggctaaacg  acggacagtt  cacagtcac
2521  cagctcgtgg  gcatgctcgc  gggcatcgcc  tcgggcatgc  ggtacctgc  cgagatgagc
2581  tacgtccacc  gagacctggc  tgctcgcaac  atcctagtca  acagcaact  cgtctgcaa
2641  gtgtctgact  ttggccttcc  ccgattcctg  gaggagaact  cttccgatcc  cacctacacg
2701  agctccctgg  gaggaaagat  tcccatccga  tggactgcc  cggaggccat  tgcttccgg
2761  aagttcactt  ccgccagtga  tgccctggag  tacgggattg  tgatgtggga  ggtgatgtca
2821  tttggggaga  ggccgtactg  ggacatgagc  aatcaggacg  tgatcaatgc  cattgaacag
2881  gactaccggc  tgccccgcc  cccagactgt  cccacctccc  tccaccagct  catgctggac
2941  tgttggcaga  aagaccggaa  tgccccggcc  cgcttcccc  aggtggtcag  cgccctggac
3001  aagatgatcc  ggaacccccg  cagcctcaaa  atcgtggccc  gggagaatgg  cggggcctca
3061  caccctctcc  tggaccagcg  gcagcctcac  tactcagctt  ttggtctgt  gggcgagtg
3121  cttcgggcca  tcaaaatggg  aagatacgaa  gaaagtctcg  cagccgctgg  ctttggctcc
3181  ttcgagctgg  tcagccagat  ctctgctgag  gacctgctcc  gaatcggagt  cactctggcg
3241  ggacaccaga  agaaaatctt  ggccagtgct  cagcacatga  agtcccaggc  caagocggga
3301  accccgggtg  ggacaggagg  accggccccg  cagtactgac  ctgcaggaac  tcccccccc

```

Fig 2 continuación

```

3361 agggacaccg cctccccatt ttccggggca gagtggggac tcacagagge ccccagccct
3421 gtgccccgct ggattgcact ttgagcccgt ggggtgagga gttggcaatt tggagagaca
3481 ggatttgggg gttctgcat aataggaggg gaaaatcacc cccagccac ctcggggaac
3541 tccagaccaa gggtagggc gccttccct caggactggg tgtgaccaga ggaaaaggaa
3601 gtgccaaca tctcccagcc tcccaggtg ccccctcac cttgatgggt gcgttccgc
3661 agaccaaaaga gagtgtgact cccttgccag ctccagagtg ggggggctgt cccagggggc
3721 aagaaggggt gtcagggccc agtgacaaaa tcattgggggt ttgtagtccc aacttgctgc
3781 tgtcaccacc aaactcaatc atttttttcc cttgtaaatg cccctcccc agctgctgcc
3841 ttcataattga aggttttga gttttgttt ttggtctaat tttctcccc gttccctttt
3901 tgtttcttgc ttttgtttt ctaccgtcct tgtcataact ttgtgttggg gggaacctgt
3961 ttcactatgg cctcctttgc ccaagttgaa acaggggccc atcatcatgt ctgtttccag
4021 aacagtgcct tggatcatccc acatccccgg accccgcctg ggacccccaa gctgtgtcct
4081 atgaaggggt gtggggtgag gtagtaaaa gggcggtagt tgggtggtgga acccagaaac
4141 ggacgccggt gcttggaggg gttcttaaat tatatttaa aaagtaactt tttgtataaa
4201 taaaagaaaa tgggacgtgt cccagctcca ggggt

```

Figura 3: Secuencia de aminoácidos de la proteína B4ECv3 (dominio extracelular de EphB4)

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSG  
LDEEQHSVRTYEVCVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVIYATLRFTM  
LECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTV  
AAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALL  
SLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAPGSP  
SLYCREDGQWAEQPVTGCSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFFKPLSGE  
GSCQPCPANSHTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRS  
VVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGD  
LTFDPGPRDLVEPWVVRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPVPE  
PVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK  
YHEKGAEGPSSVRFLKTSNRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGP  
FGQEHHSQTQLDESEGWREQSKRAILQIEGKPIPNPLLGLDSTRTG  
HHHHHH

Figura 4: Secuencia de aminoácidos de la proteína B4ECv3NT (dominio extracelular de EphB4)

MELRVLLCWASLAAALEETLLNFKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSG  
LDEEQHSVRTYEVCEVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVIATLRFTM  
LECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTV  
AAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAFAQDQGACMALL  
SLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAPGSP  
SLYCREDGQWAEQPVTGCSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGTFKPLSGE  
GSCQPCPANSNTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRS  
VVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGD  
LTFDPGPRDLVEPWVVVRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPVPFE  
PVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPRAPSGAWLDYEVK  
YHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGP  
FGQEHHSQTQLDESEGWREQGSKRAILQISSTVAAARV

Figura 5: Sumario de topología de EphB4 y sitio de unión del anticuerpo

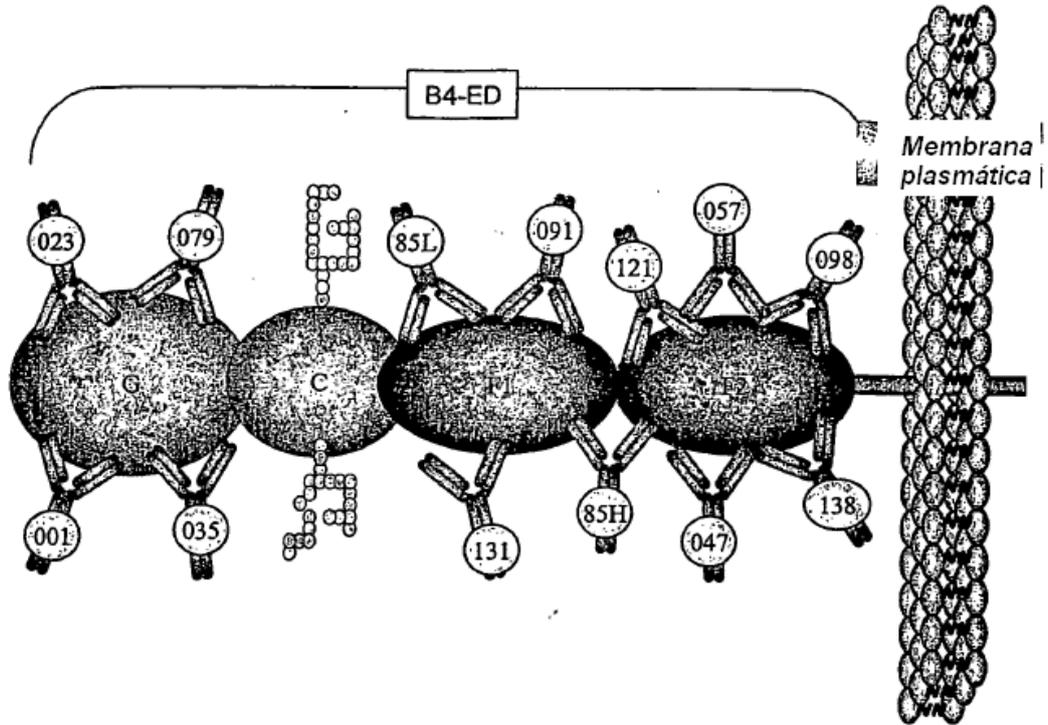


Fig 6A

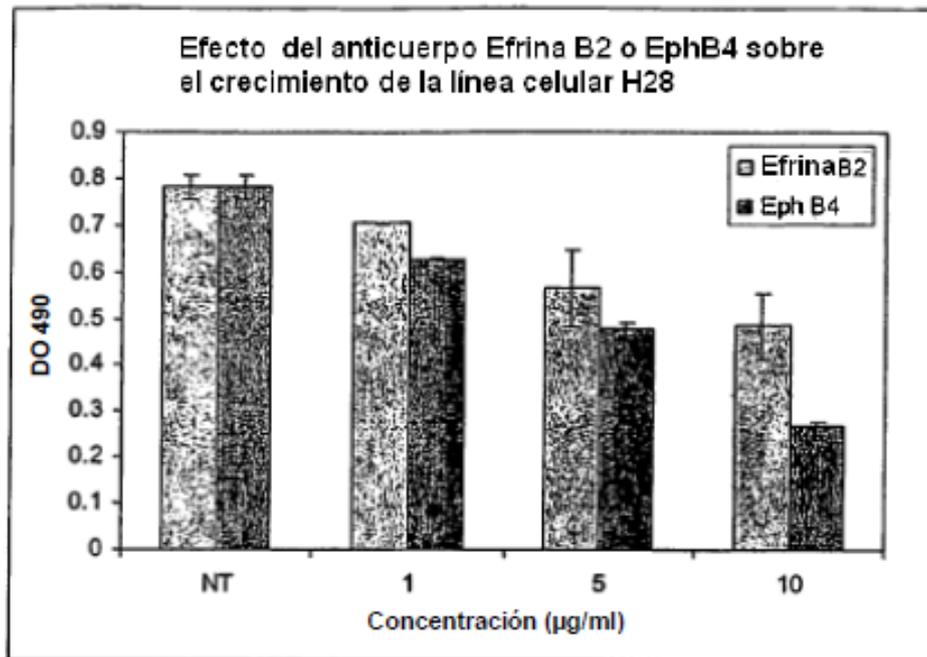


Fig 6B

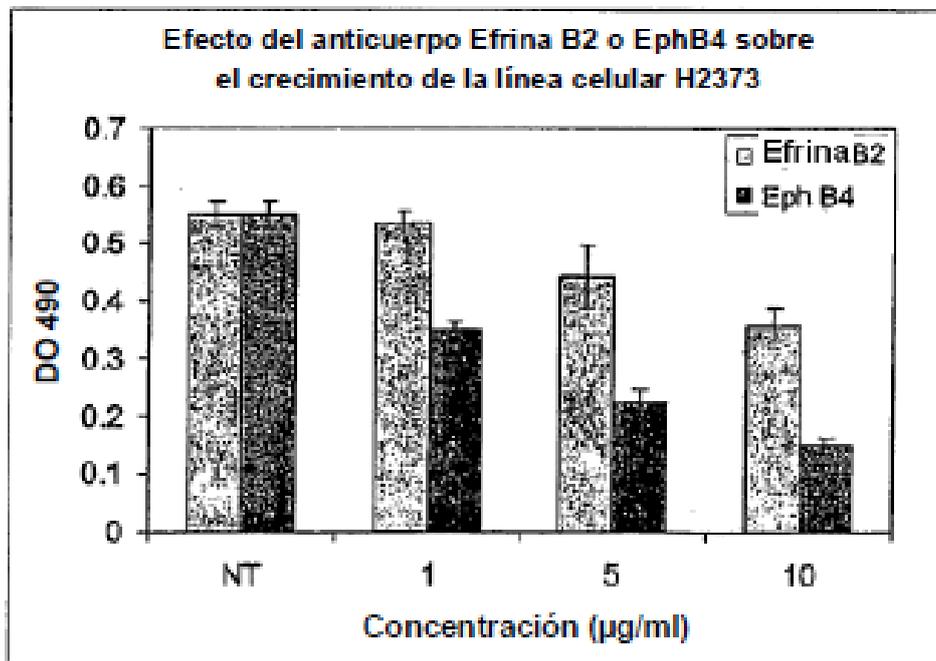


Figura 6c

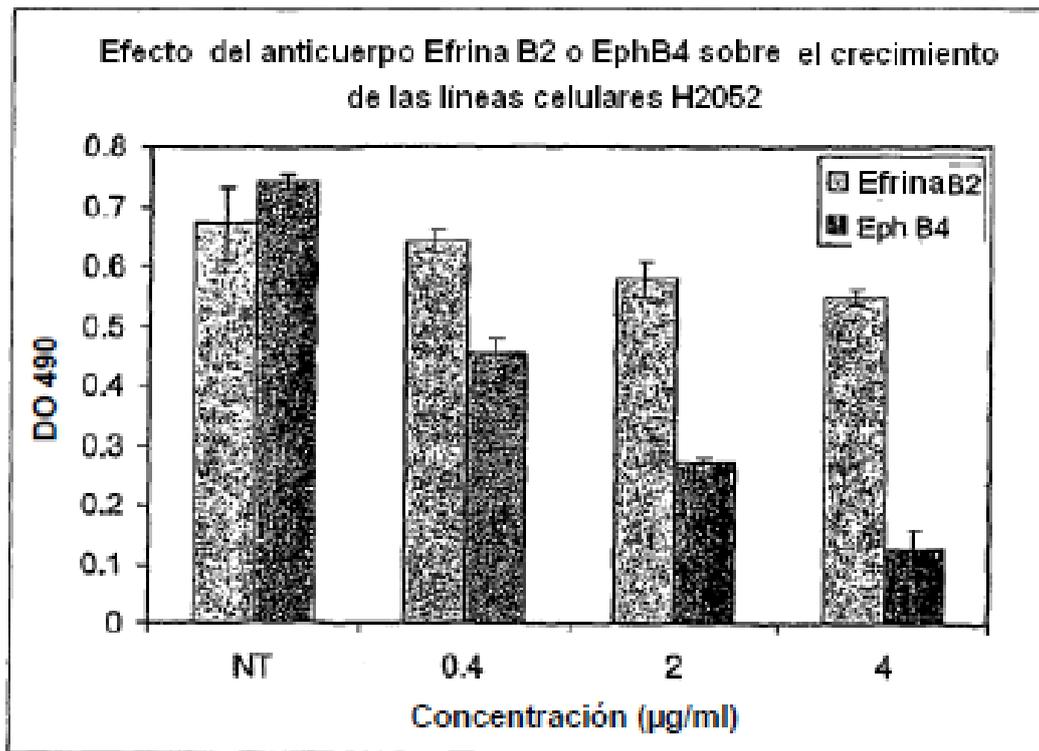


Figura 7

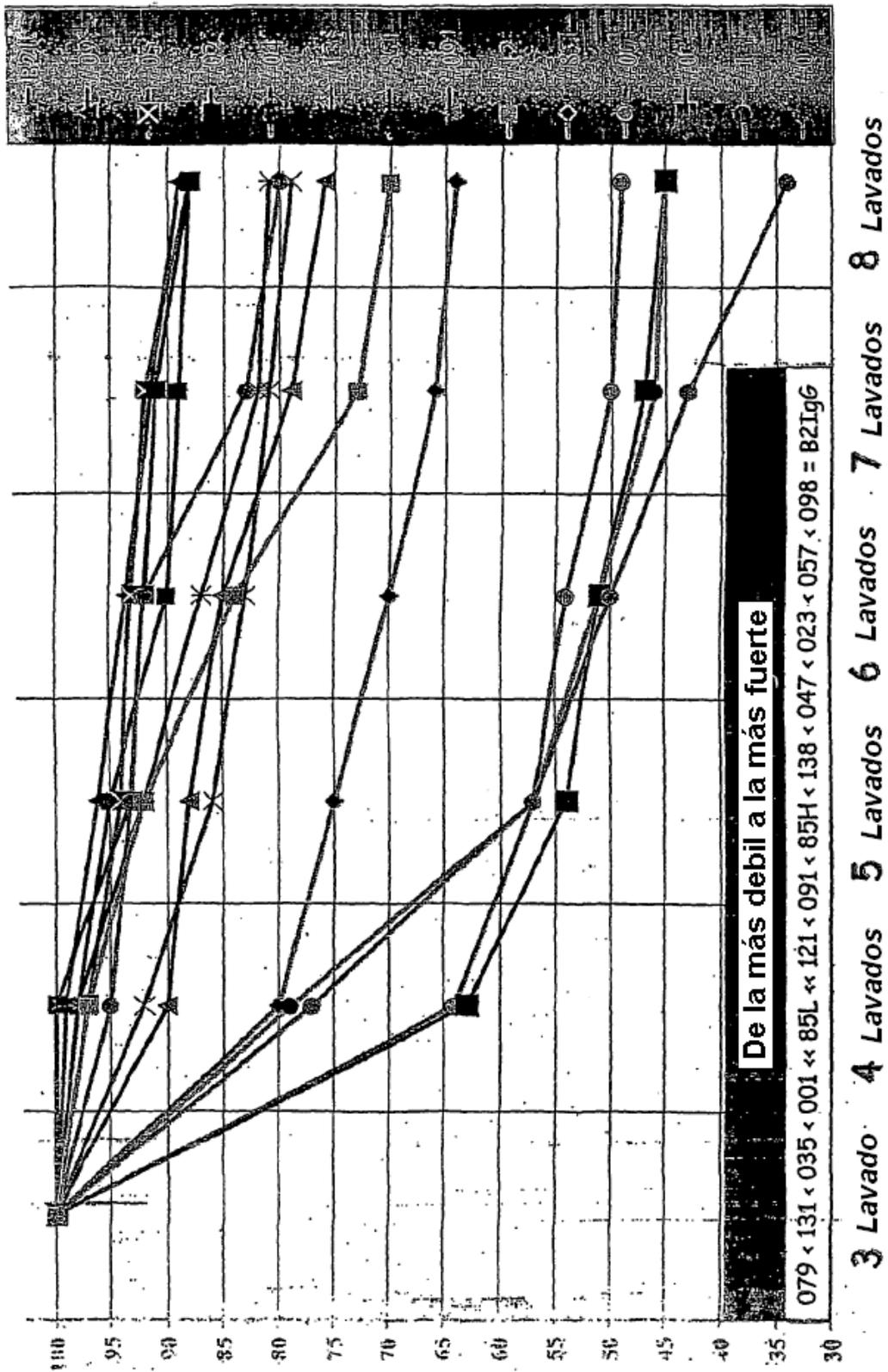


Fig 8

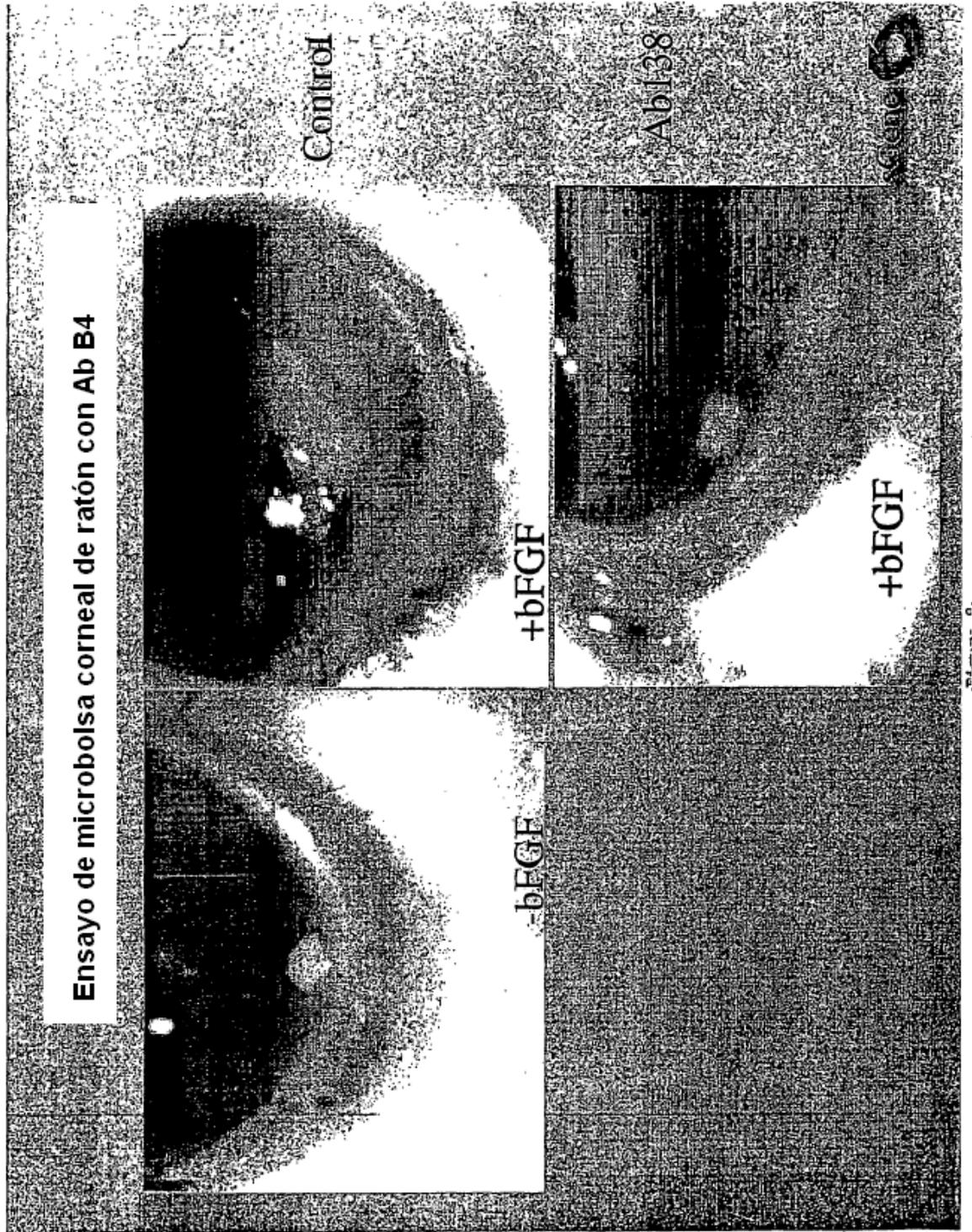


Fig 9: Regresión del tumor de xenoinjerto de SCC15/MG

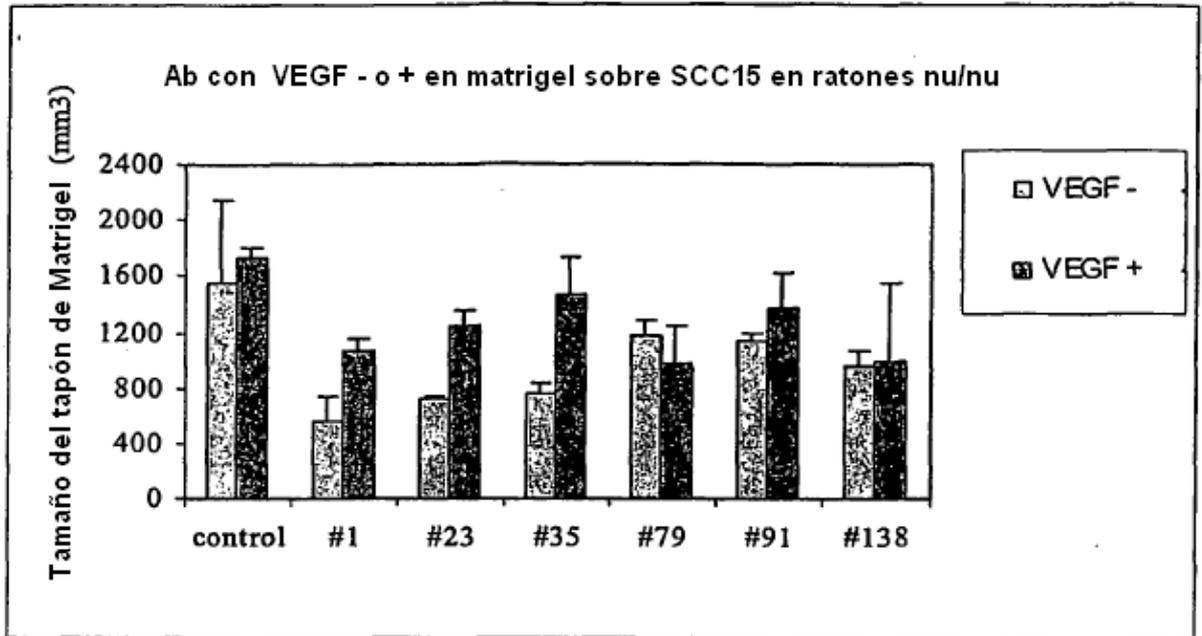


Figura 10: Efecto de anticuerpos B4 sobre la histología del tumor SCC15

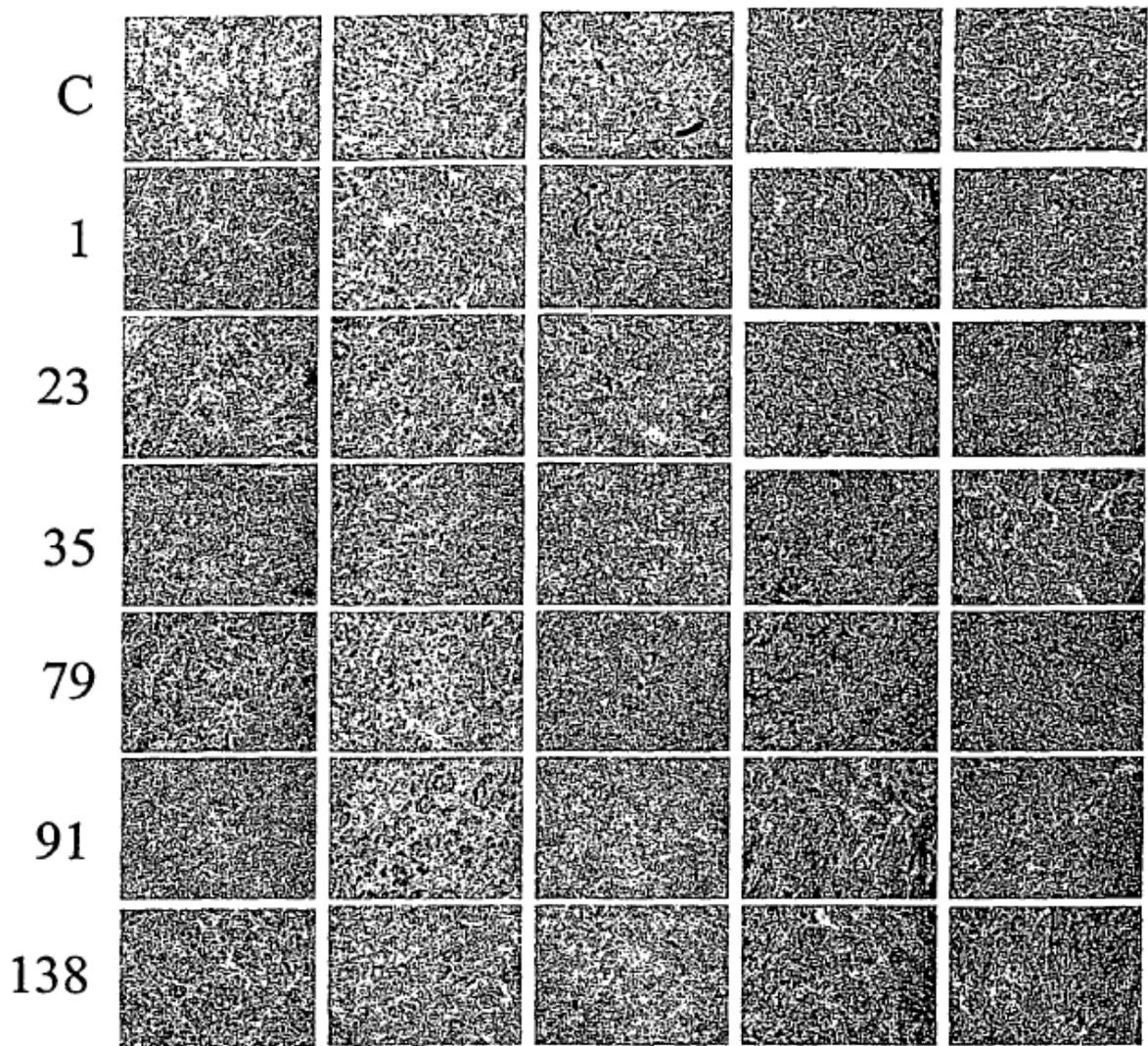


Fig 11: Regresión del tumor de xenoinjerto tratado con Ab SCC15/IP,SC B4

