

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 720**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)	A61P 35/04	(2006.01)
C12N 15/12	(2006.01)	A61K 31/00	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)	C07K 16/28	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)	A61K 47/48	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)	C12N 15/13	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)	C12N 5/20	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	G01N 33/577	(2006.01)
C12P 21/08	(2006.01)	G01N 33/68	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03784738 .1**
- 96 Fecha de presentación: **12.05.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1575509**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **ANTICUERPOS MONOCLONALES AGONÍSTICOS EPHA2 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:

- 10.05.2002 US 379368 P
- 14.10.2002 US 418204 P
- 03.04.2003 US 460358 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

30.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

30.03.2012

73 Titular/es:

**Purdue Research Foundation
1291 Cumberland Avenue
West Lafayette, IN 47906, US y
MedImmune, LLC**

72 Inventor/es:

KINCH, Michael, S.;
CARLES-KINCH, Kelly y
STEWART, Jane, C.

74 Agente/Representante:

BALLESTER CAÑIZARES, ROSALÍA

ES 2 377 720 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

1. CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención hace referencia a los métodos y composiciones diseñados para el tratamiento, gestión o prevención del cáncer. Los métodos de invención incluyen la administración de una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos específicos EphA2, preferiblemente anticuerpos monoclonales, que son agonistas de EphA2 y que preferentemente se unen a los epítomos de EphA2 que se exponen o crecen selectivamente en las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que se componen de uno o más de los anticuerpos monoclonales de la invención, bien solos o en combinación con uno o más de los otros agentes útiles/beneficiosos para la terapia de cáncer. Se proporcionan asimismo los métodos de diagnóstico y los métodos de cribado para los anticuerpos anti-EphA2 terapéuticamente útiles/beneficiosos.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION**Cáncer**

[0002] Un neoplasma, o un tumor, es una masa neoplásica producida por el crecimiento anormal e incontrolado de las células, la cual puede ser benigna o maligna. Los tumores benignos generalmente permanecen localizados. Los tumores malignos se denominan colectivamente cánceres. El término "maligno" generalmente significa que el tumor puede invadir y destruir las estructuras corporales vecinas y dispersarse a sitios distantes hasta causar la muerte (para revisión, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122). El cáncer puede aparecer en muchas partes de cuerpo y comportarse de manera distinta dependiendo de su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del cuerpo en el que se originan y después se extienden a otra(s) parte(s) del cuerpo donde comienzan a crecer de nuevo y causan más destrucción.

[0003] Más de un 1,2 millones de americanos desarrollan un cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa de muerte en los Estados Unidos y, si la tendencia actual continúa, se espera que el cáncer se convierta en la primera causa de muerte en 2010. El cáncer de pulmón y el de próstata son los que causan un mayor número de muertes entre los hombres en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón y el de mama son los que causan un mayor número de muertes entre las mujeres en los Estados Unidos. A uno de cada dos hombres en los Estados Unidos se le diagnosticará cáncer en algún momento de su vida. A una de cada tres mujeres en los Estados Unidos se le diagnosticará cáncer en algún momento de su vida.

[0004] Todavía no se ha encontrado ninguna cura para el cáncer. Las opciones de tratamiento que existen actualmente, tales como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, son en la mayoría de los casos ineficaces o presentan graves efectos secundarios.

Metástasis

[0005] Las formas de cáncer que ponen en mayor riesgo la vida a menudo aparecen cuando una población de células tumorales adquiere la capacidad de colonizar partes del cuerpo distantes y extrañas. Dichas células metastásicas sobreviven anulando las restricciones que normalmente limitan la colonización de las células en tejidos diferentes. Por ejemplo, las células epiteliales mamarias características generalmente no crecerán ni sobrevivirán si se transplantan al pulmón, pero las metástasis pulmonares siguen siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el cáncer de mama. Datos recientes demuestran que se puede producir la diseminación de células metastásicas en el organismo de forma prolongada/durante mucho tiempo antes de la presentación clínica del tumor primario. Estas células micrometastásicas pueden permanecer inactivas durante muchos meses o incluso años tras la detección y extirpación del tumor primario. Por lo tanto, es muy importante lograr un mejor entendimiento de los mecanismos que permiten el crecimiento y supervivencia de las células metastásicas en un microentorno extraño para el perfeccionamiento de los terapéuticos diseñados para combatir el cáncer metastásico y el perfeccionamiento de los diagnósticos para una pronta detección y localización de la metástasis.

Señalización de células cancerosas

[0006] El cáncer es una enfermedad de transducción de señales anormales. La señalización de células anormales anula las limitaciones dependientes de sujeción en el crecimiento y supervivencia de las células (Rhim, et al., *Critical Reviews in Oncogenesis* 8:305, 1997; Patarca, *Critical Reviews in Oncogenesis* 7:343, 1996; Malik, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1287:73, 1996; Cance, et al., *Breast Cancer Res Treat* 35:105, 1995). La actividad de la tirosina quinasa es inducida por la sujeción ECM; además, la expresión o función de la tirosina quinasa es normalmente mayor en las células malignas (Rhim, et al., *Critical Reviews in Oncogenesis* 8:305,1997; Cance, et al., *Breast Cancer Res Treat* 35:105, 1995; Hunter, *Cell* 88:333, 1997). Basándose en los datos que muestran que la actividad de la tirosina quinasa es necesaria para el crecimiento de las células malignas, se ha empleado la tirosina quinasa con nuevos terapéuticos (Levitzi, et al., *Science* 267:1782, 1995; Kondapaka, et al., *Molecular & Cellular Endocrinology* 117:53, 1996; Fry, et al., *Current Opinion in BioTechnology* 6: 662, 1995). Desafortunadamente, obstáculos asociados con blancos específicos para las células tumorales a menudo limitan la aplicación de estos fármacos. En particular, la actividad de la tirosina quinasa es a menudo esencial para el funcionamiento y la supervivencia de los tejidos benignos (Levitzi, et al., *Science*

267:1782, 1995). A fin de de minimizar la toxicidad colateral, es fundamental identificar y focalizar la tirosina quinasa que esté selectivamente sobreexpuesta en las células tumorales.

EphA2

[0007] El EphA2 es un receptor 130 kDa de la tirosina quinasa que se manifiesta en epitelios adultos, donde se encuentra a niveles bajos y se enriquece en los lugares de adhesión de célula-célula (Zantek, et al, *Cell Growth & Differentiation* 10:629, 1999; Lindberg, et al., *Molecular & Cellular Biology* 10: 6316, 1990). Esta localización subcelular es importante porque el EphA2 se une a los ligandos (conocidos como Efrinas de la A1 a A5) que están sujetos a la membrana celular (Eph Nomenclature Committee, 1997, *Cell* 90:403; Gale, et al., 1997, *Cell & Tissue Research* 290: 227). La principal consecuencia de la unión de los ligandos es la autofosforilación del EphA2 (Lindberg, et al., 1990, *supra*). Sin embargo, a diferencia de otros receptores de tirosinas quinasas, el EphA2 retiene la actividad enzimática a falta de la unión de los ligandos o del contenido de fosfotirosina (Zantek, et al., 1999, *supra*). El EphA2 se ve aumentado en un gran número de células agresivas de carcinoma.

Terapias oncológicas

[0008] Una barrera al desarrollo de los agentes antimetastásicos han sido los sistemas de ensayo que se usan para diseñar y evaluar estos fármacos. La mayoría de las terapias oncológicas convencionales alcanzan rápidamente las células en crecimiento. Sin embargo, las células cancerosas no crecen necesariamente de manera más rápida sino que sobreviven y crecen en condiciones que son no permisivas para las células normales (Lawrence and Steeg, 1996, *World J. Urol.* 14:124-130). Estas diferencias fundamentales entre los comportamientos de las células normales y de las células malignas ofrecen/brindan oportunidades para el blanco terapéutico. El paradigma de que los tumores micrometastásicos ya se han diseminado por todo el cuerpo resalta la necesidad de evaluar/valorar los fármacos quimioterapéuticos potenciales en el contexto de un microentorno extraño y tridimensional. Muchos ensayos de fármacos estándares contra el cáncer miden el crecimiento o la supervivencia de las células tumorales bajo condiciones de cultivo de células características (es decir, un crecimiento monocapa). Sin embargo, el comportamiento de las células en ensayos bidimensionales a menudo no predicen de manera fidedigna el comportamiento de las células tumorales *in vivo*.

[0009] Comúnmente, la terapia oncológica puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o radioterapia a fin de extirpar las células neoplásicas en un paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management," in *Scientific American: Medicine*, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Chapter 12, Section IV). Últimamente, la terapia oncológica puede implicar también terapia biológica o inmunoterapia. Todas estas propuestas pueden plantear inconvenientes significativos para el paciente. La cirugía, por ejemplo, puede estar contraindicada debido a la salud del paciente o puede ser inaceptable para éste. Además, la cirugía puede no eliminar por completo el tejido neoplásico. La radioterapia sólo es efectiva cuando el tejido neoplásico muestra una sensibilidad a la radiación más alta que el tejido normal, y la radioterapia también puede a menudo provocar efectos secundarios graves. La terapia hormonal rara vez se da como un agente único y, aunque puede resultar efectiva, se utiliza a menudo para prevenir o retrasar la reaparición del cáncer después de que otros tratamientos hayan eliminado la mayoría de las células cancerosas. Las terapias biológicas/inmunoterapias están limitadas en número y cada terapia resulta por lo general efectiva para un tipo de cáncer muy específico.

[0010] En cuanto a la quimioterapia, existe una variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para el tratamiento del cáncer. Una mayoría importante de los quimioterapéuticos del cáncer actúan inhibiendo la síntesis del ADN, bien directa o indirectamente inhibiendo la biosíntesis de los precursores del trifosfato desoxirribonucleótido, para prevenir la replicación del ADN y la división celular concomitante (véase, por ejemplo, Gilman et al., *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Eighth Ed. (Pergamom Press, New York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como la nitrosourea; los antimetabolitos, tales como el metotrexato y la hidroxiurea, y otros agentes, tales como los etopósidos, las camptotecinas, la bleomicina, la doxorubicina, la daunorrubicina, etc., aunque no necesariamente específicos del ciclo celular, destruyen las células durante la fase S debido a su efecto en la replicación del ADN. Otros agentes, sobre todo la colchicina y los alcaloides de la vinca, tales como la vinblastina y la vincristina, obstaculizan el ensamblaje microtubular que resulta en arresto mitótico. Los protocolos de la quimioterapia generalmente implican la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos para aumentar la eficacia del tratamiento.

[0011] A pesar de la disponibilidad de una variedad de agentes quimioterapéuticos, la quimioterapia conlleva muchos inconvenientes (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" in *Scientific American Medicine*, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., ch. 12, sect. 10). Casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos, y la quimioterapia causa importantes y a menudo graves efectos secundarios, que incluyen náuseas, depresión de la médula ósea, inmunosupresiones, etc. Adicionalmente, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan una resistencia a los agentes quimioterapéuticos. De hecho, estas células resistentes a los agentes quimioterapéuticos específicos utilizados en el protocolo de tratamiento a menudo demuestran ser resistentes a otros fármacos, incluso aquellos agentes que actúan mediante mecanismos diferentes de los mecanismos de acción de los fármacos empleados en el tratamiento específico; este fenómeno se denomina resistencia al multifármaco o al fármaco pleitrópico. Así, debido a la resistencia al fármaco, muchos cánceres se muestran resistentes a los protocolos de tratamiento quimioterapéutico estándares.

[0012] Existe una necesidad importante de tratamientos oncológicos alternativos, particularmente para el tratamiento de aquel cáncer que ha demostrado ser resistente a los tratamientos oncológicos estándares, tales como la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia hormonal. Además, es extraño que el cáncer se trate con un único método. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos agentes terapéuticos y nuevas combinaciones de terapias que resulten más efectivas para el tratamiento del cáncer. La patente WOO1/12172 describe el tratamiento oncológico que utiliza los anticuerpos agonísticos anti-EphA2.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] El EphA2 está sobreexpresado y funcionalmente alterado en un gran número de carcinomas malignos. El EphA2 es una oncoproteína y es suficiente para conferir el potencial metastásico a las células cancerosas. El EphA2 que está sobreexpresado en las células malignas muestra la actividad quinasa independiente de la unión a los ligandos. Los presentes inventores han descubierto que una disminución de los niveles de EphA2 reduce el comportamiento metastásico de una célula. En particular, los inventores de la presente invención han descubierto que, sorprendentemente, los anticuerpos que agonizan al EphA2, es decir, que obtienen la señalización del EphA2, de hecho disminuye la expresión del EphA2 e inhibe el crecimiento de las células tumorales y/o las metástasis. Aunque no teniendo la intención de estar unido mediante ningún mecanismo de acción, los anticuerpos agonísticos pueden reprimir el comportamiento de las células malignas induciendo la autofosforilación del EphA2, y por tanto causar la posterior degradación del EphA2 para regular a la baja la expresión. De este modo, los anticuerpos EphA2 de la invención agonizan a la señalización del EphA2 y aumentan la fosforilación del EphA2 ("anticuerpos agonísticos EphA2").

[0014] Las diferencias en la localización subcelular, las propiedades de unión a los ligandos o la organización de las proteínas (por ejemplo, la estructura, la orientación en la membrana celular) pueden además diferenciar el EphA2 que está presente en las células cancerosas del EphA2 que está en las células no cancerosas. En las células no cancerosas, el EphA2 se expresa a niveles bajos y se localiza en lugares de contacto célula-célula, donde pueden relacionarse con sus ligandos sujetos a la membrana. Sin embargo, las células cancerosas generalmente presentan reducidos contactos de célula-célula y esto puede disminuir la unión del EphA2-ligando. Además, la sobreexpresión del EphA2 puede causar un excedente de EphA2 en comparación con el ligando que aumenta la cantidad de no ligando unido al EphA2. Consecuentemente, los cambios en la distribución subcelular o en la orientación de la membrana del EphA2 puede provocar que el EphA2 se localice en lugares de una célula cancerosa donde es inaccesible al ligando. Adicionalmente, el EphA2 puede haber alterado las propiedades de unión al ligando (por ejemplo, debido a una conformación alterada) en las células cancerosas que es incapaz de establecer las interacciones estables con su ligando tanto si está como si no localizado en la unión célula-célula. En cada caso, estos cambios pueden mostrar determinados epítopos en el EphA2 en las células cancerosas que no están expuestas en las células no cancerosas. En consecuencia, la invención también proporciona los anticuerpos que se unen específicamente al EphA2 pero preferiblemente se unen a un epítipo del EphA2 expuesto en células cancerosas pero no en células no cancerosas ("anticuerpos de un epítipo del EphA2 expuestos"). El exponer las células cancerosas a tales anticuerpos EphA2 que preferencialmente se unen a los epítopos en EphA2 que selectivamente se exponen o crecen en células cancerosas pero no en células no cancerosas hace que se dirija al anticuerpo terapéutico/profiláctico hacia las células cancerosas y prevenga o disminuya la capacidad de las células de proliferar mientras respeta a las células no cancerosas.

[0015] La presente invención proporciona la detección y la identificación de los anticuerpos que se unen y agonizan al EphA2 y preferencialmente se unen a los epítopos en EphA2 que selectivamente se exponen o crecen en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas, preferiblemente anticuerpos monoclonales. En particular, los anticuerpos de la invención se unen al dominio extracelular del EphA2 y, preferiblemente, obtienen la señalización del EphA2 y la fosforilación del EphA2. En otra realización particular, los anticuerpos de la invención se unen al dominio extracelular del EphA2 y, preferiblemente, se unen al epítipo del EphA2 expuesto en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas.

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son humanos o humanizados.

[0016] A fin de identificar los anticuerpos que preferencialmente se unen a un epítipo de EphA2 expuesto en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas, se puede examinar la capacidad de los anticuerpos para unirse al EphA2 no ligado al ligando, por ejemplo, la Efrina A1, y que no está localizada en los contactos de célula-célula. Se puede emplear cualquier método conocido en el campo para determinar la unión/localización de los anticuerpos en una célula para examinar los anticuerpos candidatos para las propiedades de unión convenientes. En una realización específica, se usa el microscopio de inmunofluorescencia o la citometría de flujo para determinar las características de unión de un anticuerpo. En esta realización, los anticuerpos que se unen insuficientemente al EphA2 cuando se une a su ligando y se localiza en los contactos de célula-célula pero se unen correctamente al EphA2 libre en una célula son englobados por esta invención. En otra realización específica, se seleccionan los anticuerpos EphA2 por su capacidad para competir con los ligandos (por ejemplo, ligandos sujetos a la célula o los purificados) para unirse al EphA2 usando ensayos basados en células o ensayos ELISA.

[0017] Los anticuerpos de la invención pueden ser humanos o humanizados.

[0018] En consecuencia, la presente invención hace referencia a las composiciones farmacéuticas y a los regímenes profilácticos y terapéuticos diseñados para prevenir, tratar, o gestionar el cáncer, particularmente el cáncer metastásico,

- en un sujeto que comprende la administración de uno o más anticuerpos que específicamente se unen y agonizan al EphA2 y preferencialmente se unen a los epítomos del EphA2 que selectivamente se exponen o crecen en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas. En una realización, el cáncer es de origen celular epitelial. En otra realización, el cáncer es un cáncer de piel, pulmón, colon, mama, próstata, vejiga, riñón o páncreas. En otra realización, las células cancerosas en el cáncer para ser prevenidas, tratadas o gestionadas sobreexpresan el EphA2. En una realización preferida, algunos EphA2 no están unidos al ligando, bien como consecuencia de los reducidos contactos de célula-célula, de la localización subcelular alterada, o el aumento en cantidad del EphA2 en comparación con el ligando. En una realización preferida, los métodos de la invención se usan para prevenir, tratar o gestionar las metástasis de los tumores. Los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una o más de las otras terapias oncológicas. En particular, la presente invención proporciona los anticuerpos para prevenir, tratar o gestionar el cáncer en un sujeto al que se le puede administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de uno o más de los anticuerpos EphA2 de la invención en combinación con la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una o más quimioterapias, terapias hormonales, terapias biológicas/inmunoterapias y/o radioterapias además de la administración de un anticuerpo EphA2 de la invención o en combinación con la cirugía.
- 15 **[0019]** Las composiciones de la invención son útiles/beneficiosas no sólo en pacientes no tratados sino también en el tratamiento de pacientes resistentes parcial o totalmente a las terapias oncológicas experimentales y estándares que incluyen, aunque no de forma excluyente las quimioterapias, las terapias hormonales, las terapias biológicas, las radioterapias, y/o la cirugía así como en la mejora de la eficacia de dichos tratamientos. En consecuencia, en una realización preferida, la invención proporciona los anticuerpos terapéuticos y profilácticos para el tratamiento o la
- 20 prevención del cáncer que han demostrado ser o que pueden ser resistentes o no receptivos a las terapias aparte de las que comprenden la administración de los anticuerpos EphA2 de la invención. En una realización específica, se administran uno o más de los anticuerpos EphA2 de la invención a un paciente resistente o no receptivo a un tratamiento no basado en EphA2 para ofrecer al paciente no resistente o receptivo. El tratamiento al que el paciente ha demostrado ser resistente anteriormente puede entonces administrarse con efecto terapéutico.
- 25 **[0020]** Además, la presente invención proporciona métodos de cribado para los anticuerpos EphA2 de la invención. En particular, los anticuerpos se pueden cribar al unirlos al EphA2, en particular al dominio extracelular del EphA2, usando técnicas inmunológicas rutinarias. En una realización, a fin de identificar los anticuerpos EphA2 agonísticos, se pueden cribar los anticuerpos EphA2 para obtener la señalización del EphA2, es decir, para aumentar la fosforilación del EphA2.
- [0021]** En otra realización, a fin de identificar los anticuerpos que preferencialmente se unen a un epítomo del EphA2
- 30 expuesto en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas, se pueden cribar los anticuerpos para unirse preferencialmente al EphA2 que no está unido al ligando, por ejemplo, la Efrina A1, y que no está localizado en los contactos de célula-célula. Se puede usar cualquier método conocido en el campo para determinar el anticuerpo de unión/localización en una célula para examinar los anticuerpos candidatos para las propiedades de unión convenientes. En una realización específica, se usa el microscopio de inmunofluorescencia o la citometría de flujo para determinar las
- 35 características de unión de un anticuerpo. En esta realización, los anticuerpos que se unen insuficientemente al EphA2 cuando se une a su ligando y que se localiza en los contactos de célula-célula pero que se unen correctamente al EphA2 libre en una célula son englobados por la invención. En otra realización específica, los anticuerpos EphA2 se seleccionan para competir con los ligandos (por ejemplo, los ligandos sujetos a las células o los purificados) para unirse al EphA2 usando ensayos basados en células o ensayos ELISA.
- 40 **[0022]** La invención proporciona asimismo los métodos de diagnóstico que usan los anticuerpos EphA2 de la invención para evaluar la eficacia del tratamiento oncológico, basado o no en el EphA2. En general, la expresión aumentada del EphA2 se asocia cada vez más con los cánceres metastásicos invasivos. Por lo tanto, una reducción en la expresión del EphA2 con un tratamiento particular indica que el tratamiento está reduciendo la capacidad invasora y/o potencial metastásico del cáncer. En realizaciones particulares, los métodos de diagnóstico de la invención proporcionan métodos
- 45 de diagnóstico por imágenes y de localización de metástasis y métodos de diagnóstico y pronóstico que usan tejidos y fluidos distales del lugar del tumor primario (así como métodos que usan tejidos y fluidos del tumor primario), por ejemplo, aspirados con aguja de fina de sangre total, esputo, orina y suero (es decir, las biopsias). En otras realizaciones, los métodos de diagnóstico de la invención proporcionan métodos de diagnóstico por imágenes y de localización de metástasis y métodos de diagnóstico y pronóstico *in vivo*. En tales realizaciones, los tumores
- 50 metastásicos primarios se detectan usando un anticuerpo de la invención, preferiblemente un anticuerpo del epítomo del EphA2 expuesto. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para análisis inmunohistoquímicos de células congeladas o fijas o ensayos de tejidos.
- [0023]** En otra realización, se proporcionan los *kits* que se componen de composiciones farmacéuticas o reagentes de diagnóstico de la invención.

55 **3.1 DEFINICIONES**

- [0024]** Tal y como se emplea aquí, el término "agonista" hace referencia a un anticuerpo, o a un fragmento de anticuerpo, que aumenta la actividad, la activación o la función de otra molécula. Los EphA2 agonistas provocan el aumento de la fosforilación y pueden provocar la degradación de la proteína EphA2. Los anticuerpos EphA2 que agonizan a los EphA2 pueden o no preferencialmente unirse al epítomo del EphA2 que está expuesto en una célula cancerosa en comparación con una célula no cancerosa.

[0025] El término "anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente al EphA2" tal y como se emplea aquí hace referencia a los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un polipéptido de EphA2 o a un fragmento de polipéptido de EphA2 y que no se unen específicamente a otros polipéptidos de EphA2. Preferiblemente, los anticuerpos o los fragmentos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 o a un fragmento del mismo no reaccionan de manera cruzada con otros antígenos (por ejemplo, las uniones no pueden competir con una proteína no EphA2, por ejemplo, BSA en un inmunoensayo adecuado). Los anticuerpos o los fragmentos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 se puede identificar, por ejemplo, mediante los inmunoensayos u otras técnicas conocidos por los expertos en el campo. Los anticuerpos de la invención incluyen, aunque no de forma excluyente, los anticuerpos monoclonales sintéticos, los anticuerpos multiespecíficos (que incluyen los anticuerpos biespecíficos), los anticuerpos humanos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos sintéticos, los Fvs de cadena única (scFv) (que incluyen los scFvs biespecíficos), los anticuerpos de cadena única, los fragmentos Fab, los fragmentos F(ab'), los Fvs disulfidos unidos (sdFv), y los anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), y los fragmentos de unión de epítomos de cualquiera de los arriba mencionados. En particular, los anticuerpos de la presente invención incluyen moléculas inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas inmunoglobulinas, es decir, de moléculas que contienen un antígeno que se unen al lugar que inmunoespecíficamente se une a un antígeno EphA2 (por ejemplo, una o más de las regiones que determinan la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo anti-EphA2). Preferiblemente, los anticuerpos agonísticos o los fragmentos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 o al fragmento del mismo sólo agonizan al EphA2 y no agonizan significativamente a otras actividades.

[0026] Tal y como se emplea aquí, el término "cáncer" hace referencia a una enfermedad que implica que las células que tienen el potencial para originar metástasis hacia partes distales del cuerpo y mostrar las características fenotípicas que difieren de aquellas células cancerosas, por ejemplo, la formación de colonias en un sustrato tridimensional como el agar blando o la formación de redes tubulares o matrices de tela de araña en una membrana basal tridimensional o la preparación de una matriz extracelular, como MATRIGEL™. Las células no cancerosas no forman colonias en un agar blando y forman estructuras en forma de esfera inconfundibles en una membrana basal tridimensional o preparaciones de matriz extracelular. Las células cancerosas adquieren un conjunto característico de habilidades funcionales durante su desarrollo, aunque por medio de varios mecanismos. Dichas habilidades incluyen la inhibición de apoptosis, la autonomía en señales de crecimiento, la insensibilidad a señales anticrecimiento, la metástasis/ invasión de tejidos, el potencial replicativo ilimitado, y la angiogénesis continua. El término "célula cancerosa" está diseñado para englobar tanto a las células cancerosas premalignas como a las malignas.

[0027] El término "derivado" tal y como se emplea aquí hace referencia a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2, o un fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 que ha sido alterado mediante la introducción de sustituciones de residuos de aminoácidos, deleciones o adiciones (es decir, mutaciones). En algunas realizaciones, un derivado de anticuerpo o un fragmento del mismo comprende sustituciones de residuos de aminoácidos, deleciones o adiciones en una o más de las CDRs. El derivado de anticuerpo puede tener sustancialmente la misma unión, una unión mejor o una unión peor al compararlo con un anticuerpo no derivado. En realizaciones específicas, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos de la CDR han sido sustituidos, suprimidos o añadidos (es decir, mutados). El término "derivado" tal como se emplea aquí también hace referencia a un polipéptido de EphA2, a un fragmento de un polipéptido de EphA, a un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2, o a un fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2 que ha sido modificado, es decir, por medio de los acoplamientos covalentes de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, aunque no de forma excluyente, un polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo puede ser modificado, es decir, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo, clivaje proteolítico, enlace a un ligando celular o a otra proteína, etc. Un derivado de un polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo puede modificarse mediante las modificaciones químicas que usan las técnicas conocidas por los expertos en el campo, que incluyen, aunque no de forma excluyente, el clivaje químico específico, la acetilación, la formilación, la síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. En una realización, un derivado de polipéptido posee una función similar o idéntica a la de un polipéptido de EphA2, a la de un fragmento de un polipéptido de EphA2, a la de un anticuerpo, o a la de un fragmento de anticuerpo aquí descrito. En otra realización, un derivado de polipéptido de EphA2, un fragmento de un polipéptido de EphA2, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo tiene una actividad alterada cuando se compara con un polipéptido inalterado. Por ejemplo, un anticuerpo de derivado o un fragmento del mismo puede unirse a su epítomo más fuertemente o ser más resistente a la proteólisis.

[0028] El término "epítomos" tal y como se emplea aquí hace referencia a una porción de un polipéptido de EphA2 que tiene una actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y más preferiblemente en un ratón o en un humano. Un epítomo que tiene actividad inmunogénica es una porción de polipéptido de EphA2 a la que un anticuerpo se le une inmunoespecíficamente como se determina por cualquier método conocido en el campo, por ejemplo, por medio de inmunoensayos. Los epítomos antigénicos no requieren ser necesariamente inmunogénicos.

[0029] Los "fragmentos" aquí descritos incluyen un péptido o un polipéptido que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, de

- al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o de al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de EphA2 o de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de unión de epítomos.
- 10 **[0030]** Tal y como se emplea aquí, el término "anticuerpo humanizado" hace referencia a las formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de ratón) que son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En la mayoría de los casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo recipiente) en las que los residuos de la región hipervariable del recipiente son sustituidos por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como el ratón, la rata, el conejo o los primates
- 15 no humanos que tienen la especificación, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los residuos de no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo recipiente ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen a fin de perfeccionar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá de manera sustancial todo lo de al menos un, o lo de dos, dominios variables, en
- 20 los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana, que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de EphA2, que ha sido alterado mediante la introducción de sustituciones de residuos de aminoácidos,
- 25 delecciones o adiciones (es decir, mutaciones). En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es un derivado. Tal anticuerpo humanizado comprende sustituciones de residuos de aminoácidos, delecciones o adiciones en una o más de las CDRs no humanas. El derivado de anticuerpo humanizado puede tener sustancialmente la misma unión, una mejor unión o una peor unión al compararlo con un anticuerpo humanizado no derivado. En realizaciones específicas, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos de la CDR han sido sustituidos, eliminados o añadidos (es decir,
- 30 mutados). Para obtener más información acerca de los anticuerpos humanizantes, consulte las patentes europeas N° EP 239.400, EP 592.106, y EP 519.596; las publicaciones internacionales N° WO 91/09967 y WO 93/17105; las patentes de EE.UU. N° 5.225.539, 5.530.101, 5.565.332, 5.585.089, 5.766.886, y 6.407.213; y Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-
- 35 79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10; Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73; Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; and Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596.
- [0031]** Tal y como se emplea aquí, el término "región hipervariable" hace referencia a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión de los antígenos. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácidos de una "Región Determinante de Complementariedad" o "CDR" (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos desde un "bucle hipervariable" (es decir, residuos 26-32
- 40 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Los residuos de la CDR para el EA2 se incluyen en la Tabla 1. Los residuos de la "Región Variable" o "FR" son aquellos residuos variables aparte de los residuos de la región hipervariable definidos en este documento.
- [0032]** Tal y como se emplea aquí, el término "en combinación" hace referencia al uso de más de un agente profiláctico/terapéutico. El empleo del término "en combinación" no limita el orden en el que se administran los agentes profilácticos/terapéuticos a un sujeto con un trastorno de células hiperproliferativas, en particular el cáncer. Se puede administrar un primer agente profiláctico/terapéutico antes de (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos,
- 45 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), simultáneamente con, o después de
- 50 (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto que tenía, tiene o es susceptible de padecer un trastorno de células hiperproliferativas, en particular el cáncer. Se administran agentes profilácticos o terapéuticos a un sujeto en una secuencia y durante un periodo de tiempo tal que el agente de la invención puede actuar junto con otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si se hubiese administrado de otra forma. Cualquier agente profiláctico o terapéutico complementario se puede administrar en cualquier orden junto con otros agentes profilácticos o terapéuticos complementarios.
- 60

- [0033]** Tal y como se emplea aquí, la frase "tolerancia baja" hace referencia a un estado en el que el paciente sufre efectos secundarios a partir de un tratamiento del que no se beneficia y/o no continuará con la terapia debido a los efectos adversos y/o el daño de los efectos secundarios es mayor que el beneficio del tratamiento.
- [0034]** Tal y como se emplea, los términos "gestionar" "que gestionan" y "gestión" hacen referencia a los efectos
5 beneficiosos que un sujeto obtiene de la administración de un agente profiláctico o terapéutico, que no da lugar a la cura de la enfermedad. En determinadas realizaciones, a un sujeto se le administra uno o más agentes profilácticos o terapéuticos para "gestionar" una enfermedad así como para prevenir la progresión/ avance o empeoramiento de la misma.
- [0035]** Tal y como se emplea aquí, la frase "no receptivo/resistente" se emplea para describir a pacientes tratados con
10 una o más terapias disponibles actualmente (por ejemplo, terapias oncológicas) tales como la quimioterapia, la radioterapia, la cirugía, la terapia hormonal y/o la terapia biológica/inmunoterapia, en particular un régimen terapéutico estándar para el cáncer en cuestión, donde la terapia no es clínicamente adecuada para tratar a los pacientes quienes requieren una terapia efectiva complementaria, por ejemplo, que siguen resistentes a la terapia. La frase también puede describir a los pacientes que responden a la terapia y sufren efectos secundarios, sufren una recaída, desarrollan
15 resistencia, etc. En diversas realizaciones, "no receptivo/ resistente" hace referencia a que al menos alguna porción importante de las células cancerosas no son eliminadas o que su división celular no se ha detenido. La determinación de si las células cancerosas son o no "no receptivas/resistentes" puede realizarse bien *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en el campo a fin de estudiar la efectividad del tratamiento en células cancerosas, usando los significados aceptados por el campo de "resistente" en un contexto como éste. En diversas realizaciones, un cáncer es
20 "no receptivo/resistente" cuando el número de células cancerosas no se ha reducido de manera significativa, o ha aumentado durante el tratamiento.
- [0036]** Tal y como se emplea aquí, el término "potenciar" hace referencia a una mejoría en la eficacia de un agente terapéutico con su dosis común o aprobada.
- [0037]** Tal y como se emplea aquí, los términos "prevenir," "que previene" y "prevención" hacen referencia a la
25 prevención de la reaparición o propagación de una enfermedad en un sujeto a raíz de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.
- [0038]** Tal y como se emplea aquí, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" hacen referencia a cualquier agente(s) que puede ser usado en la prevención del comienzo, reaparición o propagación de un trastorno asociado con la sobreexpresión del EphA2, en particular el cáncer. El término "agente profiláctico" hace referencia a un
30 anticuerpo agonístico BphA2 y opcionalmente a un anticuerpo del epítipo de EphA2 expuesto. En otras determinadas realizaciones, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" hacen referencia a las quimioterapias, las radioterapias, las terapias hormonales, las terapias biológicas (por ejemplo, las inmunoterapias), y/o los anticuerpos EphA2 de la invención. En otras realizaciones, se puede administrar más de un agente profiláctico en combinación.
- [0039]** Tal y como se emplea aquí, una "cantidad profilácticamente efectiva" hace referencia a esa cantidad de agente
35 profiláctico suficiente para dar lugar a la prevención de la reaparición o propagación del cáncer. Una cantidad profilácticamente efectiva puede hacer referencia a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la reaparición o propagación del cáncer o la incidencia del cáncer en un paciente, que incluye entre otros a aquellos predisuestos al cáncer o previamente expuestos a los carcinógenos. Una cantidad profilácticamente efectiva también puede hacer referencia a la cantidad de agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención del
40 cáncer. Además, una cantidad profilácticamente efectiva con respecto a un agente profiláctico de la invención se refiere a esa cantidad de agente profiláctico, solo o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención del cáncer. Usados en conexión con una cantidad del anticuerpo EphA2 de la invención, el término puede englobar una cantidad que mejora la profilaxis global o la eficacia profiláctica o las sinergias con otro agente profiláctico.
- [0040]** Tal y como se emplea aquí, un "protocolo" incluye la dosificación y los regímenes de dosificación.
- [0041]** Tal y como se emplea aquí, la frase "efectos secundarios" engloba los efectos no deseados y adversos de un agente profiláctico o terapéutico. Los efectos adversos son siempre no deseados, pero los efectos no deseados no son necesariamente adversos. Un efecto adverso de un agente profiláctico o terapéutico puede ser perjudicial, molesto o
50 peligroso. Los efectos secundarios de una quimioterapia incluyen, aunque no de forma excluyente, la toxicidad gastrointestinal tales como, la diarrea temprana y tardía y la flatulencia, las náuseas, los vómitos, la anorexia, la leucopenia, la anemia, la neutropenia, la astenia, los calambres abdominales, la fiebre, el dolor, la pérdida de peso, la deshidratación, la alopecia, la disnea, el insomnio, los vértigos, la mucositis, la xerostomía, y la insuficiencia renal, así como el estreñimiento, los efectos nerviosos y musculares, los daños temporales o permanentes en el riñón o en la vejiga, los síntomas gripales, la retención de líquidos, y la infertilidad temporal o permanente. Los efectos secundarios de la radioterapia incluyen, aunque no de forma excluyente, la fatiga, la xerostomía y la pérdida del apetito. Los efectos secundarios de las terapias biológicas/ inmunoterapias incluyen, aunque no de forma excluyente las erupciones o las tumefacciones en el lugar de la administración, los síntomas gripales como la fiebre, los resfriados y la fatiga, los problemas del aparato digestivo y las reacciones alérgicas. Los efectos secundarios de las terapias hormonales incluyen, aunque no de forma excluyente, las náuseas, los problemas de fertilidad, la depresión, la pérdida de apetito, los

problemas de visión, el dolor de cabeza, y la fluctuación de peso. Son numerosos los otros efectos no deseados típicamente sufridos por los pacientes como se conoce en el campo. Muchos aparecen descritos en el Physicians' Desk Reference (56th ed., 2002).

- 5 **[0042]** Tal y como se emplea aquí, los términos "cadena ligera Fv" o "scFv" hacen referencia a los fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, donde tales dominios están presentes en una cadena ligera de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido Fv además comprende un enlazador entre los dominios VH y VL que permiten al scFv formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). En realizaciones específicas, los scFvs incluyen scFvs biespecíficos y scFvs humanizados.
- 10 **[0043]** Tal y como se emplea aquí, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente. Tal y como se emplea aquí, un sujeto es preferiblemente un mamífero como un no primate (por ejemplo, las vacas, los cerdos, los caballos, los gatos, los perros, las ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, el mono y un humano), la mayoría preferiblemente un humano.
- 15 **[0044]** Tal y como se emplea aquí, los términos "tratar," "que se trata" y "tratamiento" hace referencia a la extirpación, reducción o mejoría de los síntomas de una enfermedad o trastorno, en particular, la extirpación, la eliminación, la modificación, o el control de un tejido canceroso metastásico, regional y primario que resulta de la administración de uno o más de los agentes terapéuticos. En determinadas realizaciones, dichos términos hacen referencia a la minimización o al retraso de la propagación del cáncer que resulta de la administración de uno o más de los agentes terapéuticos a un paciente con tal enfermedad.
- 20 **[0045]** Tal y como se emplea aquí, los términos "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" hacen referencia a cualquier agente(s) que se pueda usar en la prevención, tratamiento o gestión de un trastorno asociado con la sobreexpresión del EphA2, en particular el cáncer. En determinadas realizaciones, el término "agente terapéutico" hace referencia a un anticuerpo agonístico del EphA2 y opcionalmente a un anticuerpo del epítipo del EphA2 expuesto. En otras determinadas realizaciones, los términos "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" hacen referencia a las
- 25 quimioterapias del cáncer, a las radioterapias, a la terapia hormonal, a la terapia biológica/inmunoterapia, en combinación con el anticuerpo del EphA2 de la invención. En otras realizaciones, más de un agente terapéutico se puede administrar en combinación.
- [0046]** Tal y como se emplea aquí, una "cantidad terapéuticamente efectiva" hace referencia a esa cantidad del agente terapéutico suficiente para destruir, modificar, controlar o eliminar el tejido canceroso metastásico regional y primario.
- 30 Una cantidad terapéuticamente efectiva puede hacer referencia a la cantidad del agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede hacer referencia a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o el control del cáncer. Además, una cantidad terapéuticamente efectiva con respecto a un agente terapéutico de la invención significa que esa cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otras terapias, proporciona un beneficio terapéutico en el
- 35 tratamiento o el control del cáncer. Usado en conexión con una cantidad del anticuerpo del EphA2 de la invención, el término puede englobar una cantidad que mejora la terapia global, reduce o evita los efectos no deseados, o aumenta la eficacia terapéutica o las sinergias con otro agente terapéutico.

4. DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 40 **[0047] FIGS. 1A-1C:** Los anticuerpos del EphA2 promueven la fosforilación de la tirosina y la degradación del EphA2 en las células MDA-MB-231. **(A, B)** Las monocapas de células MDA-MB-231 fueron incubadas en presencia de EA2 o EA5 o del control durante 8 minutos a 37°C. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo específico del EphA2, resueltos por SDS-PAGE y estuvieron sujetos al análisis por *western blot* con un anticuerpo específico de fosfotirosina **(A)**. Las membranas fueron tratadas y analizadas de nuevo con el anticuerpo específico del EphA2 usado en la inmunoprecipitación como un control de carga **(B)**. Los niveles de fosforilación del EphA2 aumentan con la incubación
- 45 del anticuerpo. **(C)** Las monocapas de las células MDA-MB-231 fueron incubadas en presencia de 30 µg/ml de EA2 o EA5 o de un control durante 24 horas a 37°C. Los lisados celulares fueron resueltos por SDS PAGE y estuvieron sujetos al análisis por *western blot* con un anticuerpo específico del EphA2. Los niveles de la proteína EphA2 disminuyen con la incubación del anticuerpo. La movilidad relativa del estándar de masa molecular se muestra a la izquierda de cada membrana. Se indican las cadenas pesadas (IgH) y ligeras (IgL) del anticuerpo.
- 50 **[0048] FIGS. 2A-2D:** Los anticuerpos del EphA2 promueven la fosforilación de la tirosina y la degradación del EphA2 en las células A549. Las monocapas de las células A549 fueron incubadas a 37°C en presencia de EA2 o EA5 o del control (PBS) durante **(A, B)** 10 minutos o **(C, D)** 5 horas. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo específico D7 del EphA2, resueltos por SDS-PAGE y sujetos al análisis por *western blot* con un anticuerpo específico de fosfotirosina **(A, C)**. Las membranas fueron tratadas y analizadas de nuevo con el anticuerpo específico del EphA2
- 55 usado en la inmunoprecipitación como un control de carga **(B, D)**.
- [0049] FIGS. 3A-3B:** Los anticuerpos del EphA2 inhiben el crecimiento de las células tumorales malignas *in vitro*. Los anticuerpos del EphA2 purificados fueron incubados con las células tumorales malignas y benignas durante 7 días a 37°C en agar blando. **(A)** Las células cancerosas pulmonares malignas A549 fueron incubadas con 10 µg/ml o 2.5 µg/ml

de anticuerpos monoclonales EA2 o EA5 o un control (PBS). Todas las cantidades de anticuerpos usados inhibieron el crecimiento de las células en agar blando. **(B)** Las células tumorales epiteliales de mama MCF-7 benignas fueron convertidas en células malignas por la sobreexpresión del EphA2 (MCF-7^{EphA2}). Ambos tipos de células tumorales fueron incubados bien con anticuerpos monoclonales del EA2 o con un control (PBS). El EA2 inhibe la capacidad de las células MCF-7^{EphA2} para crecer en un agar blando. Los resultados fueron recogidos como colonias por campo de alta potencia (HPF).

[0050] FIGS. 4A-4D: El anticuerpo EA2 del EphA2 inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vivo*. Las células MDA-MB-231 del cáncer de mama fueron implantadas **(A)** ortotópicamente o **(B)** subcutáneamente en ratones atímicos. **(C)** Las células A549 del cáncer de pulmón fueron implantadas subcutáneamente en ratones atímicos. Después de que los tumores hubiesen crecido hasta un volumen medio de 100mm³, a los ratones se les administró 6 mg/kg del anticuerpo indicado o del control negativo (PBS o anticuerpo 1A7) intraperitonealmente dos veces por semana durante 3 semanas. El crecimiento del tumor fue evaluado y expresado como una proporción del volumen del tumor dividido entre el volumen del tumor inicial (100 mm³). **(D)** Las células MDA-MB-231 del cáncer de mama fueron implantadas subcutáneamente en ratones atímicos. Después de que los tumores hubiesen crecido hasta un volumen medio de 100mm³, a los ratones se les administró 6 mg/kg del anticuerpo indicado o del control negativo intraperitonealmente dos veces a la semana durante 3 semanas. El volumen total del tumor fue determinado después de sacrificarlos. El control negativo es negro y el EA2 es blanco.

[0051] FIGS. 5A-5B: La sobreexpresión del EphA2 aumenta de manera selectiva el crecimiento de las células malignas. **(A)** El control 1x10⁵ (la franja blanca) o las células MCF-7^{EphA2} (la franja negra) fueron suspendidos en un agar blando en presencia de 1 mg/ml 17β-estradiol durante 14 días antes de la evaluación microscópica. Las células transfectadas del EphA2 formaron más colonias (47 colonias/campo de alta potencia (HPF)) que los controles correspondientes (1 colonia/HPF; P<0.01). **(B)** Los ensayos de crecimiento de monocapas no distinguieron entre el crecimiento del control (círculos blancos) y las células MCF-7^{EphA2} (cuadros negros).

[0052] FIGS. 6A-6B: La sobreexpresión del EphA2 aumenta el potencial tumorigénico. **(A)** El control 1x10⁶ (círculo blanco) o las células MCF-7^{EphA2} (cuadro negro) fueron implantados en el pániculo adiposo mamario de ratones atímicos (n=20 ratones por grupo) en presencia de estrógeno suplementario (1 μM 17β-estradiol). Los tumores formados por células MCF-7^{EphA2} fueron de manera significativa más grandes que los tumores formados por controles correspondientes (P = 0.027). **(B)** Las mismas cantidades de lisados de proteínas, aisladas de las células de entrada o de los tumores resecos (T) fueron evaluados por los análisis por *western blot* con un anticuerpo del EphA2 (D7). Las membranas fueron tratadas y analizadas de nuevo con un anticuerpo específico de la catenina β como un control de carga.

[0053] FIGS. 7A-7C: La sobreexpresión del EphA2 disminuye la dependencia estrógena. **(A)** El control 1x10⁵ (la franja blanca) o las células MCF-7^{EphA2} (la franja negra) fueron suspendidos en un agar blando a falta de estrógeno exógeno y la formación de colonias fue evaluada de manera microscópica tras 14 días. Se aumentó el crecimiento de las monocapas **(B)** y del potencial tumorigénico **(C)** de las células MCF-7^{EphA2} (franja negra) relativas a los controles correspondientes (el círculo blanco) a falta de estrógeno suplementario (P<0.01 y P<0.004, respectivamente).

[0054] FIGS. 8A-8B: La sobreexpresión del EphA2 disminuye la sensibilidad al tamoxifeno. **(A)** Las células 1x10⁵ MCF-7 o las células MCF-7^{EphA2} fueron suspendidas en agar blando en presencia de 1μM tamoxifeno (TAM) y/o 1μM 17β-estradiol y la formación de colonias fue evaluada de manera microscópica tras 14 días. **(B)** Las células MCF-7 (círculos) o las células MCF-7^{EphA2} (cuadros) fueron implantadas en un pániculo adiposo mamario (n=15 ratones por grupo) en presencia del estrógeno suplementario. El tratamiento de tamoxifeno fue iniciado 17 días después de la implantación. El volumen tumoral de animales tratados con tamoxifeno (círculos y cuadros negros) y con salino (círculos y cuadros blancos) fue medido en el momento indicado. Obsérvese los efectos inhibidores más bajos de tamoxifeno en las células MCF-7^{EphA2} en comparación con las células de control (P=0.01).

[0055] FIGS. 9A-9F: El receptor de estrógeno se expresa funcionalmente alterado en las células MCF-7^{EphA2}. **(A)** Los niveles ERα y **(B)** ERβ fueron evaluados en las células de control MCF-7^{neo} y en las células MCF-7^{EphA2} por análisis de la membrana western con un anticuerpo específico del EphA2 (D7). **(C, D)** Las membranas fueron tratadas y analizadas de nuevo con un anticuerpo específico de catenina β como un control de carga. **(E, F)** La actividad receptora de estrógeno fue medida usando un sistema de informes CAT, que revela la actividad receptora del estrógeno comparable en el control y en las células MCF-7^{EphA2}. La media que resulta de tres experimentos se representa en **(F)**. El E2 indica el tratamiento de estrógeno; el TAM indica el tratamiento de tamoxifeno; la conversión en % indica la cantidad de sustrato convertida del sustrato no acetilado (non-AC) en sustrato acetilado (AC) por la enzima del CAT.

[0056] FIGS. 10A-10C: El anticuerpo agonístico EA2 del EphA2 disminuye el crecimiento maligno. Las células MCF-7^{EphA2} fueron incubadas en presencia de 3 μg/ml de EA2 durante el tiempo indicado antes de la extracción de la muestra y de los análisis por *western blot* con un anticuerpo específico del EphA2 (D7). **(B)** La membrana fue tratada y reanalizada con un anticuerpo específico de catenina β como un control de carga. **(C)** El control 1x10⁵ o las células MCF-7^{EphA2} fueron suspendidas en agar blando en presencia o a falta de tamoxifeno (TAM, 1μM) y del anticuerpo agonístico del EphA2 (EA2, 10μg/ml). Obsérvese que el EA2 aumentó la sensibilidad de las células MCF-7^{EphA2} al tamoxifeno.

- [0057] FIGS. 11A-11D:** El EA2 y EA5 se unen selectivamente a las células malignas. Los anticuerpos monoclonales EA2 del anti-EphA2 (**A, C**) y EA5 (**B, D**) se unen a las células MDA-MB-231 del tumor de mama epiteliales y malignas (**A, B**) más fuertemente que las células MCF-10A del tumor de mama epiteliales y benignas (**C, D**) como se muestra por la mancha inmunofluorescente.
- 5 **[0058] FIG. 12:** El EA2 era inmunoreactivo contra las células prostáticas y malignas. El anticuerpo monoclonal EA2 del anti-EphA2 identificó las células del cáncer de próstata malignas en especímenes clínicos conservados en formalina fijada y parafina incrustada.
- [0059] FIGS. 13A-13D:** El anticuerpo EA2 del EphA2 EA2 se une preferencialmente a las células cancerosas. Las células MCF-10A (**A, C**) no transformadas o las células MDA-MB-231 (**B, D**) transformadas fueron incubadas con 10 µg/ml (**A, B**) de Eph099B-233.152 o (**C, D**) EA2 a 4°C antes de la fijación y el inmunomarcaje con IgG anti-ratón de conjugado fluoróforo.
- 10 **[0060] FIGS. 14A-14D:** El anticuerpo EA2 del EphA2 se une preferencialmente a los epítomos del EphA2 expuestos por la disminución de los contactos de célula-célula. Las células MCF-10A no transformadas (**A, B**) fueron etiquetadas con el EA2 a 4°C antes (**A**) o después (**B**) del tratamiento con EGTA y antes de producirse la fijación y el inmunomarcaje con 15 IgG anti-ratón de conjugado fluoróforo. Las células MCF-10A (**C**) no transformadas (**C, D**) o las células MDA-MB-231 transformadas (**D**) fueron etiquetadas con el EA2 antes (a mitad de) o después (arriba) del tratamiento con EGTA. Las células de control fueron incubadas con el anticuerpo secundario solo (abajo). La cantidad de la unión EA2-EphA2 fue medida usando la citometría de flujo.
- [0061] FIGS. 15A-15B:** El epítomo EA2 del EphA2 es distinto del lugar de unión del ligando. (**A**) El EphA2- F_o fue incubado y ligado a la Efrina A1-F_c. inmovilizada - Efrina etiquetada A1-F_o (negro) o el EA2 (blanco) fue incubado con el complejo EphA2-Efrina A1-F_c y se midió la cantidad de unión. (**B**) El BphA2-F_c fue incubado y ligado a la Efrina A1-F_c.inmovilizada - EA2 etiquetado que fue incubada entonces con el complejo EphA2-Efrina A1. El competidor no etiquetado fue incubado con el complejo EphA2-Efrina A1-EA2 en la cantidad indicada. Los competidores fueron la Efrina A1-F_c (negro) o el EA2 (blanco).
- 20 **[0062] FIG. 16:** Se muestran las secuencias de VL y VH de EA2, las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de EA2 (**A**), el VL (SEQ ID NOs:1 y 9, respectivamente) y (**B**) el VH (SEQ ID NOs:5 y 13, respectivamente). Se indican las secuencias de las CDRs.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- [0063]** La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los inventores de que los anticuerpos monoclonales EphA2 pueden inhibir los fenotipos de células cancerosas. La actividad reducida del BphA2 inhibe de manera selectiva el crecimiento de las células cancerosas malignas. La actividad reducida del EphA2 se puede lograr con los anticuerpos monoclonales agonísticos EphA2. Aunque no teniendo la intención de ligarse por ningún mecanismo de acción, esta inhibición del crecimiento de células malignas se logra mediante la simulación (es decir, agonizando) de la señalización del BphA2 causando de ese modo la fosforilación del EphA2 hasta su degradación. El crecimiento de las 35 células malignas se disminuye debido a los niveles reducidos del EphA2 y, por tanto, de la señalización del EphA2 independiente del ligando.

- [0064]** Por lo tanto, la presente invención hace referencia a las composiciones que proporcionan el tratamiento, la inhibición, y la gestión del cáncer, particularmente del cáncer metastásico. Un aspecto particular de la invención hace referencia a las composiciones que contienen compuestos que inhiben la proliferación e invasión de las células cancerosas, particularmente aquellas células cancerosas que sobreexpresan el EphA2. La presente invención también se refiere a las composiciones para el tratamiento, la inhibición, o la gestión de los cánceres metastásicos de origen celular y epitelial, sobre todo en cánceres humanos de mama, pulmón, piel y próstata. Otras composiciones de la invención incluyen otros tipos de componentes activos en combinación con los anticuerpos EphA2 de la invención.

- [0065]** La presente invención también hace referencia a las composiciones para el tratamiento, la inhibición, y la gestión del cáncer que se han vuelto parcial o totalmente resistentes al tratamiento de cáncer estándar actual, como la quimioterapia, la radioterapia, la terapia hormonal y la terapia biológica.

- [0066]** La invención también ofrece métodos de diagnóstico que usan los anticuerpos EphA2 de la invención, particularmente los anticuerpos de epítomos de EphA2 expuestos, a fin de evaluar la eficacia del tratamiento de cáncer, tanto los basados en EphA2 como los no basados en EphA2. Los métodos de diagnóstico de la invención también se pueden usar para pronosticar o predecir la progresión del cáncer. En realizaciones particulares, los métodos de diagnóstico de la invención proporcionan anticuerpos para el diagnóstico por imágenes y la localización de las metástasis y para el diagnóstico y pronóstico usando tejidos y fluidos distales al lugar del tumor primario (así como métodos que usan los tejidos y fluidos del tumor primario). En otras realizaciones, los métodos de diagnóstico de la invención proporcionan anticuerpos para el diagnóstico por imágenes y la localización de las metástasis y para el 55 diagnóstico y pronóstico *in vivo*.

[0078] La presente invención también proporciona anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos que comprenden una región marco conocida por los expertos en el campo. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención o el fragmento del mismo es humano o humanizado.

[0079] La presente invención engloba anticuerpos de dominio único, que incluyen anticuerpos de dominio único camérido (véase por ejemplo, Muyldermans et al., 2001, *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Nuttall et al., 2000, *Cur. Pharm. Biotech.* 1:253; Reichmann and Muyldermans, 1999, *J. Immunol. Meth.* 231:25; las publicaciones internacionales N° WO 94/04678 y WO 94/25591; la patente de Estados Unidos N° 6.005.079.

En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos de dominio único que comprenden dos dominios VH de un anticuerpo agonístico EphA2 o preferiblemente el anticuerpo EphA2 que preferencialmente se une a un epítipo BphA2 expuesto en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas con modificaciones tales que se forman los anticuerpos de dominio único.

[0080] La presente invención también engloba el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen semividas (por ejemplo, semividas en suero) en un mamífero, preferiblemente un humano, de más de 15 días, preferiblemente de más de 20 días, de más de 25 días, de más de 30 días, de más de 35 días, de más de 40 días, de más de 45 días, de más de 2 meses, de más de 3 meses, de más de 4 meses, o de más de 5 meses. Las semividas aumentadas de los anticuerpos de la presente invención o de los fragmentos de los mismos en un mamífero, preferiblemente un humano, dan lugar a un título de suero mayor que dichos anticuerpos o fragmentos del anticuerpo en un mamífero, y por tanto, reducen la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y/o reducen la concentración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo para ser administrados. Los anticuerpos o los fragmentos de los mismos que han aumentado las semividas *in vivo* pueden generarse por técnicas conocidas por los expertos en el campo. Por ejemplo, los anticuerpos o los fragmentos de los mismos con semividas *in vivo* aumentadas pueden generarse mediante la modificación (por ejemplo, sustitución, delección o adición) de los residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO 97/34631 y WO 02/060919), o los fragmentos de los mismos con semividas *in vivo* aumentados se pueden generar insertando a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo moléculas de polímero como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular. El PEG se puede insertar a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con o sin un enlazador multifuncional a través de la conjugación específica de lugar del PEG al extremo N- o C- de dicho anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o vía grupos amino-epsilon presentes en los residuos de lisina. Se usará la derivatización de polímeros lineales o ramificados que dan lugar a la actividad biológica de pérdida mínima. El grado de conjugación será controlado de cerca por SDS-PAGE y la espectrometría de masa a fin de asegurar la conjugación adecuada de las moléculas PEG a los anticuerpos. El PEG sin reacción se puede separar de los conjugados de anticuerpo-PEG por, por ejemplo, la exclusión de tamaño o la cromatografía de intercambio de iones.

[0081] La presente invención también engloba el uso de los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos de uno o ambos dominios variables de EA2, EA3, EA4, o EA5 con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones de marco o variables. Preferiblemente, las mutaciones en estos anticuerpos mantienen o aumentan la avidéz y/o la afinidad de los anticuerpos para los antígenos particulares a los que se unen inmuno-específicamente. Las técnicas estándares conocidas por los expertos en el campo (por ejemplo, los inmunoensayos) se pueden usar para estudiar la afinidad de un anticuerpo para un antígeno particular.

[0082] Las técnicas estándares conocidas por los expertos en el campo se pueden usar para introducir las mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifican un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que incluyen, por ejemplo, la mutagénesis dirigida al lugar y la mutagénesis mediada PCR, que dan lugar a las sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos relacionados con el anticuerpo original o fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservadoras de aminoácidos realizadas en uno o más de los residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

[0083] La presente invención también engloba los anticuerpos o los fragmentos de los mismos que se unen inmuno-específicamente al EphA2 y agonizan el EphA2 y/o preferencialmente se unen a un epítipo de EphA2 expuesto en las células cancerosas, dichos anticuerpos o fragmentos del anticuerpo que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable que es al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable y/o de la cadena pesada de PTA-4380 o PTA-4381. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se unen inmuno-específicamente al EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera variable que es al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO:1. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos del anticuerpo de la invención se unen inmuno-específicamente al EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable que es al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO:5. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se unen

inmunoespecíficamente al EphA2 y comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable que es de al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO:1 y una cadena pesada variable que es de al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO:5.

[0084] La determinación de la identidad de porcentaje de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por cualquier método conocido por un experto en el campo, que incluyen las búsquedas de proteína BLAST.

[0085] La presente invención además engloba los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente al EphA2 y agonizan el EphA2 y/o preferencialmente se unen a un epítipo de EphA2 expuesto en las células cancerosas, tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden una secuencia de aminoácidos de 6 CDRs que comprenden las sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos, como se muestra en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, o 8. El anticuerpo que comprende una o más de las CDRs que comprenden las sustituciones, deleciones o adiciones de los residuos de aminoácidos pueden tener sustancialmente la misma unión, una mejor unión, o una peor unión cuando se compara con un anticuerpo que comprende una o más de las CDRs sin sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos. En realizaciones específicas, uno, dos o tres residuos de aminoácidos de las CDR se han sustituido, eliminado o añadido (es decir, mutado).

[0086] La presente invención también engloba los anticuerpos o el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen inmunoespecíficamente al EphA2 y agonizan el EphA2 y preferencialmente unen epítopos al EphA2 que selectivamente se exponen y crecen en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas, donde tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpo están codificados por una secuencia de nucleótidos que producen híbridos para la secuencia de nucleótidos de PTA-4380 o PTA-4381 bajo condiciones estrictas. En una realización, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente al EphA2 y agonizan el EphA2 y/o preferencialmente unen un epítipo al EphA2 que selectivamente se exponen y crecen en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden una cadena ligera variable codificada por una secuencia de nucleótidos que produce híbridos bajo condiciones estrictas a la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable de PTA-4380 o PTA-4381.

En una realización preferida, los anticuerpos o fragmentos de la invención se unen inmunoespecíficamente al EphA2 y comprenden una CDR codificada por una secuencia de nucleótidos que produce híbridos bajo condiciones estrictas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:10, 11, or 12, y comprenden una CDR codificada por una secuencia de nucleótido que produce híbridos bajo condiciones estrictas a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:14, 15, o 16.

[0087] Las condiciones estrictas de hibridización incluyen, aunque no de forma excluyente, la hibridización al ADN ligada al filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio de 6X (SSC) a alrededor de 45°C seguido por uno o más lavados en 0.2X SSC/0.1% SDS a alrededor de 50-65°C, en condiciones altamente estrictas tales como la hibridización al ADN ligada al filtro en 6X SSC a alrededor de 45°C seguido de uno o más lavados en 0.1X SSC/0.2% SDS a alrededor de 60°C, o cualquier condición estricta de hibridización conocida por los expertos en el campo (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NY en páginas desde el 6.3.1 al 6.3.6 y 2.10.3).

[0088] La presente invención además engloba los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen inmunoespecíficamente al EphA2 y agonizan el EphA2 y preferencialmente unen un epítipo de EphA2 expuesto en las células cancerosas, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden una o más CDRs codificadas por una secuencia de nucleótidos de una o más CDRs que comprenden sustituciones, deleciones, o adiciones de residuos de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO:10, 11, 12, 14, 15, o 16. El anticuerpo que comprende una o más CDRs que comprende sustituciones supresiones o adiciones de residuos de ácido nucleico pueden tener sustancialmente la misma unión, una mejor unión, o peor unión cuando se compara con un anticuerpo que comprende una o más CDRs sin sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de ácido nucleico. En realizaciones específicas, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince residuos de ácido nucleico de las CDR han sido sustituidas, eliminadas o añadidas (es decir, mutadas). Las sustituciones de ácido nucleico pueden o no cambiar la secuencia de aminoácidos de la CDR mutada.

TABLA 1

Anticuerpo	Cadena V	CDR	SEQ ID NO. (aminoácidos)	SEQ ID NO. (ácidos nucleicos)	Nº de registro en la ATCC
EA2					PTA-4380
	VL		1	9	

Anticuerpo	Cadena V	CDR	SEQ ID NO. (aminoácidos)	SEQ ID NO. (ácidos nucleicos)	Nº de registro en la ATCC
		VL1	2	10	
		VL2	3	11	
		VL3	4	12	
	VH		5	13	
		VH1	6	14	
		VH2	7	15	
		VH3	8	16	

5.1.1 Conjugados de anticuerpo

- [0089] La presente invención engloba el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos recombinantemente fusionados o químicamente conjugados (que incluyen conjugaciones covalentes y no covalentes) con un polipéptido heterólogo (o una porción del mismo, preferiblemente para un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) a fin de generar proteínas de fusión. La fusión no requiere necesariamente ser directa, pero puede tener lugar a través de secuencias de enlazadores. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden usar para dirigir polipéptidos heterólogos a tipos celulares particulares, bien *in vitro* o *in vivo*, mediante la fusión o conjugación de anticuerpos a anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particular. Los anticuerpos fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos se pueden usar también en los inmunoensayos *in vitro* y en los métodos de purificación que usan métodos conocidos en el campo. Véase por ejemplo, la publicación internacional N° WO 93/21232; EP 439.095; Naramura et al., 1994, *Immunol. Lett.* 39:91-99; la patente de Estados Unidos N° 5.474.981; Gillies et al., 1992, *PNAS* 89:1428-1432; y Fell et al., 1991, *J. Immunol.* 146:2446-2452.
- 15 En algunas realizaciones, el trastorno para ser detectado, tratado, gestionado o monitorizado es un cáncer maligno que sobreexpresa el EphA2. En otras realizaciones, el trastorno para ser detectado, tratado, gestionado o monitorizado en una condición precancerosa asociada con las células que sobreexpresan el EphA2. En realizaciones específicas, la condición precancerosa es la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN), el fibroadenoma de mama, la enfermedad fibroquística, o un nevo compuesto.
- 20 [0090] La presente invención además incluye las composiciones de polipéptidos heterólogos fusionados o conjugados con fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos se pueden fusionar o conjugar con un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento F(ab)₂, o una porción del mismo. Los métodos para el uso o conjugación de polipéptidos para porciones de anticuerpos son conocidos en el campo. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N°. 5.336.603. 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, y 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; la publicación internacional N° WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, *PNAS* 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; y Vil et al., 1992, *PNAS* 89:11337- 11341.
- 30 [0091] Las proteínas de fusión adicionales se pueden generar a través de las técnicas de transposición genética, de transposición de unidades, de transposición de exones, y/o de transposición de secuencias (colectivamente denominada "transposición de ADN"). La transposición de ADN se puede emplear para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades más altas e índices de disociación más bajos). Véase, generalmente, la patente de Estados Unidos N°. 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten et al., 1997, *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998. *Trends Bioechnol.* 16:76; Hansson, et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265; y Lorenzo and Blasco, 1998, *BioTechniques* 24:308. Los anticuerpos o los fragmentos de los mismos, o los anticuerpos o fragmentos de los mismos codificados se pueden alterar por estar sujetos a la mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, por la inserción de nucleótidos aleatorios o por otros métodos anteriores a la recombinación. Una o más de las porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, cuyas porciones se unen inmunoespecíficamente al EphA2, se pueden recombinar con uno o más de los componentes, unidades, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más de las moléculas heterólogas.
- 40 [0092] Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden fusionar con secuencias de marcadores, como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos de marcadores es un

péptido de hexahistidina, como la etiqueta provista en un vector pQB (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los que están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., 1989, *PNAS* 86:821, por ejemplo, la hexahistidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de la fusión. Otras etiquetas de péptidos beneficiosos para la purificación incluyen, aunque no de forma excluyente, la etiqueta "HA" de la hemaglutinina, que se corresponde con un epítipo derivado de la proteína de la hemaglutinina de influenza (Wilson et al., 1984, *Cell* 37:767) y la etiqueta "indicador".

[0093] En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención o los fragmentos o las variantes de los mismos se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles/beneficiosos para controlar o pronosticar el desarrollo o progresión de un cáncer como parte de un procedimiento de evaluación clínica, como determinar la eficacia de una terapia particular. Adicionalmente, tales anticuerpos pueden ser útiles/beneficiosos para controlar o pronosticar el desarrollo o progresión de una condición precancerosa asociada con células que sobreexpresan el EphA2 (por ejemplo, la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN), el fibroadenoma de mama, la enfermedad fibroquística, o el nevo compuesto). En una realización, un anticuerpo de epítipo de EphA2 expuesto se conjuga con un agente de diagnóstico o detectable. En una realización más específica, el anticuerpo es el EA2, (PTA-4380).

[0094] Tal diagnóstico y detección se pueden llevar a cabo acoplado el anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, aunque no de forma excluyente, varios enzimas, tales como, la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa, o la acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos, tales como la estreptavidina/biotina y la avidina/biotina; los materiales fluorescentes, tales como, la umbeliferona, la fluoresceína, la isotiocinata de fluoresceína, la rodamina, la fluoresceína de diclorotriazilamina, el cloruro de danisil o la ficoeritrina; los materiales luminescentes, tales como, el luminol; los materiales bioluminescentes, tales como, la luciferasa, la luciferina, y la aecurina; los materiales radioactivos, tales como el bismuto (^{213}Bi), el carbono (^{14}C), el cromo (^{51}Cr), el cobalto (^{57}Co), la fluorina (^{18}F), el gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), el galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), el germanio (^{68}Ge), el holmio (^{166}Ho), el indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), la yodina (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), el lantano (^{140}La), el lutecio (^{177}Lu), el manganeso (^{54}Mn), el molibdeno (^{99}Mo), el paladio (^{103}Pd), el fósforo (^{32}P), el praseodimio (^{142}Pr), el promecio (^{149}Pm), el renio (^{186}Re , ^{188}Re), el rodio (^{105}Rh), el rutenio (^{97}Ru), el samario (^{153}Sm), el escandio (^{47}Sc), el selenio (^{75}Se), el estroncio (^{85}Sr), el sulfuro (^{35}S), el tecnecio (^{99}Tc), el talio (^{201}Tl), el estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), el tricio (^3H), el xenon (^{133}Xe), el yterbio (^{119}Yb , ^{175}Yb), el ytrio (^{90}Y), el zinc (^{65}Zn); metales de emisión de positrones que usan varias tomografías de emisión de positrones, e iones de metales paramagnéticos nomadioactivos.

[0095] La presente invención además engloba los usos de los anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un agente terapéutico.

[0096] Un anticuerpo o fragmento del mismo se puede conjugar con una porción terapéutica como la citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocidal, un agente terapéutico o un ion de metal radioactivo, por ejemplo, los emisores alfa. Un agente de citotoxina o citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tonopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, epirubicina, y ciclofosfamida y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, entre otros, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexata, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarrabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucil de tioepa, melfalán, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C, y platino de cisdiclorodiamina (II) (DDP) cisplatina), antracilinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y los agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

[0097] Además, un anticuerpo o un fragmento del mismo se puede conjugar con un agente terapéutico o con una porción de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Los agentes terapéuticos o las porciones de fármacos no se deben considerar agentes terapéuticos químicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina como la abrina, la ricina A, la exotoxina de pseudomonas, la toxina del cólera, o la toxina de la difteria; una proteína como el factor de necrosis tumoral, el interferón α , el interferón β , el factor de crecimiento neuronal, el factor de crecimiento derivado de platelet, el activador plasminogénico de tejido, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I (véase, la publicación internacional N° WO 97/33899), AIM II (véase, la publicación internacional N° WO 97/34911), Fas Ligand (Takahashi et al., 1994, *J. Immunol.*, 6:1567), y VEGF (véase, la publicación internacional N° WO 99/23105), un agente trombotico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo, la angiostatina o la endostatina; o, un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, la interleukina-1 ("IL-1"), la interleukina-2 ("IL-2"), la interleukina-6 ("IL-6"), el factor estimulante de colonia de macrofagia granulocita ("GM-CSF"), y el factor estimulante de colonia granulocita ("G-CSF")), o un factor de crecimiento (por ejemplo, la hormona del crecimiento ("GH")).

[0098] Además, un anticuerpo se puede conjugar con porciones terapéuticas tales como materiales radioactivos o queladores macrocíclicos útiles/beneficiosos para conjugar los iones de radiometales (véanse arriba los ejemplos de materiales radioactivos). En determinadas realizaciones, el quelador macrocíclico es 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-ácido tetraacetico (DOTA) que pueden fijarse al anticuerpo vía molécula enlazadora. Tales moléculas

enlazadoras son comúnmente conocidas en el campo y descritas en Denardo et al., 1998, *Clin Cancer Res.* 4:2483-90; Peterson et al., 1999, *Bioconjug. Chem.* 10:553; y Zimmerman et al., 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26:943-50.

[0099] En una realización específica, el anticuerpo conjugado es un anticuerpo EphA2 que preferiblemente se une a un epítipo del EphA2 expuesto en las células cancerosas pero no en las células no cancerosas (es decir, el anticuerpo del epítipo del EphA2 expuesto). En una realización más específica, el anticuerpo conjugado es el EA2 (PTA- 4380).

[0100] Las técnicas para conjugar las porciones terapéuticas con los anticuerpos son bien conocidas. Las porciones se pueden conjugar con los anticuerpos mediante cualquier método conocido en el campo, que incluyen, aunque no de forma excluyente al enlace aldehído/Schiff, enlace sulfhidrilo, enlace de ácido lábil, enlace cis-aconitil, enlace hidrazona, enlace degradable enzimáticamente (véase, Garnett, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:171-216). Las técnicas adicionales para conjugar las porciones terapéuticas con los anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., 1982, *Immunol; Rev.* 62:119-58. Los métodos para la fusión y conjugación de los anticuerpos con las porciones de polipéptidos son conocidos en el campo. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, y 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; la publicación internacional N° WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, *PNAS* 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; y Vil et al., 1992, *PNAS* 89:11337-11341. La fusión de un anticuerpo con una porción no requiere necesariamente que sea directa, pero puede ocurrir mediante secuencias enlazadoras. Dichas moléculas enlazadoras son comúnmente conocidas en el campo y descritas en Denardo et al., 1998, *Clin Cancer Res.* 4:2483-90; Paterson et al., 1999, *Bioconjug. Chem.* 10:553; Zimmerman et al., 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26:943-50; Garnett, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:171-216.

[0101] Alternativamente, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como lo describe Segal en la patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

[0102] Los anticuerpos también pueden sujetarse a soportes sólidos, que son particularmente útiles/beneficiosos para los inmunoensayos o para la purificación del antígeno objetivo. Tales soportes sólidos incluyen, entre otros, el vidrio, la celulosa, la poliacrilamida, el nailon, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno.

5.1.2 Métodos para producir anticuerpos

[0103] Los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden producir por cualquier método conocido en el campo para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante la síntesis química o preferiblemente, mediante las técnicas de expresión recombinantes.

[0104] Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el campo que incluyen el uso de hibridomas, las tecnologías de muestra fágica recombinantes o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando las técnicas de hibridomas que incluyen, entre otros, a aquellos expertos en el campo, como por ejemplo en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se emplea aquí no se limita a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo que resulta de un clon único, que incluye cualquier clon fágico, procariótico o eucariótico, y no al método por el que es producido.

[0105] Los métodos para producir y cribar los anticuerpos específicos usando la tecnología de hibridomas son rutinarios y bien conocidos en el campo. Por poco tiempo, los ratones pueden ser inmunizados con el EphA2 (tanto la proteína de duración completa o un dominio de la misma, por ejemplo, el dominio extracelular o el dominio de unión del ligando) y una vez se detecta una respuesta inmunológica, por ejemplo, se detectan los anticuerpos específicos para el EphA2 en el suero del ratón, se cultiva el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos son entonces fusionados por técnicas bien conocidas en el campo con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células a partir de la línea celular SP20 disponible en la ATCC. Los hibridomas son seleccionados y clonados mediante una dilución limitada. Los clones de hibridoma son entonces estudiados mediante los métodos conocidos en el campo para las células que ocultan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la invención. El fluido de ascitos, que generalmente contiene niveles altos de anticuerpos, se pueden generar mediante la inmunización de los ratones con clones de hibridoma positivos.

[0106] En consecuencia, los anticuerpos monoclonales se pueden generar al cultivar una célula de hibridoma ocultando un anticuerpo de la invención en el que, preferiblemente, el hibridoma sea generado por la fusión de esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con el EphA2 o con un fragmento del mismo con células de mieloma y la detección de los hibridomas resultantes de la fusión por clones de hibridoma que ocultan un anticuerpo capaz de unirse al EphA2.

[0107] Los fragmentos de anticuerpo que reconocen los epítomos específicos de EphA2 se pueden generar por cualquier técnica conocida por un experto en el campo. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención se pueden producir por clavaje proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas como la papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la
5 región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Además, los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar usando varios métodos fágicos de muestra conocidos en el campo.

[0108] En los métodos fágicos de muestra, los dominios del anticuerpo funcional son mostrados en la superficie de las partículas fágicas que portan las secuencias de polinucleótido que las codifica. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL son amplificadas a partir de las bibliotecas ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de
10 ADNc humanas o murinas de tejidos linfáticos). El ADN que codifica los dominios VH y VL son recombinados juntos con un enlazador scFv mediante PCR y clonado en un vector fagémido (por ejemplo, p CANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector es electroporado en *E. coli* y el *E. coli* es infectado con la fagia ayudante. La fagia usada en estos métodos es típicamente fagia filamentosa que incluye fd y M13 y los dominios VHy VL son normalmente recombinantemente fusionados con el gen fágico III o con el gen fágico VIII. La fagia que expresa un dominio de unión de antígeno que se
15 une al epítomo de interés EphA2 se puede seleccionar o identificar con el antígeno, por ejemplo, usando el antígeno etiquetado o el antígeno ligado o capturado a una superficie sólida. Ejemplos de los métodos de muestra fágica que se pueden usar para fabricar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descritos en Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 184:177; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic et al., 1997, *Gene* 187:9; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology* 57:191-280;
20 Solicitud Internacional N° PCT/GB91/01134; Publicación Internacional N° WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, y WO97/13844; y la Patente de Estados Unidos N° 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108.

[0109] La fagia se puede detectar por la unión al EphA2, particularmente al dominio extracelular del EphA2. La actividad agonizante del EphA2 (por ejemplo, aumentando la fosforilación del EphA2 y reduciendo los niveles de EphA2) también
25 se puede detectar.

[0110] Como se describe en las referencias anteriores, tras la selección fágica, el anticuerpo que codifica las regiones a partir de la fagia se pueden aislar y se pueden usar para generar anticuerpos completos que incluyen anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión de antígeno deseado y expresado en un huésped deseado que incluyen
30 células de mamíferos, de insectos, de plantas, de levadura y de bacterias, por ejemplo, como se describe a continuación. Las técnicas para producir recombinantemente los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear usando métodos conocidos en el campo tales como los descritos en la Publicación Internacional N° WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, *BioTechniques* 12:864; Sawai et al., 1995, *AJRI* 34:26; and Better et al., 1988, *Science* 240:1041.

[0111] Para generar los anticuerpos completos, los cebadores PCR que incluyen las secuencias de nucleótidos VH o VL, un lugar de restricción, y una secuencia extrema para proteger el lugar de restricción se pueden usar para amplificar las
35 secuencias VH o VL en los clones scFv. Utilizando las técnicas de clonación conocidas por los expertos en el campo, los dominios VH amplificados de PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante VH, por ejemplo, la región constante 4 gamma humana, y los dominios VL amplificados de PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante VL, por ejemplo, regiones constantes humanas kappa o lambda. Preferiblemente, los vectores para
40 expresar los dominios VH o VL se componen de un promotor EF-1 α , de una señal de secreción, de un lugar de clonación para el dominio variable, de dominios constantes, y de un marcador de selección como la neomicina. Los dominios VH y VL se pueden clonar en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera son entonces co-transfectados en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transientes que expresan anticuerpos de duración completa, por ejemplo, IgG,
45 usando técnicas conocidas por los expertos en el campo.

[0112] Para algunos usos que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en humanos y los ensayos de detección *in vitro*, pueden ser conveniente usar anticuerpos humanos o quiméricos. Los anticuerpos humanos son particularmente convenientes para el tratamiento terapéutico de los sujetos humanos. Los anticuerpos humanos se pueden crear mediante una variedad de métodos conocidos en el campo que incluyen los métodos fágicos de muestra arriba descritos
50 que usan las bibliotecas de anticuerpos resultantes de la secuencia de inmunoglobulina. Véase también la patente de Estados Unidos N° 4.444.887 y 4.716.111; y la publicación internacional N° WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

[0113] Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar las inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que puedan expresar genes de inmunoglobulina humana.
55 Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y de cadena ligera humana se pueden introducir al azar o por la recombinación homóloga en las células del tronco embrionario de los ratones. Alternativamente, la región variable humana, la región constante, y la región de diversidad se pueden introducir en células del tronco embrionario de los ratones además de los genes de la cadena pesada y ligera humana. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y de cadena ligera de ratón se pueden dar de manera no funcional por separado o simultáneamente con
60 la introducción de las localizaciones de la inmunoglobulina humana por la recombinación homóloga. En particular, la eliminación homocigota de la región J_H evita la producción del anticuerpo endógeno. Las células del tronco embrionario

modificadas se expanden y se microinyectan a blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos son criados para producir crías homocigotas que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos están inmunizados frente a la creación normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener a partir de ratones inmunizados y transgénicos usando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgénicos de inmunoglobulina humana escondidos en los ratones transgénicos cambian de lugar durante la diferenciación celular B, y posteriormente sufren el cambio de clase y la mutación somática. De este modo, usando una técnica, es posible producir terapéuticamente anticuerpos IgG, IgA, IgM and IgE beneficiosos. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 98/24893, WO 96/34096, y WO 96/33735; la patente de Estados Unidos N° 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318, y 5.939.598. Además, las empresas como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) se pueden relacionar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

[0114] Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo resultan de distintas moléculas de inmunoglobulinas tales como los anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo no humano y de una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir los anticuerpos quiméricos son conocidos en el campo. Véase por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; y la patente de Estados Unidos N° 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567, y 4.816.397. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una o más de las CDRs de una especie no humana y las regiones marco a partir de una molécula de inmunoglobulina humana se pueden producir usando una variedad de técnicas conocidas en el campo que incluyen, por ejemplo, el injerto de CDR (EP 239,400; publicación internacional N° WO 91/09967; y la patente de Estados Unidos N° 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), la restauración y el revestimiento (EP 592.106; EP 519.596; Radian, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al, 1994, *Protein Engineering* 7:805; and Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969), y arrastre de cadenas (patente de Estados Unidos N° 5.565.332).

En una realización específica, un anticuerpo quimérico de la invención se une inmunoespecíficamente al EphA2 y comprende una VL CDRs que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2,3, y 4. En una realización, un anticuerpo quimérico de la invención se une inmunoespecíficamente al EphA2 y comprende una VH CDR que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6,7, y 8.

En una realización preferida específica, un anticuerpo quimérico de la invención se une inmunoespecíficamente al EphA2 y comprende una VL CDR que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2,3, y 4 y además comprende una VH CDR que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6,7, y 8.

[0115] A menudo, los residuos marco en las regiones marco serán sustituidos por el correspondiente residuo del anticuerpo del donante de la CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión del antígeno. Las sustituciones marco se identifican por los métodos bien conocidos en el campo, por ejemplo, por modelar las interacciones de las CDR y de los residuos marco para identificar los residuos marco importantes para la unión del antígeno y la comparación de secuencia para identificar los residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n° 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323).

[0116] Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo o su variante o un fragmento del mismo que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos los de al menos uno, y dos, dominios variables en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo del donante) y todas o casi todas las regiones marco son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente esa de una inmunoglobulina humana. Ordinariamente, el anticuerpo contendrá las cadenas ligeras y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, el eje, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado se puede seleccionar a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y cualquier isotipo, que incluye IgG₁, IgG₂, IgG₃ y IgG₄. Usualmente el dominio constante es un complemento que fija el dominio constante donde se desea que el anticuerpo humanizado exhiba la actividad citotóxica, y la clase es típicamente IgG₁. Cuando dicha actividad citotóxica no se desea, el dominio constante puede ser de clase IgG₂. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y seleccionar los dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la técnica ordinaria conocida en el campo. El marco y las regiones CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente con las secuencias parentales, por ejemplo, el donante de CRD o el marco consensuado puede ser mutagenizado por sustitución, inserción o eliminación de al menos un residuo para que la CDR o el residuo marco en ese lugar no se corresponda con el consenso o el anticuerpo de importación. Dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensivas. Usualmente, al menos el 75% de los residuos de anticuerpos humanizados se corresponderá con aquellos de la región marco regional (FR) y de las secuencias CDR, más a menudo el 90%, y más preferiblemente mayor del 95%. Los anticuerpos humanizados se

pueden producir usando una variedad de técnicas conocidas en el campo, que incluyen, entre otros, el injerto-CDR (la patente europea N° EP 239.400; la publicación internacional N° WO 91/09967; y la patente de Estados Unidos N° 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), la restuaración y el revestimiento (la patente europea N° EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; and Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973), el arraste de cadenas (la patente de estados Unidos N° 5.565.332), y las técnicas descritas en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, la publicación internacional N° WO 9317105, Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25, Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60, Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79, Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84, Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904, Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s, Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10, Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73, Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525, Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323, and Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. A menudo, los residuos marco en las regiones marco serán sustituidos por los residuos correspondientes a partir del anticuerpo del donante de CDR para alterar, y preferiblemente mejorar la unión del antígeno. Estas sustituciones marco son identificadas por métodos conocidos en el campo, por ejemplo, por la modelación de las interacciones de las CDR y los residuos marco para identificar residuos marco importantes para la unión del antígeno y la secuencia comparada para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al., la patente de Estados Unidos N° 5.585.089; and Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323, ies.).

[0117] Además, los anticuerpos de la invención pueden, a su vez, se utilizados para generar anticuerpos antiidiotipos usando las técnicas bien conocidas en el campo. (Véase, por ejemplo, Greenspan & Bona, 1989, *FASEB J.* 7:437-444; and Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147:2429-2438). La invención proporciona los métodos que emplean el uso de los policleótidos que se componen de una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo.

5.1.3 Polinucleótidos que codifican a un anticuerpo

[0118] Los métodos de la invención también engloban los polinucleótidos que hibridizan bajo condiciones de hibridización de alta, media y baja estringencia, por ejemplo, como define supra, para los polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención.

[0119] Los polinucleótidos se pueden obtener, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos se puede determinar, por cualquier método conocido en el campo. Puesto que las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos son conocidos, las secuencias de nucleótidos que codifican estos anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien conocidos en el campo, es decir, codones de nucleótidos conocidos por codificar los aminoácidos particulares se acoplan de tal manera para generar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede acoplar a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17:242), que, por poco tiempo, implica la síntesis de los oligonucleótidos sobrepasados que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, ligando esos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

[0120] Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo se puede generar a partir de un ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero se conoce la secuencia de la molécula del anticuerpo, (véase por ejemplo, FIG. 16), un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina se puede sintetizar químicamente a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, un anticuerpo de una biblioteca de ADNc o de una biblioteca de ADNc generada, o del ácido nucleico, preferiblemente poli+ A+ RNA, aislado de cualquier tejido o de células que expresan el anticuerpo, tales como las células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención, por ejemplo, el clon depositado en la ATCC con n° de registro PTA-4380) por amplificación del PCR usando cebadores sintéticos hibridizables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante la clonación usando una sonda de oligonucleótidos específicos para la secuencia genética particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden ser clonados en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en el campo.

[0121] Una vez la secuencia de nucleótidos del anticuerpo se determina, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo se puede manipular usando métodos bien conocidos en el campo para la manipulación de las secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas recombinantes de ADN, mutagénesis dirigida al lugar, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel et al., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, que están incluidas por referencia aquí en el documento), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, extirpaciones y/o inserciones.

[0122] En una realización específica, una o más de las CDRs se insertan dentro de las regiones marco usando técnicas de ADN recombinantes rutinarias. Las regiones marco pueden ser regiones marco naturalmente ocurrentes o consensuadas, y preferiblemente regiones marco humanas (véase por ejemplo, Chothia et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 para un listado de regiones marco humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y de las CDRs codifica un anticuerpo que se une de manera específica al EphA2. Preferiblemente, como discute supra, una o más sustituciones de aminoácidos se pueden realizar dentro de las regiones marco y

preferiblemente las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo con su antígeno. Adicionalmente, tales métodos se pueden usar para realizar las sustituciones o extirpaciones de los aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace de disulfida intracadenal para generar las moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces de disulfida intracadenal. Otras alteraciones de los polinucleótidos se engloban en la presente invención y dentro de lo que se conoce en el campo.

5.1.4 Expresión recombinante de un anticuerpo

[0123] La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, derivado y análogo o de fragmento del mismo, (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o de una porción de la misma o un anticuerpo de cadena única de la invención), requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo. Una vez se ha obtenido un polinucleótido que codifique una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción de la misma (preferiblemente, pero no necesariamente que contenga el dominio variable de cadena pesada o ligera), el vector para la producción de la molécula del anticuerpo se puede producir por la tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en el campo. De este modo, se describen aquí los métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica la secuencia de nucleótidos. Los métodos que son bien conocidos por aquellos expertos en el campo se pueden usar para construir los vectores de expresión que contienen un anticuerpo que codifica las secuencias y las señales de control translacional y de transcripción adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, las técnicas de ADN recombinantes *in vitro*, las técnicas sintéticas, y la recombinación genética *in vivo*. La invención, por tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican una molécula de anticuerpo de la invención, una cadena pesada o ligera del anticuerpo, una dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, una CRD cadena pesada o ligera, operablemente unida a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifican la región constante de la molécula del anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente de Estados Unidos N° 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en un vector para la expresión de toda la cadena pesada, de toda la cadena ligera o de ambas cadenas.

[0124] El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas son entonces cultivadas mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Así, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o una porción del mismo, o un anticuerpo de cadena única de la invención, operablemente unido a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de cadena doble, los vectores que codifican tanto la cadena pesada como la ligera pueden ser co-expresados en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, como se detalla a continuación.

[0125] Una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped se pueden utilizar para expresar las moléculas del anticuerpo de la invención (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.807.715). Tales sistemas de expresión del huésped representan vehículos por los que las secuencias codificantes de interés se pueden producir y posteriormente se pueden purificar, pero también representan las células que pueden, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias codificantes de nucleótidos adecuadas, expresar una molécula del anticuerpo de la invención *in situ*. Éstas incluyen, entre otros, a microorganismos como la bacteria (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformada con el ADN bacteriofágico recombinante, el ADN de plasmida o los vectores de expresión del ADN cósmido que contienen las secuencias codificantes de anticuerpo; la levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen las secuencias codificantes del anticuerpo; los sistemas de células de insectos infectadas con los vectores recombinantes de expresión del virus (por ejemplo, baculovirus) que contiene las secuencias codificantes de anticuerpo; los sistemas celulares de plantas infectados con los vectores recombinantes de expresión del virus (por ejemplo, virus mosaico de lac coliflor, CaMV; virus mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plasmida recombinante (por ejemplo, plasmida Ti) que contiene el anticuerpo que codifica las secuencias; o los sistemas celulares de los mamíferos (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, NS0, y 3T3 cells) albergando constructores de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de la metalotioneína) o de los virus de los mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor del virus de la vacuna 7,5K). Preferiblemente, las células de las bacterias como la *Escherichia coli*, y más preferiblemente, las células eucariótidas, sobre todo para la expresión de toda la molécula del anticuerpo recombinante, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de los mamíferos tales como las células de ovario del hámster chino (CHO), en conjunción con un vector como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor de un citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para los anticuerpos (Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; and Cockett et al., 1990, *BioTechnology* 8:2). En una realización específica, la expresión de las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos o los fragmentos de los mismos que se unen inmunoespecíficamente y agonizan se regula mediante un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido.

[0126] En sistemas bacteriológicos, un número de vectores de expresión pueden ser seleccionados de manera beneficiosa dependiendo del uso previsto para la molécula del anticuerpo que está expresado. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de una proteína se tiene que producir, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula del anticuerpo, los vectores que dirigen la expresión de niveles altos de los productos proteínicos de fusión que

son fácilmente purificados pueden ser aconsejables. Tales vectores incluyen, entre otros, el vector de expresión *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO 12:1791), en el que el anticuerpo que codifica la secuencia puede estar ligado individualmente al vector en un marco con el lac Z que codifica la región para que se produzca una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también se pueden usar para expresar los polipéptidos extraños como las proteínas de fusión con glutatona 5-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden fácilmente ser purificadas a partir de células lisadas por adsorción y unión a gotas de glutatona-agarosa de matriz seguidas de la elución en presencia de la glutatona libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir trombina o los lugares de clavaje de la proteasa del factor Xa para que el producto genético de objetivo clonado se pueda liberar a partir de una porción de GST.

[0127] En un sistema de insectos, el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar los genes extraños. El virus crece en las células *Spodoptera frugiperda*. El anticuerpo que codifica la secuencia se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen poliédrico) del virus y colocarlo bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor poliédrico).

[0128] En células huésped de mamíferos, un número de sistemas de expresión basados en virales se puede utilizar. En aquellos casos en los que un adenovirus se usa como un vector de expresión, el anticuerpo que codifica la secuencia de interés puede ligarse a una transcripción de adenovirus/complejo de control de traducción, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia tripartita del líder. El gen quimérico puede entonces ser insertado en un genoma del adenovirus por una recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, *PNAS* 81:355-359). Las señales específicas de iniciación pueden también ser requeridas para la eficiente traducción del anticuerpo insertado que codifica las secuencias. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en la fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de toda la inserción. Estas señales translacionales y exógenas de control y los codones de iniciación pueden provenir de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede resaltarse por la inclusión de los elementos potenciadores de transcripción adecuados, finalizadores de transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153:516-544).

[0129] Además, se puede elegir una variedad de células huésped que modelan la expresión de las secuencias insertadas, o modifican y procesan el producto genético en la creación específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, la glicosilación) y el proceso (por ejemplo, el clavaje) de los productos proteínicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el proceso post-translacional y para la modificación de las proteínas y los productos genéticos. Las líneas celulares adecuadas y los sistemas de huéspedes se pueden elegir para asegurar la correcta modificación y el proceso de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar las células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el correcto procesamiento de la transcripción primaria, la glicosilación y la fosforilación del producto genético. Tales células huésped de mamíferos incluyen, entre otros CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, NS1, y T47D, NS0 (una línea celular del mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), y las células CRL7030 y HsS78Bst.

[0130] Para la producción de proteínas recombinantes de larga duración y de alto rendimiento, se prefiere la expresión sólida. Por ejemplo, se pueden diseñar las líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Más que usando los vectores de expresión que contienen orígenes virales de réplica, las células huésped se pueden transformar con el ADN controlado por los elementos de control de expresión adecuados (por ejemplo, promotor, intensificador, secuencias, finalizador de transcripciones, lugares de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Siguiendo la introducción del ADN extraño, las células diseñadas pueden permitirse el crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y entonces cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido a sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez puedan ser clonados y expandidos en líneas celulares. Este método se puede usar de manera ventajosa para diseñar líneas celulares que expresen la molécula del anticuerpo. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente ventajosas en la detección y evaluación de las composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula del anticuerpo.

[0131] Se puede usar un número de sistemas de selección, que incluye, entre otros, la quinasa de timidina del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, *Cell* 11:223), la sintasa de glutamina, el fosforribosiltransferasa de guanina hipoxantina (Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202), y fosforribosiltransferasa de adenina (Lowy et al., 1980, *Cell* 22:8-17) los genes se pueden emplear en células tk-, gs-, hgprt- or aprt-, respectivamente. También, se puede usar la resistencia antimetabólica como la base de la selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confieren resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, *PNAS* 77:357; O'Hare et al., 1981, *PNAS* 78:1527); *gpt*, que confieren resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, *PNAS* 78:2072); neo, que confieren resistencia a la aminoglicosida G-418 (Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573; Mulligan, 1993, *Science* 260:926; and Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191; May, 1993, TIB TECH 11:155-); y *hygro*, que confieren resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, *Gene* 30:147). Los métodos comúnmente conocidos en el campo de tecnología recombinante del ADN pueden ser rutinariamente solicitados para

seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos como se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1.

5 **[0132]** Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentar por la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Desde que la región amplificada se asocia con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

15 **[0133]** La célula huésped puede ser co-transfectada con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica una cadena pesada derivada de un polipéptido y el segundo vector que codifica una cadena ligera derivada de polipéptido. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la misma expresión de los polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera. Alternativamente, un vector único codificante puede usarse, y es capaz de expresar, los polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debería ser colocada antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; and Kohler, 1980, *PNAS* 77:2197). Las secuencias que codifican las cadenas pesadas y ligeras puede comprender ADNc o ADN genómico.

20 **[0134]** Una vez la molécula del anticuerpo de la invención se ha producido por expresión recombinante, puede ser purificada por cualquier método conocido en el campo para la purificación de las moléculas de la inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, el intercambio de iones, la afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico tras la Proteína A, y la evaluación de la cromatografía de la columna), la centrifugación, la solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica para la purificación de las proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismo se pueden fusionar con secuencias de polipéptidos heterólogos aquí descritas o conocidas en el campo para facilitar la purificación.

5.2 Métodos profilácticos/terapéuticos

30 **[0135]** La presente invención engloba los anticuerpos para tratar, prevenir o gestionar un trastorno asociado con la sobreexpresión del EphA2, preferiblemente, el cáncer, en un sujeto que comprende la administración de uno o más anticuerpos agonísticos EphA2 y opcionalmente de los anticuerpos de epítomos BphA2 expuestos, preferiblemente uno o más anticuerpos monoclonales agonísticos EphA2 (o anticuerpos de alguna otra fuente de una especie de anticuerpo única) y opcionalmente anticuerpos de epítomos EphA2 expuestos. En una realización específica, el trastorno para ser tratado, prevenido, o gestionado es un cáncer maligno. En otra realización específica, el trastorno para ser tratado, prevenido o gestionado es una condición precancerosa asociada con células que sobreexpresan el EphA2. En realizaciones más específicas, la condición precancerosa es la neoplasia intraepitelial prostática de grado alto (PIN), el fibroadenoma de mama, la enfermedad fibroquística, o el compuesto nevo.

40 **[0136]** En una realización, los anticuerpos de la invención pueden ser administrados en combinación con uno o más agentes terapéuticos beneficiosos en el tratamiento, prevención o gestión del cáncer. En determinadas realizaciones, uno o más anticuerpos EphA2 de la invención son administrados a un mamífero, preferiblemente a un humano, simultáneamente con uno o más de los otros agentes terapéuticos beneficiosos para el tratamiento oncológico. El término "simultáneamente" no está limitado a la administración de los agentes profilácticos o terapéuticos a la vez, sino que más bien significa que los anticuerpos EphA2 de la invención y el otro agente son administrados a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos de la invención pueden actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si fueran administrados de otra forma. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico puede administrarse a la vez o en secuencia en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo; sin embargo, si no se administran a la vez, deberían ser administrados lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico se puede administrar por separado, en una forma y por una vía de administración adecuada. En otras realizaciones, los anticuerpos EphA2 de la invención son administrados antes, a la vez o después de la cirugía. Preferiblemente, la cirugía elimina por completo los tumores localizados o reduce el tamaño de los tumores grandes. La cirugía también se puede realizar como medida preventiva o para aliviar el dolor.

55 **[0137]** En varias realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos son administrados en menos de 1 hora aparte, en alrededor de 1 hora aparte, en alrededor de una 1 hora a 2 horas aparte, en alrededor de 2 horas a 3 horas aparte, en alrededor de 3 horas a 4 horas aparte, en alrededor de 4 horas a 5 horas aparte, en alrededor de 5 horas a 6 horas aparte, en alrededor de 6 horas a 7 horas aparte, en alrededor de 7 horas a 8 horas aparte, en alrededor de 8 horas a 9 horas aparte, en alrededor de 9 horas a 10 horas aparte, en alrededor de 10 horas a 11 horas aparte, en alrededor de 11 horas a 12 horas aparte, no más de 24 horas aparte o no más de 48 horas aparte. En realizaciones preferidas, dos o tres componentes son administrados durante una misma visita al paciente.

[0138] La cantidad y la frecuencia de administración de las dosis proporcionadas aquí están englobadas por los términos terapéutica y profilácticamente efectivos. Las dosis y la frecuencia variarán de acuerdo con los factores específicos de

cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos y profilácticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta, y la historia médica del paciente. Los regímenes adecuados se pueden seleccionar por uno de los expertos en el campo mediante la consideración de dichos factores y siguiendo, por ejemplo, con las dosis presentadas en el material publicado y recomendado en el Physician's Desk Reference (56th ed, 2002).

5.2.1 Población de pacientes

[0139] La invención proporciona los anticuerpos para tratar, prevenir y gestionar el cáncer mediante la administración a un sujeto de una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de uno o más anticuerpos EphA2 de la invención. En otra realización, los anticuerpos EphA2 de la invención pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos. El sujeto es preferiblemente un mamífero como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono, como un mono cinomolgo y un humano). En una realización preferida, el sujeto es un humano.

[0140] Los ejemplos específicos de los cánceres que pueden ser tratados por los anticuerpos englobados por la invención incluyen, entre otros, los cánceres que sobreexpresan el EphA2. En una realización adicional, el cáncer es de origen epitelial. Los ejemplos de dichos cánceres son el cáncer de pulmón, colon, próstata, mama y piel. Los cánceres adicionales están incluidos en el apartado siguiente 5.2.1.1. En realizaciones particulares, los métodos de la invención se pueden usar para tratar y/o prevenir las metástasis de tumores primarios.

[0141] Los anticuerpos y composiciones de la invención comprenden la administración de uno o más anticuerpos EphA2 de la invención a sujetos que padecen o esperan padecer un cáncer, por ejemplo, que tienen una predisposición genética a un particular tipo de cáncer, habiendo sido expuestos a un carcinógeno, o están en remisión de un particular cáncer. Tal y como se emplea aquí, el "cáncer" hace referencia a los cánceres primarios o metastásicos. Dichos pacientes pueden o no haber sido tratados previamente de cáncer. Los anticuerpos y composiciones de la invención pueden ser usados como un tratamiento oncológico de primera línea o de segunda línea. Incluidos en la invención se encuentran también el tratamiento de los pacientes que han experimentado otras terapias oncológicas y los anticuerpos y composiciones de la invención se pueden usar antes de que se produzca cualquier efecto secundario o cualquier tipo de intolerancia a esas otras terapias. La invención también engloba los anticuerpos para tratar o mejorar los síntomas en pacientes resistentes. En determinadas realizaciones, el hecho de que el cáncer sea resistente a una terapia significa que al menos alguna porción importante de las células cancerosas no se han eliminado o su división celular se ha frenado. La determinación de si las células cancerosas son resistentes se puede hacer *in vivo* o *in vitro* por cualquier método conocido en el campo para el estudio de la efectividad del tratamiento de células cancerosas, usando los significados de "resistente" aceptados en el campo en dicho contexto. En diversas realizaciones, un cáncer es resistente cuando el número de células cancerosas no se ha reducido de forma significativa, o ha aumentado. La invención también engloba los anticuerpos para prevenir el comienzo o reaparición del cáncer en pacientes predispuestos a padecer cáncer.

[0142] En realizaciones particulares, los anticuerpos EphA2 de la invención son administrados para invertir la resistencia o reducir la sensibilidad de las células cancerosas a determinados agentes hormonales, de radiación o quimioterapéuticos donde se resensibilizan las células cancerosas a uno o más de esos agentes, que pueden ser administrados (o continuar siendo administrados) para tratar o gestionar el cáncer, que incluye la prevención de la metástasis.

[0143] En realizaciones alternativas, la invención proporciona los anticuerpos para tratar el cáncer de los pacientes en combinación con cualquier otro tratamiento o para pacientes que han demostrado ser resistentes a otros tratamientos pero nunca más a estos tratamientos. En determinadas realizaciones, los pacientes siendo tratados por los anticuerpos de la invención son pacientes que ya han sido tratados con quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes están los pacientes resistentes y aquellos con cáncer a pesar del tratamiento con terapias oncológicas existentes. En otras realizaciones, los pacientes han sido tratados y no han sufrido la actividad de enfermedad y uno o más anticuerpos agonísticos de la invención son administrados para prevenir la reaparición del cáncer.

[0144] En realizaciones preferidas, el tratamiento existente es la quimioterapia. En realizaciones particulares, el tratamiento existente incluye la administración de quimioterapias que incluyen, entre otros, el metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiaurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatina, carboplatina, mitomicina, dacarbazina, procarbina, etoposidos, campotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, etc. Entre estos pacientes se encuentran los pacientes tratados con radioterapia, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes también se encuentran aquellos que han padecido cirugía para el tratamiento del cáncer.

[0145] Alternativamente, la invención también engloba los anticuerpos para tratar al paciente que sufre o ha sufrido radioterapia. Entre esos pacientes que están siendo o que previamente han sido tratados con quimioterapia, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia. Entre esos pacientes también se encuentran los que han padecido la cirugía para el tratamiento del cáncer.

[0146] En otras realizaciones, la invención engloba los anticuerpos para tratar a pacientes que sufren o han sufrido terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes que están siendo o han sido tratados con quimioterapia y/o radioterapia. También entre esos pacientes se encuentran aquellos que han padecido cirugía para el tratamiento del cáncer.

5 [0147] Adicionalmente, la invención también proporciona anticuerpos para el tratamiento del cáncer como una alternativa a la quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, y/o terapia biológica/inmunoterapia donde la terapia ha demostrado ser demasiado tóxica, es decir, que da lugar a efectos secundarios inaceptables o insostenibles, para el sujeto que se está tratando. El sujeto que se trata con los anticuerpos de la invención puede, opcionalmente, ser tratado con otros tratamientos de cáncer como la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia, laterapia hormonal o la terapia biológica,
10 dependiendo de qué tratamiento haya demostrado ser inaceptable o insostenible.

[0148] En otras realizaciones, la invención proporciona la administración de uno o más de los anticuerpos monoclonales agonísticos de la invención sin otras terapias oncológicas para el tratamiento del cáncer, pero aquellos que han mostrado ser resistentes a dichos tratamientos. En realizaciones específicas, a los pacientes resistentes a otras terapias de cáncer se les administran uno o más anticuerpos monoclonales agonísticos a falta de terapias oncológicas.

15 [0149] En otras realizaciones, a los pacientes con una condición precancerosa asociada con las células que sobreexpresan el EphA2 se les pueden administrar anticuerpos de la invención para tratar el trastorno y disminuir la probabilidad que hará avanzar al cáncer maligno. En realizaciones específicas, la condición precancerosa es la neoplasia intraepitelial prostática de grado alto (PIN), el fibroadenoma del mama, la enfermedad fibroquística o el compuesto nevo.

20 5.2.1.1. Cánceres

[0150] Los cánceres y los trastornos relacionados con éstos que pueden tratarse o prevenirse mediante métodos y composiciones de la presente invención incluyen pero no se limitan a cánceres de origen epitelial. Algunos ejemplos de los citados cánceres incluyen los siguientes: leucemias, tales como, la leucemia aguda, la leucemia linfocítica aguda, la leucemias mieloides agudas, como las leucemias mieloblásticas, las promielocíticas, las mielomonocíticas, las
25 monocíticas, y las eritroleucemias y el síndrome mielodisplástico; las leucemias crónicas, tales como, la leucemia mieloides (granulocítica) crónica, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia de células vellosas; la policitemia vera; los linfomas tales como la enfermedad de Hodgkin, la no enfermedad de Hodgkin; los mielomas múltiples tales como el mieloma múltiple latente, el mieloma no secretor, el mieloma osteoesclerótico, la leucemia de células plasmáticas, el plasmocitoma solitario y el plasmocitoma extramedular; la macroglobulinemia de Waldenström; la gammapatía
30 monoclonal de significado incierto; la gammapatía monoclonal benigna; la enfermedad de la cadena pesada; los sarcomas del tejido conectivo y óseo tales como el sarcoma óseo, el osteosarcoma, el condrosarcoma, el sarcoma de Ewing, el tumor de células gigantes y malignas, el fibrosarcoma óseo, el cordoma, el sarcoma periosteal, los sarcomas de tejidos blandos, el angiosarcoma (hemangiosarcoma), el fibrosarcoma, el sarcoma de Kaposi, el leiomiomasarcoma, el liposarcoma, el linfangiosarcoma, el neurilemoma, el rhabdomyosarcoma, el sarcoma sinovial; los tumores cerebrales tales
35 como, el glioma, el astrocitoma, el glioma del tronco encefálico, el ependimoma, el oligodendroglioma, el tumor no glial, el neurinoma acústico, el craneofaringioma, la meduloblastoma, la meningioma, el pineocitoma, el pineoblastoma, el linfoma cerebral primario; el cáncer de mama que incluye entre otros el adenocarcinoma, el carcinoma lobular (de células pequeñas), el carcinoma intraductal, el cáncer de mama medular, el cáncer de mama mucinoso, el cáncer de mama tubular, el cáncer de mama papilar, la enfermedad de Paget, y el cáncer de mama inflamatorio; el cáncer adrenal tales
40 como el feocromocitoma y el carcinoma adrenocortical; el cáncer tiroideo tales como el cáncer tiroideo folicular o papilar, el cáncer tiroideo medular y el cáncer tiroideo anaplástico; el cáncer pancreático tales como el insulinoma, el gastrinoma, el glucagonoma, el vipoma, el tumor secretor de somatostatina, y el tumor de células de los islotes o tumor carcinoide; los cánceres pituitarios tales como la enfermedad de Cushing, el tumor secretor de prolactina, la acromegalia, y la diabetes insípida; los cánceres de ojo tales como el melanoma ocular como el melanoma de iris, el melanoma coroidal, y
45 el melanoma de cuerpo ciliar, y el retinoblastoma; cánceres de vagina tales como el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma, y el melanoma; el cáncer de la vulva tales como el carcinoma de células escamosas, el melanoma, el adenocarcinoma, el carcinoma de células basales, el sarcoma, y la enfermedad de Paget; los cánceres cervicales tales, el carcinoma de células escamosas, y el adenocarcinoma; los cánceres de útero tales como el carcinoma de endometrio y el sarcoma uterino; los cánceres de ovario tales como, el carcinoma epitelial de ovario, el tumor de bajo potencial maligno, el tumor de células germinales, y el tumor estromal; los cánceres de esófago tales como, el cáncer escamoso,
50 el adenocarcinoma, el carcinoma quístico adenoide, el carcinoma mucoepidermoide, el carcinoma adenoescamoso, el sarcoma, el melanoma, el plasmocitoma, el carcinoma verrugoso, y el carcinoma de células de avena (células pequeñas); los cánceres de estómago tales como, el adenocarcinoma, el linfoma fungoide (polipoide), ulceroso, extensivo superficial, extensivo de manera difusa y maligno, el liposarcoma, el fibrosarcoma, y el rhabdomyosarcoma; los
55 cánceres de colon; los cánceres del recto; los cánceres de hígado tales como el carcinoma hepatocelular y el hepatoblastoma; los cánceres de vesícula biliar tales como el adenocarcinoma; los colangiocarcinomas tales como papilar, nodular y difuso; los cánceres de pulmón tales como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), el adenocarcinoma, el carcinoma de células grandes y el cáncer de pulmón de células pequeñas; los cánceres de testículo tales como el tumor germinal, el seminoma, el carcinoma
60 anaplástico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma y embrional, el teratoma carcinoma, el coriocarcinoma (tumor yolk-sac), los cánceres de próstata tales como el adenocarcinoma, el leiomiomasarcoma, y el rhabdomyosarcoma; los cánceres de pene; los cánceres orales tales como el carcinoma de células escamosas; los cánceres basales; los

cánceres de las glándulas salivares tales como el adenocarcinoma, el carcinoma mucoepidermoide, y un carcinoma adenoide quístico; los cánceres de faringe tales como el cáncer de células escamosas y verrugosas; los cánceres de piel tales como, el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas y el melanoma, el melanoma extensivo superficial, el melanoma nodular, el melanoma maligno lentigo, el melanoma lentiginoso acral; los cánceres de riñón tales como el carcinoma de células renales, el adenocarcinoma, la hipernefoma, el fibrosarcoma, el cáncer de células de transición (pelvis, renal y de útero); el tumor de Wilms; los cánceres de vejiga tales como el carcinoma de células de transición, el cáncer de células escamosas, el adenocarcinoma, el carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen el mixosarcoma, el sarcoma osteogénico, el endoteliosarcoma, el linfangioendoteliosarcoma, el mesotelioma, el sinovioma, el hemangioblastoma, el carcinoma epitelial, el cistoadenocarcinoma, el carcinoma broncogénico, el carcinoma de las glándulas sudoríparas, el carcinoma de las glándulas sebáceas, el carcinoma papilar y los adenocarcinomas papilares (para una reseña de dichos trastornos, véase Fishman et al., 1985, *Medicine*, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

[0151] Por lo tanto, los anticuerpos y composiciones de la invención también sirven/ son útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres u otras enfermedades de proliferación anormal, que incluye (entre otros) lo siguiente: carcinoma, que incluye los de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, de útero, de tiroides y de piel; incluyendo el carcinoma de células escamosas; los tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo la leucemia, la leucemia linfática aguda, la leucemia linfoblástica aguda, el linfoma de célula B, el linfoma de célula T, el linfoma de Burkitt; los tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas crónicas y agudas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo el fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, que incluyen el melanoma, el seminoma, el tetratocarcinoma, el neuroblastoma y el glioma; tumores del sistema nervioso periférico y central, que incluyen el astrocitoma, el neuroblastoma, el glioma, y los schwannomas; tumores de origen mesenquimal, que incluyen el fibrosarcoma, el rhabdomyosarcoma, y el osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen el melanoma, la xerodermia pigmentosa, el queratoactantoma, el seminoma, el cáncer folicular tiroideo y el teratocarcinoma. Se considera también que los cánceres causados por aberraciones en apoptosis también se tratarían mediante los métodos y composiciones de la invención. Los citados cánceres pueden incluir entre otros los linfomas foliculares, los carcinomas con p53 mutaciones, los tumores de mama, próstata y de ovario dependientes de hormonas, y lesiones precancerosas tales como la poliposis adenomatosa familiar, y los síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, la malignidad o los cambios disproliferativos (tales como las metaplasias y las displasias), o los trastornos hiperproliferativos, se tratan o se previenen en la piel, pulmón, colon, pecho, próstata, vejiga, riñón, páncreas, ovario o útero. En otras realizaciones específicas, el sarcoma, el melanoma, o la leucemia se trata o se previene.

[0152] En algunas realizaciones, el cáncer es maligno y sobreexpresa el EphA2. En otras realizaciones, el trastorno a tratar es una condición precancerosa asociada con las células que sobreexpresan el EphA2. En una realización específica, la condición precancerosa es neoplasia intraepitelial prostática de nivel alto (PIN), fibroadenoma del pecho/ de la mama, enfermedad fibroquística, o nevo compuesto.

[0153] En realizaciones preferidas, los anticuerpos y composiciones de la invención se usan para el tratamiento y/o prevención de los cánceres de mama, colon, ovario, pulmón y próstata y del melanoma y se indican a continuación como ejemplo más que como limitación.

40 **5.2.1.2. Tratamiento del cáncer de mama**

[0154] En realizaciones específicas, a las pacientes con cáncer de mama se les administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad efectiva de uno o más de otros agentes útiles/ ventajosos para la terapia del cáncer de mama que incluye entre otros: la doxorubicina, epirubicina, la combinación de doxorubicina y ciclofosfamida (AC), la combinación de ciclofosfamida, doxorubicina y 5-fluorouracilo (CAF), la combinación de ciclofosfamida, epirubicina y 5-fluorouracilo (CEF), herceptina, tamoxifeno, la combinación de tamoxifeno y quimioterapia citotóxica, taxanos (tales como docetaxel y paclitaxel). En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se pueden administrar con taxanos más doxorubicina y ciclofosfamida estándar para el tratamiento adyuvante del cáncer de mama localizado con/ de nodo-positivo.

50 **[0155]** En una realización específica, a los pacientes con fibroadenoma precanceroso de mama, o enfermedad fibroquística se les administra un anticuerpo EphA2 de la invención para tratar el trastorno y disminuir la probabilidad de que el cáncer de mama maligno avance.

5.2.1.3. Tratamiento del cáncer de colon

55 **[0156]** En realizaciones específicas, a los pacientes con cáncer de colon se les administra una cantidad efectiva de uno o más de los anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad efectiva de uno o más de los otros agentes ventajosos para la terapia del cáncer de colon que incluye entre otros: la combinación de 5-FU y leucovorina, la combinación de 5-FU y levamisol, irinotecán (CPT-11) o la combinación de irinotecán, 5-FU y leucovorina (IFL).

5.2.1.4. Tratamiento del cáncer de próstata

[0157] En realizaciones específicas, a los pacientes con cáncer de próstata se les administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad efectiva de uno o más de los otros agentes ventajosos para la terapia del

5 cáncer de próstata que incluye entre otros: la radioterapia externa, implantación intersticial de radioisótopos (*es decir*, I^{125} , paladio, iridio), leuprolida u otros agonistas LHRH, antiandrógenos no esteroideos (flutamida, nilutamida, bicalutamida), antiandrógenos esteroideos (acetato de ciproterona), la combinación de leuprolida y flutamida, estrógenos tales como el DES, clorotrianiseno, etinilestradiol, estrógenos conjugados U.S.P., DES-difosfato, radioisótopos, tales como el estroncio-89, la combinación de radioterapia externa y estroncio-89, terapias hormonales alternativos tales como

10 la aminoglutetimida, la hidrocortisona, la retirada de la flutamida, progesterona, y ketoconazol, prednisona en dosis baja, u otro regimenes de quimioterapia descritos para lograr una mejoría subjetiva en síntomas y una reducción en el nivel PSA que incluye docetaxel, paclitaxel, estramustina/docetaxel, estramustina/etopósido, estramustina/vinblastina, y estramustina/paclitaxel.

[0158] En una realización específica, a los pacientes con neoplasia intraepitelial prostática de grado alto precancerosa

15 (PIN) se les administra un anticuerpo EphA2 de la invención para tratar el trastorno y disminuir la probabilidad de que el cáncer de próstata progrese/ avance.

5.2.1.5. Tratamiento del melanoma

[0159] En realizaciones específicas, a los paciente con melanoma se les administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en

20 combinación con una cantidad efectiva de uno o más de los otros agentes ventajosos para la terapia del cáncer de melanoma que incluye entre otros: la dacarbazina (DTIC), nitrosoureas tales como la carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), agentes con actividad de un agente único modesto que incluye alcaloides vinca, compuestos de platino, y taxanos, el régimen Dartmouth (cisplatina, BCNU, y DTIC), interferón alfa (IFN-A), and interleucina-2 (IL-2). En una realización específica, se puede administrar una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales de la

25 invención en combinación con la perfusión hipertérmica aislada en un miembro (ILP) con melfalán (L-PAM), con o sin factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa) para pacientes con metástasis cerebrales múltiples, metástasis óseas, y compresión de la médula espinal para lograr aliviar los síntomas y una disminución del tumor con radioterapia.

[0160] En una realización específica, a los pacientes con nevo compuesto precanceroso se les administra un anticuerpo EphA2 de la invención para tratar el trastorno y disminuir la probabilidad de que el melanoma maligno progrese/ avance.

30 5.2.1.6. Tratamiento del cáncer de ovario

[0161] En realización específicas, a los pacientes con cáncer de ovario se les administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad efectiva de uno o más de los otros agentes ventajosos para la terapia de

35 cáncer de ovario que incluye entre otros: radioterapia intraperitoneal, tales como la terapia P^{32} , radioterapia pélvica y abdominal total/ completa, cisplatina, la combinación de paclitaxel (Taxol) o docetaxel (Taxotere) y cisplatina o carboplatino, la combinación de ciclofosfamida y cisplatina, la combinación de ciclofosfamida y carboplatino, la combinación de 5-FU y leucovorina, etopósido, doxorubicina liposomal, gemcitabina o topotecán. Se considera que una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales agonísticos de la invención se administra en combinación con la administración de Taxol para pacientes con enfermedad resistente al platino. El tratamiento de pacientes con cáncer

40 de ovario resistente está incluido que incluye la administración de: ifosfamida en patients con enfermedad resistente al platino, hexametilmelamina (HMM) como quimioterapia de rescate tras no haber funcionado los regimenes de combinación basados en cisplatino, y tamoxifeno en pacientes con niveles detectables de receptores de estrógeno citoplásmicos en sus tumores.

5.2.1.7. Tratamiento del cáncer de pulmón

[0162] En realizaciones específicas, a los pacientes con cáncer de células pulmonares pequeñas se les administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad efectiva de uno o más de los otros agentes ventajosos para la terapia del cáncer de pulmón que incluye entre otros: radioterapia torácica, cisplatino, vincristina, doxorubicina, y etopósido, sólo o en combinación, la combinación de ciclofosfamida, doxorubicina,

50 vincristina/etopósido, y cisplatino (CAV/EP), paliación local con terapia láser endobronquial, *stents* endobronquiales, y/o la braquiterapia.

[0163] En otras realizaciones específicas, a los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas se les administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención en combinación con una cantidad efectiva de uno o más de los otros agentes ventajosos para la terapia del cáncer de pulmón que incluye entre

55 otros: radioterapia paliativa, lacombinación de cisplatino, vinblastina y mitomicina, la combinación de cisplatino y vinorelbina, paclitaxel, docetaxel o gemcitabina, la combinación de carboplatino y paclitaxel, radioterapia intersticial para lesiones endobronquiales o radiocirugía estereotáctica.

5.2.2 Otros agentes profilácticos/terapéuticos

- [0164]** En algunas realizaciones, la terapia mediante la administración de uno o más anticuerpos monoclonales se combina con la administración de una o más terapias tales como, entre otras, quimioterapias, radioterapias, terapias hormonales, y/o terapias biológicas/inmunoterapias. Los agentes profilácticos/ terapéuticos incluyen, entre otros, moléculas proteínicas, que incluyen entre otros, péptidos, polipéptidos, proteínas, que incluye proteínas modificadas post-traduccionales, anticuerpos, etc.; o moléculas pequeñas (menos de 1000 *daltons*), compuestos inorgánicos u orgánicos; o moléculas de ácido nucleico que incluyen, entre otros, ADN dicatenario o monocatenario, o ARN dicatenario o monocatenario, así como moléculas de ácido nucleico de triple hélice. Los agente profiláctico/ terapéutico pueden derivarse de cualquier organismo conocido (que incluyen, entre otros, animales, plantas, bacterias, hongos, y protista, o virus) o de una biblioteca/ galería de moléculas sintéticas.
- [0165]** En una realización específica, los métodos de la invención engloba/ abarca la administración de un anticuerpo de la invención en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/ terapéuticos que son inhibidores de quinasas/ cinasas tales como, entre otros, ABL, ACK, AFK, AKT (por ejemplo, AKT-1, AKT-2, and AKT-3), ALK, AMP-PK, ATM, Auroral, Aurora2, bARK1, bArk2, BLK, BMX, BTK, CAK, quinasa/ cinasa CaM, CDC2, CDK, CK, COT, CTD, DNA-PK, EGF-R, ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4, ERK (por ejemplo, ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7), ERT-PK, FAK, FOR (por ejemplo, FGF1R, FGF2R), FLT (por ejemplo, FLT-1, FLT-2, FLT-3, FLT-4), FRK, FYN, GSK (por ejemplo, GSK1, GSK2, GSK3-alfa, GSK3-beta, GSK4, GSK5), quinasas/ cinasas del receptor emparejado de la proteína G (GRKs), HCK, HER2, HKIL, JAK (por ejemplo, JAK1, JAK2, JAK3, JAK4), JNK (por ejemplo, JNK1, JNK2, JNK3), KDR, KIT, receptor IGF-1, IKK-1, IKK-2, INSR (receptor de insulina), IRAK1, IRAK2, IRK, ITK, LCK, LOK, LYN, MAPK, MAPKAPK-1, MAPKAPK-2, MEK, MET, MFPK, MHCK, MLCK, MLK3, NEU, NIK, PDGF receptor alfa, PDGF receptor beta, PHK, quinasa/ cinasa PI-3, PKA, PKB, PKC, PKG, PRK1, PYK2, quinasas/ cinasas p38, p135tyk2, p34cdc2, p42cdc2, p42mapk, p44mpk, RAF, RET, RIP, RIP-2, RK, RON, quinasa/ cinasa RS, SRC, SYK, S6K, TAK1, TEC, TIE1, TIE2, TRKA, TXK, TYK2, UL13, VEGFR1, VEGFR2, YES, YRK, ZAP-70, y todos los subtipos de estas quinasas/ cinasas (véase por ejemplo, Hardie and Hanks (1995) *The Protein Kinase Facts Book, I and II*, Academic Press, San Diego, Calif.). En realizaciones preferidas, se administra un anticuerpo de la invención en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/ terapéuticos que son inhibidores de las quinasas/ cinasas receptoras del Eph (por ejemplo, EphA2, EphA4). En una realización mayormente preferida, se administra un anticuerpo de la invención en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/ terapéuticos que son inhibidores del EphA2.
- [0166]** En otra realización específica, los anticuerpos de la invención engloban la administración del anticuerpo de la invención en combinación con la administración de uno o más agentes profilácticos/ terapéuticos que son inhibidores de la angiogénesis tales como, entre otros: Angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina antiangiogénica III; Angiozyme; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado del cartílago (IDC); CAI; fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento XVIII de colágeno); fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinasas; fragmento hexasacárido de Heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; Interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por Interferón (IP-10), Interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de metaloproteínasa (TIMPs); 2-Metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de la ribonucleasa placentaria; inhibidor del activador plasminógeno; factor-4 platelet (PF4); Prinomastat; fragmento de Prolactina de 16kD; proteína relacionada con la Proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastat; Escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahydrocortisol-S; tetrathiomolybdate; talidomida; Trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; Transforming growth factor-beta de crecimiento transformador/ transformante (TGF-β); Vasculostatina; Vasoestatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD6474; inhibidores de transferasa farnesil (FTI); y bisfosfonatos.
- [0167]** En otra realización específica, los métodos de invención engloban la administración de un anticuerpo de la invención en combinación con la adminitración de uno o más agentes profilácticos/ terapéuticos que son agentes anti-cáncer tales como, entre otros: acivicina, aclarrubicina, clorhidrato de acodazol, acronina, adozelesin, aldesleukina, altretamina, ambomicina, acetato de metantrona, aminoglutetimida, ansacrina, anastrozol, antramincina, asparaginasa, asperlina, azacitidina, azetepa, azotomicina, batimastat, benzodopa, bicalutamida, clorhidrato de bisantrene, bisnafide dimesylate, bicelesina, sulfato de bleomicina, sodio de Brequinar, bropirimina, busulfán, cactinomicina, calusterona, caracemida, carbetimer, carboplatino, carmustina, clorhidrato de carrubicina, carcelesina, cedefingol, clorambucil, cirolemicina, cisplatino, cladribina, mesilato de crinamol, ciclofosfamida, citarrabina, dacarbacina, dactinomicina, clorhidrato de daunorrubicina, decarbacina, decitabina, dexormaplatino, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diacuona, docetaxel, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifene, citrato de droloxifene, dromostanolone propionato de drostanolona, duazomicina, edatrexato, clorhidrato de eflornitina, elsamitrucina, enloplatino, empromato, epipropidina, clorhidrato de epirubicina, erbulozole, clorhidrato de esorubicina, estramustina, sodio de fosfato de estramustina, etanidazole, etopósido, fosfato de etopósido, etoprina, clorhidrato de fadrozol, fazarrabina, fenretinida, floxuridina, fosfato de fludarrabina, fluorouracil, flurocitabina, fosquidona, sodio de fostriecina, gemcitabina, clorhidrato de gemcitabina, hidroxurea, clorhidrato de idarrubicina, ifosfamida, ilmofosina, interleukina 2 (que incluye interleukina 2 recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón alfa-n3, interferón beta-I a, interferón gamma-I b, ioproplatina, clorhidrato de irinotecano, acetatp de lanreotido, letrozola, acetato de leuprolido, clorhidrato de liarozola, sodio de lometrexol, lomustina, clorhidrato de losoxantrona, masoprocol, maitansina, clorhidrato de meclorretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalán, menogaril, mercaptopurina, metotrexato,

sodio de metotrexato, metoprina, meturedapa, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogillina, mitomalcina, mitomicina, mitospera, mitotana, clorhidrato de mitoxantrona, ácido micofenólico, nitrosoureas, nocodazol, nogalamicina, ormaplatina, oxisuran, paclitaxel, pegaspargasa, peliomicina, pentamustina, sulfato de peplomicina, perfosfamida, pipobroman, pipsulfan, clorhidrato de piroxantrona, plicamicina, plomestano, sodio de porfímero, porfíromicina, 5 prednimustina, clorhidrato de procarbazona, puomicina, clorhidrato de puomicina, pirazofurina, riboprina, rogletimida, safingol, clorhidrato de safingol, semustina, simtrazena, sodio de esparfosato, esparsomicina, clorhidrato de espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, estreptonigrina, estreptozocina, sulofenur, talisomicina, sodio de tecogalan, tegafur, clorhidrato de teloxantrona, temoporfina, teniposida, teroxirona, testolactona, tiamiprina, tioguanina, tiotepa, tiazofurina, tirapazamina, citrato de toremifena, acetato de trestolono, fosfato de tricirribina, trimetrexato, glucuronato de 10 trimetrexato, triptorrelina, clorhidrato de tubulozolo, mostaza uracil, uredepa, vapreotida, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de vinleurosina, tartrato de vinorrelbina, sulfato de vinrosidina, sulfato de vinzolidina, vorozolo, zeniplatina, zinostatina, clorhidrato de zorrubicina. Otros fármacos anticancerosos incluyen, entre otros 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3, 5- etiniluracil, abiraterona, aclarubicina, acilfulvena, adecipenol, adozelesina, aldesleukina, antagonistas ALL-TK, 15 altretamina, ambamustina, amidox, amifostina, ácido aminolevulínico, amrrubicina, amsacrina, anagrelido, anastrozol, andrografolida, inhibidores de angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelix, Proteína-1 morfogenética anti-dorsalizing, antiandrógenos, antiestrógenos, antineoplastona, glicinato de afidicolina, moduladores genéticos de apoptosis, reguladores de apoptosis, ácido apurínico, ara-CDP-DL-PTBA, deaminasa arginina, asulacrina, atamestano, atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina 3, azasetron, azatoxina, azatirosina, derivados de bacatin III, 20 balanol, batimastat, antagonistas BCR/ABL, benzoclorinos, benzoilstaurosporina, derivados betalactámicos, beta-aletina, betaclamina B, ácido betulínico, inhibidor bFGF, bicalutamida, bisantreno, bisaziridinilispermina, bisnafida, bistrateno A, bizelesina, breflato, bropirimina, budotitana, sulfomixina de butiniona, calcipotriol, calfostin C, derivados de camptotecina, canaripox IL-2, capecitabina, carboxamida-amino-triazole, carboxiamidotriazole, CaRest M3, CARN 700, inhibidor derivado del cartílago, carzelesina, inhibidores de la quinasa caseína (ICOS), castanospermina, cecropina B, cetorelix, 25 sulfonamida de cloroquinaxalina, cicaprost, cis-porpirina, cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazole, colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogo de combretastatina, conagenina, crambescidina 816, crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentantraquinones, cicloplatam, cipemicina, ocfostado de citarrabina, factor citólico, citostatina, dacliximab, decitabina, dehidrodidemnina B, deslorelina, dexametasona, dexifosfamida, dexrazoxano, dexverapamil, diaziquono, didemnina B, didox, dietilnorspermina, dihidro-5-azacitidina, dihidrotaxol, dioxamicina, 30 espiromustina de difenil, docetaxel, docosanol, dolasetron, doxifluridina, droloxifeno, dronabinol, duocarmicina SA, ebselen, ecomustina, edelfosina, edrecolomab, eflornitina, elemene, emitefur, epirubicina, epristerida, análogo de estramustina, agonistas de estrógeno, antagonistas de estrógeno, etanidazole, fosfatos de etopósidos, exemestano, fadrozole, fazarrabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol, flezelastina, fluasterona, fludarrabina, hidrocloreuro de fluorodauronunicina, forfenimex, formestano, fostriecin, fotemustina, texafirina de gadolinio, nitrato de galio, 35 galocitabina, ganirelix, inhibidores de gelatinasa, gemcitabina, inhibidores de glutatión, hepsulfam, heregulina, bisacetamida de hexametileno, hiperricina, ácido ibandrónico, idarrubicina, idoxifene, idramantono, ilmofosina, ilomastat, imidazoacridones, imiquimod, péptidos inmunostimulantes, inhibidor receptor del factor-1 de crecimiento de la insulina, agonistas de interferón, interferones, interleukinas, iobenguano, iododoxorrubicina, ipomeanol, iroplact, irsogladina, isobengazole, isohomohalicondrina B, itasetron, jasplakinolide, kahalalida F, triacetato de lamelarina-N, lanreotido, 40 leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinano, leptostatina, letrozole, factor inhibidor de leucemia, interferón alfa de leucocitos, leuprolida+estrógeno+progesterona, leuprorelina, levamisole, liarozole, análogo de poliamina lineal, péptido de disacarida lipofílica, compuestos de platino lipofílico, lisoclinamida 7, lobaplatin, lombricina, lometrexol, lonidamino, losoxantrone, lovastatina, loxoribine, lurtotecan, texafirina de lutecio, lisofilina, péptidos líticos, maitansina, manostatina A, marimastat, masoprocol, maspina, inhibidores de matrilisina, inhibidores de la metaloproteína matriz, menogaril, 45 merbarona, meterelin, metioninasa, metoclopramida, inhibidor MIF, mifepristone, miltefosina, mirimostim, ARN dicatenario no emparejado, mitoguazone, mitolactol, análogos de mitomicina, mitonafida, factor-saporin de crecimiento de fibroblasto de mitoxina mitoxin, mitoxantrone, mofarotene, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana, lípido monofosforil A+pared celular miobacteriana sk, mopidamol, inhibidor genético a la resistencia de multifármaco, terapia basada-1 en supresor de tumor múltiple, agente anticanceroso de mostaza, micaperoxido B, 50 extracto de pared celular micobacterial, miriaporone, N-acetiltilidinalino, benzamidas sustitutas-N, nafarelina, nagrestip, naloxone+pentazocine, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatina, nemorubicina, ácido neridróico, endopeptidasa neutral, nilutamida, nisamicina, moduladores de óxido nítrico, antioxidante de nitrógeno, nitrulina, octreótido de benzilguanina-O6, okicenone, oligonucleótidos, onapristone, ondansetron, oracina, inductor de citokina oral, ormaplatina, osaterone, oxaliplatina, oxanomicina, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, 55 palmitoilrrizoxina, ácido pamidróico, panaxytriol, panomifene, parabactina, pazelitina, pegaspargasa, peldesina, sodio de polisulfato de pentosan, pentoestatina, pentozole, perflubron, perfosfamida, alcohol de perill, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa, picibanila, hidrocloreuro de pilocarpina, piritrexim, placetin A, placetin B, inhibidor del activado plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo de platino-triamina, sodio porfímero porfíromicina, prednisone, bis-acridone propil, prostaglandina J2, inhibidores de proteasoma, modulador inmunológico basado en la proteína-A, inhibidor de la quinasa C de la proteína, inhibidores de la quinasa C de la proteína, microalgal, inhibidores de la fosfatasa tirosina de la proteína, inhibidores de fosforilasa nucleósidos purinos, purpurinas, pirazoloacridina, conjugado de polioxi-etileno de hemoglobina piridoxilatada, antagonistas raf, raltitrexed, 60 remosetron, inhibidores de la transderasa de la proteína farnesil, inhibidores ras, inhibidores ras-GAP, demetilado de reteliptina, etidrono Re 186 de renio, rizoxina, ribozimas, retinamida RII, rogletimida, rohitukina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxil, safingol, saintopina, SarCNU, sarcositol A, sargramostima, miméticos Sdi 1, semustina, inhibidor 1 derivado de la senescencia, oligonucleótidos del sentido, inhibidores de la transducción de señales, modulares de la

transducción de señales, proteína ligada al antígeno de cadena única, sizofiran, sobuzoxano, borocaptato de sodio, fenilacetato de sodio, solverol, proteína ligada a la somatomedina, sonermina, ácido esparfósico, espicamicina D, espiromustina, esplenopentina, espongiatina 1, esqualamina, inhibidores de la célula troncal, inhibidores de la división de la célula troncal, estipiámina, inhibidores de estromelina, sulfinosina, antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsonina, glicosaminoglicanos sintéticos, talimustina, metiótido de tamoxifeno, taumustina, taxol, tazarotene, sodio de tecogalan, tegafur, telurapirilio, inhibidores de telomerasa, temoporfina, temozolomide, teniposido, tetraclorodecaóxido, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiocoralina, tioguanina, trombopoietina, mimética de trombopoietina, timalfasina, agonista receptor de timopoiética, timotrinan, hormona estimuladora de la tiroides, etiopurpurina de etilo de estaño, tirapazamina, bicloruro de titanoceno, topsentina, toremifeno, factor de la célula troncal totipotente, inhibidores de traducción, tretinoin, triacetiluridina, tricirribina, trimetrexato, triptorelina, tropisetron, turosterida, inhibidores de la tirosina quinasa, tirfostinos, inhibidores UBC, ubenimex, factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de la uroquinasa, vaporeótido, variolina B, sistema de vector, terapia genética de eritrocito, velaresol, veramina, verdinos, verteporfina, vinorelbina, vinxaltina, vitaxina, vorozole, zanoterone, zeniplatina, zilascorb, y estimalamero de zinostatina. Otros fármacos anticancerosos adicionales preferidos son el 5-fluorouracil y la leucovorina.

[0168] En realizaciones más particulares, la presente invención también comprende la administración de uno o más anticuerpos monoclonales de la invención en combinación con la administración de una o más terapias tales como, entre otras, de los agente anti-cancerosos previstos en la Tabla 2, preferiblemente para el tratamiento de los cánceres de pecho/mama, ovario, melanoma, próstata, colon y pulmón como se describe a continuación.

20

TABLA 2

Agente Terapéutico	Administración	Dosis	Intervalos
Clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin RDF® y Adriamycin PFS®)	Intravenosa	60-75 mg/m ² al día 1	Intervalos de 21 días
Clorhidrato de epirubicina (Ellence™)	Intravenosa	100-120 mg/m ² al día 1 de cada ciclo o dividido en partes iguales y tomado los días 1-8 del ciclo	Ciclos de 3-4 semanas
fluorouracil	Intravenosa 5	Forma de administración: 5 ml y 10 ml viales (que contienen 250 y 500 mg de fluorouracil respectivamente)	
docetaxel (Taxotere®)	Intravenosa	60- 100 mg/m ² cada hora aproximadamente	Una vez cada 3 semanas
paclitaxel (Taxol®)	Intravenosa	175 mg/m ² cada 3 horas aproximadamente	Cada 3 semanas durante 4 ciclos (administrados secuencialmente con la quimioterapia de combinación que contiene doxorubicina)
Citrato de tamoxifeno (Nolvadex®)	Oral (comprimidos)	20-40 mg Las dosis mayores de 20 mg deberían administrarse en dosis divididas (mañana y noche)	Diariamente
Calcio de leucovorina mediante inyección	Inyección intravenosa o intramuscular	Forma de administración: vial de 350 mg	La dosis no queda clara en el texto. PDR3610
Acetato de leuprolide (Lupron®)	Inyección subcutánea única	1 mg (0,2 ml o 20 marca de unidad)	Una vez al día
flutamida (Eulexin®)	Oral (cápsulas)	250 mg (cápsulas que contienen 125 mg de flutamida cada una)	3 veces al día en intervalos de 8 horas (la dosis diaria total es de 750 mg)

ES 2 377 720 T3

Agente Terapéutico	Administración	Dosis	Intervalos
nilutamida(Nilandron®)	Oral (comprimido)	300 mg o 150 mg (comprimidos que contienen 50 o 150 mg de nilutamida cada uno)	300 mg una vez al día durante 30 días seguidos de 150 mg una vez al día
bicalutamida (Casodex®)	Oral (comprimido)	50 mg (comprimidos que contienen 50 mg de bicalutamida cada uno)	Una vez al día
progesterona	Inyección	50 mg/ml de USP en aceite de sésamo	
ketoconazol (Nizoral®)	En crema	2% de crema aplicada una o dos veces al día dependiendo de los síntomas	
prednisona	Oral (comprimido)	La dosis inicial puede variar de 5 mg a 60 mg al día	
		Dependiendo de la entidad de enfermedad específica que se está tratando	
Sodio de fosfato de estramustina (Emcyt®)	Oral (cápsulas)	14 mg/ kg del peso corporal (es decir una cápsula de 140 mg por cada 10 kg o 22 lb del peso corporal)	Diariamente suministrada en 3 o 4 dosis divididas
Etopósido o VP-16	Intravenosa	Solución de 5 ml de 20 mg/ ml (100 mg)	
dacarbazina (DTIC-Dome®)	Intravenosa	2-4,5 mg/kg	Una vez al día durante 10 días. Se puede repetir en intervalos de 4 semanas
polifeprosan 20 con implante de carmustina (BCNU) (nitrosourea) (Gliadel®)	Oblea colocada en la cavidad de inserción	8 obleas, cada uno conteniendo 7,7 mg de carmustina, por un total de 61,6 mg, según el tamaño y la forma de la cavidad de inserción lo permite	
cisplatina	Inyección	[n/a en PDR 861] Forma de administración: solución de 1 mg/ml en viales de multidosis de 50mL y 100mL	
mitomicina	Inyección	Suministrado en viales de 5 mg y 20 mg (que contienen 5 mg and 20 mg de mitomicina)	
gemcitabina (Gemzar®)	HCl Intravenosa	Los horarios NSCLC- 2 han sido investigados y el horario de dosificación óptimo no ha sido determinado si un horario de 4 semanas-administración intravenosa de 1000 mg/m ² durante 30 minutos en horario de 3-Gemzar administrado intravenosamente de 1250 mg/m ² durante 30 minutos	El horario de 4 semanas-Los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días. 100 mg/m ² de cisplatina intravenosamente en el día 1 tras la infusión de Gemzar. El horario de 3 semanas- Los días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. Se administra cisplatina intravenosamente en una dosis de 100 mg/m ² tras la administración de Gemzar el día 1.

Agente Terapéutico	Administración	Dosis	Intervalos
carboplatina (Paraplatin®)	Intravenosa	Terapia de agente único: 360 mg/m ² I.V. el día 1 (la infusión dura 15 minutos o más) Otros cálculos de la dosis: Terapia de combinación con ciclofosfamida, Recomendaciones de ajuste de la dosis, Dosis de la fórmula, etc.	Every 4 weeks
ifosamida (Ifex®)	Intravenosa	1.2 g/m ² diariamente	5 días consecutivos. Repetir cada 3 semanas o tras la recuperación de la toxicidad hematológica
Hidrocloruro de topotecan (Hycamtin®)	Intravenosa	1.5 mg/m ² por infusión intravenosa durante 30 minutos al día	5 días consecutivos, empezando el día 1 de un ciclo de 21 días

[0169] La invención también engloba la administración de los anticuerpos EphA2 de la invención en combinación con la radioterapia que comprende el uso de rayos-x, rayos-gamma y otras fuentes de radiación para destruir las células cancerosas. En realizaciones preferidas, el tratamiento con radiación se administra como radiación de destellos externos o teleterapia donde la radiación se dirige desde una fuente remota. En otras realizaciones preferidas, el tratamiento con radiación se administra como una terapia interna o braquiterapia donde una fuente radioactiva se coloca dentro del cuerpo cerca de las células cancerosas o de una masa tumoral.

[0170] Las terapias contra el cáncer y sus dosis, las vías de administración y el uso recomendado son conocidos en el campo y han sido descritos por escrito en el Physician's Desk Reference (56th ed., 2002).

10 5.3 Identificación de los anticuerpos de la invención

5.3.1 Anticuerpos agonísticos

[0171] Los anticuerpos de la invención agonizan (*es decir*, obtener la fosforilación del EphA2) y se unen de manera inmunológica al receptor del EphA2. Cuando están agonizados, el EphA2 se fosforiliza y en consecuencia se degrada/degenera. Cualquier método conocido en la técnica para estudiar el nivel de la fosforilación, la actividad o la expresión del EphA2 pueden utilizarse/emplearse para estudiar los anticuerpos EphA2 para determinar su actividad agonística (véase, *por ejemplo*, Section 6.2.1 *infra*).

[0172] La invención enseña/ muestra métodos de estudio y detección para los anticuerpos EphA2 de la invención por medio de la incubación de anticuerpos que específicamente se unen al EphA2, particularmente que unen el dominio extracelular del BphA2, con células que expresan el EphA2, particularmente células cancerosas, preferiblemente células cancerosas metastásicas, que sobreexpresan el EphA2 (en relación con células no cancerosas del mismo tipo de célula) y después estudiar un aumento en la fosforilación del EphA2 y/o degradación del EphA2, identificando de este modo un anticuerpo BphA2 de la invención.

5.3.2 Anticuerpos que preferentemente se unen a epítopos del EphA2 expuestos en células cancerosas

[0173] Los anticuerpos de la invención se pueden preferiblemente unir a epítopos del EphA2 expuestos en células cancerosas (*por ejemplo*, células que sobreexpresan el EphA2 y/o células con EphA2 sustancial que no está vinculado al ligando) pero no en células no cancerosas o en células donde el EphA2 se une al ligando. En esta realización los anticuerpos de la invención son anticuerpos dirigidos al epítipo EphA2 no expuesto en células no cancerosas pero expuesto en células cancerosas (véase, *e.g.*, Section 6.6 *infra*). Las diferencias en la distribución de la membrana del EphA2 entre las células no cancerosas y las células cancerosas exponen ciertos epítopos en células cancerosas que no se exponen en células no cancerosas. Por ejemplo, normalmente el EphA2 está unido a su ligando, la EfrinaA1, y se localiza en áreas de contactos célula-célula. Sin embargo, las células cancerosas generalmente muestran contactos célula-célula reducidos y también sobreexpresa el EphA2 por encima de su ligando. De este modo, en células cancerosas, existe una cantidad aumentada de EphA2 desatados que no se localiza en contactos de célula-célula. Como tal, en una realización, un anticuerpo que preferentemente une un EphA2 desatado e ilocalizado es un anticuerpo de la invención.

[0174] Cualquier método conocido en la técnica para determinar el candidato de un anticuerpo EphA2 fijado/localización en una célula se puede utilizar para detectar los anticuerpos del candidato para propiedades de unión deseables. En una

realización, el microscopio de inmunofluorescencia se utiliza para determinar las características de unión de un anticuerpo. Las técnicas estándar se pueden utilizar para comparar la unión de un anticuerpo uniéndose a células criadas *in vitro*. En una realización específica, el anticuerpo que se une a las células cancerosas se compara con un anticuerpo que se une a células no cancerosas. Un anticuerpo epítipo EphA2 expuesto se une pobremente/ 5 insuficientemente a células no cancerosas pero se une bien a células cancerosas. En otra realización específica, el anticuerpo que une células disociadas no cancerosas (por ejemplo, tratadas con quelator de calcio como el EGTA) se compara con el anticuerpo que une células no cancerosas que no han sido disociadas. Un anticuerpo epítipo EphA2 expuesto se une insuficientemente a células no cancerosas que no han sido disociadas pero se une bien a células no cancerosas disociadas.

10 **[0175]** En otra realización, la citometría de flujo se utiliza para determinar las características de unión de un anticuerpo. En esta realización, el EphA2 puede o no estar reticulado a su ligando, Ephrina A1. Un anticuerpo epítipo EphA2 expuesto se une insuficientemente al EphA2 reticulado pero se une bien al EphA2 no reticulado.

[0176] En otra realización, a base de células o inmunoensayos se utilizan para determinar las características de unión de un anticuerpo. En esta realización, los anticuerpos que pueden competir con un ligando EphA2 (por ejemplo, Ephrina A1) 15 para unirse al EphA2 y sustituye la Ephrina A1 por el EphA2. El ligando EphA2 utilizado en este ensayo puede ser proteína soluble (por ejemplo, expresado recombinantemente) o expresado en una célula para que está sujeto a la célula.

5.4 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica o profiláctica

[0177] La toxicidad y la eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención se pueden 20 determinar por medio de procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva para el 50% de la población). La proporción/ porcentaje de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción LD₅₀/ED₅₀. Los agentes profilácticos y terapéuticos que muestran índices terapéuticos elevados son preferidas. Cuando los agentes profilácticos y/o terapéuticos que muestran efectos 25 secundarios tóxicos se pueden utilizar, se debería tener cuidado/ prestar atención para diseñar un sistema de entrega que dirige a dichos agentes al lugar del tejido afectado para minimizar el daño potencial de las células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios.

[0178] Los datos obtenidos de los ensayos del cultivo celular y de los estudios de animales se pueden utilizar en la formulación de una variedad de dosis de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en humanos. La dosis de 30 dichos agentes se encuentra preferiblemente dentro de una variedad de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ningún tipo de toxicidad. La dosis puede variar dentro de esta variedad dependiendo de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente utilizado en el método de la invención, la dosis efectiva terapéuticamente se calcula inicialmente desde los ensayos de cultivo celular. Una dosis puede estar formulada en modelos animales para lograr una variedad de concentración de plasma circulante que incluye la IC₅₀ (es decir, la 35 concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición medio máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar de manera más precisa dosis beneficiosas en humanos. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

[0179] La actividad anti-cáncer de las terapias utilizadas según la presente invención también se pueden determinar utilizando diversos modelos de animales experimentales para el estudio del cáncer tales como el modelo de ratón SCID 40 o ratones transgénicos donde un ratón EphA2 es sustituido por el humano EphA2, ratones desnudos con xenoinjertos humanos, modelos animales descritos en Section 6 *infra*, o cualquier modelo animal (que incluye hámsters, conejos, etc.) conocido en la técnica y descrito en Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, eds. Fiebig and Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher),

5.4.1 Demostración de la utilidad terapéutica

[0180] Los protocolos y composiciones de la invención están preferentemente testados *in vitro*, y después *in vivo*, para la actividad profiláctica y terapéutica deseada, antes de ser usados en humanos. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* que 50 pueden utilizarse para determinar si la administración de un protocolo terapéutico específico está indicado, incluye ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que la muestra de tejido del paciente se reproduce en el cultivo, y a los que se les expone o se les administra un protocolo, y se observa el efecto de dicho protocolo en la muestra de tejido, por ejemplo, aumentada la fosforilación/ degradación del EphA2. Un nivel menor de proliferación o supervivencia de las células en contacto indica que el agente terapéutico es efectivo para tratar la condición del paciente. De forma alternativa, en vez de cultivar células de un paciente, los agentes terapéuticos y los métodos pueden ser detectados utilizando células de un tumor o de una línea de células malignas. Muchos ensayos típicos en el cultivo se pueden utilizar 55 para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular se puede estudiar midiendo la incorporación de la ³timidina-H, recontando células directas, detectando cambios en actividad transcripcional de genes conocidos tales como los protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede evaluar mediante la tinción azul de tripano, la diferenciación se puede evaluar visualmente basándose en cambios en la morfología, en la fosforilación/degradación aumentada del EphA2, etc.

[0181] Los compuestos para el uso en terapia se pueden testar en sistemas modelos animales apropiados antes de testarlos en humanos, que incluyen entre otros las ratas, los ratones, los pollos, las vacas, los monos, los conejos, los hámsters, etc., por ejemplo, los modelos de animales descritos anteriormente. Los compuestos se pueden utilizar de este modo en los ensayos clínicos oportunos/ pertinentes/ apropiados.

- 5 **[0182]** Además, cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica se puede utilizar para evaluar la utilidad terapéutica y/o profiláctica de las terapias combinatorias facilitadas aquí para el tratamiento o prevención del cáncer.

5.5 Composiciones farmacéuticas

- [0183]** Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármacos a granel beneficiosos en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones adulteradas o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que se pueden utilizar en la preparación de tipos de dosis. Tales composiciones comprenden una cantidad efectiva terapéutica o profilácticamente de una agente terapéutico y/o profiláctico descrito aquí o una combinación de esos agentes y un transportador aceptable farmacéuticamente. Preferentemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad efectiva profiláctica o terapéuticamente de uno o más anticuerpos EphA2 de la invención y un transportador aceptable farmacéuticamente. En una realización adicional, la composición de la invención comprende además un agente anticanceroso adicional.

- [0184]** En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal o incluida en la Farmacopea de los EE.UU. u otras farmacopeas generalmente reconocidos para el uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "transportador" hace referencia a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto) o, más preferentemente, MF59C.1 adyuvante disponible desde Chiron, Emeryville, CA), excipiente, o vehículo con el que se administra el terapéutico. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como el aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es el transportador preferente cuando una composición farmacéutica se administra de manera intravenosa. Las soluciones salinas y dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol también se pueden emplear como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, sílica gel/ gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, en caso de ser deseada, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes estabilizadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares.

- [0185]** Generalmente, los componentes de las composiciones de la invención se facilitan por separado o mezclados en una forma de dosis unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase sellado herméticamente como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se tiene que administrar por infusión, se puede administrar con una botella de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede facilitar una ampolla de agua estéril por inyección o salina para que los componentes se puedan mezclar antes de la administración.

- [0186]** Las composiciones de la invención se pueden formular como formas neutras o de sal. Las sales aceptables farmacéuticamente incluyen aquellas formadas con aniones tales como aquellos derivados de ácidos de clorhidrato, fosfóricos, acéticos, oxálicos, tartáricos, etc., y aquellas formadas con cationes como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, etanol 2-ethylamino-2, histidina, procaína, etc.

- [0187]** Se conocen diversos sistemas de entrega y pueden utilizarse para administrar un anticuerpo monoclonal agonístico de la invención o la combinación de un anticuerpo monoclonal agonístico de la invención y un agente profiláctico o un agente terapéutico beneficioso para prevenir o tratar el cáncer, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaz de expresar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, endocitosis de receptor mediado (véase, por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc. Los métodos de administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, entre otros, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosa (por ejemplo, vía intranasal, inhalada y oral). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran intramuscularmente, intravenosamente, o subcutáneamente. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección por bolo, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes activos biológicamente. La administración puede ser sistemática o local.

- 55 **[0188]** En una realización específica, puede ser conveniente administrar agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo, y no por limitación, infusión local, por inyección, o por medio de un implante, dicho implante que es de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas o fibras.

- [0189]** En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico se puede entregar en un sistema de liberación controlada o sostenida. En una realización, una bomba se puede usar para lograr una liberación controlada o sostenida (véase Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, los materiales poliméricos se pueden usar para lograr la liberación controlada y sostenida de los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (véase por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); Patente de los Estados Unidos nº 5.679.377; 5.916.597; 5.912.015; 5.989.463; 5.128.326; Publicación Internacional nº WO 99/15154 and WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, entre otros, metacrilato de etilo poli(2-hidroxi), poli(metacrilato metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólides (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilo pirrolidono), poli(alcohol de vinilo), poli(acrilamida), poli(glicol etileno), poli(láctido), poli(láctido-co-glicólides) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable en almacén, estéril y biodegradable. En otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede colocar en proximidad del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo solo una fracción de la dosis sistemática (véase, por ejemplo, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).
- [0190]** Los sistemas de liberación controlado son tratados en el estudio realizado por Langer (1990, Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida por un experto en el campo se puede usar para producir las formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos nº 4.526.938; Publicación Internacional nº WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760,

5.5.1 Formulaciones

- [0191]** Las composiciones farmacéuticas para el uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de una manera convencional usando uno o más portadores o excipientes aceptados farmacéuticamente.
- [0192]** De este modo, los anticuerpos EphA2 de la invención y sus sales aceptadas fisiológicamente y solvatos se pueden formular para la administración por inhalación o insuflación (tanto por la boca como por la nariz) o por administración oral, parenteral o a través de la mucosa (por vía bucal, vaginal, rectal o sublingual). En una realización preferida, se usa la administración parenteral local o sistemática.
- [0193]** Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por los medios convencionales con excipientes aceptados farmacéuticamente tales como los agentes enlazadores (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o metilcelulosa de hidroxipropil); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de hidrógeno de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o silicio); desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón de sodio); o agentes humificantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden estar recubiertos por métodos conocidos en el campo. Los preparados líquidos para una administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, siropes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su mezcla con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Tales preparados líquidos pueden prepararse por los medios convencionales con aditivos aceptados farmacéuticamente tales como agentes suspensores (por ejemplo, sirope de sorbitol, derivados de la celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, oésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Los preparados también pueden contener sales amortiguadoras, condimentos, colorantes o agentes endulzantes como sean necesarios.
- [0194]** Los preparados para la administración oral pueden ser formulados de manera adecuada para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.
- [0195]** Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de una forma conveniente.
- [0196]** Para la administración por inhalación, los agentes profilácticos o terapéuticos para el uso según la presente invención son convenientemente entregados en la forma de presentación en *spray* de aerosol de lotes presurizados o de un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosolo presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse facilitando una válvula para entregar una cantidad medida/contada. Las cápsulas y los cartuchos de por ejemplo, gelatina para el uso en un inhalador o insuflador se pueden formular que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuado como la lactosa o el almidón.

[0197] Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden ser formulados por administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección de bolo o por infusión continua. Las formulaciones por inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envase de multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleaginosos, y pueden
5 contener agentes formulatorios como agentes suspendidos, estabilizantes y/o dispersos. Alternativamente, el componente activo puede presentarse en polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógeno estéril, antes de usar.

[0198] Los agentes profilácticos o terapéuticos también se pueden formular en composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como
10 mantequilla de cacao u otros glicéridos.

[0199] Además de las formulaciones descritas anteriormente, los agentes profilácticos o terapéuticos también pueden estar formulados como una preparación/ preparado en depósito. Las formulaciones de acción tan larga se pueden administrar por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, los agentes profilácticos o terapéuticos pueden ser formulados con materiales poliméricos o
15 hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite adecuado) o en resinas de intercambio de iones, o como derivados solubles en poca cantidad, por ejemplo, como sal soluble en poca cantidad.

[0200] La invención también establece que un agente profiláctico o terapéutico está empaquetado en un envase sellado herméticamente como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad. En una realización, el agente profiláctico o terapéutico es suministrado como un polvo liofilizado esterilizado seco o agua libre de concentrado en un envase sellado
20 herméticamente y puede ser reconstituido, por ejemplo, con agua o salino en la concentración adecuada para su administración a un sujeto.

[0201] En una realización preferida de la invención, la formulación y administración de diversos agentes quimioterapéuticos, biológicos/ inmunoterapéuticos y terapéuticos hormonales son conocidos en el campo y a menudo son descritos en the Physician's Desk Reference, 56th ed. (2002). Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la
25 invención, los agentes terapéuticos de la invención se puede formular y suministrar según lo previsto en la Tabla 2.

[0202] En otras realizaciones de la invención, los agentes de la radioterapia tales como los isótopos radioactivos se pueden dar por vía oral como líquido en cápsulas o como una bebida. Los isótopos radioactivos se pueden formular también en inyecciones intravenosas. El oncólogo experto puede determinar la formulación preferida y la vía de administración.

[0203] En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales agonísticos de la invención están formulados al 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, y 25 mg/ml por inyecciones intravenosas y al 5 mg/ml, 10 mg/ml, y 80 mg/ml para su administración repetida de manera subcutánea e inyección intramuscular.

[0204] Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un lote o en un dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de unidades de dosificación que contiene el componente activo. El lote puede por ejemplo
35 contener papel de plástico o metal, como un lote de ampollas. El lote o aparato dispensador puede ir acompañado del prospecto para su correcta administración.

5.5.2 Dosificación

[0205] La cantidad de la composición de la invención que será efectiva en el tratamiento, prevención o control del cáncer se puede determinar mediante técnicas comunes de investigación. Por ejemplo, la dosis de la composición que será
40 efectiva en el tratamiento, prevención o control del cáncer se puede determinar mediante la administración de la composición en un modelo animal, como, por ejemplo, los modelos animales revelados aquí o conocidos por los expertos en el campo. Además, los ensayos *in vitro* se pueden emplear de manera opcional para identificar los mejores rangos de dosificación /óptimos.

[0206] La selección de la dosis efectiva preferida puede ser determinada (por ejemplo, mediante ensayos clínicos) por un especialista basándose en la consideración de diversos factores que serán conocidos para uno de los expertos en el campo. Dichos factores incluyen la enfermedad a tratar y prevenir, los síntomas implicados, la masa corporal del paciente, el estado inmunológico del paciente y otros factores conocidos por el experto para reflejar la precisión de las composiciones farmacéuticas administradas.

[0207] La dosis precisa para ser empleada en la formulación también dependerá de la vía de administración, y de la gravedad del cáncer, y deberá ser decidida de acuerdo con la opinión de un médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden ser extrapoladas de las curvas de respuesta de una dosis derivadas de los sistemas de pruebas *in vitro* o con modelos de animales.

[0208] Para los anticuerpos, la dosis administrada a un paciente es normalmente de 0.1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosis administrada a un paciente oscila entre los 0.1 mg/kg y los 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferiblemente del 1 mg/kg al 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos y humanizados tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos
55

de otras especies debido a la respuesta inmunológica a los polipéptidos extraños. De ese modo, las dosis más bajas de anticuerpos humanos y de administración menos frecuente son a menudo posibles.

[0209] Para otros agentes terapéuticos del cáncer administrados a un paciente, las dosis normales de diversos terapéuticos del cáncer conocidos en el campo se facilitan en la Tabla 2. Dada la invención, determinadas realizaciones preferidas englobarán la administración de dosis más bajas en combinación con regímenes de tratamiento que dosis recomendadas para la administración de agentes únicos.

[0210] La invención propociona un método para la administración de dosis más bajas de agentes profilácticos y terapéuticos conocidos que las que anteriormente se consideraban efectivas para la prevención, tratamiento, control o mejoría del cáncer. Preferiblemente, las dosis más bajas de las terapias anticancerosas conocidas son administradas en combinación con dosis más bajas de anticuerpos monoclonales agonísticos de la invención.

5.6 Kits

[0211] La invención proporciona un lote o *kit* farmacéutico que comprende uno o más envases presentados con un anticuerpo EphA2 de la invención. Adicionalmente, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos beneficiosos para el tratamiento de un cáncer pueden estar incluidos también en el lote o *kit*. La invención también proporciona un lote o *kit* farmacéutico que comprende uno o más envases presentados con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con dicho envase puede ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana.

[0212] La presente invención propociona *kits* que pueden usarse en los métodos anteriormente mencionados. En una realización, un *kit* comprende uno o más anticuerpos EphA2 de la invención. En otra realización, un *kit* comprende uno o más agentes profilácticos o terapéuticos beneficiosos para el tratamiento del cáncer, en uno o más envases.

En determinadas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es un terapéutico biológico u hormonal.

6. EJEMPLOS

6.1 Preparación de los anticuerpos monoclonales

Preparación del antígeno

[0213] Las células MCF-10A Ras-transformadas fueron extraídas en el amortiguador RIPA. Las proteínas fosforiladas de tirosina fueron parcialmente purificadas usando anticuerpos PY20 inmovilizados (Kanner et al., 1989, *J. Immunol. Meth.* 120:115-124). Las proteínas ligadas fueron competitivamente eluidas con 25 mM de fenilfosfato. Las fracciones que contienen las proteínas reactivas al PY20 fueron confirmadas por el análisis por *western blot* usando anticuerpos específicos de fosfotirosina.

DetECCIÓN DEL ANTICUERPO

[0214] Como una pantalla preliminar for la inmunoreactividad del EphA2, los sobrenadantes de los hibridomas de cultivo en masa fueron sometidos a la inmunoreactividad frente al EphA2. La estrategia de inmunización fue diseñada para identificar a los epítomos extracelulares del EphA2 en células tumorales viables. De este modo, se utilizó un protocolo ELISA basado en la fluorescencia (FluorELISA), que selecciona/ prefiere/ elige la reactividad del anticuerpo frente a las células vivas. Este enfoque preventivo fue preferible para los análisis por *western blot*, que han sesgado contra/ frente a los anticuerpos que reconocen los epítomos restringidos a la conformación.

[0215] La unión de superficie celular mediante anticuerpos anti-EphA2 al receptor del EphA2 fue monitorizado usando las modificaciones de un ensayo realizado (Kilpatrick et al., 1998, *Hybridoma* 17:576). Las placas de 96 pocillos y tratadas con cultivo de tejido de fondo (Costar, Cambridge, MA) fueron tratadas con 100µl de hidrobromida poli-L-lisina (Sigma, St. Louis, MO) diluidas en 10 µg/ml en 0.1M de fosfato de sodio (pH 8.0) durante 1 hora. La Poli-L-lisina fue sacada de los pocillos antes de añadir 100µl de una suspensión celular de las células MDA-MB-23 1 (positivo para el EphA2) o de las células BT474 (controles negativos) en una concentración de 3×10^4 células por pocillo. Después de la incubación durante la noche a 37°C, 5% CO₂, los medios de cultivo fueron sacados con cuidado, y 100µl de sobrenadantes de los hibridomas fueron incubados en células a temperatura ambiente durante 1 hora. Las muestras fueron lavadas tres veces con 1X de salino regulado con fosfato de Dulbecco (pH 7.1) (GIBCO, Grand Island, NY). El anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (100µl; Molecular Probes, Eugene, OR), diluido en 2µg/ml en PBS, fue añadido durante una hora a temperatura ambiente. Después del lavado de células con PBS, 50 µl de PBS que contienen 2% FCS fue añadido a cada pocillo antes de la observación usando un microscopio de fluorescencia invertido (Model DM-IRB, Leica, Deerfield, IL).

[0216] El protocolo FluorELISA identificó 44 poblaciones de hibridoma en masa que tiñeron las células tumorales sobreexpresadas del EphA2 (MDA-MB-231), pero no las células deficientes del EphA2 (BT474) (no se muestran datos). La inmunoreactividad fue confirmada usando el microscopio de fluorescencia, que reveló un patrón de la membrana

difusa que teñía lo que era consecuente con nuestros estudios anteriores (por ejemplo, Zelinski et al., 2001, *Cancer Res.* 61:2301 and Zantek, et al., 1999, *Cell Growth Diff.* 10:629) de/ sobre la localización subcelular del EphA2. Los cultivos en masa de hibridomas fueron inicialmente seleccionados parasubclonar mediante la citometría de flujo basada en las células de inmunotinción fuerte de objetivo-positivo pero no en las células de objetivo deficiente. Las poblaciones de cultivos en masa de hibridomas fueron entonces subclonadas mediante la citometría de flujo y se repitió el protocolo FluorELISA con sobrenadantes de hibridomas subclonados.

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

6.2.1 La fosforilación y la degradación del EphA2

[0217] Los anticuerpos EphA2 promueven la fosforilación de la tirosina y la degradación del EphA2 en las células MDA-MB-231 (FIGS. 1A-1C). Las monocapas de las células fueron incubadas en presencia del EA2 (FIGS. 1A-1B, calles 2, 3) o del EA5 (FIGS. 1A-1B, calles 4, 5) o del control (FIGS. 1A-1B, calle 1) durante 8 minutos a 37°C. Los lisados celulares fueron entonces inmunoprecipitados con un anticuerpo específico del EphA2 (D7, comprado de Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NY y depositado en la *American Type Tissue Collection* el 8 de diciembre de 2000 bajo el n° de registro/acceso PTA 2755), resueltos por SDS-PAGE y sujetos al análisis por *western blot* con un anticuerpo específico de fosfotirosina (4G10, comprado de Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NY) (FIG. 1A). Las membranas fueron tratadas y analizadas de nuevo con el anticuerpo específico del EphA2 usado en la inmunoprecipitación (D7) como un control de carga.

[0218] Los análisis por *western blot* y las inmunoprecipitaciones fueron llevadas a cabo como se ha descrito anteriormente (Zantek et al., 1999, *Cell Growth Diff.* 10:629-38). Por poco tiempo, los extractos detergente de las monocapas celulares fueron extraídas en salino Tris-reguladora que contiene un 1% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO). Después de medir las concentraciones de proteínas (BioRad, Hercules, CA), 1.5 mg de lisado celular fue inmunoprecipitado, resuelto por SDS-PAGE y transferido a nitrocelulosa (Protran, Schleicher and Schuell, Keene, NH). La unión del anticuerpo fue detectada por quimioluminiscencia optimizada (Pierce, Rockford, IL) y audioradiografía (Kodak X-OMAT; Rochester, NY).

[0219] Se descubrió que los niveles de fosforilación del EphA2 aumentaban con el EA2 agonístico del EphA2 y con la incubación del anticuerpo EA5 (FIG. 1B). Las monocapas de las células MDA-MB-231 fueron incubadas en presencia de 30 µg/ml de EA2 (FIG. 1C, calles 2, 3) o de EA5 (FIG. 1C, calles 4, 5) o de un control (FIG. 1C, calle 1) durante 24 horas a 37°C. Los lisados celulares fueron entonces resueltos por SDS-PAGE y sometidos al análisis por *western blot* con un anticuerpo específico del EphA2 (D7). Los niveles de la proteína EphA2 disminuyen con la incubación del anticuerpo.

[0220] Se llevaron a cabo experimentos similares con las células A549. Las monocapas de las células A549 fueron incubadas a 37°C en presencia del EA2 o del EA5 o del control (PBS) durante 10 minutos (FIGS. 2A-2B) o durante 5 horas (FIGS. 2C-2D). Los lisados celulares fueron entonces inmunoprecipitados con un anticuerpo específico del EphA2 (D7), resueltos por SDS-PAGE y sometidos al análisis por *western blot* con un anticuerpo específico de fosfotirosina (4G10, comprado de Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NY) (FIGS. 2A, 2C). Las membranas fueron tratadas y analizadas de nuevo con el anticuerpo específico del EphA2 usado en la inmunoprecipitación (D7) como un control de carga (FIGS. 2B, 2D). A los 10 minutos, la incubación del anticuerpo provocó un aumento en la fosforilación (FIG. 2A). Con una incubación continua de 5 horas, estos anticuerpos provocaron la degradación de la proteína EphA2. (FIG. 2D).

6.2.2 Crecimiento en Agar Blando

[0221] Las células tumorales fueron suspendidas en agar blando. La formación de colonias en agar blando fue ensayada como se describe en Zelinski et al. (2001, *Cancer Res.* 61:2301-6). Los anticuerpos o una solución de control (PBS) fue incluida en las soluciones de agar inferiores y superiores. Las células fueron suspendidas en agar blando durante 7 días a 37°C en presencia del anticuerpo purificado o de la solución de control (PBS) y administradas durante el momento de la suspensión. La formación de colonias fue puntuada microscópicamente usando un microscopio de fase de contraste invertido Olympus CK-3 equipado con un objetivo 40x. Los grupos que contenían al menos tres células fueron puntuadas como un positivo. Se muestra el número medio de colonias por campo de alta potencia. Diez campos microscópicos de alta potencia distintos fueron medidos en cada experimento, y los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos diferentes.

[0222] Las células del cáncer de pulmón malignas A549 fueron incubadas con 10 µg/ml o 2,5 µg/ml de anticuerpos monoclonales EA2 o EA5 o un control (PBS). Todas las cantidades de anticuerpos usados inhibieron el crecimiento de las células en agar blando (véase la figura 3A). Las células tumorales epiteliales de mama MCF-7 benignas fueron convertidas en células malignas por la sobreexpresión del EphA2 (MCF-7^{EphA2}). Los tipos de células tumorales fueron incubados con anticuerpos monoclonales EA2 o con un control (PBS). El EA2 inhibe la habilidad de las células MCF-7^{EphA2} de crecer/ reproducirse en agar blando. Las MCF-7 benignas no formaron colonias en agar blando con o sin la incubación de anticuerpos (véase la figura 3B). Los resultados fueron presentados como colonias por campo de alta potencia (HPF). Los experimentos de control confirmaron que ni los controles de isotopos apareados (IgG₁) (por ejemplo, anti-paxilina) ni los anticuerpos frente a los epitopos intracelulares en EphA2 (por ejemplo, D7) disminuyeron la colonización en agar blando (no se muestran datos).

6.2.3 La formación de red tubular en MATRIGEL™

[0223] El comportamiento celular del tumor dentro de un micromedioambiente tridimensional, como el MATRIGEL™, puede predecir de una manera fidedigna el estado de diferenciación y la agresividad de las células epiteliales de mama. Los cultivos monocapa de las células epiteliales de mama benignas (MCF-10A) o malignas (MDA-MB-231) son incubadas en MATRIGEL™ en presencia de anticuerpos EphA2 (10 µg/ml) o solución de control (PBS). El comportamiento de las células en MATRIGEL™ es analizado como se describe en Zelinski et al. (2001, Cancer Res. 61:2301-6). Por poco tiempo, las placas de cultivo de tejido son recubiertas con MATRIGEL™ (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) a 37°C antes de añadir las células 1×10^5 MDA-MB-231 o las células MCF-10^a que habían sido incubadas en hielo durante 1 hora con un anticuerpo agonístico EphA2 o con una solución de control (PBS). Las células son incubadas en MATRIGEL™ durante 24 horas a 37°C, y el comportamiento de las células es evaluado usando un microscopio óptico invertido IX-70 Olympus. Todas las imágenes son grabadas en una película de 35 mm (T-Max-400, Kodak, Rochester, NY).

[0224] A las 24 horas, las células epiteliales MCF-10A no transformadas organizan esferas en forma de acinos en MATRIGEL™ mientras las células MDA-MB-231 rápidamente se reúnen en redes tubulares. Estas redes progresivamente invaden todo el MATRIGEL™. Con la adición de anticuerpos agonísticos EphA2, se previene la formación de redes tubulares.

6.2.4 Crecimiento *in vivo*

[0225] El EA2 puede inhibir el crecimiento *in vivo* de las células tumorales. Las células del cáncer de mama 5×10^6 MDA-MB-231 fueron implantadas ortotópicamente o subcutáneamente y las células del cáncer de pulmón 5×10^6 A549 fueron implantadas subcutáneamente en ratones atímicos. Después de que los tumores hubieran crecido/ se hubieran reproducido hasta un volumen medio de 100 mm^3 , a los ratones se les administró 6mg/kg de un EA2 o control negativo (PBS o anticuerpo 1A7) intraperitonealmente dos veces por semana durante 3 semanas. Por lo general, los animales fueron sacrificados al menos dos semanas después del último tratamiento o cuando los tumores sobrepasaron los 2000 mm^3 . El crecimiento del tumor fue evaluado y expresado en un ratio del volumen del tumor dividido por el volumen del tumor inicial (100 mm^3) o como el volumen total del tumor. El EA2 inhibió el crecimiento de las células MDA-MB-231 implantadas ortotópicamente (véase la figura 4A) o subcutáneamente (véase la figura 4B, D). El crecimiento de las células A549 implantadas subcutáneamente también fue inhibida por el EA2 (véase la figura 4C).

6.3 Dependencia del estrógeno en las células del cáncer de mama

[0226] Las células del cáncer de mama sensibles al estrógeno, las células MCF-7, fueron transfectadas y establemente sobreexpresadas con el EphA2 humano (MCF-7^{EphA2}) (pNeoMSV-EphA2 facilitado por el Dr. T. Hunter, Scripps Institute). Los análisis por *western blot* confirmaron la sobreexpresión ectópica del EphA2 en células transfectadas relacionadas con los controles apareados (no se muestran datos).

[0227] La sobreexpresión del EphA2 aumentó el crecimiento maligno (véase las figuras 5A-5B). Los ensayos de crecimiento fueron realizados de la siguiente forma. Las células MCF-7^{neo} (células de control) o las células MCF7^{EphA2} fueron cultivadas en placas de 96 pocillos. El crecimiento de las células fue medido con azul Alamar (Biosource International, Camarillo, CA) siguiendo la sugerencia del fabricante. La formación de colonias en agar blando fue realizada como se describió anteriormente (Zelinski et al., 2001, Cancer Res. 61:2301-6) y contabilizada microscópicamente, definiendo los grupos de al menos tres células como un positivo. Los datos representan la media de 10 campos microscópicos de alta potencia distintos de cada muestra y representativo de al menos tres experimentos diferentes. Las barras de error representan el error común de la media de al menos tres experimentos distintos como se estableció usando el *software* Microsoft Excel.

[0228] Aunque las células de control MCF-7 en buena parte fueron incapaces de colonizar el agar blando (una media de 0.1 colonia/campo), las células MCF-7^{EphA2} formaron colonias más grandes y numerosas (4,7 colonias/campo; $P < 0.01$) que persistieron/ duraron durante al menos tres semanas (véase la figura 5A y no se muestran datos). A pesar de la colonización aumentada del agar blando, el crecimiento de las células MCF-7^{EphA2} en un cultivo monocapa no se diferenciaban de los controles apareados (véase la figura 5B), indicando que el crecimiento que estimulan las actividades del EphA2 fueron más aparentes usando condiciones experimentales que modelan el crecimiento celular (maligno) de anclaje independiente.

[0229] En consecuencia con la colonización de agar blando aumentada, ortotópicamente las células MCF-7^{EphA2} implantadas formaron tumores más grandes y que más rápido crecían *in vivo*. Se compraron ratones atímicos que tenían de 6 a 8 semanas de vida de Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN). Cuando se indicó, un gránulo de estradiol de liberación controlada (0.72 mg 17β-estradiol, formulación de 60 días) fue inyectada subcutáneamente mediante un trocar de anchura-14 estéril 24 horas antes de la implantación del tumor y los gránulos fueron sustituidos cada 60 días para aquellos experimentos que se extienden > 60 días de duración. Las células 1×10^6 MCF-7^{neo} o las células MCF7^{EphA2} fueron inyectadas a la almohadilla/ panículo adiposo mamaria bajo visualización directa. Cuando se indicó, se administró tamoxifeno (1 mg) mediante sondaje oral 6 días a la semana.

[0230] En presencia de estrógeno suplementario (17β-estradiol comprado de Sigma), las células MCF-7^{EphA2} demostraron un aumento doble en el volumen del tumor relativo a los controles apareados (véase, la figura 6A). Los

tumores sobreexpresados del EphA2 difirieron fenotípicamente de los tumores de control en los que eran más vasculares y más localmente invasivos en el momento de la resección (no se muestran datos). Para confirmar que estos tumores expresaban el EphA2, lisados celulares completos de tumores reseccionados fueron sometidos a los análisis por *western blot* con anticuerpos específicos del EphA2 (véase, la figura 6B). Las membranas fueron entonces tratadas y resonadas con anticuerpos de catenina β para verificar que la carga de la muestra era igual. La cantidad relativa del EphA2 fue mayor en las muestras de tumores que en las células de entrada (antes de la implantación), sugiriendo que los tumores surgieron de las células con niveles altos de EphA2. Descubrimientos comparables con modelos *in vitro* y *in vivo* indican que la sobreexpresión del EphA2 resulta en un fenotipo más agresivo.

[0231] Estudios paralelos fueron llevados a cabo en ausencia del estrógeno exógeno. La privación experimental de estrógeno amplificó las diferencias entre los comportamientos celulares de control y las células MCF-7^{EphA2}. Mientras las células MCF-7^{EphA2} continuaban colonizando el agar blando de una manera más eficiente que los controles apareados (véase la figura 7A), estas células crecían/ se reproducían en ausencia del estrógeno exógeno (véase la figura 7B). Por el contrario, el estrógeno suplementario fue requerido para el crecimiento monocapa de las células de control (véase la figura 7B). Adicionalmente, las células MCF-7^{EphA2} retenían el potencial tumorigénico en ausencia del estrógeno suplementario. Mientras las células de control MCF-7 rara vez formaron tumores palpables, las células MCF-7^{EphA2} formaron tumores que persistieron durante alrededor de 12 semanas (véase la figura 7C y no se muestran datos). De este modo, los sistemas de ensayo *in vitro* y *in vivo* confirman que la sobreexpresión del EphA2 disminuye la necesidad de estrógeno exógeno.

[0232] Se midió la sensibilidad de las células MCF-7^{EphA2} al tamoxifeno. El tamoxifeno (4-hidroxitamoxifeno comprado de Sigma) reducía la colonización en agar blando de las células de control MCF-7 en al menos el 60%. Las acciones inhibitoras del tamoxifeno en las células MCF-7^{EphA2} fueron menos pronunciadas (inhibición del 25%, véase la figura 8A). Notablemente el estradiol en exceso superó los efectos inhibitorios del tamoxifeno, que aportó evidencia adicional de la especificidad de este descubrimiento (véase la figura 8A). De manera similar, el potencial tumorigénico de las células MCF-7^{EphA2} fue menos sensible al tamoxifeno como se comparó con las células de control (MCF-7^{neo}) (véase la figura 8B).

[0233] Dado que la sensibilidad al tamoxifeno a veces se refiere a la expresión del receptor estrógeno, la expresión del receptor de estrógeno y la actividad fueron estudiados/ ensayados en MCF-7^{EphA2}. Los análisis por *western blot* revelaron niveles comparables de ER α y ER β en las células de control y en las células MCF-7^{EphA2} (véanse las figuras 9A-9B) (los anticuerpos ER α y ER β fueron comprados de Chemicon, Temecula, CA). Además, los niveles comparables de la actividad receptora de estrógenos fue detectada en las células de control y en las células MCF-7^{EphA2} y esta actividad enzimática continuó sensible al tamoxifeno (véanse las figuras 9E- 9F). La actividad receptora de estrógenos fue medida usando el vector ERE-TK-CAT (que codifica un único ERE; una donación generosa del Dr. Nakshatri, Indiana University School of Medicine) en el estado no estimulado, tras la estimulación con estradiol (10^{-8} M) y la inhibición con tamoxifeno (10^{-6} M). Las células fueron recubiertas en fenol sin rojo y suero tratado con carbón vegetal durante 2 días y transfectadas con ERE-TK-CAT (5 μ g) usando el método de fosfato de calcio. El vector de expresión de galactosidasa- β RSV/ β -galactosidasa (2 μ g, donación del Dr. Nakshatri) fue cotransfectado como un control. Los medios frescos que incluyen los fármacos seleccionados de manera adecuada fueron añadidos 24 horas después de la transfección. Las células fueron recolectadas tras 24 horas y la actividad CAT fue evaluada como se describe (Nakshatri et al., 1997, Mol. Cell. Biol. 17:3629-39). Estos resultados indican que el receptor de estrógenos en células MCF-7^{EphA2} está expresado y continúa sensible al tamoxifeno, sugiriendo así que el defecto que resulta en MCF-7^{EphA2} menos dependiente en estrógeno radica en su origen de señalización de estrógeno.

[0234] El crecimiento de las células MCF-7^{EphA2} que había disminuido en los niveles de expresión del EphA2 fue ensayado en agar blando. El anticuerpo monoclonal EA2 del EphA2 indujo la activación y posterior degradación del EphA2. Los niveles disminuidos de la expresión del EphA2 fueron observadas durante dos horas de tratamiento de EA2 y el EphA2 permaneció indetectable durante al menos las 24 horas siguientes (véase la figura 10A). La colonización del agar blando de las células de control MCF-7 fue sensible al tamoxifeno (véase la figura 10C) y el EA2 no alteró esta respuesta (ya que estas células carecen de EphA2 endógeno). Las células MCF-7^{EphA2} fueron menos sensibles al tamoxifeno (inhibición del 25% mediante tamoxifeno) cuando se compara con los controles apareados (inhibición del 75% mediante tamoxifeno). Mientras el EA2 disminuyó la colonización en agar blando (por un 19%), la combinación del EA2 y el tamoxifeno causó una disminución mucho más drástica (>80%) en la colonización en agar blando. De este modo, el tratamiento de EA2 restableció un fenotipo que era equivalente a las células de control MCF-7. Estos descubrimientos sugieren que el anticuerpo que dirige el EphA2 puede servir para re-sensibilizar las células de tumor de mama al tamoxifeno.

[0235] Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el t-test del Estudiante usando Microsoft Excel (Seattle, WA), definiendo $P < 0.05$ como importante. Los análisis del crecimiento del tumor *in vivo* fueron llevados a cabo usando el software GraphPad (San Diego, CA).

6.4 Expresión del EphA2 en neoplasia intraepitelial prostática

[0236] La inmunoreactividad del EphA2 diferenció las células epiteliales prostáticas neoplásicas de sus homólogas no neoplásicas. Se consiguieron 93 casos de prostatectomía retropúbica radical de los archivos de patología quirúrgica del Centro Médico de la Universidad de Indiana. Los pacientes tenían entre 44 y 77 años (una media de 63 años). La

clasificación del tumor primario a partir de especímenes de prostatectomía radical se realizó de acuerdo con el sistema Gleason (Bostwick "Neoplasms of the prostate" in Bostwick and Eble, eds., 1997, *Urologic Surgical Pathology* St. Louis: Mosby page 343-422; Gleason and Mellinger, 1974, *J. Urol.* 111:58-64). La clasificación Gleason iba de 4 a 10. La fase patológica fue evaluada siguiendo el criterio TNM de 1997 (tumor, nódulos linfáticos y metástasis) (Fleming et al., 1997, *AJCC Cancer Staging Manual*. Philadelphia: Raven and Lippincott). Las fases patológicas fueron T2a (n= 9 pacientes), T2b (n= 43), T3a (n= 27), T3b (n=14). 13 pacientes tenían metástasis de los nódulos linfáticos en el momento de la cirugía.

[0237] Las secciones de serie 5 µm-thick de cortes fijados con formalina de especímenes de prostatectomía radical fueron usados para la tinción inmunofluorescente. Se seleccionaron los bloques de tejido que contenían la cantidad máxima de tumor y el mayor grado Gleason. Se analizó un corte representativo de cada caso. Los cortes fueron deparafinados en xileno dos veces cada 5 minutos y rehidratados por medio de etanoles graduados para destilar el agua. La recuperación del antígeno se llevó a cabo calentando las secciones en EDTA (pH 8.0) durante 30 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena fue inactivada mediante la incubación en 3% H₂O₂ durante 15 minutos. Los lugares de unión no específicos fueron bloqueados usando el Bloque de Proteína (DAKO) durante 20 minutos. Las secciones de tejido fueron entonces incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón frente al humano EphA2 (IgG1, disolución 1:100) durante la noche a temperatura ambiente, seguido del anticuerpo secundario biotinilado (sociedad DAKO, Carpinteria, CA) y la estreptavidina etiquetada de peroxidasa, y se usó la diaminobenzidina 3,3 como el cromógeno en presencia del peróxido de hidrógeno. Se realizaron controles positivos y negativos en paralelo con cada grupo.

[0238] El alcance y la intensidad de la tinción fueron evaluadas en el epitelio benigno, en neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) y adenocarcinoma a partir del mismo corte para cada caso. Los campos microscópicos con el nivel más alto de inmunoreactividad fueron elegidos para el análisis. Al menos 1000 células fueron analizadas en cada caso. El porcentaje de las células que mostraban la tinción en cada caso fue evaluado semicuantitativamente en una escala incremental del 5% yendo del 0 al 95%. Se establece un resultado de la intensidad numérica de 0 a 3 (0, no tinción; 1 tinción débil; 2 tinción moderada; y 3, tinción fuerte) (Jiang et al., 2002, *Am. J. Pathol.* 160:667-71; Cheng et al., 1996, *Am J. Pathol.* 148:1375-80).

[0239] El porcentaje medio de las células inmunoreactivas en epitelios benignos, PIN de grado alto y adenocarcinomas fueron comparados usando la prueba Wilcoxon de rango señalada y emparejada. La intensidad de la tinción para el EphA2 epitelios benignos, PIN de grado alto y adenocarcinomas fue comparada usando los tests Cochran-Mantel-Haenszel para la información categórica ordenada y correlativa. Las comparaciones por parejas eran realizadas si el revelaba diferencias significativas. Un valor-p<0.05 era considerado significativo, y todos los valores-p fueron bilaterales.

[0240] La inmunoreactividad del EphA2 fue observada en todos los casos de neoplasia intraepitelial prostática de grado alto (PIN) y de cánceres pero no en células epiteliales benignas. Por ejemplo, la expresión del EphA2 (el porcentaje de media de las células inmunoreactivas y la intensidad de la tinción) aumentó en las PIN de grado alto y en los cánceres relativos a células epiteliales benignas (Tablas 3 y 4). De manera similar, la inmunoreactividad del EphA2 (el porcentaje de media de las células inmunoreactivas y la intensidad de la tinción) fue aumentada en los carcinomas prostáticos comparados con las PIN de grado alto (Tablas 3 y 4). Esta inmunoreactividad era evidente en la membrana y el citoplasma de células neoplásicas (no se muestran datos). Por el contrario, la no inmunoreactividad del EphA2 fue observada en las células estomacales proximales al tumor. En el grupo PIN de grado alto, el 22% mostró una intensidad de tinción de grado 1, el 73% mostró una intensidad de tinción de grado 2, y el 5% mostró una intensidad de tinción de grado 3 (Tabla 3). En el grupo de los adenocarcinomas, el 13% de los casos mostró una intensidad de tinción de grado 1, el 50% mostró una intensidad de tinción de grado 2, y el 37% mostró una intensidad de tinción de grado 3. Por el contrario, el grupo de epitelios normales mostró una tinción de grado 1 en el 66% de los casos, el resto de los casos mostró una no inmunoreactividad a la proteína EphA2 (intensidad de tinción de grado 0) (Tabla 3). El porcentaje de media de las células inmunoreactivas del EphA2 fue del 12% en las células epiteliales normales, del 67% en las PIN de grado alto, y el 85% en el adenocarcinoma prostático (Tabla 4).

[0241] A pesar de que los niveles altos de EphA2 pudieron diferenciar las células epiteliales prostáticas benignas de las neoplásicas, el EphA2 no guarda relación con otros parámetros histológicos o patológicos de gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, los niveles altos de EphA2 fueron observados en la mayoría de los carcinomas prostáticos y no hacen referencia al grado Gleason, a la fase patológica, a la metástasis de nódulos linfáticos, a la extensión extraprostática, a los márgenes quirúrgicos, a la invasión vascular, a la invasión perineural, o a la presencia de otras áreas de la próstata con PIN de grado alto (Tabla 5).

TABLA 3

Tipo de célula	Grado de Intensidad de Tinción			
	0	1	2	3
Epitelios benignos	31(33%)	61(66%)	1(1%)	0(0%)

ES 2 377 720 T3

Tipo de célula	Grado de Intensidad de Tinción			
	0	1	2	3
PIN ^a de grado alto	0 (0%)	20 (22%)	68 (73%)	5(5%)
Adenocarcinoma ^{a,b}	0(0%)	12 (13%)	47(50%).	34 (37%)

^aIndica que el porcentaje de intensidad de tinción era estadísticamente menor en comparación con las células normales con valor P = 0.0001 usando una prueba Wilcoxon de rango señalada y emparejada.

^bLa intensidad de tinción era significativamente mayor en comparación con el PIN de grado alto (P<0.01, test Cochran-Mantel-Henszel).

TABLA 4

Tipo de célula	Media en % of Tinción Celular ± SD	Alcance (%)
Células normales	12±17	0-90
PIN de grado alto	67±18 ^a	5-95
Adenocarcinoma	85±12 ^{a,b}	30-95

^aIndica el porcentaje de tinción estadísticamente menor en comparación con la tinción de las células normales con un valor P = 0.0001 usando una prueba Wilcoxon de rango señalada y emparejada.

^bEl porcentaje de tinción era estadísticamente mayor en comparación con el PIN de grado alto (P<0.01, ANOVA).

TABLA 5

Característica del Paciente	% de Pacientes Totales (n=93)	Media en % de Tinción Celular w/Anticuerpo EphA2 (±SD)	Media Intensidad Tinción del Anticuerpo EphA2 (±SD)
Grado Gleason Primario			
2	12	83±2	2.0±0.6
3	43	86±10	2.3±0.7
4	23	84±16	2.3±0.7
5	15	86±11	2.3±0.6
Grado Gleason Secundario			
2	15	82±16	2.3±0.5
3	29	85±15	2.1±0.6
4	35	85±9	2.3±0.7
5	14	88±8	2.4±0.8

ES 2 377 720 T3

Característica del Paciente		% de Pacientes Totales (n=93)	Media en % de Tinción Celular w/Anticuerpo EphA2 (\pm SD)	Media Intensidad Tinción del Anticuerpo EphA2 (\pm SD)
Suma Gleason	<7	28	83 \pm 12	2.2 \pm 0.6
	7	35	85 \pm 14	2.2 \pm 0.7
	>7	30	87 \pm 10	2.4 \pm 0.7
Clasificación T	T2a	9	89 \pm 6	2.3 \pm 0.5
	T2b	43	84 \pm 12	2.2 \pm 0.7
	T3a	27	84 \pm 15	2.2 \pm 0.7
	T3b	14	63 \pm 10	2.4 \pm 0.6
Metástasis del Nódulo Linfático				
	Positivo	13	88 \pm 9	2.3 \pm 0.6
	Negativo	80	84 \pm 13	2.2 \pm 0.7
Extensión Extraprostática				
	Positivo	53	86 \pm 11	2.3 \pm 0.7
	Negativo	40	84 \pm 14	2.2 \pm 0.7
Margen Qurúrgico	Positivo	50	86 \pm 11	2.1 \pm 0.6
	Negativo	43	84 \pm 13	2.4 \pm 0.7
Invasión Vascular	Positivo	30	85 \pm 11	2.1 \pm 0.8
	Negativo	63	86 \pm 13	2.3 \pm 0.6
Invasión Perineural	Positivo	82	82 \pm 15	2.4 \pm 0.5
	Negativo	11	85 \pm 12	2.2 \pm 0.7
PIN de grado alto	Positivo	89	85 \pm 12	2.3 \pm 0.7
	Negativo	4	85 \pm 9	2.0 \pm 0.8

6.5 Tratamiento de Pacientes con Cáncer Metastásico

[0242] Se ha diseñado un estudio para evaluar la farmacocinética y la seguridad de los anticuerpos monoclonales agonísticos de esta invención en pacientes con cáncer de mama metastásico. Actualmente a las pacientes con cáncer se les suministra Taxol o Taxotere. A las pacientes que en la actualidad reciben tratamiento se les permite continuar con estos fármacos.

5 [0243] A las pacientes se les administra una única dosis IV de un anticuerpo monoclonal de la invención y a continuación, a partir de las 4 semanas se les analiza continuando la administración de repetidas dosis IV semanales con la misma dosis durante un periodo de 12 semanas. Se mide la seguridad del tratamiento con el anticuerpo monoclonal agonístico de la invención así como los cambios potenciales en la actividad de la enfermedad durante 26
10 semanas con una dosis IV. Se tratan a distintos grupos de pacientes que se evalúan de manera similar pero reciben dosis de 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, o 8 mg/kg.

[0244] Los anticuerpos de la invención son formulados en 5 mg/ml y 10 mg/ml durante la inyección IV. Se requiere una formulación de 80 mg/ml para una administración subcutánea repetida. Los anticuerpos de la invención también son formulados en 100 mg/ml para su administración durante el ensayo.

[0245] Se miden o determinan los cambios mediante/ teniendo en cuenta/ observando la progresión del crecimiento del
15 tumor.

6.6 Análisis de Epítomos de Anticuerpos EphA2

[0246] El epítipo de los anticuerpos EphA2 fue calificado. El EA2 y el EA5 se unen de manera selectiva con las células malignas. Los anticuerpos monoclonales anti-EphA2 EA2 y EA5 se unen a las células tumorales epiteliales de mama MDA-MB-231 malignas (véase figuras 11A-11B) más fuertemente que a las células tumorales epiteliales de mama MCF-
20 10A benignas (véase figuras 11C-11D) como se muestra por la tinción inmunofluorescente. Además, el EA2 era inmunoreactivo contra las células prostáticas malignas. El anticuerpo monoclonal anti-EphA2 EA2 identificó las células cancerosas prostáticas malignas en especímenes clínicos conservados en formalina fijada y parafina incrustada (véase la figura 12).

[0247] El EA2 preferencialmente se une al epítipo EphA2 expuesto en las células cancerosas pero no en las células no
25 cancerosas. Las células MCF-10A no transformadas y las células MDA-MB-231 transformadas fueron incubadas con 10 µg/ml EA2 a 4°C durante 30 minutos antes de la fijación en una solución de formalina del 3% formalin solution y del inmunoe Etiquetado con IgG anti-ratón de conjugado de fluoróforo. El EA2 preferencialmente se une al EphA2 en las células transformadas (véase la figura 13D). Por el contrario, otro anticuerpo EphA2 Eph099B-233.152 (con n° de registro/ acceso en la ATCC no. __; véase co-pending US Patent Application Serial No. __, entitled "EphA2 Monoclonal
30 Antibodies and Methods of Use Thereof" filed May 12, 2003 as Attorney Docket No. 10271-097-999) se une al EphA2 expresado en las células transformadas y en las no transformadas (véase las figuras 13A-13B). El tratamiento de las células MCF-10A no transformadas con 4mM EGTA durante 20 minutos disoció las células. El EA2 unido al EphA2 en el EGTA disoció las células pero no las células no tratadas (véase las figuras 14A-14B).

[0248] Se llevó a cabo un experimento equivalente usando las células MCF-10A o MDA-MB-231. La cantidad de EA2
35 que se une al EphA2 fue medida usando la citometría de flujo (véase las figuras 17C-17D). Las células fueron tratadas por incubación en 4 mM EGTA durante 10-15 minutos en hielo (panel superior) o no fueron tratadas con EGTA (panel central) antes de la incubación con 10 µg/ml EA2. Las células fueron fijadas con 3% de formalina y etiquetadas con IgG anti-ratón mono etiquetado de fluoróforo. Las células de control fueron incubadas sólo con el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón mono etiquetado de fluoróforo) en ausencia del anticuerpo primario (EA2) (panel inferior). Las muestras fueron
40 entonces evaluadas usando la citometría de flujo (Becton Dickinson FACStar Plus). El tratamiento EGTA no afectó al EA2 unido a las células transformadas (véase la figura 17D, paneles superior y central). Por el contrario, el EA2 unido a las células no transformadas fue aumentado mediante la incubación en EGTA (véase la figura 17C, paneles superior y central).

[0249] El EA2 no se une a los mismos epítomos que el ligando EphA2 Efrina A1. Una placa de microtitulación fue
45 cubierta con 10 mg/ml Efrina A1-F_c durante la noche a 4°C. Una proteína de fusión que consiste en el dominio extracelular de EphA2 unido a la región constante IgG₁ humana (EphA2-F_c) fue incubada y unida al Efrina A1-F_c. Inmovilizada Efrina A1-F_c Biotinilada o el EA2 fue incubada con el complejo EphA2-Efrina A1-F_c y se midió la cantidad de unión. Muy pocas Efrina A1-F_c adicionales se unieron al complejo EphA2-Efrina A1-F_c mientras, por el contrario, niveles considerables de EA2 se unieron al complejo EphA2-Efrina A1-F_c (véase la figura 15A).

[0250] El complejo EphA2-Efrina A1-F_c fue preparado como se describió anteriormente. EA2 Biotinilado (10 µg/ml) fue
50 incubado con el complejo durante 30 minutos. El competidor no etiquetado fue incubado con el complejo EphA2-Efrina A1-F_c-EA2 en la cantidad indicada. El EA2 no etiquetado podría sustituir al EA2 etiquetado en concentraciones de 100 ng/ml o superior. La Efrina A1-F_c No Etiquetada no sustituyó de manera significativa al EA2 etiquetado (véase la figura 15B).

7. EQUIVALENTE

[0251] Aquellos expertos en el campo reconocerán, o serán capaces de establecer, usando tan sólo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención aquí descritas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0252]

- 5 <110> Purdue Research Foundation Kinch, Michael Carles-Kinch, Kelly
 <120> Anticuerpos monoclonales agonísticos EphA2 y métodos de uso de los mismos
 <130> 10271-107-228
 <140>
 <141>
- 10 <150> 60/379,368
 <151> 2002-05-10
 <150> 60/418,204
 <151> 2002-10-14
 <150> 60/460,358
- 15 <151> 2003-04-03
 <160> 16
 <170> Versión de la patente 3.2
 <210> 1
 <211> 107
- 20 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Lys | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Met | Tyr | Ala | Ser | Leu | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Asp | Ile | Asn | Asn | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Ser | Trp | Phe | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ser | Pro | Lys | Thr | Leu | Ile |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Arg | Ala | Asn | Arg | Leu | Val | Asp | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Gly | Ser | Gly | Gln | Asp | Tyr | Ser | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Glu | Tyr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Asp | Met | Gly | Ile | Tyr | Tyr | Cys | Leu | Lys | Tyr | Asp | Glu | Phe | Pro | Tyr |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | | | | | |
| | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | | |
- <210> 2

ES 2 377 720 T3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10 <400> 3

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo Sapiens

<400> 4

Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 5

<211> 115

20 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

ES 2 377 720 T3

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

Val Ser Ala
 115

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 6

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

<210> 7

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 7

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

Gly

<210> 8

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 8

Glu Ala Ile Phe Thr Tyr
 1 5

20 <210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtc ggacattaat aactatttaa gctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180
 25 aggttcagtg gcagtgatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctgaaa tatgatgagt ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

ES 2 377 720 T3

<210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 10
 gcgagtcagg acattaataa ctatthaagc 30
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 cgtgcaaaca gattgtaga t 21
 <210> 12
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 aaatatgatg agttccgta c 21
 <210> 13
 20 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 gacgtgaagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatacca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtactta cacctactat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaaaga caccctgtac 240
 ctgcaaataga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtac aagagaagct 300
 atctttactt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
 25 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 30 ggattcactt tcagtagcta taccatgtct 30
 <210> 15
 <211> 51

<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 15
accattagta gttggtgtac ttacacctac tatccagaca gttggaaggg c 51
5 <210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 16
10 agagaagcta tctttactta c 21
<110> Purdue Research Foundation Kinch, Michael Carles-Kinch, Kelly
<120> Anticuerpos monoclonales agonísticos EphA2 y métodos de uso de los mismos
<130> 10271-107-228
<140>
15 <141>
<150> 60/379,368
<151> 2002-05-10
<150> 60/418,204
<151> 2002-10-14
20 <150> 60/460,358
<151> 2003-04-03
<160> 16
<170> Versión de la patente 3.2
<210> 1
25 <211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 1

ES 2 377 720 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 4

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 4

Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

20 <210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

ES 2 377 720 T3

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ala
115

<210> 6

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 6

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

<210> 7

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 7

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

15 Gly

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

20 <400> 8

Glu Ala Ile Phe Thr Tyr
1 5

<210> 9

ES 2 377 720 T3

<211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 gaċātcaāga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aactatttaa gctggttcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctgaaa tatgatgagt ttccgtacac gttcggaggg 300
 5 gggaccaagc tggaaataaa a 321
 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 10
 gcgagtcagg acattaataa ctattaagc 30
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 cgtgcaaaca gattgtaga t 21
 <210> 12
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 aaatatgatg agtttccgta c 21
 <210> 13
 25 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 gaċgtgaagc tggtagagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatacca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtactta cacctactat 180

ES 2 377 720 T3

ctcagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtac aagagaagct 300
atctttactt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 14
<211> 30
<212> ADN

5 <213> Homo sapiens
<400> 14
ggattcactt tcagtagcta taccatgtct 30
<210> 15
<211> 51

10 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 15
accattagta gtgggtgtac ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg c 51
<210> 16

15 <211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 16
agagaagcta tctttactta c 21

20

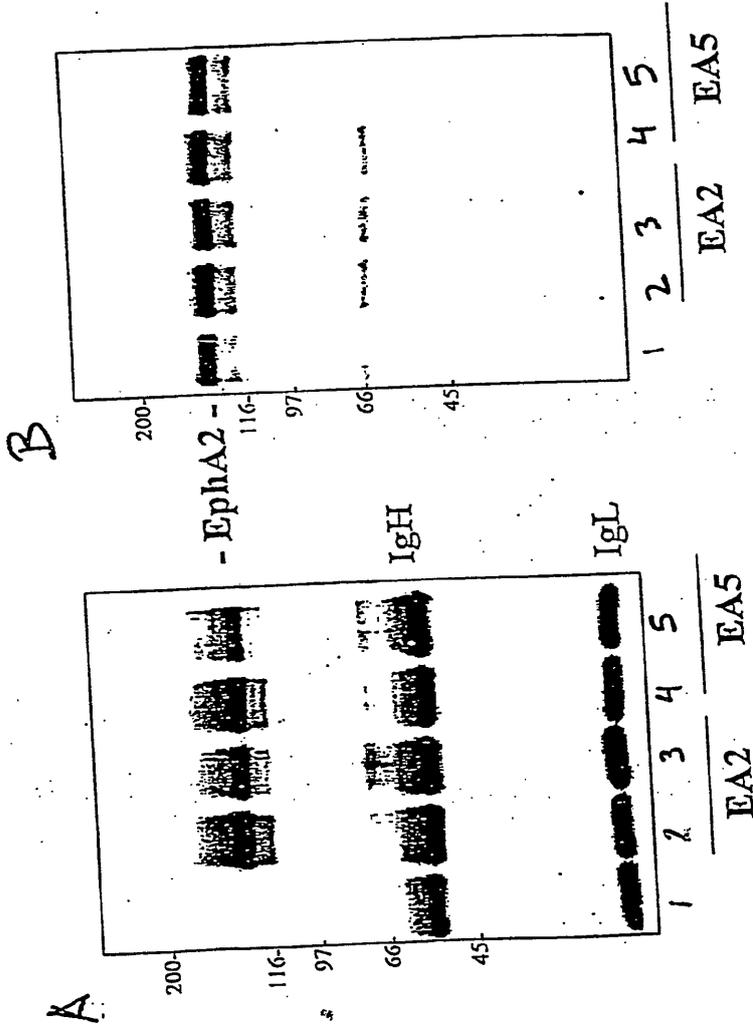
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que específicamente se une al EphA2 y produce la fosforilación del EphA2, donde:
 - a. el anticuerpo compete por unirse al EphA2 con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la *American Type Culture Collection* (ATCC) con nº de registro PTA-4380;
 - 5 b. el anticuerpo compete por unirse al EphA2 con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC con nº de registro PTA-4381;
 - c. el anticuerpo se produce por el hibridoma depositado en la ATCC con nº de registro PTA-4380;
 - d. el anticuerpo se produce por el hibridoma depositado en la ATCC con nº de registro PTA-4381;
 - 10 e. el anticuerpo se compone de una cadena VH que consta de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 y de una cadena VL que consta de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1;
 - f. el anticuerpo se compone de una VL CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, de una VL CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3, de una VL CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, de una VH CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, de una VH CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, y de una VH CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8; o
 - 15 g. el anticuerpo se compone de una VL CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, de una VL CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3, de una VL CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, de una VH CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, de una VH CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, y de una VH CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8, donde una o más de las CDRs tiene una, dos o tres mutaciones.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se produce por el hibridoma depositado en la ATCC con el nº de registro PTA-4380.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se produce por el hibridoma depositado en la ATCC con nº de registro PTA-4381.
- 25 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se compone de una cadena VH que consta de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se compone de una cadena VL que contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
- 30 6. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se compone de una cadena VH que consta de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 y de una cadena VL que consta de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se compone de una VL CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, de una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3, de una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, de una VH CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, de una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, y de una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8.
- 35 8. El anticuerpo de la reivindicación 4, 5 o 6, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, una cadena única Fv (scFv), un anticuerpo de cadena única, un fragmento Fab (Fab), o un F(ab')₂.
9. El anticuerpo de la reivindicación 7, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una cadena única Fv (scFv), un anticuerpo de cadena única, un fragmento Fab (Fab), o un F(ab')₂.
- 40 10. Un conjugado de anticuerpo que consta del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes conjugado o fusionado con un polipéptido heterólogo.
11. Un conjugado de anticuerpo que consta del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 conjugado o fusionado con un agente de diagnóstico o detectable.
- 45 12. Un conjugado de anticuerpo que consta del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 conjugado o fusionado con un agente terapéutico.
13. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 12, donde el agente terapéutico es una citotoxina.

- 5
14. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 13, donde la citotoxina es paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracenodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1 - dihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaina, propanolol, puomicina, epirubicina, o ciclofosfamida.
- 10
15. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 12, donde el agente terapéutico es abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera, toxina de la difteria, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón beta, o plaqueta derivada del factor de crecimiento.
16. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 12, donde el agente terapéutico es un material radioactivo o quelador macrocíclico.
17. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleótida que codifica el anticuerpo de la reivindicación 2, 3 o 6.
18. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 17.
- 15
19. El vector de la reivindicación 18 que comprende además una secuencia nucleótida que regula la expresión de la secuencia nucleótida.
- 20
20. Una célula huésped transgénica que contiene o expresa el ácido nucleico de la reivindicación 17.
21. Una célula huésped transgénica que contiene el vector de la reivindicación 18 o 19.
22. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 y un portador aceptable desde un punto de vista farmacéutico.
- 20
23. El empleo de la composición farmacéutica de la reivindicación 22 en la fabricación de un fármaco para el tratamiento oncológico, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, para su uso en el tratamiento oncológico, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
- 25
25. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 16 y un portador aceptable desde un punto de vista farmacéutico.
26. El empleo de la composición farmacéutica de la reivindicación 24 en la fabricación de un fármaco para el tratamiento oncológico, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
27. La composición farmacéutica de la reivindicación 24, para su uso en el tratamiento oncológico, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
- 30
28. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
29. El empleo del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 en la preparación de un fármaco para el tratamiento del cáncer en un paciente, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
- 35
30. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 16 para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
31. El empleo del conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 16 en la preparación de un fármaco para el tratamiento del cáncer en un paciente, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
32. El empleo de la reivindicación 29 o 31, donde el fármaco comprende además una terapia adicional.
- 40
33. Un método para diagnosticar el cáncer en un paciente, que comprende:
- a. células de contacto de dicho paciente con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 según las condiciones adecuadas para el anticuerpo de unión EphA2; y
- b. la medición del anticuerpo EphA2 unido a dichas células, donde un anticuerpo de unión mayor que un control indica que el paciente padece cáncer.
- 45
34. El empleo del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 en la preparación de un fármaco para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la eficacia de la terapia de cáncer en un paciente, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.

- 5
35. El empleo del conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 16 en la preparación de un fármaco para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la eficacia de la terapia de cáncer en un paciente, donde el cáncer está asociado con la sobreexpresión del EphA2.
36. El empleo de la reivindicación 23, 29 o 34 o de la composición de la reivindicación 24, donde el cáncer es de origen epitelial.
37. El empleo de la reivindicación 26, 31 o 35 o de la composición de la reivindicación 27, donde el cáncer es de origen epitelial.
- 10
38. El empleo de la reivindicación 23, 29 o 34 o de la composición de la reivindicación 24, donde el cáncer es un carcinoma de célula renal, un melanoma, un cáncer metastásico, o un cáncer de piel, de pulmón, de colon, de mama, de próstata, de vejiga, de riñón o de páncreas.
39. El empleo de la reivindicación 26, 31 o 35 o de la composición de la reivindicación 27, donde el cáncer es un carcinoma de célula renal, un melanoma, un cáncer metastásico, o un cáncer de piel, de pulmón, de colon, de mama, de próstata, de vejiga, de riñón o de páncreas.
- 15
40. El empleo de las reivindicaciones 23, 26, 29, 31, 34 o 35, donde el paciente es humano.
41. La composición de las reivindicaciones 24 y 27, donde el paciente es humano.
42. El empleo de la reivindicación 40, donde el humano se muestra resistente a la terapia anterior.
43. La composición de la reivindicación 41, donde el humano se muestra resistente a una terapia anterior.
44. El método de la reivindicación 33, donde el cáncer es de origen epitelial.
- 20
45. El método de la reivindicación 33, donde el cáncer es un carcinoma de célula renal, un melanoma, un cáncer metastásico, o un cáncer de piel, de pulmón, de colon, de mama, de próstata, de vejiga, de riñón o de páncreas.
46. El método de la reivindicación 33, donde las células provienen de la sangre total, del esputo, de la orina, del suero o de aspirados con aguja fina de tejido de células tumorales.
47. El método de la reivindicación 33, donde el paciente es humano.
48. Un hibridoma depositado en la ATCC con nº de registro PTA-4380.
- 25
49. Un hibridoma depositado en la ATCC con nº de registro PTA-4381.
50. Un método para producir un anticuerpo, que comprende el cultivo de la célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21 según las condiciones en las que el ácido nucleico viene expresado.
51. Un *kit* que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, en un envase, y las instrucciones de uso.
- 30
52. Un *kit* que comprende el conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16, en un envase, y las instrucciones de uso.
53. El anticuerpo de la reivindicación 7, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

Dibujos



FIGS. 1A-1B

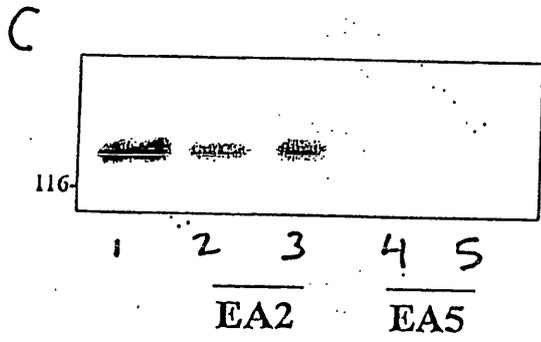
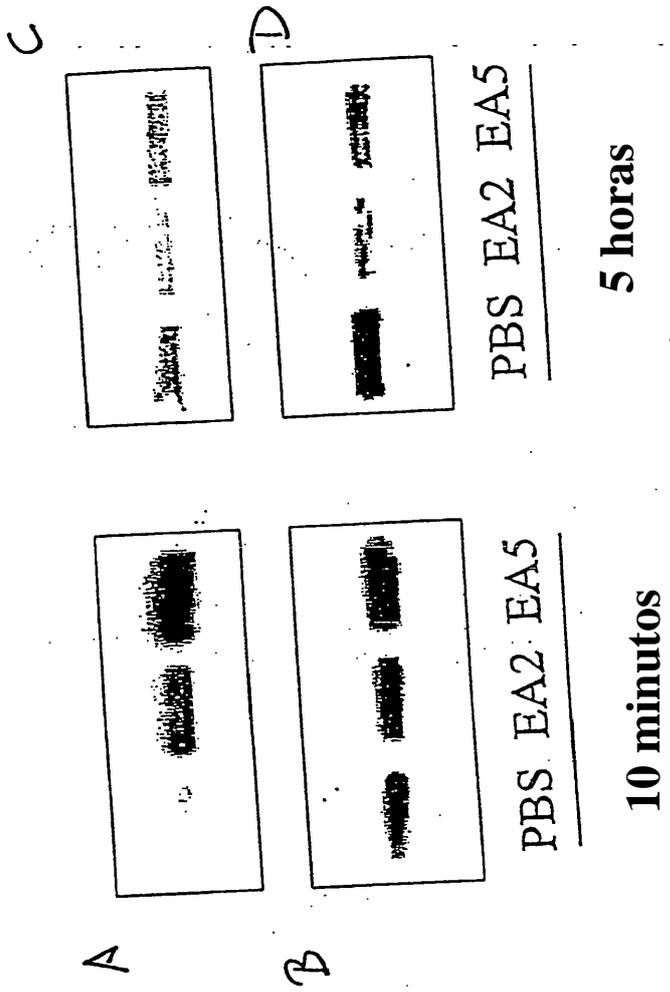


FIG. 1C



FIGS. 2A-2D

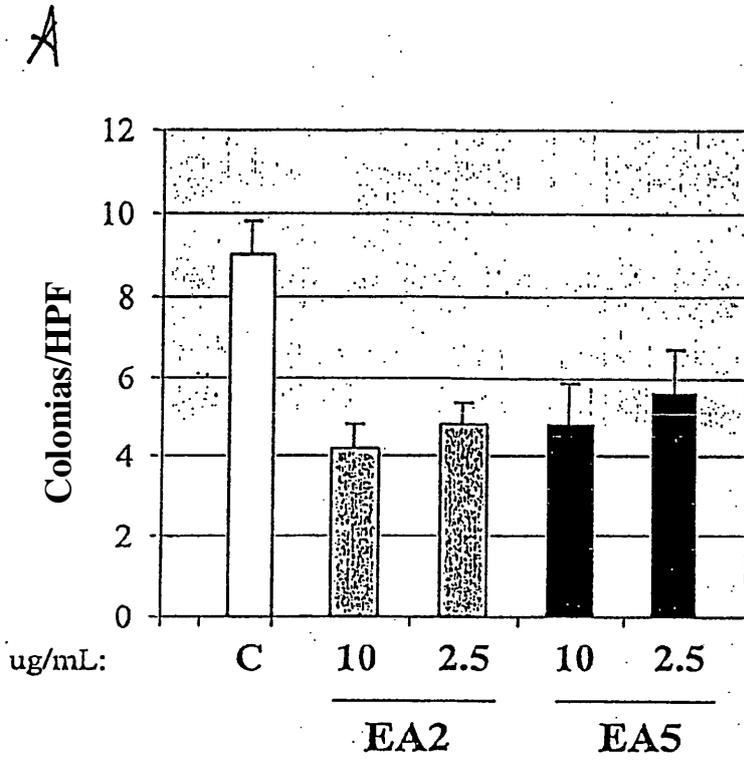


FIG. 3A

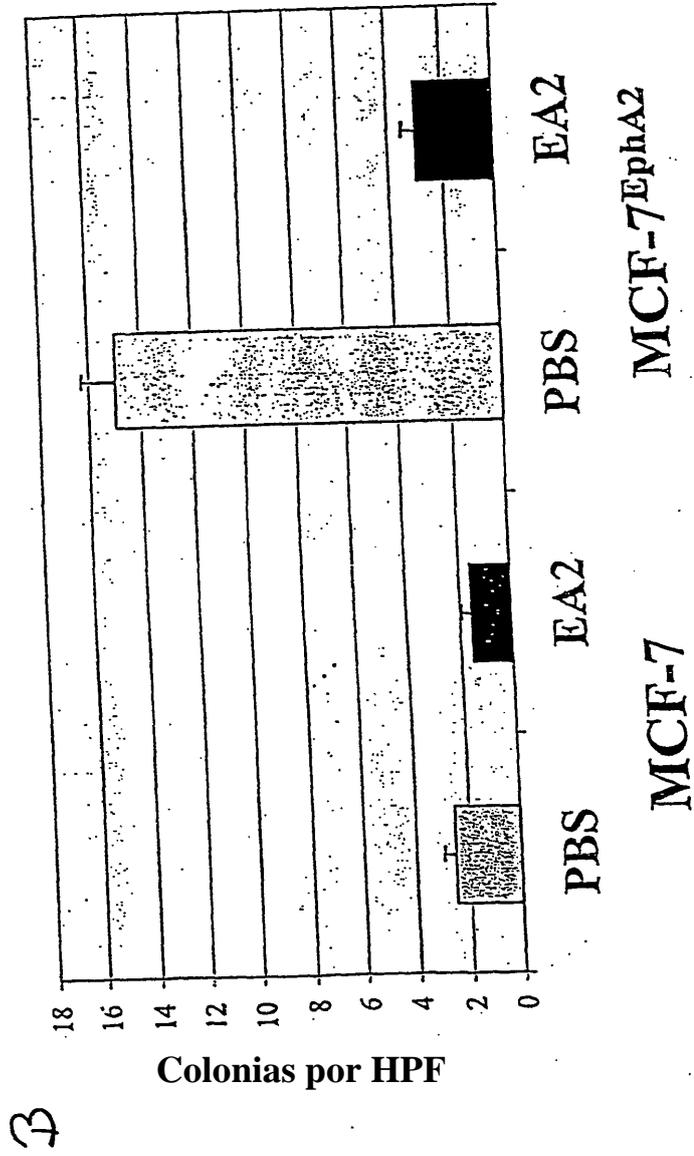
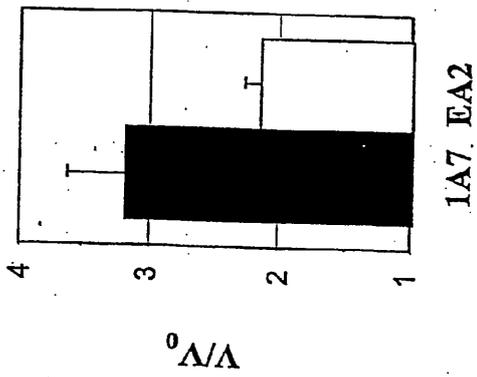
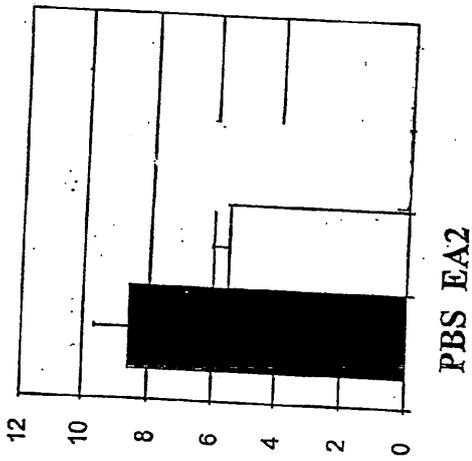
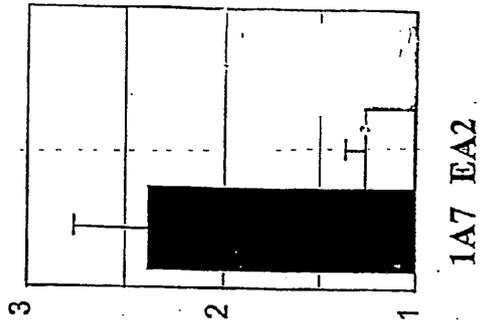


FIG. 3B



FIGS. 4A-4C

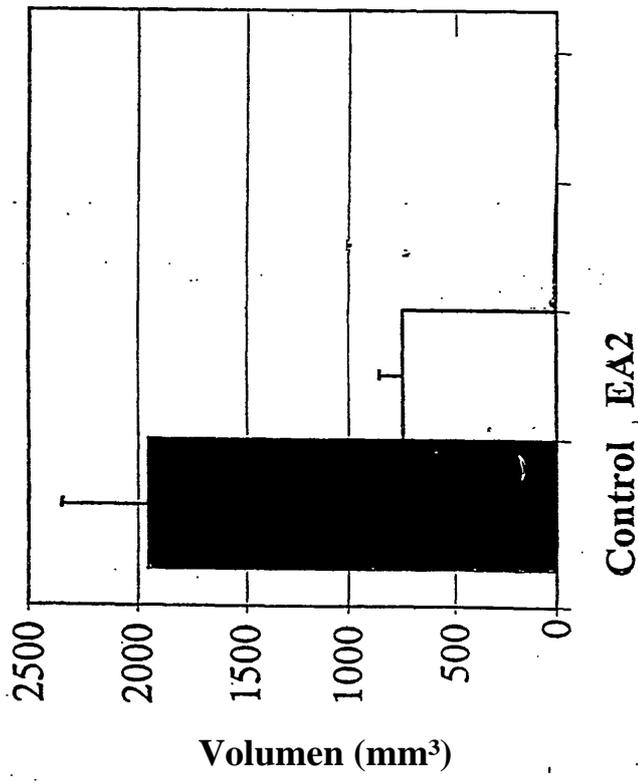
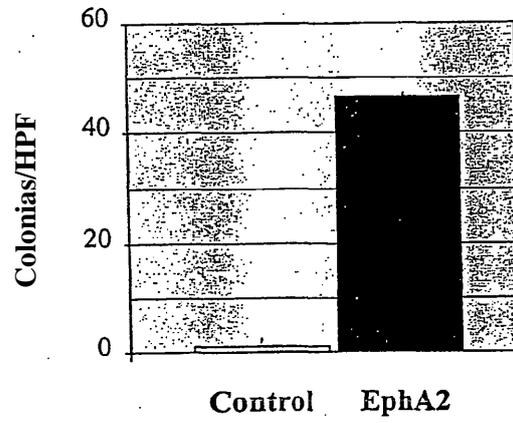
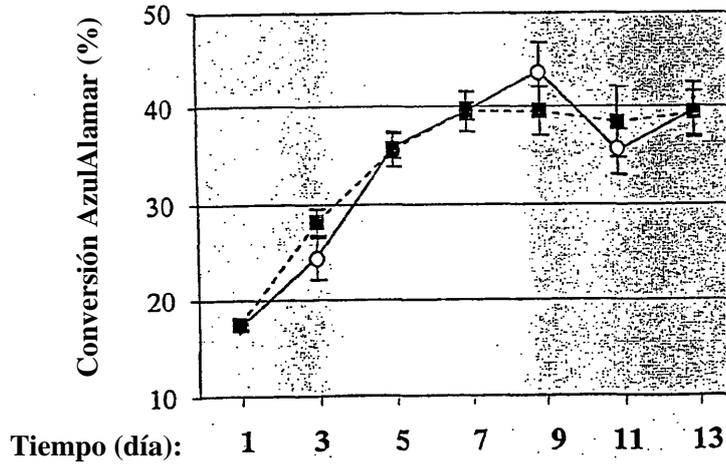


FIG. 4D

A

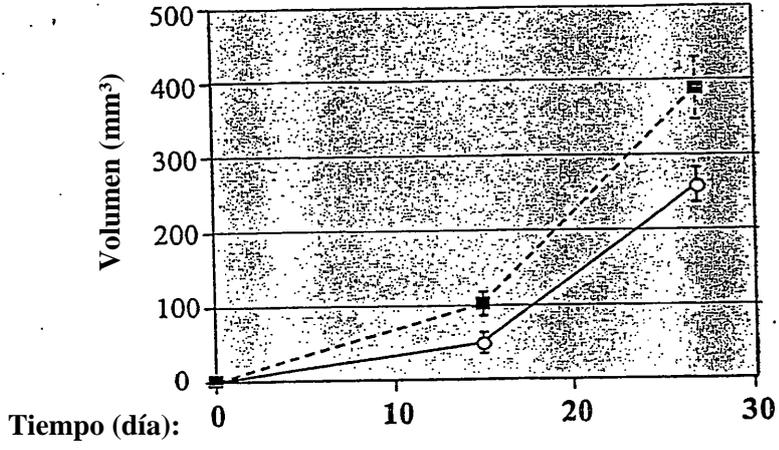


B

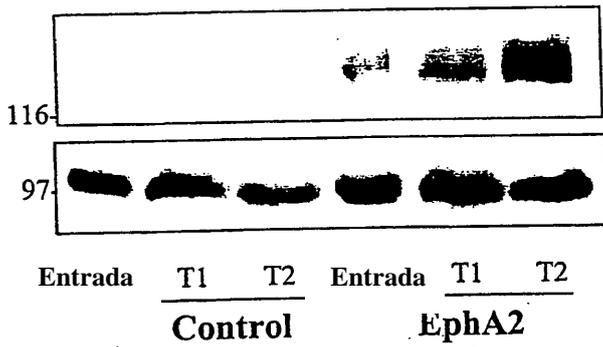


FIGS. 5A-5B

A

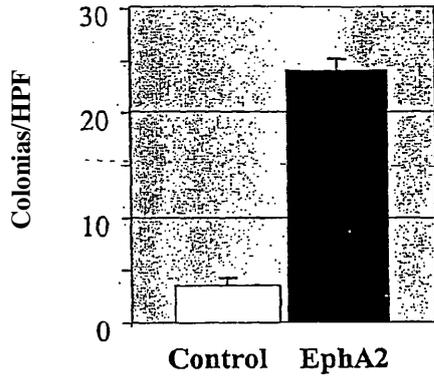


B

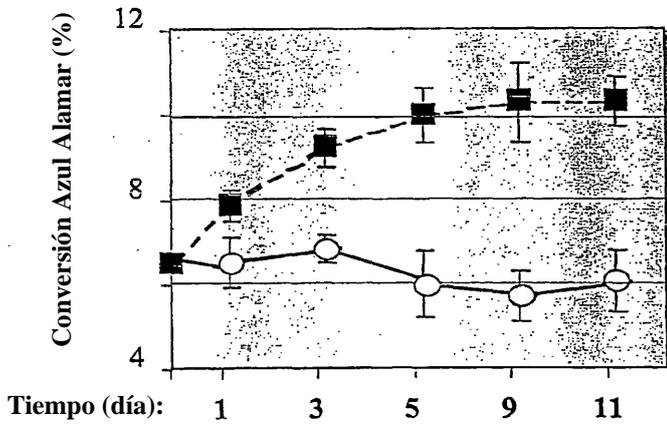


FIGS. 6A-6B

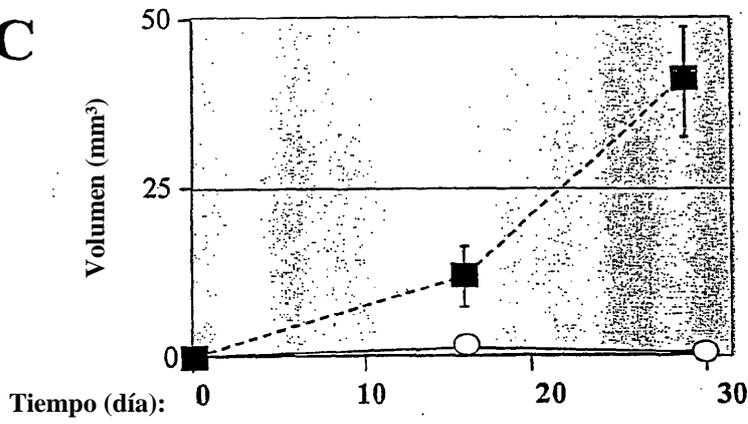
A



B

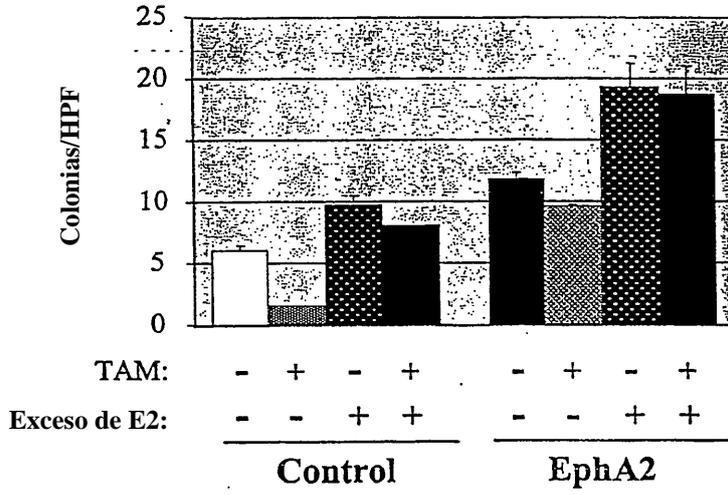


C

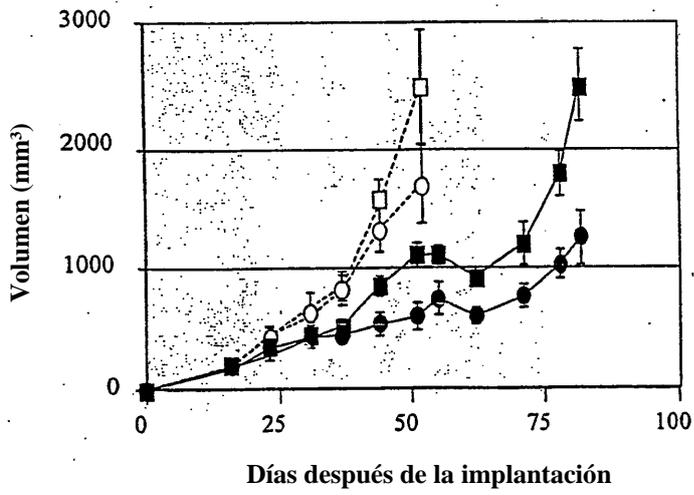


FIGS. 7A-7C

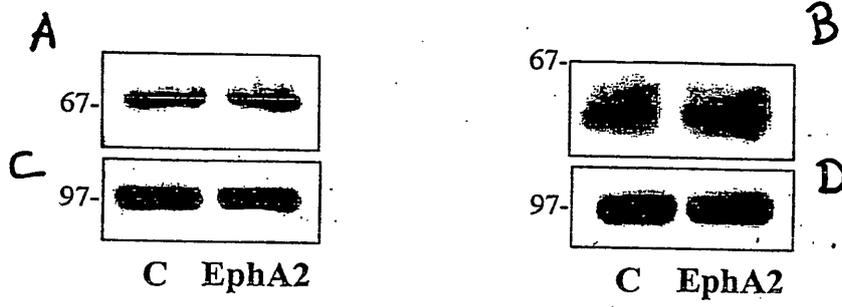
A



B

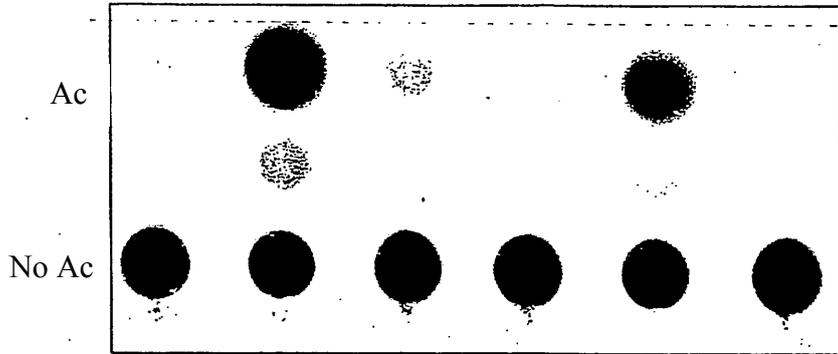


FIGS. 8A-8B

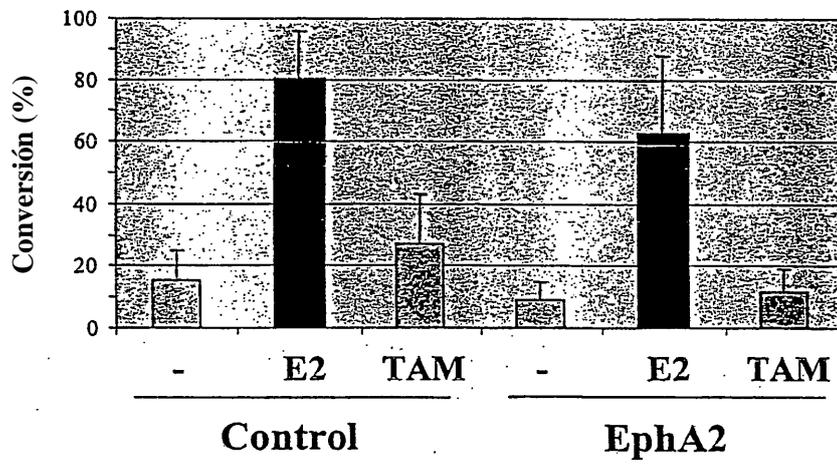


FIGS. 9A-9D

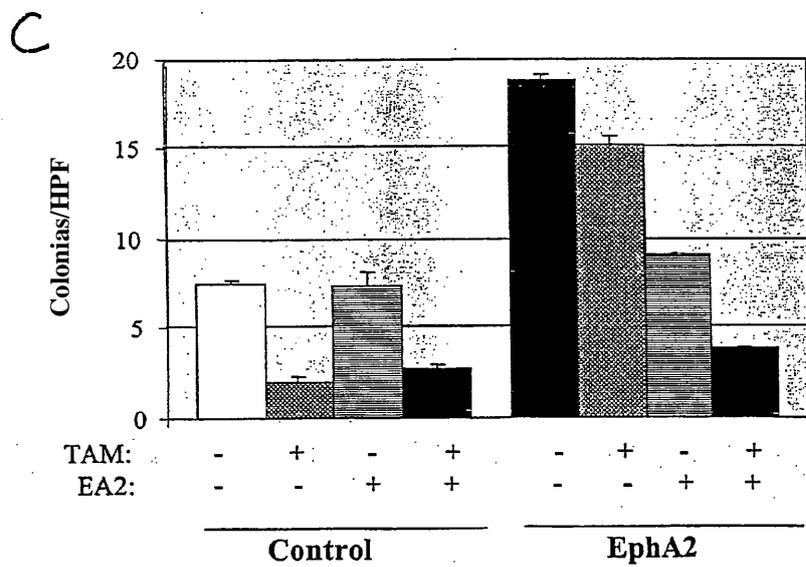
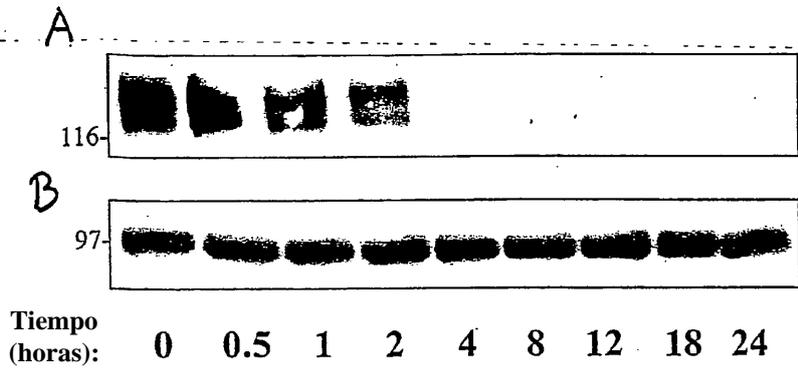
E



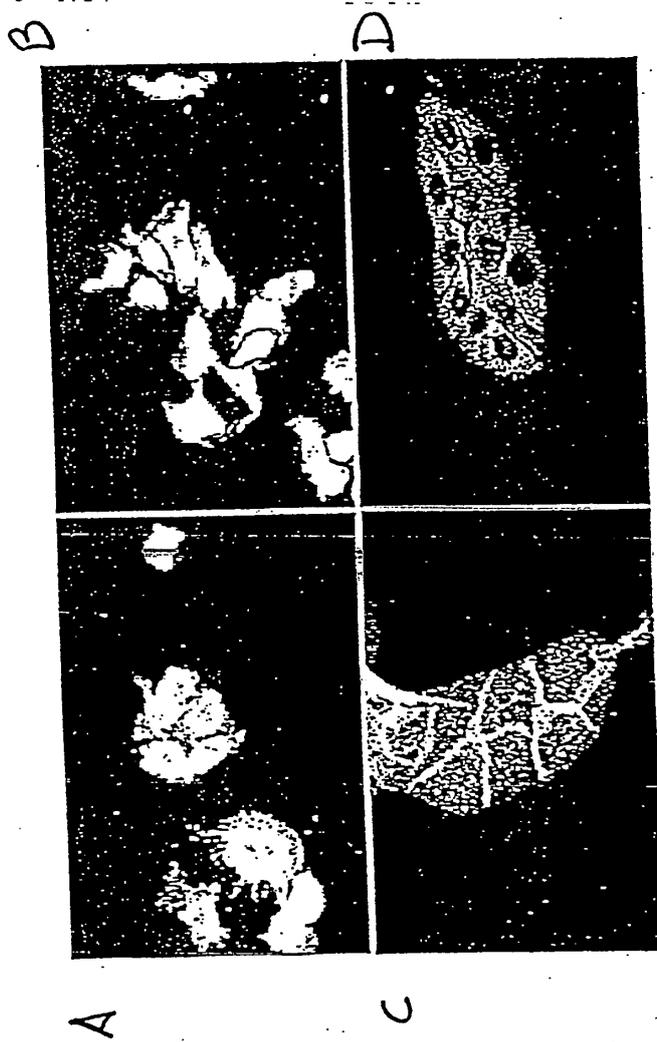
F



FIGS. 9E-9F



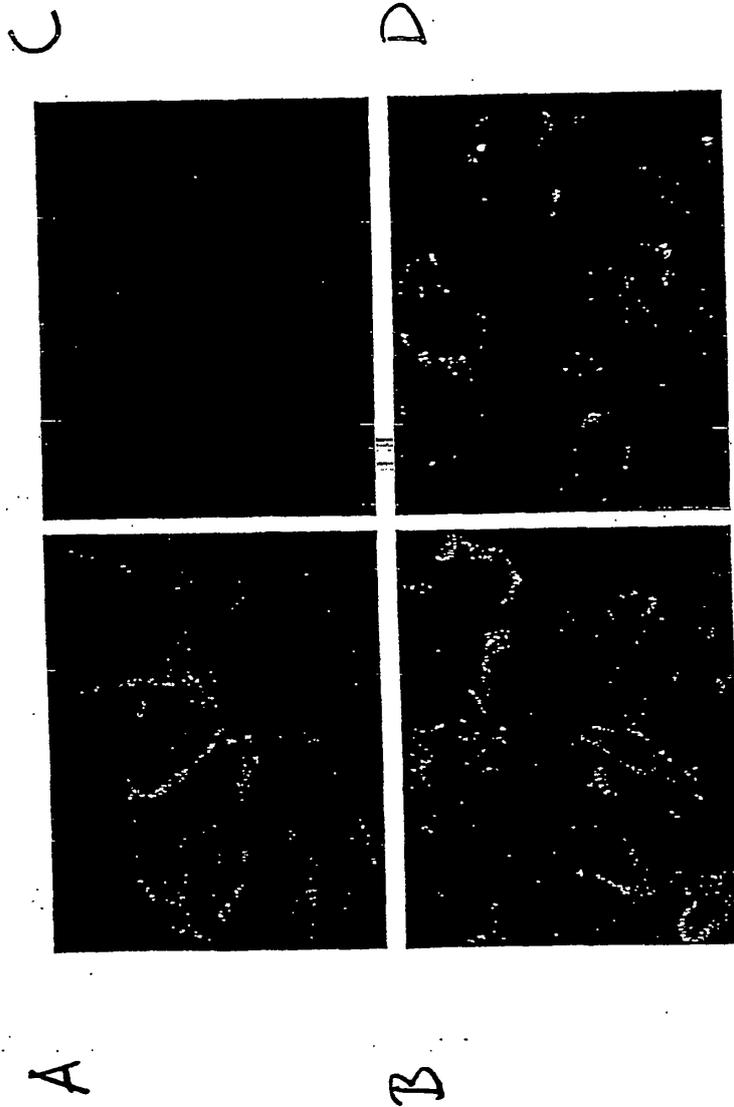
FIGS. 10A-10C



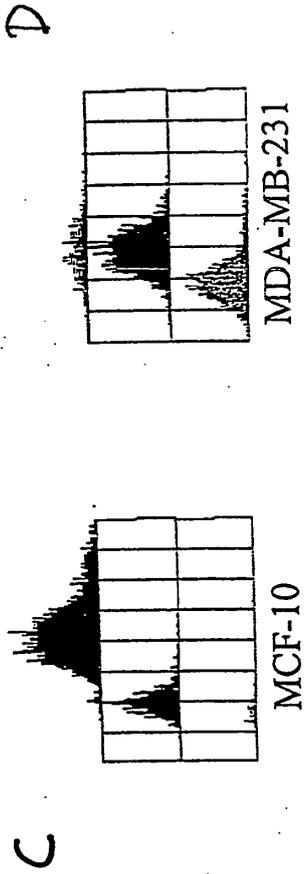
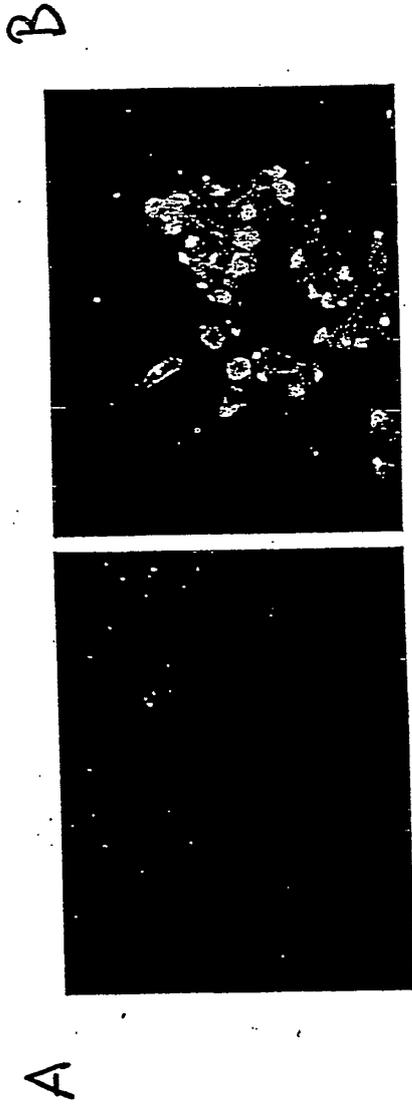
FIGS. 11A-11D



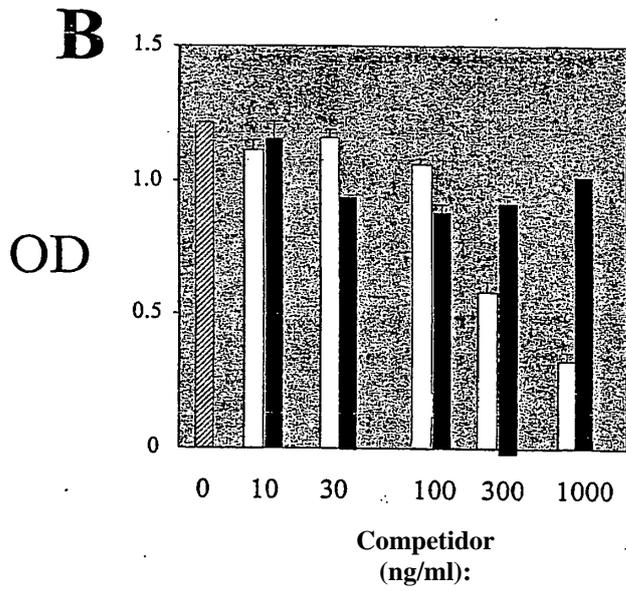
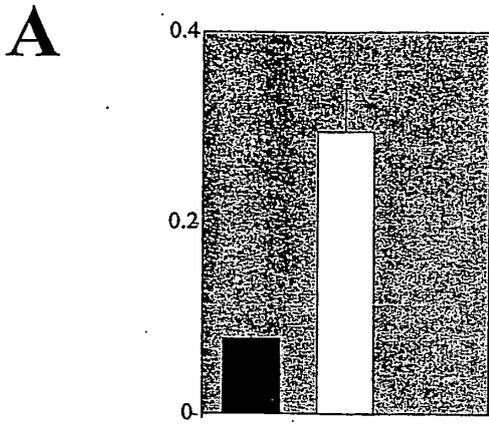
FIG. 12



FIGS. 13A-13D



FIGS. 14A-14D



FIGS. 15A-15B

EA2 Variable Light Chain

```

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

```

FIG. 16A

Cadena Ligera Variable de EA2

EA2 Variable Heavy Chain

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

FIG. 16B

Cadena Pesada Variable de EA2

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante se incluye únicamente para la comodidad del lector, no formando parte del documento de la patente europea. A pesar del sumo cuidado durante la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones, declinando la OEP toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción:

ES 2 377 720 T3

- EP 239400 A [0030] [0114] [0116]
- EP 592106 A [0030] [0114] [0116]
- EP 519596 A [0030] [0114] [0116]
- WO 9109967 A [0030] [0114] [0116]
- WO 9317105 A [0030] [0116]
- US 5225539 A [0030] [0114] [0116]
- US 5530101 A [0030] [0114] [0116]
- US 5565332 A [0030] [0114] [0116]
- US 5585089 A [0030] [0114] [0115] [0116]
- US 5766886 A [0030] [0116]
- US 6407213 B [0030] [0116]
- WO 9317715 A [0071]
- WO 9208802 A [0071]
- WO 9100360 A [0071]
- WO 9205793 A [0071]
- US 4474893 A [0071]
- US 4714681 A [0071]
- US 4925648 A [0071]
- US 5573920 A [0071]
- US 5601819 A [0071]
- WO 9404678 A [0079]
- WO 9425591 A [0079]
- US 6005079 A [0079]
- WO 9734631 A [0080]
- WO 02060919 A [0080]
- WO 9321232 A [0089]
- EP 439095 A [0089]
- US 5474981 A [0089]
- US 5336603 A [0090] [0100]
- US 5622929 A [0090] [0100]
- US 5359046 A [0090] [0100]
- US 5349053 A [0090] [0100]
- US 5447851 A [0090] [0100]
- US 5112946 A [0090] [0100]
- EP 307434 A [0090] [0100]
- EP 367166 A [0090] [0100]
- WO 9604388 A [0090] [0100]
- WO 9106570 A [0090] [0100]
- US 5605793 A [0091]
- US 5811238 A [0091]
- US 5830721 A [0091]
- US 5834252 A [0091]
- US 5837458 A [0091]
- WO 9733899 A [0097]
- WO 9734911 A [0097]
- WO 9923105 A [0097]
- US 4676980 A, Segal [0101]
- GB 9101134 W [0108]
- WO 9002809 A [0108]
- WO 9110737 A [0108]
- WO 9201047 A [0108]
- WO 9218619 A [0108]
- WO 9311236 A [0108]
- WO 9515982 A [0108]
- WO 9520401 A [0108]
- WO 9713844 A [0108]
- US 5698426 A [0108]
- US 5223409 A [0108]
- US 5403484 A [0108]
- US 5580717 A [0108]
- US 5427908 A [0108]
- US 5750753 A [0108]
- US 5821047 A [0108]
- US 5571698 A [0108]
- US 5516637 A [0108]
- US 5780225 A [0108]
- US 5658727 A [0108]
- US 5733743 A [0108]
- US 5969108 A [0108]
- WO 9222324 A [0110]

- US 4444887 A [0112]
- US 4716111 A [0112]
- WO 9846645 A [0112]
- WO 9850433 A [0112]
- WO 9824893 A [0112] [0113]
- WO 9816654 A [0112]
- WO 9634096 A [0112] [0113]
- WO 9633735 A [0112] [0113]
- WO 9110741 A [0112]
- US 5413923 A [0113]
- US 5625126 A [0113]
- US 5633425 A [0113]
- US 5569825 A [0113]
- US 5661016 A [0113]
- US 5545806 A [0113]
- US 5814318 A [0113]
- US 5939598 A [0113]
- US 6311415 B [0114]
- US 5807715 A [0114] [0125]
- US 4816567 A [0114]
- US 4816397 A [0114]
- WO 8605807 A [0123]
- WO 8901036 A [0123]
- US 5122464 A [0123]
- US 5679377 A [0189]
- US 5916597 A [0189]
- US 5912015 A [0189]
- US 5989463 A [0189]
- US 5128326 A [0189]
- WO 9915154 A [0189]
- WO 9920253 A [0189]
- US 4526938 A [0190]
- WO 9105548 A [0190]
- WO 9620698 A [0190]
- US 60379368 A [0252]
- US 60418204 A [0252]
- US 60460358 A [0252]
- US 60379368 B [0252]
- US 60418204 B [0252]
- US 60460358 B [0252]

Referencia bibliográficas citadas en la descripción que no se corresponden con patentes:

- **Robbins ; Angell.** Basic Pathology. W.B. Saunders Co, 1976, 68-122 [0002]
- **Rhim et al.** *Critical Reviews in Oncogenesis*, 1997, vol. 8, 305 [0006]
- **Patarca.** *Critical Reviews in Oncogenesis*, 1996, vol. 7, 343 [0006]
- **Malik et al.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, vol. 1287, 73 [0006]
- **Cance et al.** *Breast Cancer Res Treat*, 1995, vol. 35, 105 [0006]
- **Hunter.** *Cell*, 1997, vol. 88, 333 [0006]
- **Levitzki et al.** *Science*, 1995, vol. 267, 1782 [0006]
- **Kondapaka et al.** *Molecular & Cellular Endocrinology*, 1996, vol. 117, 53 [0006]
- **Fry et al.** *Current Opinion in BioTechnology*, 1995, vol. 6, 662 [0006]
- **Zantek et al.** *Cell Growth & Differentiation*, 1999, vol. 10, 629 [0007]
- **Lindberg et al.** *Molecular & Cellular Biology*, 1990, vol. 10, 6316 [0007]
- Cell. Eph Nomenclature Committee, 1997, vol. 90, 403 [0007]
- **Gale et al.** *Cell & Tissue Research*, 1997, vol. 290, 227 [0007]
- **Lawrence; Steeg.** *World J. Urol.*, 1996, vol. 14, 124-130 [0008]
- Principles of Cancer Patient Management. **Stockdale.** Scientific American: Medicine. 1998, vol. 3 [0009]

- **Gilman et al.** Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Pergamon Press, 1990 [0010]
- Principles Of Cancer Patient Management. **Stockdale.** Scientific American Medicine. 1998, vol. 3 [0011]
- **Padlan.** *Molecular Immunology*, 1991, vol. 28 (4/5), 489-498 [0030] [0116]
- **Studnicka et al.** *Protein Engineering*, 1994, vol. 7 (6), 805-814 [0030] [0116]
- **Roguska et al.** *PNAS*, 1994, vol. 91, 969-973 [0030] [0116]
- **Tan et al.** *J. Immunol.*, 2002, vol. 169, 1119-25 [0030] [0116]
- **Caldas et al.** *Protein Eng.*, 2000, vol. 13, 353-60 [0030] [0116]
- **Morea et al.** *Methods*, 2000, vol. 20, 267-79 [0030] [0116]
- **Baca et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 10678-84 [0030] [0116]
- **Roguska et al.** *Protein Eng.*, 1996, vol. 9, 895-904 [0030]
- **Couto et al.** *Cancer Res.*, vol. 55 (23), 5973s-5977s [0030]
- **Couto et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 1717-22 [0030]
- **Sandhu.** *Gene*, 1994, vol. 150, 409-10 [0030] [0116]
- **Pedersen et al.** *J. Mol. Biol.*, 1994, vol. 235, 959-73 [0030] [0116]
- **Jones et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0030] [0116]
- **Reichmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0030]
- **Presta.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0030] [0116]
- **Kabat et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest. Public Health Service, National Institutes of Health*, 1991 [0031]
- **Chothia ; Lesk.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0031]
- Physicians' Desk Reference. 2002 [0041]
- **Pluckthun.** The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0042]
- **Tutt et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60-69 [0071]
- **Kostelny et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1547-1553 [0071]
- **Muyldermans et al.** *Trends Biochem. Sci.*, 2001, vol. 26, 230 [0079]
- **Nuttall et al.** *Cur. Pharm. Biotech.*, 2000, vol. 1, 253 [0079]
- **Reichmann ; Muyldermans.** *J. Immunol. Meth.*, 1999, vol. 231, 25 [0079]
- Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc, 1989, vol. 1, 6.3.1-6.3.62.10.3 [0087]
- **Naramura et al.** *Immunol. Lett.*, 1994, vol. 39, 91-99 [0089]
- **Gillies et al.** *PNAS*, 1992, vol. 89, 1428-1432 [0089]
- **Fell et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 146, 2446-2452 [0089]
- **Ashkenazi et al.** *PNAS*, 1991, vol. 88, 10535-10539 [0090] [0100]
- **Zheng et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 154, 5590-5600 [0090] [0100]
- **Vil et al.** *PNAS*, 1992, vol. 89, 11337-11341 [0090]
- **Patten et al.** *Curr. Opinion Biotechnol.*, 1997, vol. 8, 724-33 [0091]
- **Harayama.** *Trends Btoiechnol.*, 1998, vol. 16, 76 [0091]
- **Hansson et al.** *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 287, 265 [0091]
- **Lorenzo ; Blasco.** *BioTechniques*, 1998, vol. 24, 308 [0091]
- **Wilson et al.** *Cell*, 1984, vol. 37, 767 [0092]
- **Takahashi et al.** *J. Iminunol.*, 1994, vol. 6, 1567 [0097]
- **Denardo et al.** *Clin Cancer Res.*, 1998, vol. 4, 2483-90 [0098] [0100]
- **Peterson et al.** *Bioconjug. Chem.*, 1999, vol. 10, 553 [0098]
- **Zimmerman et al.** *Nucl. Med. Biol.*, 1999, vol. 26, 943-50 [0098]
- **Garnett.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, vol. 53, 171-216 [0100]
- Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy. **Arnon et al.**

- Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy. Alan R. Liss, Inc, 1985, 243-56 [0100]
- Antibodies For Drug Delivery. **Hellstrom et al.** Controlled Drug Delivery. Marcel Dekker, Inc, 1987, 623-53 [0100]
 - Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review. **Thorpe et al.** Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications. 1985, 475-506 [0100]
 - Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy. Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy. Academic Press, 1985, 303-16 [0100]
 - **Thorpe et al.** *Immunol; Rev.*, 1982, vol. 62, 119-58 [0100]
 - **Vil et al.** *PNAS*, 1992, vol. 89, 11337-11341 [0100]
 - **Paterson et al.** *Bioconjug. Chem.*, 1999, vol. 10, 553 [0100]
 - **Zimmerman et al.** *Nucl. Med. Biol.*, vol. 26, 943-50 [0100]
 - **Garnett.** *Adv. Drug Deliv.*, 2002, vol. 53, 171-216 [0100]
 - **Harlow et al.** Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0104]
 - **Hammerling et al.** Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas. Elsevier, 1981, 563-681 [0104]
 - **Brinkman et al.** *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 182, 41-50 [0108]
 - **Ames et al.** *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 184, 177 [0108]
 - **Kettleborough et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 952-958 [0108]
 - **Persic et al.** *Gene*, 1997, vol. 187, 9 [0108]
 - **Burton et al.** *Advances in Immunology*, 1994, vol. 57, 191-280 [0108]
 - **Mullinax et al.** *BioTechniques*, 1992, vol. 12, 864 [0110]
 - **Sawai et al.** *AJRI*, 1995, vol. 34, 26 [0110]
 - **Better et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1041 [0110]
 - **Lonberg ; Huszar.** *Int. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0113]
 - **Morrison.** *Science*, 1985, vol. 229, 1202 [0114]
 - **Oi et al.** *BioTechniques*, 1986, vol. 4, 214 [0114]
 - **Gillies et al.** *J. Immunol. Methods*, 1989, vol. 125, 191-202 [0114]
 - **Radian.** *Molecular Immunology*, 1991, vol. 28 (4/5), 489-498 [0114]
 - **Studnicka et al.** *Protein Engineering*, 1994, vol. 7, 805 [0114]
 - **Roguska et al.** *PNAS*, 1994, vol. 91, 969 [0114]
 - **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323 [0115] [0116]
 - **Roguska et al.** *Protein Eng.*, 1995, vol. 9, 895-904 [0116]
 - **Couto et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55 (23), 5973s-5977s [0116]
 - **Couto et al.** *Cancer Res.*, vol. 55, 1717-22 [0116]
 - **Riechmann et al.** *Nature*, 1998, vol. 332, 323 [0116]
 - **Greenspan ; Bona.** *FASEB J.*, vol. 7, 437-444 [0117]
 - **Nissinoff.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 2429-2438 [0117]
 - **Kutmeier et al.** *BioTechniques*, 1994, vol. 17, 242 [0119]
 - **Sambrook et al.** Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1990 [0121]
 - Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1998 [0121]
 - **Chothia et al.** *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 278, 457-479 [0122]
 - **Foecking et al.** *Gene*, 1986, vol. 45, 101 [0125]
 - **Cockett et al.** *BioTechnology*, 1990, vol. 8, 2 [0125]
 - **Ruther et al.** *EMBO*, 1983, vol. 12, 1791 [0126]
 - **Inouye ; Inouye.** *Nucleic Acids Res.*, 1985, vol. 13, 3101-3109 [0126]
 - **Van Heeke; Schuster.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 5503-5509 [0126]
 - **Logan ; Shenk.** *PNAS*, 1984, vol. 81 (1), 355-359 [0128]
 - **Bittner et al.** *Methods in Enzymol.*, 1987, vol. 153, 516-544 [0128]

- **Wigler et al.** *Cell*, 1977, vol. 11, 223 [0131]
- **Szybalska ; Szybalski.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 48, 202 [0131]
- **Lowy et al.** *Cell*, 1980, vol. 22, 8-17 [0131]
- **Wigler et al.** *PNAS*, 1980, vol. 77, 357 [0131]
- **O'Hare et al.** *PNAS*, 1981, vol. 78, 1527 [0131]
- **Mulligan ; Berg.** *PNAS*, 1981, vol. 78, 2072 [0131]
- **Wu; Wu.** *Biotherapy*, vol. 3, 87 [0131]
- **Tolstoshev.** *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, vol. 32, 573 [0131]
- **Mulligan.** *Science*, 1993, vol. 260, 926 [0131]
- **Morgan; Anderson.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1993, vol. 62, 191 [0131]
- **May.** *TIB TECH*, 1993, vol. 11, 155 [0131]
- **Santerre et al.** *Gene*, 1984, vol. 30, 147 [0131]
- *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, 1993 [0131]
- **Kriegler.** *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual.* Stockton Press, 1990 [0131]
- *Current Protocols in Human Genetics.* John Wiley & Sons, 1994 [0131]
- **Colberre-Garapin et al.** *J. Mol. Biol.*, 1981, vol. 150, 1 [0131]
- *DNA cloning*, 1987, vol. 3 [0132]
- **Crouse et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 257 [0132]
- **Proudfoot.** *Nature*, 1986, vol. 322, 52 [0133]
- **Kohler.** *PNAS*, 1980, vol. 77, 2197 [0133]
- *Physician's Desk Reference.* 2002 [0138] [0170] [0201]
- **Fishman et al.** *Medicine.* J.B. Lippincott Co, 1985 [0150]
- **Murphy et al.** *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery.* Penguin Books U.S.A., Inc, 1997 [0150]
- **Hardie ; Hanks.** *The Protein Kinase Facts Book, I and II.* Academic Press, 1995 [0165]
- *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development.* 1999 [0179]
- **Karger.** *Contributions to Oncology*, 1999 [0179]
- *The Nude Mouse in Oncology Research.* 1997 [0179]
- *Anticancer Drug Development Guide.* 1997 [0179]
- **Wu; Wu.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0187]
- **Sefton.** *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 1987, vol. 14 (20 [0189]
- **Buchwald et al.** *Surgery*, 1980, vol. 88, 507 [0189]
- **Saudek et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1989, vol. 321, 574 [0189]
- *Medical Applications of Controlled Release.* CRC Pres, 1974 [0189]
- *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance.* Wiley, 1984 [0189]
- **Ranger ; Peppas.** *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 1983, vol. 23, 61 [0189]
- **Levy et al.** *Science*, 1985, vol. 228, 190 [0189]
- **During et al.** *Ann. Neurol.*, 1989, vol. 25, 351 [0189]
- **Howard et al.** *J. Neurosurg.*, 1989, vol. 7 (1), 105 [0189]
- **Goodson.** *Medical Applications of Controlled Release*, 1984, vol. 2, 115-138 [0189]
- **Langer.** *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0190]
- **Ning et al.** *Radiotherapy & Oncology*, 1996, vol. 39, 179-189 [0190]
- **Song et al.** *PDA Journal of pharmaceutical Science & Technology*, 1995, vol. 50, 372-397 [0190]
- **Cleek et al.** *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 1997, vol. 24, 853-854 [0190]
- **Lam et al.** *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 1997, vol. 24, 759-760 [0190]
- **Kanner et al.** *J. Immunol. Meth.*, 1989, vol. 120, 115-124 [0213]
- **Kilpatrick et al.** *Hybridoma*, 1998, vol. 17, 576 [0215]
- **Zelinski et al.** *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, 2301 [0216]
- **Zantek et al.** *Cell Growth Diff.*, 1999, vol. 10, 629 [0216]

- **Zantek et al.** *Cell Growth Diff.*, 1999, vol. 10, 629-38 [0218]
- **Zelinski et al.** *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, 2301-6 [0221] [0223] [0227]
- **Nakshatri et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1997, vol. 17, 3629-39 [0233]
- Neoplasms of the prostate. **Bostwick.** *Urologic Surgical Pathology.* 1997, 343-422 [0236]
- **Gleson ; Mellinger.** *J. Urol.*, 1974, vol. 111, 58-64 [0236]
- **Fleming et al.** *AJCC Cancer Staging Manual.* Raven and Lippincott, 1997 [0236]
- **Jiang et al.** *Am. J. Pathol.*, 2002, vol. 160, 667-71 [0238]
- **Cheng et al.** *Am. J. Pathol.*, 1996, vol. 148, 1375-80 [0238]

*****Doña Yasmína Almela Burgos, Intérprete Jurado de Inglés, certifica que la que antecede es traducción fiel y completa al español de un documento redactado en inglés.

Elche, a 23 de enero de 2012

La Traductora Jurado