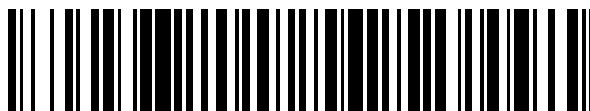


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 204**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2007** **E 07797067 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014** **EP 1973950**

54 Título: **Anticuerpos anti-EphB4 y métodos para usar los mismos**

30 Prioridad:

05.01.2006 US 756889 P
20.01.2006 US 760892 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

WU, YAN y
YAN, MINHONG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 526 204 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-EphB4 y métodos para usar los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en líneas generales a los campos de biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-EphB4, y a usos de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

El desarrollo de un suministro vascular es un requisito fundamental para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Los tejidos de crecimiento activo tales como embriones y tumores requieren un suministro adecuado de sangre. Satisfacen esta necesidad produciendo factores pro-angiogénicos, que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso llamado angiogénesis. La formación de conductos vasculares es un acontecimiento biológico complejo pero ordenado que implica todas o muchas de las siguientes etapas: a) las células endoteliales (EC) proliferan a partir de EC existentes o se diferencian a partir de células progenitoras; b) las EC migran y se unen para formar estructuras tipo cordón; c) los cordones vasculares después experimentan tubulogénesis para formar vasos con un lumen central; d) los cordones o vasos existentes emiten brotes para formar vasos secundarios; e) el plexo vascular primitivo experimenta remodelado reformación adicional; y f) se reclutan células peri-endoteliales para revestir los conductos endoteliales, proporcionando funciones de mantenimiento y modulación a los vasos; incluyendo dichas células pericitos para capilares pequeños, células de músculo liso para vasos grandes, y células de miocardio en el corazón. Hanahan, *Science* 277:48-50 (1997); Hogan y Kolodziej, *Nat. Rev. Genet.* 3:513-23 (2002); Lubarsky y Krasnow, *Cell* 112:19-28 (2003).

Ahora está bien establecido que la angiogénesis está implicada en la patogénesis de diversos trastornos. Éstos incluyen tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, enfermedades neovasculares intraoculares tales como retinopatías proliferativas, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glaucoma neovascular, rechazo inmune de tejido corneal transplantado y otros tejidos, artritis reumatoide, y psoriasis. Folkman et al., *J. Biol. Chem.* 267:10931-34 (1992); Klagsbrun et al., *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39 (1991); y Garner A., "Vascular diseases," En: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A., Klintworth GK, eds., 2ª Edición (Marcel Dekker, NY, 1994), pág. 1625-1710.

En el caso de crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar nutrición para el crecimiento y metástasis del tumor. Folkman et al., *Nature* 339:58 (1989). La neovascularización permite que las células tumorales adquieran ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa en comparación con las células normales. Un tumor habitualmente comienza como una única célula aberrante que puede proliferar solamente hasta un tamaño de unos pocos milímetros cúbicos debido a la distancia desde los lechos capilares disponibles, y puede permanecer 'latente' sin crecimiento adicional y diseminación durante un largo periodo de tiempo. Algunas células tumorales cambian al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos recién formados no solamente facilitan el crecimiento continuado del tumor primario, sino también la diseminación y recolonización de células tumorales metastásicas. Por consiguiente, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones tumorales y la supervivencia del paciente en cáncer de mama así como en otros varios tumores. Weidner et al., *N. Engl. J. Med.* 324:1-6 (1991); Horak et al. *Lancet* 340:1120-24 (1992); Macchiarini et al. *Lancet* 340:145-46 (1992). Los mecanismos precisos que controlan el cambio angiogénico no está bien comprendido, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral resultan del balance neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de la angiogénesis (Folkman, *Nat. Med.* 1(1):27-31 (1995)).

El proceso de desarrollo vascular está firmemente regulado. Hasta la fecha, una cantidad significativa de moléculas, principalmente factores secretados producidos por células adyacentes, ha demostrado regular la diferenciación, proliferación, migración y unión de EC en estructuras tipo cordón. Por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se ha identificado como el factor clave implicado en la estimulación de la angiogénesis y en la inducción de la permeabilidad vascular. Ferrara et al., *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997). El hallazgo de que la pérdida de incluso un único alelo de VEGF provoca letalidad embrionaria apunta hacia un papel irremplazable desempeñado por este factor en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular. Además, VEGF ha demostrado ser un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara et al., *Endocr. Rev. supra*. El ARNm de VEGF se sobre-expresa por la mayoría de los tumores humanos examinados. Berkman et al., *J. Clin. Invest.* 91:153-59 (1993); Brown et al., *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown et al., *Cancer Res.* 53:4727-35 (1993); Mattern et al., *Brit. J. Cancer* 73:931-34 (1996); Dvorak et al., *Am. J. Pathol.* 146:1029-39 (1995).

Además, los niveles de concentración de VEGF en fluidos oculares están altamente correlacionados con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías diabéticas y otras retinopatías relacionadas con isquemia. Aiello et al., *N. Engl. J. Med.* 331:1480-87 (1994). Además, algunos estudios han demostrado la localización de VEGF en membranas neovasculares coroidales en pacientes afectados por AMD.

Lopez et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-68 (1996).

Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF suprimen el crecimiento de diversas líneas celulares de tumor humano en ratones desnudos (Kim et al., Nature 362:841-44 (1993); Warren et al., J. Clin. Invest. 95:1789-97 (1995); Borgström et al., Cancer Res. 56:4032-39 (1996); Melnyk et al., Cancer Res. 56:921-24 (1996)) y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos isquémicos de retina (Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de la acción de VEGF son candidatos prometedores para el tratamiento de tumores y diversos trastornos neovasculares intraoculares. Dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento EP 817.648, publicado el 14 de enero de 1998; y en el documento WO 98/45331 y el documento WO 98/45332, ambos publicados el 15 de octubre de 1998. Un anticuerpo anti-VEGF, bevacizumab, se ha aprobado por la FDA para su uso en combinación con un régimen de quimioterapia para tratar cáncer colorrectal metastásico (CRC). Y bevacizumab se está investigando en muchos ensayos clínicos en curso para tratar diversas indicaciones cancerosas.

El receptor EphB4 ("EphB4" o "EphB4R") es un miembro de la familia de receptores eph, que constituye la familia más grande de receptores tirosina quinasa en el genoma humano (revisado en Dodelet, Oncogene, 19: 5614-5619, 2000). Las tirosina quinasas de receptores eph humanos se clasifican por identidad de secuencia en una clase A y una clase B con correspondientes ligandos de tipo A y tipo B mencionados como efrinas. La señalización puede suceder de manera directa, en que el receptor tirosina quinasa se activa por el ligando, y de manera inversa, en que los ligandos efrinaB transmembrana se activan mediante la interacción con receptores. Las interacciones del ligando del receptor Eph se han implicado en una amplia gama de funciones biológicas incluyendo guía de axones, formación de límites tisulares, vasculogénesis, y motilidad celular (Kullander et al. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3: 475-486, 2002; Cheng et al. Cytokine Growth Factor Rev., 13: 75-85, 2002; Coulthard et al. Int. J. Dev. Biol., 46: 375-384, 2002). EphB4 se une a ligandos tales como efrina-B1, efrina-B2, y efrina-B3. El receptor EphB4 tiene una región extracelular con un motivo rico en cisteínas que se extiende sobre su mitad amino-terminal seguida de dos motivos de fibronectina tipo II. Existe un dominio intracelular que presenta una región quinasa conservada y un dominio transmembrana.

Está claro que sigue existiendo la necesidad de agentes que tengan atributos clínicos que sean óptimos para su desarrollo como agentes terapéuticos. La invención descrita en este documento cumple esta necesidad y proporciona otros beneficios.

El documento WO 2004/024773 describe métodos para inhibir el crecimiento canceroso de una célula usando un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo del polipéptido EphB4. También se describen anticuerpos purificados de EphB4, métodos para prevenir o tratar el cáncer y métodos para identificar agentes que puedan inhibir el crecimiento canceroso de una célula.

El documento WO 2005/090406 describe composiciones polipeptídicas (por ejemplo, anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen a EphB4), y métodos para inhibir la actividad EphB4. También se describen métodos y composiciones para tratar el cáncer o para tratar enfermedades asociadas con angiogénesis.

Sumario de la invención

La invención se basa en parte en la identificación de diversos agentes de unión a EphB4 (tal como inmunoconjugados, anticuerpos, y fragmentos de los mismos). EphB4 se presenta como una importante y ventajosa diana terapéutica, y la invención proporciona composiciones y métodos basados en la unión de EphB4. Los agentes de unión a EphB4 de la invención, como se describe en este documento, proporcionan importantes agentes terapéuticos y de diagnóstico para su uso en abordar afecciones patológicas asociadas con la expresión y/o actividad de las vías EphB4-ligando EphB4. Por consiguiente, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con la unión de EphB4.

La presente invención proporciona anticuerpos definidos en las reivindicaciones que se unen (tal como unión específica) a EphB4. La forma IgG de longitud completa del anticuerpo puede unirse específicamente a EphB4 humano con una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o mejor. Como está bien establecido en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor puede determinarse usando cualquiera de diversos ensayos, y expresarse en términos de diversos valores cuantitativos. Por consiguiente, en una realización, la afinidad de unión se expresa como valores Kd y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos minimizados de avidéz). General y preferiblemente, la afinidad de unión se mide in vitro, ya sea en un entorno libre de células o asociado a células. Cualquiera de varios ensayos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en este documento, puede usarse para obtener mediciones de afinidad de unión incluyendo, por ejemplo, Biacore, radioinmunoensayo (RIA) y ELISA.

El anticuerpo puede unirse a una región de unión a ligando de EphB4. En algunas reas, el anticuerpo aislado se une a un polipéptido que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en el dominio extracelular de EphB4.

El anticuerpo inhibe, reduce, y/o bloquea la actividad EphB4, incluyendo la autofosforilación de EphB4 y la unión de efrina B2 a EphB4. También se describe un anticuerpo anti-EphB4, que comprende:

(a) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de región hipervariable (HVR) seleccionadas entre el grupo que consiste en:

- (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, donde A1-A11 es RASQDVSTAVA (SEC ID N° 9)
- (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es SASFLYS (SEC ID N° 11)
- (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QESTTTPPT (SEC ID N° 15)
- (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GFSISNYLH (SEC ID N° 2)
- (v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GGIYLYGSSEYADSVKG (SEC ID N° 4) y
- (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F17, donde F1-F17 es ARGSGRLRLGGLDYAMDY (SEC ID N° 7); y

(b) al menos una HVR variante, donde la secuencia de HVR variante comprende modificación de al menos un resto de la secuencia representada en las SEC ID N° 1-17.

De acuerdo con las reivindicaciones, la invención proporciona un anticuerpo que comprende seis HVR, donde cada HVR comprende o consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 1-17, y donde la SEC ID N° 9 o 10 corresponde a una HVR-L1, la SEC ID N° 11 o 12 corresponde a una HVR-L2, la SEC ID N° 13, 14, 15, 16, o 17 corresponde a una HVR-L3, la SEC ID N° 1 o 2 corresponde a una HVR-H1, la SEC ID N° 3, 4, 5 o 6 corresponde a una HVR-H2, y la SEC ID N° 7 u 8 corresponde a una HVR-H3.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, donde cada una, en orden, comprenden la SEC ID N° 9, 11, 13, 1, 3, 7.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, donde cada una, en orden, comprenden la SEC ID N° 10, 12, 14, 1, 3, 8.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, donde cada una, en orden, comprenden la SEC ID N° 9, 11, 15, 2, 4, 7.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, donde cada una, en orden, comprenden la SEC ID N° 9, 11, 16, 1, 5, 7.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, donde cada una, en orden, comprenden la SEC ID N° 9, 11, 17, 1, 6, 7.

Las HVR variantes en un anticuerpo descrito en este documento pueden tener modificaciones de uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, o más) restos dentro de la HVR.

Una HVR-L1 variante puede comprender 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: A6 (V o S), A7 (S o E), A8 (T o I), A9 (A o F), y A10 (V o L).

Una HVR-L2 variante puede comprender 1-2 (1 o 2) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: B4 (F o N) y B6 (Y o E).

Una HVR-L3 variante puede comprender 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: C2 (Q, E, o K), C3 (S o T), C4 (Y, N, T, E, o A), C5 (T, A, o Q), C6 (T, V, o I), C8 (P, L, o E), y C9 (T o S).

Una HVR-H1 variante puede comprender 1-3 (1, 2 o 3) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: D3 (T o S), D6 (G o N), y D9 (I o L).

Una HVR-H2 variante puede comprender 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E5 (P, o L), E7 (S o G), E8 (G o S), E10 (T, S, o R), y E11 (D, E, o G).

Una HVR-H3 variante puede comprender 1 sustitución en las siguientes posiciones: F3 (G o S).

La letra o letras en paréntesis después de cada posición indican un aminoácido de sustitución ilustrativa (es decir, remplazo); como sería evidente para un especialista en la técnica, la idoneidad de otros aminoácidos como aminoácidos de sustitución en el contexto descrito en este documento puede evaluarse de forma rutinaria usando técnicas conocidas en la técnica y/o descritas en este documento.

Las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N° 1-17 están numeradas con respecto a las HVR individuales (es decir, H1, H2 o H3) como se indica en la Figura 1, siendo la numeración coherente con el sistema de numeración de Kabat como se describe a continuación.

5 También se describen anticuerpos que comprenden secuencias HVR de cadena pesada como se representa en la Figura 1.

También se describen anticuerpos que comprenden secuencias HVR de cadena ligera como se representa en la Figura 1.

10 Algunos anticuerpos descritos en este documento comprenden un dominio variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 4D5 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EEUU) (también mencionado en la patente de Estados Unidos N° 6.407.213 y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93) que se representa en la SEC ID N° 18 a continuación.

15 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Asn** Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **His** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
Ile Lys 107 (SEC ID N° 18) (los restos HVR están subrayados)

En algunas realizaciones de los anticuerpos de la invención, la secuencia del dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 está modificada en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg y His como se indica en
25 negrita/cursiva anteriormente, respectivamente). En una realización, la secuencia modificada de huMAb4D5-8 comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. Por consiguiente, en una realización, un anticuerpo de la invención comprende a dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia representada en la SEC ID N° 52 a continuación:

30 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser **Gly** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **Ser** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
35 Ile Lys 107 (SEC ID N° 52) (los restos HVR están subrayados)

Los restos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 se indican en negrita/cursiva anteriormente.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia adecuada del dominio variable
40 flanqueante, con la condición de que la actividad de unión a EphB4 se retenga sustancialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia consenso flanqueante de cadena pesada del subgrupo III humano. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso flanqueante comprende sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias flanqueantes del dominio
45 variable de cadena pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EEUU) (también mencionado en las patentes de Estados Unidos N° 6.407.213 y 5.821.337, y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93). En una realización, estos anticuerpos comprenden adicionalmente una secuencia consenso flanqueante de cadena ligera xl humana. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias HVR de
50 cadena ligera de huMAb4D5-8 como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 6.407.213 y 5.821.337. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EEUU) (también mencionado en las patentes de Estados Unidos N° 6.407.213 y 5.821.337, y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93).

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, donde la
55 secuencia flanqueante comprende la secuencia de las SEC ID N° 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, y/o 37, y las secuencias HVR H1, H2 y H3 son las SEC ID N° 9, 11, y 15, respectivamente. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, donde la secuencia flanqueante comprende la secuencia de la SEC ID N° 38, 39, 40 y/o 41, y las secuencias HVR L1, L2 y L3 son las
60 SEC ID N° 2, 4, y 7, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, donde la
65 secuencia flanqueante comprende la secuencia de la SEC ID N° 46, 47, 48, y/o 49, y las secuencias HVR H1, H2 y H3 son las SEC ID N° 2, 4, y 7, respectivamente. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, donde la secuencia flanqueante comprende la secuencia de la SEC ID N° 42, 43, 44, y/o 45, y las secuencias HVR L1, L2 y L3 son las SEC ID N° 9, 11, y 15, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, donde la secuencia flanqueante comprende las secuencias de las SEC ID N° 46, 47, 51, y 49, y las secuencias HVR H1, H2 y H3 son las SEC ID N° 2, 4, y 7, respectivamente. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, donde la secuencia flanqueante comprende las secuencias de las SEC ID N° 42, 43, 50, y 45, y las secuencias HVR L1, L2 y L3 son las SEC ID N° 9, 11 y 15, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo de la invención está madurado en afinidad para obtener la afinidad de unión diana deseada. En un ejemplo, un anticuerpo de afinidad madurada de la invención comprende sustitución en una o más de las posiciones de aminoácido H28, H31, H34, H52a, H54, H55, H57, H58, H95, L29, L30, L31, L32, L33, L53, L55, L90, L91, L92, L93, L94, L96, o L97. En un ejemplo un anticuerpo de afinidad madurada de la invención comprende una o más de las siguientes sustituciones: (a) en la cadena pesada, T28S, G31N, I34L, P52aL, S54G, G55S, T57S o R, D58, E o G, G95S, o (b), en la cadena ligera, V29S, S30E, T31I, A32F, V33L, F53N, Y55E, Q90E o K, S91T, Y92N T E o A, T93V o I, T94V o I, P96L o E, o T97S.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 53. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 54. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 53 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 54.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 55. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 56. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 55 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 56.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 57. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 58. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 57 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 58.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 59. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 60. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 59 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 60.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 61. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 62. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID N° 61 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEC ID N° 62.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente por la unión a EphB4. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo en EphB4 que cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Como se sabe en la técnica, y como se describe en mayor detalle a continuación en este documento, la posición/límite de aminoácidos que delinean una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica (como se describe a continuación). Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden verse como posiciones hipervariables híbridas porque puede considerarse que estas posiciones están dentro de una región hipervariable bajo una serie de criterios mientras se consideran fuera de una región hipervariable bajo una serie diferente de criterios. También puede encontrarse una o más de estas posiciones en regiones hipervariables ampliadas (como se define adicionalmente a continuación).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de afinidad madurada, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, o scFv.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias de unión a antígeno de un donante no humano injertadas en una secuencia heteróloga no humana, humana o humanizada (por ejemplo, secuencias flanqueantes y/o de dominio constante). En una realización, el donante no humano es un ratón. En una realización, una secuencia de unión a antígeno es sintética, por ejemplo obtenida por

mutagénesis (por ejemplo, exploración de presentación en fagos, etc.). En una realización, un anticuerpo quimérico de la invención tiene regiones V murinas y región C humana. En una realización, la región V de cadena ligera murina se fusiona a una cadena ligera kappa humana. En una realización, la región V de cadena pesada murina se fusiona a una región C de IgG1 humana.

Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen aquellos que tienen sustituciones de aminoácidos en las FR y variantes de maduración de afinidad con cambios en las CDR injertadas. Los aminoácidos sustituidos en las CDR o FR no están limitados a aquellos presentes en el anticuerpo donante o receptor. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden adicionalmente cambios en restos de aminoácido en la región Fc que conducen a una mejorada función efectora incluyendo función CDC y/o ADCC potenciada y eliminación de células B. Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos que tienen cambios específicos que mejoran la estabilidad. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden cambios en restos de aminoácido en la región Fc que conducen a una función efectora disminuida, por ejemplo función CDC y/o ADCC disminuida y/o eliminación disminuida de células B. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una unión disminuida (tal como ausencia de unión) al factor del complemento humano C1q y/o el receptor Fc humano en linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una unión disminuida (tal como la ausencia de unión) a human FcγRI, FcγRIIA, y/o FcγRIIIA. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son de la clase IgG (por ejemplo, IgG 1 o IgG4) y comprenden al menos una mutación en E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración de acuerdo con el índice EU). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden la mutación L234A/L235A o D265A/N297A.

En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos anti-EphB4 que comprenden cualquiera de las secuencias de unión a antígeno proporcionadas en este documento, donde los polipéptidos anti-EphB4 se unen específicamente a EphB4.

Los anticuerpos de la invención se unen (tal como unión específica) a EphB4 y bloquean la unión de efrinaB2 a EphB4 y bloquean la fosforilación de tirosina mediada por efrinaB2 de EphB4 y no reaccionan de forma cruzada con EphB1 humana, EphB2 humana, EphB3 humana o EphB6 humana. En algunas realizaciones, pueden modular uno o más aspectos diferentes de los efectos asociados a EphB4, incluyendo aunque sin limitación la activación de EphB4, la señalización molecular corriente abajo de EphB4, la activación de ligando EphB4, la señalización molecular corriente abajo de ligando EphB4, y/o la multimerización de EphR4, y/o la fosforilación de ligando EphB4, y/o la alteración de cualquier vía biológica de EphB4 y/o ligando EphB4 biológicamente relevante, inhibición de angiogénesis, y/o tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de EphB4 (tal como expresión y/o actividad aumentada de EphB4). En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención se une específicamente a EphB4. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular (ECD) de EphB4. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que consiste en o consiste esencialmente en el dominio extracelular de EphB4. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a EphB4 con una KD de aproximadamente 50 pM o más fuerte. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención reduce, inhibe, y/o bloquea la actividad EphB4 in vivo y/o in vitro. De acuerdo con la invención, el anticuerpo reduce, inhibe y/o bloquea la autofosforilación de EphB4. De acuerdo con la invención, el anticuerpo compite por la unión con efrinaB2 (reduce y/o bloquea la unión de efrinaB2 a EphB4).

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el trastorno es una neuropatía o enfermedad neurodegenerativa.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la preparación de un medicamento para la inhibición de la angiogénesis.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-EphB4 de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más ácidos nucleicos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona células hospedadoras que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo un vector recombinante tal como un vector de expresión. Puede usarse cualquiera de diversas células hospedadoras. En una realización, una célula hospedadora es una célula procariota, por ejemplo, E. coli. En una realización, una célula hospedadora es una célula eucariota,

por ejemplo una célula de mamífero tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).

En un aspecto, la invención proporciona métodos para preparar un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona métodos para preparar un anticuerpo anti-EphB4 (que, como se define en este documento incluye longitud completa y fragmentos del mismo) o inmunoconjugado, comprendiendo dicho método expresar en una célula hospedadora adecuada un vector recombinante de la invención que codifique dicho anticuerpo (o fragmento del mismo), y recuperar dicho anticuerpo.

También se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, donde la composición comprende uno o más anticuerpos anti-EphB4 de la invención. En una realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende adicionalmente un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación de la invención comprende adicionalmente instrucciones para administrar la composición (para, por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto (tal como instrucciones para cualquiera de los métodos descritos en este documento).

También se describe un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos anti-EphB4 de la invención; y un segundo recipiente que comprende un tampón. En una realización, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende adicionalmente un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un kit comprende adicionalmente instrucciones para administrar la composición (para, por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-EphB4 de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el trastorno es una neuropatía o enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, el trastorno es una afección patológica asociada con angiogénesis.

También se describe el uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el trastorno es una neuropatía o enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, el trastorno es una afección patológica asociada con angiogénesis.

También se describe el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el trastorno es una neuropatía o enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, el trastorno es una afección patológica asociada con angiogénesis.

También se describe el uso de una célula hospedadora de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el trastorno es una neuropatía o enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, el trastorno es una afección patológica asociada con angiogénesis.

También se describe el uso de un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el trastorno es una neuropatía o enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, el trastorno es una afección patológica asociada con angiogénesis.

También se describe el uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el trastorno es una neuropatía o enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, el trastorno es una afección patológica asociada con angiogénesis.

La invención proporciona medios, como se define en las reivindicaciones, útiles para modular las patologías asociadas con la expresión y/o actividad de EphB4, tal como expresión y/o actividad aumentada o disminuida, o expresión y/o actividad indeseada.

En un aspecto, la invención proporciona medios para tratar o prevenir un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular asociado con expresión y/o actividad aumentada de EphB4, administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

También se describen métodos para eliminar una célula (tal como una célula cancerosa o tumoral), comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona medios para reducir, inhibir, bloquear, o prevenir el crecimiento de un tumor o cáncer, administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

También se describen métodos para tratar o prevenir una neuropatía o enfermedad neurodegenerativa, o reparar una célula nerviosa dañada, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

- 5 También se describen métodos para promover el desarrollo, proliferación, mantenimiento o regeneración de neuronas, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

10 En un aspecto, la invención proporciona medios para inhibir la angiogénesis que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona medios para tratar una afección patológica asociada con angiogénesis que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con angiogénesis es un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con angiogénesis es una enfermedad neovascular intraocular.

La invención puede usarse para afectar a cualquier estado patológico adecuado. Trastornos ejemplares se describen en este documento, e incluyen un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer pulmonar microcítico, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), y carcinoma hepatocelular.

En una realización, una célula que se aborda por la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada entre el grupo que consiste en una célula cancerosa de mama, una célula cancerosa colorrectal, una célula cancerosa pulmonar, una célula de carcinoma papilar, una célula cancerosa de colon, una célula cancerosa pancreática, una célula cancerosa de ovario, una célula cancerosa cervical, una célula cancerosa del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula cancerosa de vejiga, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma, una célula de leucemia, y una célula de adenoma de colon. En una realización, una célula que se aborda por la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula que se aborda por la invención es una célula displásica. En otra realización más, una célula que se aborda por la invención es una célula metastásica.

Pueden emplearse etapas adicionales de tratamiento. Por ejemplo, en una realización, una célula y/o tejido diana (para, por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a tratamiento de radiación o a un agente quimioterapéutico.

El anticuerpo anti-EphB4 de la invención puede administrarse en combinación con una cantidad eficaz de otro agente terapéutico (tal como un agente anti-angiogénesis). Por ejemplo, se usan uno o más anticuerpos anti-EphB4 en combinaciones con agente anti-neoplásico o agente anti-angiogénico para tratar diversas afecciones neoplásicas o no neoplásicas. En una realización, la afección neoplásica o no neoplásica es una afección patológica asociada con angiogénesis. En algunas realizaciones, el otro agente terapéutico es un agente anti-angiogénico, un agente anti-neoplásico, y/o un agente quimioterapéutico.

El anticuerpo anti-EphB4 puede administrarse en serie o en combinación con el otro agente terapéutico que es eficaz para esos propósitos, en la misma composición o como composiciones diferentes. La administración del anticuerpo anti-EphB4 y el otro agente terapéutico (por ejemplo, agente anti-neoplásico, agente anti-angiogénico) puede hacerse simultáneamente, por ejemplo, como una única composición o como dos o más composiciones distintas, usando la misma o diferentes vías de administración. Como alternativa, o adicionalmente, la administración puede hacerse secuencialmente, en cualquier orden. Como alternativa, o adicionalmente, las etapas pueden realizarse como una combinación de tanto secuencial como simultánea, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días, hasta semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente anti-neoplásico puede administrarse primero, seguido del anticuerpo anti-EphB4. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo anti-EphB4 primero. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un anticuerpo anti-EphB4, seguido de la administración de un agente anti-angiogénico (tal como un anticuerpo anti-VEGF, tal como bevacizumab). En ciertas realizaciones, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días, hasta semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones.

En ciertos aspectos, la invención proporciona medios para tratar un trastorno (tal como un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular) administrando cantidades eficaces de un anticuerpo anti-EphB4 y/o uno o más inhibidores de la angiogénesis y uno o más agentes quimioterapéuticos. Puede usarse diversos agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Una lista ejemplar y no limitante de los agentes quimioterapéuticos contemplados se proporciona en este documento en "Definiciones". La administración del anticuerpo anti-EphB4 y el agente quimioterapéutico puede hacerse simultáneamente, por ejemplo, como una única composición o como dos o más composiciones distintas, usando la misma o diferentes vías de administración. Como alternativa, o adicionalmente, la administración puede hacerse secuencialmente, en cualquier orden. Como

alternativa, o adicionalmente, las etapas pueden realizarse como una combinación de tanto secuencial como simultánea, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días, hasta semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede administrarse primero, seguido del anticuerpo anti-EphB4. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo anti-EphB4 primero. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un anticuerpo anti-EphB4, seguido de la administración de un agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días, hasta semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones.

En un aspecto, la invención proporciona medios para potenciar la eficacia de un agente anti-angiogénico en un sujeto que tiene una afección patológica asociada con angiogénesis, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 en combinación con el agente anti-angiogénico, potenciando de este modo la actividad inhibidora de dicho agente anti-angiogénico.

En otro aspecto, como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona métodos para la detección de EphB4, comprendiendo los métodos detectar el complejo EphB4-anticuerpo anti-EphB4 en la muestra. El término "detección" como se usa en este documento incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (medición de niveles) con o sin referencia a un control.

En otro aspecto, como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de EphB4, comprendiendo los métodos detectar el complejo EphB4-anticuerpo anti-EphB4 en una muestra biológica de un paciente que tiene o se sospecha que tiene el trastorno. En algunas realizaciones, la expresión de EphB4 es expresión aumentada o expresión anormal. DE acuerdo con la invención, el trastorno es un tumor, cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular.

En otro aspecto, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anti-EphB4 descritos en este documento, donde el anticuerpo anti-EphB4 comprende un marcador detectable.

En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-EphB4 descritos en este documento y EphB4. En algunas realizaciones, el complejo está in vivo o in vitro. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB4 está marcado de forma detectable.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1: Secuencias de bucle HVR de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos anti-EphB4. La figura muestra las secuencias HVR de cadena pesada, H1, H2, y H3, y las secuencias HVR de cadena ligera, L1, L2 y L3. La numeración de secuencias es la siguiente: clon 30.35 (HVR-H1 es la SEC ID N° 1; HVR-H2 es la SEC ID N° 3; HVR-H3 es la SEC ID N° 7; HVR-L1 es la SEC ID N° 9; HVR-L2 es la SEC ID N° 11; HVR-L3 es la SEC ID N° 13); clon 30.35.1D2 (HVR-H1 es la SEC ID N° 1; HVR-H2 es la SEC ID N° 3; HVR-H3 es la SEC ID N° 8; HVR-L1 es la SEC ID N° 10; HVR-L2 es la SEC ID N° 12; HVR-L3 es la SEC ID N° 14); clon 30.35.2D8 (HVR-H1 es la SEC ID N° 2; HVR-H2 es la SEC ID N° 4; HVR-H3 es la SEC ID N° 7; HVR-L1 es la SEC ID N° 9; HVR-L2 es la SEC ID N° 11; HVR-L3 es la SEC ID N° 15); clon 30.35.2D12 (HVR-H1 es la SEC ID N° 1; HVR-H2 es la SEC ID N° 5; HVR-H3 es la SEC ID N° 7; HVR-L1 es la SEC ID N° 9; HVR-L2 es la SEC ID N° 11; HVR-L3 es la SEC ID N° 16); y clon 30.35.2D13 (HVR-H1 es la SEC ID N° 1; HVR-H2 es la SEC ID N° 6; HVR-H3 es la SEC ID N° 7; HVR-L1 es la SEC ID N° 9; HVR-L2 es la SEC ID N° 11; HVR-L3 es la SEC ID N° 17). Las posiciones de aminoácido están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe a continuación.

Las FIGURAS 2A y 2B y 3 representan secuencias flanqueantes consenso humanas aceptoras ejemplares para su uso en la práctica de la presente invención con los siguientes identificadores de secuencia:

Regiones flanqueantes consenso de cadena pesada variable (VH) (FIG. 2A y 2B)

flanqueante consenso humana VH subgrupo I menos CDR de Kabat (SEC ID N° 19)

flanqueante consenso humana VH subgrupo I menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID N° 20-22)

flanqueante consenso humana VH subgrupo II menos CDR de Kabat (SEC ID N° 23)

flanqueante consenso humana VH subgrupo II menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID N° 24-26)

flanqueante consenso humana VH subgrupo III menos CDR de Kabat (SEC ID N° 27)

flanqueante consenso humana VH subgrupo III menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID N° 28-30)

flanqueante aceptora humana VH menos CDR de Kabat (SEC ID N° 31)

flanqueante aceptora humana VH menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID N° 32-33)

flanqueante 2 aceptora humana VH human menos CDR de Kabat (SEC ID N° 34)

flanqueante 2 aceptora humana VH human menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID N° 35-37)

Regiones flanqueantes consenso de cadena ligera variable (VL) (FIG. 3)

flanqueante consenso humana VL kappa subgrupo I (SEC ID N° 38)

flanqueante consenso humana VL kappa subgrupo II (SEC ID N° 39)

flanqueante consenso humana VL kappa subgrupo III (SEC ID N° 40)

flanqueante consenso humana VL kappa subgrupo IV (SEC ID N° 41)

La FIGURA 4 representa secuencias de región flanqueante de cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácido de acuerdo con Kabat.

La FIGURA 5 representan secuencias modificadas/variantes de región flanqueante de cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácido de acuerdo con Kabat.

La FIGURA 6 representa regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de los clones de anticuerpo 30.35, 30.35.1D2, 30.35.2D8, 30.35.2D12, y 20.25.2D13.

FIGURA 7: Un anticuerpo monoclonal anti-EphB4 bloquea la señalización del receptor EphB4 en un ensayo basado en células.

Descripción detallada de la invención

La invención de este documento proporciona anticuerpos anti-EphB4, que son útiles para, por ejemplo, el tratamiento o prevención de patologías asociadas con la expresión y/o actividad de EphB4, tal como expresión y/o actividad aumentada o expresión y/o actividad indeseada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para tratar un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-EphB4 de la invención encuentran utilidad como reactivos para la detección y/o aislamiento de EphB4, tal como la detección de EphB4 en diversos tejidos y tipos celulares.

La invención proporciona adicionalmente métodos para preparar anticuerpos anti-EphB4, y polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-EphB4.

Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o remitidos en este documento son generalmente bien comprendidos y habitualmente empleados usando metodología convencional por los especialistas en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, y *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que impedirían los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solitos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y mucho más preferiblemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminales o internos mediante el uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está habitualmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico de anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente en la forma o entorno en que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, por lo tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

La expresión "numeración de restos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de posiciones de aminoácido como en Kabat", y variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo,

restos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en este documento, se refiere a un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador) de modo que un especialista en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente menor de aproximadamente el 50 %, preferiblemente menor de aproximadamente el 40 %, preferiblemente menor de aproximadamente el 30 %, preferiblemente menor de aproximadamente el 20 %, preferiblemente menor de aproximadamente el 10 % como una función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). Salvo que se indique de otro modo, como se usa en este documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en este documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conoce en la técnica diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los propósitos de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

En una realización, la " K_d " o "valor de K_d " de acuerdo con esta invención se mide mediante un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fab por antígeno equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, después capturando el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de microtitulación (Dynex) durante una noche con 5 μ g/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con albúmina sérica bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc nº 269620), se mezcla [^{125}I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés después se incuba durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. Por lo tanto, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución después se retira y la placa se lava ocho veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 μ l/pocillo de agente de centello (MicroScint-20; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan lugar a menos de o igual al 20 % de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización la K_d o el valor de K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, en 5 μ g/ml (~0,2 μ M) antes de la inyección a un caudal de 5 μ l/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 μ l/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) por ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la tasa de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con un flujo discontinuo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "tasa de asociación" o " k_{on} " de acuerdo con esta invención también puede determinarse con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000

(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) por ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Sin embargo, si la tasa de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa de asociación se determina preferiblemente usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo discontinuo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

El término "vector", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fágico. Otro tipo de vector es un vector viral, donde los segmentos adicionales de ADN pueden ligarse en el genoma viral. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episódicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episódicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están unidos de forma funcional. Dichos vectores se mencionan en este documento como "vectores recombinantes de expresión" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico" usados de forma intercambiable en este documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura nucleotídica puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la síntesis, tal como por conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "capuchas", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede remplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soporte sólidos o semi-sólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de encapsulado orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos básicos tales como metil ribósido. Puede remplazarse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, aunque sin limitación, realizaciones donde el fosfato se remplaza por P(O)S("tioato"), P(S)S("ditioato"), "(O)NR₂("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂("formacetal"), en que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en este documento, incluyendo ARN y ADN.

"Oligonucleótido", como se usa en este documento, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos que son generalmente, pero no necesariamente, de menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Las expresiones "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivas. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a oligonucleótidos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia peptídica o polipeptídica se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversos modos que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible al público tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los especialistas en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los propósitos de este documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencia ALIGN-2, donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla A a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla A a continuación se ha presentado con documentación de usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado con el N° U.S. Copyright Registration TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se configuran por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencia de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede expresarse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de restos de aminoácido valorados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de restos de aminoácido en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

Salvo que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en este documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedentes usando el programa informático ALIGN-2.

El término "EphB4" (llamado de forma intercambiable "EphB4R"), como se usa en este documento se refiere, salvo que se indique específica o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido EphB4 nativo o variante (ya sea nativo o sintético). La expresión "secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y ajuste alternativo) y variantes alélicas de origen natural. La expresión "EphB4 de tipo silvestre" generalmente se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína EphB4 de origen natural. La expresión "secuencia de EphB4 de tipo silvestre" generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos hallada en un EphB4 de origen natural.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de forma intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (para, por ejemplo, anticuerpos monoclonal de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también puede incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describe en mayor detalle en este documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de forma uniforme en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman flanqueantes (FR). Los dominios variables de las

5 cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada una cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en cerca proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

10 La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de entrecruzar antígeno.

15 "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. En una especie Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en firme asociación no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie de un dímero VH-VL. De forma colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

25 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab mediante la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en este documento para Fab' en que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes albergan un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de los anticuerpos originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

30 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

35 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

40 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solamente una parte de un anticuerpo intacto, donde la parte preferiblemente retiene al menos una, preferiblemente la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y por tanto retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la vida media del anticuerpo, función ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad in vivo al fragmento.

45 La expresión "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se usa en este documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariable en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Están en uso varias delineaciones de región hipervariable y se abarcan en este documento. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chotia en su lugar se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chotia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre la CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chotia, y se usan por el software de

modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en el análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

5		<u>Bucle</u>	<u>Kabat</u>	<u>AbM</u>	<u>Chotia</u>	<u>Contacto</u>
		L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
		L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
		L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
		H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
10			(numeración de Kabat)			
		H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
			(numeración de Chotia)			
		H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
		H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables ampliadas" del siguiente modo: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Los restos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra* para cada una de estas definiciones.

Los restos "flanqueantes" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes a los restos de la región hipervariable como se define en este documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contiene secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los restos de una región hipervariable del receptor están remplazados por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región flanqueante (FR) de la inmunoglobulina humana se remplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en esos documentos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Los anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) tienen una parte de la cadena pesada y/o ligera idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestran la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Anticuerpo humanizado como se usa en este documento es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al cual un anticuerpo puede unirse selectivamente. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto de origen natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno diana es un polipéptido.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH - VL). Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se describe en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos no humanos de unión a antígeno.

Un anticuerpo de "afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que provocan una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo precursor que no posee esa o esas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad por redistribución del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o restos flanqueantes se describe por: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al. J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas que se pueden atribuir a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en que Ig secretadas unidas a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) posibilitan que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que alberga antígeno y posteriormente eliminen la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "dotan" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha eliminación. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo *in vitro* de ADCC, tal como el descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337 o patente de Estados Unidos de Presta N° 6.737.056. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

Las células "efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo de sangre.

"Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y como alternativa formas de corte y ajuste de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen similares secuencias de aminoácidos que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activado basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (véase la revisión M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos a identificar en el futuro, se abarcan por el término "FcR" en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de inmunoglobulinas. El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR. Véase, también, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

Los métodos para medir la unión a FcRn son conocidos (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión a FcRn humano *in vivo* y la vida media en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humano pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se ha administrado los polipéptidos variantes Fc.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos alteradas de la región Fc y capacidad aumentada o disminuida de unión a C1q en la patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

La expresión "polipéptido que comprende región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o inmunoadhesina (véanse las definiciones a continuación), que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc de acuerdo con esta invención puede comprender polipéptidos con K447, con todas las K447 eliminadas, o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", como se usa en este documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Una "región flanqueante humana aceptora" para los propósitos de este documento es una región flanqueante que comprende la secuencia de aminoácidos de una región flanqueante VL o VH derivada de una región flanqueante de inmunoglobulina humana, o de una región flanqueante consenso humana. Una región flanqueante humana aceptora "derivada de" una región flanqueante de inmunoglobulina humana o región flanqueante consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios pre-existentes en la secuencia de aminoácidos. Cuando hay cambios pre-existentes en aminoácidos presentes, preferiblemente no más de 5 y preferiblemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios pre-existentes de aminoácidos están presentes. Cuando hay cambios pre-existentes de aminoácidos presentes en una VH, preferiblemente aquellos cambios son solamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los restos de aminoácido en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, la región flanqueante humana aceptora VL es idéntica en secuencia a la secuencia flanqueante de inmunoglobulina humana VL o la secuencia flanqueante consenso humana.

Una "región flanqueante consenso humana" es una región flanqueante que representa el resto de aminoácido más habitual en una selección de secuencias flanqueantes VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.* En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.* En una realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*

Una "región flanqueante consenso VH de subgrupo III" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de cadena pesada variable de Kabat *et al.* En una realización, la secuencia de aminoácidos flanqueante consenso VH de subgrupo III comprende al menos una parte o todo de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID N° 42)-HI-WVRQAPGKGLEWV (SEC ID N° 43)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEC ID N° 44)-H3-WGQGTTLTVSS (SEC ID N° 45).

Una "región flanqueante consenso VL de subgrupo I" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I de cadena ligera kappa variable de Kabat *et al.* En una realización, la secuencia de aminoácidos flanqueante consenso VH de subgrupo I comprende al menos una parte o todo de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID N° 46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID N° 47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEC ID N° 48)-L3-FGQGTKVEIK (SEC ID N° 49).

Un "trastorno" o "enfermedad" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en este documento incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma, y sarcoma.

Las expresiones "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con algún grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

"Tumor", como se usa en este documento, se refiere a todo crecimiento o proliferación celular neoplásica, ya sea maligna o benigna, y todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Las expresiones "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente exclusivas como se menciona en este documento.

Las expresiones "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento/proliferación celular no regulada. Ejemplos de cáncer incluyen aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma del endometrio o útero, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer gástrico, melanoma, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. La mala regulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que pueden tratarse mediante composiciones y métodos de la invención. Estos trastornos incluyen afecciones tanto no neoplásicas como neoplásicas. Las neoplásicas incluyen aunque sin limitación aquellas descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen aunque sin limitación hipertrofia indeseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (RA), psoriasis, placas psoriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatías diabéticas y otras retinopatías proliferativas incluyendo retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de la córnea, neovascularización de injerto de córnea, rechazo de injerto de córnea, neovascularización retiniana/coroidea, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otro tejido, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/ARDS, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado con apoplejía aguda/lesión/traumatismo cerrado de cabeza), inflamación sinovial, formación de pannus en RA, miositis osificante, formación de hueso hipertrófico, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, enfermedades de tercer espacio de fluido (pancreatitis, síndrome del compartimento, quemaduras, enfermedad del intestino), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica tal como IBD (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome nefrótico, crecimiento indeseado o aberrante de masa tisular (no cáncer), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento capilar, síndrome de Osler-Weber, fibroplasias retrolentales de granuloma piogénico, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como la asociada con pericarditis), y efusión pleural.

Como se usa en este documento, "tratamiento" se refiere a intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individual o célula que se está tratando, y puede realizarse para profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevención de aparición o recidiva de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progreso de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y remisión o prognosis mejorada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Las expresiones "enfermedad neurodegenerativa" y "trastorno neurodegenerativo" se usan en el sentido más amplio para incluir todos los trastornos cuya patología implica degeneración y/o disfunción neuronal incluyendo, sin limitación, neuropatías periféricas; trastornos motoneuronas, tales como esclerosis lateral amiotrófica (ALS, enfermedad de Lou Gehrig), parálisis de Bell, y diversas afecciones que implica atrofia o parálisis muscular espinal; y otras enfermedades neurodegenerativas humanas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia, esclerosis múltiple, corea de Huntington, síndrome de Down, sordera nerviosa, y enfermedad de Meniere.

La "neuropatía periférica" es un trastorno neurodegenerativo que afecta a los nervios periféricos, muy a menudo manifestado como una o una combinación de disfunción motora, sensorial, sensoriomotora, o autonómica. Las neuropatías periféricas pueden, por ejemplo, adquirirse genéricamente, pueden resultar de una enfermedad sistémica, o pueden inducirse por un agente tóxico, tal como un fármaco neurotóxico, por ejemplo, agente antineoplásico, o contaminante industrial o ambiental. La "neuropatía sensorial periférica" se caracteriza por la degeneración de neuronas sensoriales periféricas, que puede ser idiopática, puede suceder, por ejemplo, como una consecuencia de diabetes (neuropatía diabética), terapia con fármacos citostáticos en cáncer (por ejemplo, tratamiento con agentes quimioterapéuticos tales como vincristina, cisplatino, metotrexato, 3'-azido-3'-desoxitimidina, o taxanos, por ejemplo paclitaxel [TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.] y doxetaxel [TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia]), alcoholismo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), o predisposición genérica. Las neuropatías periféricas adquiridas genéticamente incluyen, por ejemplo, enfermedad de Refsum, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Fabry, síndrome de Dejerine-Sottas, abetalipoproteinemia, y enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (también conocida como atrofia muscular del peroneo o neuropatía sensorial motora hereditaria (HMSN)). La mayoría de los tipos de neuropatía

periférica se desarrollan lentamente, sobre el curso de varios meses o años. En la práctica clínica dichas neuropatías se llaman crónicas. A veces la neuropatía periférica se desarrolla rápidamente, sobre el curso de unos pocos días, y se menciona como aguda. La neuropatía periférica habitualmente afecta a nervios sensoriales y motores juntos de modo que causa una neuropatía sensorial y motora mixta, pero también se conocen neuropatía sensorial pura y motora pura.

Un "individuo" es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, aunque sin limitación, animales de granja (tal como vacas), animales de deportes, mascotas (tal como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

"Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de deportes, o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, la edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista de provocar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente pero no necesariamente, como se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o una fase temprana de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o causa destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos descritos a continuación. Se describen a continuación otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa destrucción de células tumorales.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecano (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostarina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptodicina 1 y criptodicina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcellomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostanol, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido

aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziadona; elfornitina; acetato de elliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK® complejo polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espiro-germanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM libre de cremofor, formulación de nanopartícula modificada con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXA-TINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonal que actúan regulando, reduciendo, bloqueando, o inhibiendo los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer, y a menudo están en forma de tratamiento sistémico, o de organismo completo. Pueden ser hormonas en sí mismas. Ejemplos incluyen anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), EVISTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan suprimiendo o apagando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) tales como LUPRON® y ELIGARD® acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromataza que inhiben la enzima aromataza, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, formestano, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), DIDROCAL® etidronato, NE-58095, ZOMETA® ácido zoledrónico/zoledronato, FOSAMAX® alendronato, AREDIA® pamidronato, SKELID® tiludronato, o ACTONEL® risedronato; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; LURTOTECAN® inhibidor de topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa dual de ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa EphB4) in vitro o in vivo. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa EphB4) en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un sitio diferente de la fase S), tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueantes clásicos en fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también se extenderán a detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos ambos derivados del árbol tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, que provoca la inhibición de la mitosis en células.

La "doxorubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

La expresión "composición anti-neoplásica" se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, "agente anti-neoplásico". Ejemplos de agentes

terapéuticos (agentes anti-cáncer, también llamados "agente anti-neoplásico" en este documento) incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes anti-angiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, toxinas, y otros agentes para tratar el cáncer, por ejemplo, anticuerpo neutralizante anti-VEGF, antagonista de VEGF, anti-HER-2, anti-CD20, un antagonistas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1/EGFR, erlotinib, un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de los receptores de ErbB2, ErbB3, ErbB4, o VEGF, inhibidores para receptores tirosina quinasa, para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y/o el factor de células madre (SCF) (por ejemplo, mesilato de imatinib (Gleevec ® Novartis)), TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc.

El término "profármaco" como se usan en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menor citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma precursora más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pág. 375-382, 615^o Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, aunque sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta-lactama, opcionalmente profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida o opcionalmente profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para su uso en esta invención incluyen, aunque sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un "agente anti-angiogénesis" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una sustancia de pequeño peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o la permeabilidad vascular indeseable, directa o indirectamente. Por ejemplo, un agente anti-angiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista contra un agente angiogénico como se ha definido anteriormente, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF, anticuerpos contra receptores de VEGF, moléculas pequeñas que bloquean la señalización de receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706). Los agentes anti-angiogénesis también incluyen inhibidores nativos de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, Tabla 3 que enumera la terapia anti-angiogénica en melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, Tabla 2 que enumera factores antiangiogénicos); y, Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) (por ejemplo, Tabla 1 que enumera agentes anti-angiogénicos usados en ensayos clínicos).

Composiciones de la invención y métodos para preparar las mismas

Esta invención abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-EphB4; y polinucleótidos que comprenden las secuencias que codifican un anticuerpo anti-EphB4. Como se usa en este documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a EphB4, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden las secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen a EphB4. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente vehículos adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que son bien conocidos en la técnica.

La invención también abarca realizaciones de anticuerpo y polinucleótido aislado. La invención también abarca realizaciones de anticuerpo y polinucleótido sustancialmente puro.

Los anticuerpos anti-EphB4 de la invención son preferiblemente monoclonales. También se abarcan dentro del alcance de la invención fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ de los anticuerpos anti-EphB4 proporcionados en este documento. Estos fragmentos de anticuerpo pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o pueden generarse por técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los propósitos de diagnóstico y terapéuticos expuestos a continuación.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos diferentes.

Los anticuerpos monoclonales anti-EphB4 de la invención pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Los anticuerpos contra EphB4 generalmente se crean en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de EphB4 y un adyuvante. EphB4 puede prepararse usando métodos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en este documento. Por ejemplo, la producción recombinante de EphB4 se describe a continuación. En una realización, se inmunizan animales con un derivado de EphB4 que contiene el dominio extracelular (ECD) de EphB4 fusionado a la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización preferida, se inmunizan animales con una proteína de fusión EphB4-IgG1. Los animales habitualmente se inmunizan contra conjugados inmunogénicos o derivados de EphB4 con monofosforil lípido A (MPL)/trehalosa dicrinomicolato (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta por vía intradérmica en múltiples sitios. Dos semanas después, los animales se refuerzan. De 7 a 14 días después se exanguina a los animales y se ensaya el suero para el título anti-EphB4. Los animales se refuerzan hasta que se estabiliza el título.

Como alternativa, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Los linfocitos después se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma precursoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirán hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), que son sustancias que evitan el crecimiento de células HGPRT-deficientes.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares preferidas de mieloma son líneas murinas de mieloma, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EEUU, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Mariland EEUU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en que se cultivan las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra EphB4. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, cromatografía en proteína A-Sepharose, en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos anti-EphB4 de la invención pueden prepararse usando bibliotecas combinatorias para seleccionar clones sintéticos de anticuerpo con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones sintéticos de anticuerpo se seleccionan por exploración de bibliotecas de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de envuelta del fago. Dichas bibliotecas de fagos se distribuyen por cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y por tanto se separan de los clones sin unión en la biblioteca. Los clones de unión después se eluyen del antígeno, y pueden enriquecerse adicionalmente por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos anti-EphB4 de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de selección de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de construcción de un clon de anticuerpo anti-EphB4 de longitud completa usando las secuencias Fv del clon de fago de interés y secuencias adecuadas de la región constante (Fc) descritas en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3.

El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), que ambas presentan tres bucles hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden presentarse de forma funcional en el fago, como fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), en que VH y VL están unidos covalentemente a través de un corto péptido flexible, o como fragmentos Fab, en que están cada uno fusionados a un dominio constante y interactúan de forma no covalente, como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en este documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se mencionan colectivamente como "clones de fago Fv" o "clones Fv".

Pueden clonarse por separado repertorios de genes VH y VL por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después pueden buscarse para clones de unión a antígeno como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, puede clonarse el repertorio virgen para proporcionar una fuente única de anticuerpos humanos contra un amplio intervalo de no auto antígenos y también auto-antígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden prepararse bibliotecas vírgenes de forma sintética clonando los segmentos del gen V no reordenados a partir de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento in vitro como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Se usa fago filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpo por fusión con la proteína de envuelta minoritaria pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden presentarse como fragmentos Fv de cadena sencilla, en que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo como se describe por Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en que una cadena está fusionada a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde se ensambla una estructura Fab-proteína de envuelta que llega a presentarse en la superficie del fago desplazando algunas proteínas de envuelta de tipo silvestre, por ejemplo como se describe en Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos génicos de anticuerpo se obtienen de células inmunes recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca desviada en favor de clones anti-EphB4, el sujeto se inmuniza con EphB4 para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan las células esplénicas y/o las células B en circulación diferentes a los linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpo humano desviada en favor de clones anti-EphB4 generando una respuesta de anticuerpos anti-EphB4 en ratones transgénicos que portan una serie funcional de genes de inmunoglobulina humana (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales) de modo que la inmunización con EphB4 da lugar a células B que producen anticuerpos humanos contra EphB4. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

Puede obtenerse enriquecimiento adicional para poblaciones celulares reactivas anti-EphB4 usando un procedimiento de selección adecuado para aislar células B que expresan anticuerpo unido a membrana específico de EphB4, por ejemplo, por separación celular con cromatografía de afinidad por EphB4 o adsorción de células a EphB4 marcado con fluorocromo seguido de clasificación celular activada por flujo (FACS).

Como alternativa, el uso de células esplénicas y/o células B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en que EphB4 no es antigénico. Para bibliotecas que incorporan la construcción de genes de anticuerpo in vitro, se recogen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpo no reordenados. Las células inmunes de interés pueden obtenerse a partir de diversas especies animales, tales como seres humanos, ratones, ratas, lagomorfos, especies lupinas, caninas, felinas, porcinas, bovinas, equinas, y aves, etc.

Se recuperan ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos variables de anticuerpo (incluyendo segmentos VH y VL) de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas génicas de VH y VL reordenados, el ADN deseado puede obtenerse aislado el ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reordenados como se describe en Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), haciendo de este modo diversos repertorios de gen V para su expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir del ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados en el segmento J como se describe en Orlandi et al. (1989) y en Ward et al., *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón líder como se describe en Jones et al., *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, puede incorporarse degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi et al. (1989) o Sastry et al. (1989). Preferiblemente, la diversidad de la biblioteca se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de

gen V para amplificar todos los ordenamientos VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmune, por ejemplo como se describe en el método de Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para clonar el ADN amplificado en vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción raros dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o por amplificación adicional por PCR con un cebador marcado como se describe en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Pueden obtenerse repertorios de genes V sintéticamente reordenados in vitro a partir de segmentos génicos V. La mayoría de los segmentos génicos VH humanos se han clonado y secuenciado (informado en Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y mapeado (informado en Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios génicos VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Los repertorios VH también pueden prepararse con toda la diversidad de secuencia centrada en un largo bucle H3 de una única longitud como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos humanos V κ y V λ se han clonado y secuenciado (informado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para preparar repertorios sintéticos de cadena ligera. Los repertorios sintéticos de gen V, basados en un intervalo de pliegues VH y VL, y longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Después de la amplificación de ADN que codifican el gen V, pueden reordenarse segmentos de gen V de la línea germinal in vitro de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpo combinado repertorios de genes VH y VL juntos de varios modos. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores pueden recombinarse in vitro, por ejemplo, como se describe en Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993), o in vivo por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* explota la naturaleza de dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Se clonan repertorios VH y VL vírgenes por separado, uno en un fagómido y el otro en un vector fágico. Las dos bibliotecas después se combinan por infección con fago de las bacterias que contienen fagómido de modo que cada célula contenga una diferente combinación y el tamaño de la biblioteca esté limitado solamente por la cantidad de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación in vivo de modo que los genes VH y VL se recombinen en un único replicón y se co-empaqueten en viriones fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes cantidades de anticuerpos diversos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos por PCR y después clonarse, por ejemplo como se describe en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje por PCR también puede usarse para unir ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena sencilla (scFv). En otra técnica más, se usa "ensamblaje por PCR en célula" para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos por PCR y después se clonan los repertorios de genes ligados como se describe en Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas vírgenes (naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M $^{-1}$), pero la maduración de afinidad también puede imitarse *in vitro* construyendo y re seleccionando a partir de bibliotecas secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), *supra*. Por ejemplo, puede introducirse una mutación aleatoria in vitro usando polimerasa propensa a errores (informado en Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Además, la maduración de afinidad puede realizarse por mutación aleatoria de una o más CDR, por ejemplo usando PCR con cebadores que portan secuencia aleatoria que abarca la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y seleccionando clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describía un método para inducir mutagénesis en una región determinante de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados por presentación en fagos con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y exploración de mayor afinidad en varias rondas de redistribución de cadenas como se describe en Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de 10^{-9} M.

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de EphB4 son conocidas en la técnica. La secuencia de ácido nucleico que codifica el EphB4 puede diseñarse usando la secuencia de aminoácidos de la región deseada de EphB4. Como alternativa, puede usarse la secuencia de ADNc (o fragmentos de la misma) de los números de acceso a GenBank NM_004444, o descrita en la patente de Estados Unidos N° 5.635.177. Los ADN que codifican EphB4 pueden prepararse por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, síntesis química por cualquiera de los métodos descritos en Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), tal como los métodos de triéster, fosfito, fosforamidita y H-fosfonato. En una realización, se usan

codones preferidos por la célula hospedadora de expresión en el diseño del ADN codificante de EphB4. Como alternativa, el ADN que codifica el EphB4 puede aislarse de una biblioteca genómica o de ADNc.

Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica el EphB4, la molécula de ADN se une de forma funcional a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, donde la secuencia de control se reconoce por una célula hospedadora transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y control que se obtienen de especies compatibles con la célula hospedadora. El vector habitualmente porta un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Los vectores adecuados para la expresión en células hospedadoras procariotas y eucariotas son conocidos en la técnica y algunos se describen adicionalmente en este documento. Pueden usarse organismos eucariotas, tales como levaduras, o células derivadas de organismos multicelulares, tales como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica el EphB4 se une de forma funcional a una secuencia líder secretora que provoca la secreción del producto de expresión por la célula hospedadora en el medio de cultivo. Ejemplos de secuencias líder secretoras incluyen stII, ecotina, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa, y factor alfa. También es adecuada para su uso en este documento la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)).

Las células hospedadoras se transfectan y preferiblemente transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente de esta invención y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según lo apropiado para inducir promotores, selección de transformantes, o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula hospedadora se exprese en realidad o no alguna secuencia codificante. Se conocen numerosos métodos de transfección por los especialistas en la técnica, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y electroporación. La transfección satisfactoria generalmente se reconoce cuando sucede alguna indicación del funcionamiento de este vector dentro de la célula hospedadora. Los métodos de transfección son bien conocidos en la técnica, y algunos se describen adicionalmente en este documento.

Transformación significa introducir ADN en un organismo de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se hace usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. Los métodos de transformación son bien conocidos en la técnica, y algunos se describen adicionalmente en este documento.

Las células hospedadoras procariotas usadas para producir el EphB4 pueden cultivarse como se describe en líneas generales en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las células hospedadoras de mamífero usadas para producir el EphB4 pueden cultivarse en diversos medios, que son bien conocidos en la técnica y algunos de los cuales se describen en este documento.

Las células hospedadoras mencionadas en esta descripción abarcan células en cultivo *in vitro* así como células que están dentro del animal hospedador.

La purificación de EphB4 puede conseguirse usando métodos reconocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en este documento.

El EphB4 purificado puede unirse a una matriz adecuada tal como perlas de agarosa, perlas de acrilamida, perlas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de hidroxil metacrilato, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nylon, vehículos neutros e iónicos, y similares, para su uso en la separación cromatográfica de afinidad de clones de presentación en fagos. La unión de la proteína EphB4 a la matriz puede realizarse por los métodos descritos en Methods in Enzymology, vol. 44 (1976). Una técnica habitualmente empleada para unir ligandos proteicos a matrices de polisacárido, por ejemplo agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del vehículo con haluros de cianógeno y posterior acoplamiento de las aminas alifáticas o aromáticas primarias del liando peptídico a la matriz activada.

Como alternativa, puede usarse EphB4 para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en clasificación celular, o conjugarse a biotina para captura con perlas recubiertas con estreptavidina, o usarse en cualquier otro método conocido en la técnica para exponer bibliotecas de presentación en fagos.

Las muestras de biblioteca de fagos se ponen en contacto con EphB4 inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas fágicas con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, fuerza iónica, temperatura y similares se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen por ácido, por ejemplo como se describe en Barbas et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o por álcali, por ejemplo como se describe en Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o por competición de antígeno EphB4, por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1.000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a rondas adicionales de selección.

La eficacia de selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago puede acoplar simultáneamente con antígeno. Los anticuerpos con cinética rápida de disociación (y débiles afinidades de unión) pueden retenerse mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solamente estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la re-unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con lenta cinética de disociación (y buenas afinidades de unión) puede promoverse mediante el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalentes como se describe en Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos fágicos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, por EphB4. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas de las técnicas de maduración de afinidad descritas anteriormente) probablemente produce muchos mutantes, la mayoría de los cuales se unen al antígeno, y unos pocos con mayor afinidad. Limitando EphB4, podrían eliminarse por competición los fagos raros de alta afinidad. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con exceso de EphB4 biotinilado, pero con el EphB4 biotinilado a una concentración de molaridad inferior que la constante de afinidad molar diana para EphB4. Los fagos de unión de alta afinidad después pueden capturarse por perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con afinidad tan poco mayor como dos veces a partir de un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar basándose en la cinética de disociación.

Los clones anti-EphB4 pueden seleccionarse por actividad. La invención proporciona anticuerpos anti-EphB4 que bloquean la unión entre un ligando EphB4 (concretamente efrina-B2) y EphB4, pero no bloquean la unión entre un ligando EphB4 y EphB1, EphB3, EphB4, EphB5 o EphB6. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-EphB4 pueden seleccionarse por (1) aislamiento de clones anti-EphB4 a partir de una biblioteca de fagos como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente amplificación de la población aislada de clones fágicos por crecimiento de la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) selección de EphB4 y una segunda proteína frente a los cuales se desea actividad de bloqueo y no de bloqueo, respectivamente; (3) adsorción de los clones fágicos anti-EphB4 en EphB4 inmovilizado; (4) uso de un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a EphB4 que solapan o están compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) elución de los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades deseadas de bloqueo/no de bloqueo pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo los procedimientos de selección descritos en este documento una o más veces.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones Fv de presentación en fagos de la invención se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de cadena pesada y ligera de interés del molde de ADN del hibridoma o fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se introducen por transfección en células hospedadoras tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras recombinantes. Artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpo incluyen Skerra et al., Curry Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol Revs, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv de la invención puede combinarse con secuencias conocidas de ADN que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias apropiadas de ADN pueden obtenerse de Kabat *et al.*, supra) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este propósito, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como ser humano) y después fusionado al ADN de región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias codificantes para cadena pesada y/o cadena ligera "híbrida", de longitud completa se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en este documento. En una realización preferida, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona a ADN de región constante humana para formar una o más secuencias codificantes para cadenas pesadas y/o ligeras completamente humanas, de longitud completa o parcial.

El ADN que codifica el anticuerpo anti-EphB4 derivado de un hibridoma de la invención también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominio constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o clon Fv puede modificarse adicionalmente por unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados del clon Fv o clon de hibridoma de la invención.

Fragmentos de anticuerpo

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. En ciertas circunstancias existen ventajas de usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una rápida eliminación, y puede conducir a un acceso mejorado a tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en y secretarse a partir de E. coli, permitiendo de este modo la fácil producción de cantidades grandes de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Se describe fragmentos Fab y F(ab')₂ con vida media aumentada in vivo que comprenden restos de epítipo de unión a receptor de rescate en la patente de Estados Unidos N° 5.869.046. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo para los especialistas en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las patentes de Estados Unidos N° 5.571.894; y 5.587.458. Fv y sFv son la única especie con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, son adecuados para unión no específica reducida durante su uso in vivo. Pueden construirse proteínas de fusión sFv para producir una fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos lineales de anticuerpo pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

La presente invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácido introducidos en el mismo desde una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácido no humanos a menudo se mencionan como restos de "importación", que se cogen normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo secuencias de región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos N° 4.816.567) donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que está más cerca de la del roedor entonces se acepta como la región flanqueante humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chotia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901). Otro método usa una región flanqueante particular derivada de la secuencia consenso de anticuerpos completamente humanos de un subgrupo particular de cadena ligera o pesada. Puede usarse la misma región flanqueante para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol, 151:2623).

Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursora y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están habitualmente disponibles y son familiares para los especialistas

en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias candidatas seleccionadas de inmunoglobulina. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse y combinarse restos FR a partir de las secuencias receptora y de importación de modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están implicados directamente y muy sustancialmente en la influencia a la unión al antígeno.

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos anti-EphB4 de la invención pueden construirse combinando una o más secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas a partir de bibliotecas de presentación en fagos derivados de seres humanos con una o más secuencias conocidas de dominio constante humano como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los anticuerpos monoclonales humanos anti-EphB4 de la invención pueden prepararse por el método de hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal provoca la inhibición completa de producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal provocará la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993).

También puede usarse redistribución génica para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se llama "impresión de epítipo", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de presentación en fagos como se ha descrito anteriormente se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humano, creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno provoca el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana donde la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la correspondiente cadena no humana en el clon primario de presentación en fagos, es decir el epítipo gobierna (imprime) la elección del compañero de cadena humana. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por EphB4 y la otra es por cualquier otro antígeno. Anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína EphB4. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan EphB4. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a EphB4 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 (1983)). A causa de la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpo, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace habitualmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se describe procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., EMBOJ., 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente y más preferido, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio

constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión diferentes, y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales provoca elevados rendimientos o cuando las proporciones no son de importancia particular.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuesto por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones indeseadas de cadena de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivo celular recombinante. La superficie de contacto preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplaza una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácido de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se ha propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células indeseadas (patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documento WO 91/00360, documento WO 92/00373, y documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método conveniente de entrecruzamiento. Los agentes adecuados de entrecruzamiento son bien conocidos en la técnica, y se describen en la patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento donde anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de complejos de ditiol arsenito sódico para estabilizar ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB después se vuelve a convertir en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El reciente progreso ha facilitando la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobre-expresaban el receptor HER2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena

ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

10 **Anticuerpos multivalentes**

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpo multivalentes (que son diferentes de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en este documento comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en este documento preferiblemente comprende adicionalmente al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en este documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden adicionalmente un dominio CL.

Variantes de anticuerpo

En algunas realizaciones, se contemplan una o más modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios apropiados de nucleótido en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución se hace para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se prepara la secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido con alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Aquí, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones entonces se refinan introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación *per se* no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis por barrido con ala o aleatoria en el codón o región diana y se exploran las inmunoglobulinas expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud de uno resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de uno solamente o múltiples restos de aminoácido. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variaciones de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

La glucosilación de polipéptidos es normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento

para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. Glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligada a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligada a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede estar alterado. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo en la solicitud de patente de Estados Unidos Nº US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se mencionan anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y la patente de Estados Unidos Nº 6.602.684, Umana et al. Se informa de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 1997/30087, Patel et al. Véase, también, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) que se refiere a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana et al.) sobre moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

La variante de glucosilación preferida en este documento comprende una región Fc, donde una estructura de carbohidrato unida a la región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen función ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende adicionalmente una o más sustituciones de aminoácido en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de los restos). Ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Biol. Chem. 279:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); solicitud de patente de Estados Unidos Nº US 2003/0157108 A1, Presta, L.; y documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares knockout, tales como células CHO *FUT8*, gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, knockout (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo remplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones provocan un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a clases de aminoácidos, y explorarse los productos.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu

Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoide, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basados en propiedades comunes de cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetados en cada partícula. Las variantes presentadas en fago después se exploran para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se describe en este documento. Para identificar sitios candidatos de región hipervariable para modificación, puede realizarse mutagénesis por barrido con alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y los restos adyacentes son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en este documento. Una vez generadas dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en este documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante previamente preparada o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácido en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido incluyendo la de una cisteína bisagra. De acuerdo con esta descripción y los contenidos de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo usado en métodos de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo equivalente de tipo silvestre, por ejemplo en la región Fc. Estos anticuerpos no obstante retendrían sustancialmente las mismas características necesarias para su utilidad terapéutica en comparación con su equivalente de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que pueden hacerse ciertas alteraciones en la región Fc que provocarían una unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir, mejorada o disminuida), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter Nature 322:738-40 (1988); la patente de Estados Unidos N° 5.648.260; la patente de

Estados Unidos N° 5.624.821; y el documento WO94/29351 respecto a otros ejemplos de variantes de región Fc. El documento WO00/42072 (Presta) y el documento WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR. Véase, también, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Se describen anticuerpos con vidas medias aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyeret et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con uno o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos alteradas de región Fc y capacidad aumentada o disminuida de unión a C1q en la patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1, el documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para que contengan motivos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferiblemente, los motivos adecuados para derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, aunque sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, la cantidad y/o tipo de polímeros usados para derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, aunque sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

Selección de anticuerpos con propiedades deseadas

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los anticuerpos se caracterizan por una cualquiera o más de reducción o bloqueo de activación de EphB4, reducción o bloqueo de la señalización corriente abajo de EphB4, reducción o bloqueo de activación de ligando EphB4, reducción o bloqueo de señalización molecular corriente abajo de ligando EphB4, alteración o bloqueo de la unión de ligando (por ejemplo, efrina-B1, efrina-B2, y/o efrina-B3) a EphB4, fosforilación de EphB4 y/o multimerización de EphB4, y/o la fosforilación de ligando EphB4, y/o tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de EphB4 (tal como expresión y/o actividad aumentada de EphB4).

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos incluyendo, aunque sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida a alta presión (HPLC) por exclusión de tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio y digestión con papaína.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos producidos en este documento se analizan para su actividad biológica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se ensayan para su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que son conocidos en la técnica y pueden usarse en este documento incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directa o competitiva usando técnicas tales como transferencia de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A. Se proporcionan ensayos de unión a antígeno ilustrativos a continuación en la sección de Ejemplos.

En otra realización más, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-EphB4 que compiten con anticuerpo 30.35, 30.35.1D2 y/o 30.35.2D8 por la unión a EphB4. Dichos anticuerpos competidores incluyen anticuerpos que reconocen un epítipo EphB4 que es igual a o solapa con el epítipo EphB4 reconocido por el anticuerpo 30.35, 30.35.1D2 y/o 30.35.2D8. Dichos anticuerpos competidores pueden obtenerse por exploración de sobrenadantes de hibridoma anti-EphB4 para la unión a EphB4 inmovilizado en competición con anticuerpo 30.35, 30.35.1D2 y/o 30.35.2D8 marcado. Un sobrenadante de hibridoma que contiene anticuerpo competidor reducirá la cantidad de anticuerpo marcado unido detectado en la mezcla de unión de competición objeto en comparación con la cantidad de anticuerpo marcado unido detectado en una mezcla de unión de control que contiene anticuerpo irrelevante (o ausente). Es adecuado cualquier ensayo de unión de competición descrito en este documento para su uso en el procedimiento anterior.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-EphB4 que comprende una o más (tal como 2, 3, 4, 5, y/o 6) HVR del anticuerpo 30.35, 30.35.1D2 o 30.35.2D8. Un anticuerpo monoclonal anti-EphB4 que

comprende una o más HVR de 30.35, 30.35.1D2 y/o 30.35.2D8 puede construirse injertando una o más HVR de 30.35, 30.35.1D2 y/o 30.35.2D8 en una secuencia de anticuerpo molde, por ejemplo una secuencia de anticuerpo humano que está muy cercana a la correspondiente secuencia murina del anticuerpo precursor, o una secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos en el subgrupo particular de la cadena ligera o pesada del anticuerpo precursor, y que expresa la secuencia o secuencias variables resultantes químéricas de cadena ligera y/o pesada, con o sin secuencia o secuencias de región constante complementarias, en células hospedadoras recombinantes como se describe en este documento.

Los anticuerpos anti-EphB4 de la invención que poseen las propiedades únicas descritas en este documento pueden obtenerse explorando clones de hibridoma anti-EphB4 para las propiedades deseadas por cualquier método conveniente. Por ejemplo, si se desea un anticuerpo monoclonal anti-EphB4 que bloquee o no bloquee la unión de ligandos EphB4 a EphB4, el anticuerpo candidato puede ensayarse en un ensayo de competición de unión, tal como un ELISA de unión competitiva, donde se recubren los pocillos de la placa con EphB4, y se estratifica una solución de anticuerpo en un exceso del ligando Eph de interés sobre las placas recubiertas, y se detecta anticuerpo unido de forma enzimática, por ejemplo poniendo en contacto el anticuerpo unido con anticuerpo anti-Ig conjugado con HRP o anticuerpo anti-Ig biotinilado y desarrollando la reacción de color de HRP, por ejemplo revelando placas con estreptavidina-HRP y/o peróxido de hidrógeno y detectando la reacción de color de HRP por espectrofotometría a 490 nm con un lector de placa ELISA.

Si se desea un anticuerpo anti-EphB4 que inhibe o activa la activación de EphB4, el anticuerpo candidato puede ensayarse en un ensayo de fosforilación de EphB4. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y uno de estos ensayos se describe en la sección de Ejemplos.

Si se desea un anticuerpo anti-EphB4 que inhiba el crecimiento celular, el anticuerpo candidato puede ensayarse en ensayos in vitro y/o in vivo que miden la inhibición del crecimiento celular. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y se describen adicionalmente y ejemplifican en este documento.

En una realización, la presente invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que lo hacen un candidato deseado para muchas aplicaciones en que la vida media del anticuerpo in vivo es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades Fc de la inmunoglobulina producida se miden para asegurar que se mantienen solamente las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo para confirmar la reducción/disminución de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión de receptor Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero retiene capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo in vitro para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.500.362 o 5.821.337. Células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). También pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de la unión a FcRn y eliminación/vida media in vivo usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo aquellos descritos en la sección de Ejemplos.

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican la cadena pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora a usar. Generalmente, las células hospedadoras preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos usando célula hospedadoras procariotas:

i. Construcción de vector

Las secuencias polinucleotídicas que codifican los componentes de polipéptido del anticuerpo de la invención pueden obtenerse usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias de polinucleótido deseadas

pueden aislarse y secuencias a partir de células productoras de anticuerpo tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica pueden usarse para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertar en el vector y la célula hospedadora particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, aunque sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y control que se obtienen de especies compatibles con la célula hospedadora en conexión con estos hospedadores. El vector habitualmente porta un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* normalmente se transforma usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por tanto proporciona un medio fácil para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos pueden contener también, o modificarse para que contengan, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particular se describen en detalle en Carter et al., patente de Estados Unidos N° 5.648.237.

Además, pueden usarse vectores fágicos que contienen secuencias de replicón y control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en conexión con estos hospedadores. Por ejemplo, puede utilizarse un bacteriófago tal como XGEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que pueda usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en la cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente pertenecen a dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Es bien conocida una gran cantidad de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse de forma funcional al ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Puede usarse tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y rendimientos más elevados del gen diana expresado en comparación con el promotor del polipéptido diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tal como otros promotores conocidos de bacterias o fagos). Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, posibilitando de este modo que un trabajador capacitado las ligue de forma funcional a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción necesario.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la traslocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de esta invención debe ser uno que se reconozca y procese (es decir se escinda por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal está sustituida con una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo que consiste en los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, *lpp*, o enterotoxina II estable al calor (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede suceder en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. A ese respecto, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas *E.*

coli trxB-) proporcionan condiciones citoplasmáticas que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiados de las subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (por ejemplo, E. coli), Bacilli (por ejemplo, B. subtilis), Enterobacteria, especies Pseudomonas (por ejemplo, P. aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, o Paracoccus. En una realización, se usan células gram-negativas. En una realización, se usan células de E. coli como hospedadores para la invención. Ejemplos de cepas de E. coli incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; ATCC Depósito Nº 27,325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 Δ hfuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de Estados Unidos Nº 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como E. coli 294 (ATCC 31.446), E. coli B, E. coli λ 1776 (ATCC 31.537) y E. coli RV308 (ATCC 31.608) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse adecuadamente especies E. coli, Serratia, o Salmonella como hospedador cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inhibidores adicionales de proteasa pueden incorporarse de forma deseable en el cultivo celular.

ii. Producción de anticuerpo

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se hace usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados incluyen caldo luria (LB) más suplementos nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan gen resistente a ampicilina.

También puede incluirse cualquier suplemento necesario más allá de fuentes de carbono, nitrógeno, y fosfato inorgánico a concentraciones apropiadas introducidas en solitario o como una mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados entre el grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitól.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de E. coli, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferiblemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferiblemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para E. coli, el pH es preferiblemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferiblemente de aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteína se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferiblemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Puede usarse diversos otros inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se sabe en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas normalmente implica alterar el microorganismo, generalmente mediante medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez las células

se han alterado, pueden retirarse los desechos celulares o células completas por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse en el medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células pueden retirarse del cultivo y puede filtrarse el sobrenadante de cultivo y concentrarse para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse adicionalmente e identificarse usando métodos habitualmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpo se realiza en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación por lotes a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferiblemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). Fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a fermentación en un fermentador que no es de más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión proteica normalmente se inicia después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta la densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, fase en la cual las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se sabe en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiados de los polipéptidos secretados de anticuerpo, pueden usarse vectores adicionales que sobre-expresan proteínas chaperona, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células hospedadoras procariotas. Las proteínas chaperona han demostrado facilitar el plegamiento y solubilidad apropiados de las proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou et al., patente de Estados Unidos N° 6.083.715; Georgiou et al., patente de Estados Unidos N° 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse ciertas cepas hospedadoras deficientes en enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una o más mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas proteasa-deficientes de E. coli están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), supra; Georgiou et al., patente de Estados Unidos N° 5.264.365; Georgiou et al., patente de Estados Unidos N° 5.508.192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

En una realización, se usan cepas de E. coli deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobre-expresan una o más proteínas chaperona como células hospedadoras en el sistema de expresión de la invención.

iii. Purificación de anticuerpo

Pueden emplearse métodos convencionales de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos adecuados de purificación: fraccionamiento en columnas de inmutafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o en resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatofenofque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se usa proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación por inmutafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de pared celular de 41 kD de Staphylococcus aureus que se une con una elevada afinidad a la región Fc de anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida en la que se inmutafila la proteína A es preferiblemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferiblemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento por evitar la adherencia no específica de contaminantes.

Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo como se ha descrito anteriormente se aplica a la fase sólida con proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a proteína A. La fase sólida después se lava para retirar los contaminantes unidos de forma no específica a la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

b. Generación de anticuerpos usando células hospedadoras eucariotas:

Los componentes de vector generalmente incluyen, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En expresión celular de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes de secreción viral, por ejemplo, la señal gD de herpes simple.

El ADN para dicha región precursora está ligado en fase de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

Generalmente, un componente de origen de replicación no es necesario APRA vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente solamente porque contiene el promotor temprano.

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también llamado marcador de selección. Los genes típicos de selección codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas complementarias, cuando sea relevante, o (c) suministro de nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Esas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que posibilitan la identificación de células competente para captar el ácido nucleico de anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primer cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, pueden seleccionarse células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo silvestre, y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

(iv) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido de forma funcional al ácido nucleico del polipéptido de anticuerpo. Se conocen secuencias promotores para eucariotas. Casi todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción del polipéptido de anticuerpo a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como poliovirus, pox virus de aves, adenovirus (tal como Adenovirus 2), papiloma virus bovino, sarcoma virus de aves, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula hospedadora.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Se describe un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamífero usando el papiloma virus bovino como un vector en la patente de Estados Unidos Nº 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la patente de Estados Unidos Nº 4.601.978. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

(v) Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de esta invención por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, y insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede sufrir corte y ajuste en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido de anticuerpo, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadora eucariotas normalmente también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están habitualmente disponibles a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región poliadenilación de la hormona bovina del crecimiento. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión descrito en este documento.

(vii) Elección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de este documento incluyen células eucariotas superiores descritas en este documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según lo apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en diversos medios. Son adecuados medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), patentes de Estados Unidos Nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o patente de Estados Unidos Re. 30.985 puede

usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según lo necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente equivalente de energía. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para los especialistas en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los especialistas en la técnica.

(ix) Purificación de anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los desechos particulados, células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, generalmente primero se concentran los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión usando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de estas células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie es isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Se recomienda proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es muy habitualmente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos más cortos de procesamiento que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteína tales como fraccionamiento en columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatografía en SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizada a bajas concentraciones salinas (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Inmunconjugados

La invención también proporciona inmunconjugados (llamados de forma intercambiable "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC"), que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-OX40L descritos en este documento conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de las mismas), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos que eliminan o inhiben células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; patente de Estados Unidos 4.975.278) permite el suministro dirigido del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes de fármaco no conjugados puede provocar niveles inaceptables de toxicidad a células normales así como las células tumorales que se intentan eliminar (Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pág. 475-506). De este modo se busca una eficacia máxima con toxicidad mínima. Se ha informado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) supra). Las toxinas usadas en conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 93:8618-8623), y calicheamicina (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden realizar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN, o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptor de proteína.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjugados anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por enlazador-quelante tiourea (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin de células B (NHL), la administración provoca citopenias severas y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo contra hu CD33 unido a calicheamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; patentes de Estados Unidos N° 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo contra huC242 unido mediante el enlace disulfuro SPP al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está avanzando en ensayos en fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tal como de colon, pancreático, gástrico, y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en neoplasias hematológicas) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en este documento (por ejemplo, anteriormente). Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteína tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

También se contemplan en este documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como calicheamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad toxina.

i. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) de la invención conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina fue el primero aislado del arbusto de África oriental Maytenus serrata (patente de Estados Unidos N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de Estados Unidos N° 4.151.042). Se describen maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos de fármaco maitansinoide son restos atractivos de fármaco en conjugados anticuerpo-fármaco porque son: (i) relativamente accesibles de preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles a derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra diversas líneas celulares

tumorales.

Se describen inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para preparar los mismos, y su uso terapéutico, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM 1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico hacia células cancerosas de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral in vivo. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas de células cancerosas de colon humano, o a con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une a HER-2/oncogén neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó in vitro en la línea de células cancerosas de mama humana SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando la cantidad de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan por enlace químico de un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar de forma negativa a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de la toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente mencionadas anteriormente en este documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de unión conocidos en la técnica para preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), y solicitud de patente de Estados Unidos Nº 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC pueden prepararse como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos Nº 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos inestables en ácido, grupos fotoinestables, grupos inestables en peptidasa, o grupos inestables en esterasa, como se describe en las patentes identificadas anteriormente, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter. Se describen y ejemplifican en este documento grupos adicionales de unión.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteína tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), di-isocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede formarse por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas convencionales de acoplamiento. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

ii. Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos y derivados de dolostatina, las auristatinas (patentes de Estados Unidos Nº 5635483; 5780588). Las dolastatinas y auristatinas han demostrado impedir la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP, y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents y Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Realizaciones ejemplares de auristatina incluyen los restos de fármaco monometilauristatina unidos a extremo N DE

y DF, descritos en "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento de Estados Unidos N° Ser. 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

Normalmente, los restos de fármaco basados en péptido puede prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlace peptídicos puede prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de los documento: US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Véase también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento de Estados Unidos N° Ser. 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004, (que describe, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

iii. Calicheamicina

En otras realizaciones, el inmunconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos calicheamicina es capaz de producir roturas en ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia calicheamicina, véanse las patentes de Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco anti-tumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la calicheamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

iv. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296).

Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla adicionalmente un inmunconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centelleografía, por ejemplo tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imágenes de resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de modos conocidos. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores adecuados de aminoácido que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcadores tales como tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse mediante un resto de cisteína en el péptido. El itrio-90 puede unirse mediante un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

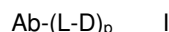
Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteína tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales

como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoi) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), di-isocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador inestable en ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotoinestable, enlazador dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, aunque sin limitación, ADC preparado con reactivos de entrecruzamiento: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EEUU). Véase las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco

En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, a través de un enlazador (L). El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones, y reactivos conocidos para los especialistas en la técnica, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en este documento métodos adicionales para preparar ADC.



El enlazador puede estar compuesto por uno o más componentes enlazadores. Componentes enlazadores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrullina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Componentes enlazadores adicionales son conocidos en la técnica y algunos se describen en este documento. Véase también "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento de Estados Unidos N° Ser. 10/983.340, presentado el 5, de noviembre de 2004.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácido. Componentes enlazadores de aminoácido ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrullina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrullina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Restos de aminoácido que comprenden un componente enlazador de aminoácido incluyen aquellos de origen natural, así como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Pueden diseñarse componentes enlazadores de aminoácido y optimizarse en sus selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D, o una plasmina proteasa.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, aunque sin limitación: (i) grupos amina N-terminales, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol en cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar donde el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol, e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en motivos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los antibióticos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará de este modo, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que provoca la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro, o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más restos de aminoácido cisteína no nativos).

Los conjugados de fármaco de anticuerpo de la invención también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir motivos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con agentes oxidantes periodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los

reactivos enlazadores o motivos de fármaco. Los grupos de base de Schiff imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de boro hidruro para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta-periodato sódico pueden producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, proteínas que contienen restos de serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-periodato sódico, provocando la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con un motivo de fármaco o nucleófilo enlazador.

Así mismo, los grupos nucleófilos en un motivo de fármaco incluyen, aunque sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en motivos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo, y maleimida.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" "tal como estreptavidina) para su utilización en el pre-abordamiento de tumores donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene al grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20ª edición (2000)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no-iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación de este documento también puede contener más de un compuesto activo necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20ª edición (2000).

Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilvinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico

degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etilenvinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el organismo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, provocando una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tiodisulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos sulfidrilos, liofilizando en soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Usos

Un anticuerpo de la presente invención puede usarse en, por ejemplo, métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular asociado con expresión y/o actividad aumentada de EphB4, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para reducir, inhibir, o prevenir el crecimiento de un tumor o cáncer, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

EphB4 se ha implicado en la guía de motoaxones y la migración de células de la cresta neural en el desarrollo de embriones. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención también son útiles en el tratamiento (incluyendo prevención) de trastornos cuya patología implique degeneración o disfunción celular, tal como tratamiento de diversos trastornos neurodegenerativos (crónicos) y lesiones agudas de células nerviosas. Dichos trastornos neurodegenerativos incluyen, sin limitación, neuropatías periféricas; trastornos de motoneuronas, tales como esclerosis lateral amiotrófica (ALS, enfermedad de Lou Gehrig), parálisis de Bell, y diversas afecciones que implican atrofia o parálisis muscular espinal; y otras enfermedades neurodegenerativas humanas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia, esclerosis múltiple, corea Huntington, síndrome de Down, sordera nerviosa, y enfermedad de Meniere, y lesiones agudas de células nerviosas, por ejemplo debido a traumatismo o lesión de medula espinal.

Los anticuerpos de la invención también son útiles para inhibir la angiogénesis. En algunas realizaciones, el sitio de angiogénesis es un tumor o cáncer.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis que comprenden administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una afección patológica asociada con angiogénesis que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con angiogénesis es un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con angiogénesis es una enfermedad neovascular intraocular.

Además, al menos algunos de los anticuerpos de la invención pueden unirse a antígenos de otras especies. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención puede usarse para unirse a actividad antigénica específica, por ejemplo, en un cultivo celular que contenga el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tengan el antígeno con el cual un anticuerpo de la invención reacciona de forma cruzada (por ejemplo, chimpancés, babuinos, tití común, macacos cynomolgus y rhesus, cerdos o ratones). En alguna realización, el anticuerpo de la invención puede usarse para inhibir actividades antigénicas por contacto del anticuerpo con el antígeno de modo que se inhiba la actividad antigénica. Preferiblemente, el antígeno es una molécula proteica humana.

En una realización, puede usarse un anticuerpo de la invención en un método para unir un antígeno en un sujeto que padece un trastorno asociado con expresión y/o actividad antigénica aumentada, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de modo que el antígeno en el sujeto esté unido. Preferiblemente, el antígeno es una molécula proteica humana y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que exprese el antígeno con el cual se une un anticuerpo de la invención. Adicionalmente el sujeto puede ser un mamífero en el cual se ha introducido el antígeno (por ejemplo, por administración del antígeno o por expresión de un transgén antigénico). Puede administrarse un anticuerpo de la invención a un sujeto humano con fines terapéuticos. Además, puede administrarse un anticuerpo de la invención a un mamífero no humano que exprese un antígeno con el cual la inmunoglobulina reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) con fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. Respecto a lo último, dichos modelos

animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayos de dosificaciones y cursos de tiempo de administración).

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir, retardar el progreso de, evitar/retardar la recurrencia de, mejorar, o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad de una o más moléculas antigénicas.

Trastornos ejemplares incluyen carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer pulmonar incluyendo cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o útero, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de células B, cáncer de cerebro así como de cabeza y cuello, y metástasis asociadas. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer pulmonar microcítico, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), y carcinoma hepatocelular.

En ciertas realizaciones, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno al cual se une se internalizan por la célula, provocando una eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la eliminación de la célula diana a la cual se une. En una realización, el agente citotóxico aborda o interfiere con el ácido nucleico en la célula diana. En una realización, el agente citotóxico aborda o interfiere con la polimerización de microtúbulos. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos indicados en este documento (tal como un maitansinoide, auristatina, dolastatina, o una caliquamicina), un isótopo radiactivo, o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede co-administrarse con otro anticuerpo, agente o agentes quimioterapéuticos (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), otro u otros agentes citotóxicos, agente o agentes anti-angiogénicos, citoquinas, y/o agente o agentes inhibidores del crecimiento. Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento tumoral, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o más agentes terapéuticos diferentes que también inhiban el crecimiento tumoral. Como alternativa o adicionalmente, el paciente puede recibir terapia de radiación combinada (por ejemplo, irradiación con rayos externos o terapia con un agente marcado de forma radiactiva, tal como un anticuerpo). Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen administración combinada (donde los dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o formulaciones diferentes), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede suceder antes de, y/o después de, la administración de la terapia o terapias adyuvantes.

Terapias de combinación

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona terapias combinadas en las cuales se administra un anticuerpo anti-EphB4 con otra terapia. Por ejemplo, los anticuerpos anti-EphB4 se usan en combinaciones con agentes terapéuticos antineoplásicos o un agente terapéutico anti-neovascularización para tratar diversas afecciones neoplásicas o no neoplásicas. En una realización, la afección neoplásica o no neoplásica se caracteriza por trastorno patológico asociado con angiogénesis aberrante o indeseada. El anticuerpo anti-EphB4 puede administrarse en serie o en combinación con otro agente que sea eficaz para dichos fines, en la misma composición o como composiciones diferentes. Como alternativa, o adicionalmente, pueden administrarse múltiples inhibidores de EphB4.

La administración del anticuerpo anti-EphB4 puede hacerse simultáneamente, por ejemplo, como una única composición o como dos o más composiciones distintas usando la misma o diferentes vías de administración. Como alternativa, o adicionalmente, la administración puede hacerse secuencialmente, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días, hasta semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente antineoplásico puede administrarse primero, seguido por el inhibidor de EphB4. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo anti-EphB4 primero.

Las cantidades eficaces de agentes terapéuticos administrados en combinación con un anticuerpo anti-EphB4 serán a juicio del médico o veterinario. La administración de dosificación y el ajuste se hacen para conseguir una gestión máxima de las afecciones a tratar. La dosis dependerá adicionalmente de factores tales como el tipo de agente terapéutico a usar y el paciente específico que se esté tratando. Las dosificaciones adecuadas para el agente antineoplásico son aquellas actualmente usadas y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente antineoplásico y el anticuerpo anti-EphB4. En ciertas realizaciones, las combinaciones de los inhibidores

potencia la eficacia de un único inhibidor. El término "potenciar" se refiere a una mejora en la eficacia del agente terapéutico a su dosis habitual o aprobada.

Normalmente, los anticuerpos anti-EphB4 y los agentes antineoplásicos son adecuados para la misma o similares enfermedades para bloquear o reducir un trastorno patológico tal como crecimiento tumoral o crecimiento de una célula cancerosa. En una realización, el agente antineoplásico es un agente anti-angiogénesis.

La terapia anti-angiogénica en relación al cáncer es una estrategia de tratamiento de cáncer dirigida a inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos tumorales necesarios para proporcionar nutrientes para apoyar el crecimiento tumoral. Como la angiogénesis está implicada tanto en el crecimiento de tumores primarios como en metástasis, el tratamiento anti-angiogénico proporcionado por la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico del tumor en un sitio primario así como de prevenir la metástasis de tumores en los sitios secundarios, permitiendo por lo tanto el ataque de los tumores por otros agentes terapéuticos.

Se han identificado muchos agentes anti-angiogénicos y son conocidos en las técnicas, incluyendo aquellos enumerados en este documento, por ejemplo, enumerados en las definiciones, y por, por ejemplo, Carmeliet y Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara et al., *Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). Véase también, la solicitud de patente de Estados Unidos US20030055006. En una realización, se usa un anticuerpo anti-EphB4 en combinación con un anticuerpo neutralizante anti-VEGF (o fragmento) y/u otro antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo, fragmentos del receptor de VEGF solubles (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de las tirosina quinasas VEGFR (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF, variantes de antagonista de VEGF; y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o adicionalmente, opcionalmente pueden co-administrarse dos o más inhibidores de la angiogénesis al paciente además de antagonista de VEGF y otro agente. En cierta realización, puede administrarse uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes antineoplásicos, en combinación con anticuerpo anti-EphB4, el antagonista de VEGF, y un agente anti-angiogénesis.

En ciertos aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para terapia de combinación contra tumores con un anticuerpo anti-EphB4 incluyen otras terapias contra el cáncer (por ejemplo, cirugía, tratamientos radiológicos (por ejemplos, que implican irradiación o administración de sustancias radiactivas), quimioterapia, tratamiento con agentes anti-neoplásicos enumerados en este documento y conocidos en la técnica, o combinaciones de los mismos). Como alternativa, o adicionalmente, dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más diferentes antígenos descritos en este documento pueden co-administrarse al paciente. A veces, puede ser beneficioso también administrar una o más citoquinas al paciente.

Agentes quimioterapéuticos

En ciertos aspectos, la invención proporciona un método para bloquear o reducir el crecimiento tumoral o el crecimiento de una célula cancerosa, administrando cantidades de un antagonista de EphB4 y/o uno o más inhibidores de la angiogénesis y uno o más agentes quimioterapéuticos a un paciente susceptible a, o diagnosticado con, cáncer. Puede usarse diversos agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Se proporciona en este documento una lista ejemplar y no limitada de agentes quimioterapéuticos contemplados en "Definiciones".

Como se entenderá por los especialistas en la técnica, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos generalmente serán cerca de aquellas ya empleadas en terapias clínicas donde los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Probablemente sucederá variación en la dosificación dependiendo de la afección que se esté tratando. El médico que administre el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Crecimiento tumoral recurrente

A invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir el crecimiento tumoral recurrente o el crecimiento recurrente de células cancerosas. El crecimiento tumoral recurrente o el crecimiento recurrente de células cancerosas se usa para describir una afección en la cual los pacientes que experimentan o se tratan con una o más terapias actualmente disponibles (por ejemplo, terapias contra el cáncer, tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia con anticuerpos anti-VEGF, particularmente un régimen terapéutico convencional para el cáncer particular) no son clínicamente adecuadas para tratar los pacientes o los pacientes ya no están recibiendo ningún efecto beneficioso de la terapia de modo que estos pacientes necesiten terapia eficaz adicional. Como se usa en este documento, la expresión también puede hacer referencia a un estado del paciente "no sensible/refractario", por ejemplo, que describe pacientes que responden a terapia que aún padecen efectos secundarios, desarrollan resistencia, no responden a la terapia, no responden satisfactoriamente la terapia, etc. En diversas realizaciones, un cáncer es crecimiento tumoral recurrente o crecimiento recurrente de células tumorales cuando la cantidad de células cancerosas no se ha reducido

significativamente, o ha aumentado, o el tamaño del tumor no se ha reducido significativamente, o ha aumentado, o no logra ninguna reducción adicional en el tamaño o en la cantidad de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas son crecimiento tumoral recurrente o crecimiento recurrente de células cancerosas puede hacerse in vivo o in vitro por cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia del tratamiento sobre las células cancerosas, usando los significados aceptados en la técnica de "recurrencia" o "refractario" o "no sensible" en dicho contexto. Un tumor resistente a tratamiento anti-VEGF es un ejemplo de un crecimiento tumoral recurrente.

La invención proporciona métodos para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recurrente o el crecimiento recurrente de células cancerosas en un sujeto administrando uno o más anticuerpos anti-EphB4 para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recurrente o el crecimiento recurrente de células cancerosas en el sujeto. En ciertas realizaciones, el antagonista puede administrarse después del agente terapéutico contra el cáncer. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB4 se administra simultáneamente con terapia contra el cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, la terapia de anticuerpos anti-EphB4 alterna con otra terapia contra el cáncer, que puede realizarse en cualquier orden. La invención también abarca métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para evitar la aparición o recidiva de cáncer en pacientes predispuestos a tener cáncer. Generalmente, el sujeto experimentó o está experimentando de forma concurrente terapia contra el cáncer. En una realización, la terapia contra el cáncer es tratamiento con un agente anti-angiogénesis, por ejemplo, un antagonista de VEGF. El agente anti-angiogénesis incluye aquellos conocidos en la técnica y aquellos encontrados en las definiciones en este documento. En una realización, el agente anti-angiogénesis es un anticuerpo neutralizante anti-VEGF o fragmento (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; documento WO98/45332; documento WO 96/30046; documento WO94/10202; documento EP 0666868B1; solicitudes de patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); y, documento WO2005012359. Pueden administrarse agentes adicionales en combinación con antagonista de VEGF y un anticuerpo anti-EphB4 para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recurrente o el crecimiento recurrente de células cancerosas, por ejemplo, véase la sección titulada Terapias de combinación en este documento.

El anticuerpo de la invención (y agente terapéutico auxiliar) se administra o administran por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesión. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión pulsada, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tal como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La composición de anticuerpo de la invención se formulará, dosificará, y administrará de un modo coherente con la buena práctica médica. Factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se esté tratando, el mamífero particular que se esté tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos para los facultativos médicos. El anticuerpo, aunque no necesariamente, se formula opcionalmente con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración usadas anteriormente en este documento o de aproximadamente el 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se solo o en combinación con otros agentes tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad o curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico que esté atendiendo. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o sobre una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones diferentes, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se sostiene hasta que sucede una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo sería en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, puede administrarse una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de los mismos) al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga mayor inicial, seguida por una o más dosis inferiores. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida por una dosis de

mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

5 Los anticuerpos anti-EphB4 de la invención son útiles en ensayos para detectar la expresión de EphB4 (tales como ensayos de diagnóstico o pronóstico) en células o tejidos específicos donde los anticuerpos están marcados como se describe a continuación y/o están inmovilizados en una matriz insoluble.

10 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para detectar EphB4, comprendiendo los métodos detectar el complejo EphB4-anticuerpo anti-EphB4 en la muestra. El término "detección" como se usa en este documento incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (medición de niveles) con o sin referencia a un control.

15 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de EphB4, comprendiendo los métodos detectar el complejo EphB4-anticuerpo anti-EphB4 en una muestra biológica de un paciente que tiene o se sospecha que tiene el trastorno. En algunas realizaciones, la expresión de EphB4 es expresión aumentada o expresión anormal (indeseada). En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular.

20 En otro aspecto, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anti-EphB4 descritos en este documento, donde el anticuerpo anti-EphB4 comprende un marcador detectable.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-EphB4 descritos en este documento y EphB4. En algunas realizaciones, el complejo es in vivo o in vitro. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB4 está marcado de forma detectable.

30 Los anticuerpos anti-EphB4 pueden usarse para la detección de EphB4 en uno cualquiera de varios métodos de ensayo de detección bien conocidos. Por ejemplo, puede ensayarse una muestra biológica para EphB4 obteniendo la muestra de una fuente deseada, mezclando la muestra con anticuerpo anti-EphB4 para permitir que el anticuerpo forme el complejo anticuerpo/EphB4 con cualquier EphB4 presente en la mezcla, y detectando cualquier complejo anticuerpo/EphB4 presente en la mezcla. La muestra biológica puede prepararse para ensayo por métodos conocidos en la técnica que son adecuados para la muestra particular. Los métodos de mezcla de la muestra con anticuerpos y los métodos para detectar el complejo anticuerpo/EphB4 se eligen de acuerdo con el tipo de ensayo usado. Dichos ensayos incluyen inmunohistoquímica, ensayos competitivos y tipo sándwich, y ensayos de inhibición

35 estérica. Los métodos analíticos para EphB4 usan todos uno o más de los siguientes reactivos: análogo EphB4 marcado, análogo EphB4 inmovilizado, anticuerpo anti-EphB4 marcado, anticuerpo anti-EphB4 inmovilizado y conjugados estéricos. Los reactivos marcados también se conocen como "indicadores".

40 El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que no impida la unión de EphB4 y el anticuerpo anti-EphB4. Se conocen numerosos marcadores para su uso en inmunoensayo, incluyendo ejemplos restos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromo, marcadores quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que pueden hacerse reaccionar o derivatizarse para detectarse. Ejemplos de dichos marcadores incluyen:

45 El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que impida la unión de EphB4 y el anticuerpo anti-EphB4. Se conocen numerosos marcadores para su uso en inmunoensayo, incluyendo ejemplos restos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromo, marcadores quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas que pueden hacerse reaccionar o derivatizarse para detectarse. Ejemplos de dichos marcadores incluyen los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinediones, peroxidasa de rábano rústico (HRP), fosfatasa alcalina, p-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófago, radicales libres estables, y similares.

60 Están disponibles métodos convencionales para unir estos marcadores de forma covalente con proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, pueden usarse agentes de acoplamiento tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, bencidina bis-diazotizada, y similares para marcar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos descritos anteriormente. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 3.940.475 (fluorimetría) y 3.645.090 (enzimas); Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); y Nygren, J.

Histochem. y Cytochem., 30: 407-412 (1982). Los marcadores preferidos en este documento son enzimas tales como peroxidasa de rábano rusticano y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, con el anticuerpo es un procedimiento de manipulación convencional para un especialista en técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone y H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nueva York, Nueva York, 1981), pág. 147-166.

La inmovilización de reactivos es necesaria para ciertos métodos de ensayo. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-EphB4 de cualquier EphB4 que permanezca libre en solución. Esto se consigue convencionalmente insolubilizando el anticuerpo anti-EphB4 o el análogo EphB4 antes del procedimiento de ensayo, como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., documento U.S. 3.720.760), por acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o por insolubilización del anticuerpo anti-EphB4 o análogo EphB4 después de ello, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

La expresión de proteínas en una muestra puede examinarse usando inmunohistoquímica y protocolos de tinción. La tinción inmunohistoquímica de secciones tisulares ha demostrado ser un método fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente por métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de la muestra, puede usarse una muestra tisular o celular de un mamífero (normalmente un paciente humano). Ejemplos de muestras incluyen, aunque sin limitación, células cancerosas tales como células cancerosas de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma, y leucemia. La muestra puede obtenerse por diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija e incrusta en parafina o similares. La muestra tisular puede fijarse (es decir, conservarse) por metodología convencional. Un especialista en la técnica apreciará que la elección de un agente de fijación se determina por el propósito para el cual se tiñe histológicamente o analiza de otro modo la muestra. Un especialista en la técnica también apreciará que la longitud de fijación dependerá del tamaño de la muestra tisular y el agente de fijación usado.

Puede realizarse IHC en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* de fluorescencia. Están disponibles dos métodos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo EphB4) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como una marca fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que puede visualizarse sin interacción adicional de anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y después un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga a un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar visualización del antígeno. La amplificación de la señal sucede porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario usado para inmunohistoquímica normalmente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

Además de los procedimientos de preparación de muestra analizados anteriormente, puede desearse tratamiento adicional de la sección tisular antes de, durante o después de IHC. Por ejemplo, pueden realizarse los métodos de recuperación de epítipo, tal como calentamiento de la muestra tisular en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong et al. *Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)).

Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección tisular se expone al anticuerpo primario durante un periodo suficiente de tiempo y en condiciones adecuadas de modo que el anticuerpo primario se una al antígeno proteico diana en la muestra tisular. Las condiciones apropiadas para conseguir esto pueden determinarse por experimentación rutinaria. El grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina usando uno cualquiera de los marcadores detectables analizados anteriormente. Preferiblemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico tal como el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina. Preferiblemente, el marcador enzimático se conjuga a un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anti-conejo).

Las muestras preparadas de este modo pueden montarse y cubrirse con cubreobjetos. La evaluación del portaobjetos después se determina, por ejemplo, usando un microscopio, y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción, usados rutinariamente en la técnica. Los criterios de intensidad de tinción pueden evaluarse del siguiente modo:

Patrón de tinción	Valor
No se observa tinción en las células	0
Se detecta tinción escasa/poco perceptible en más del 10 % de las células.	1 +
Se observa tinción débil a moderada en más del 10 % de las células.	2+
Se observa tinción de moderada a fuerte en más del 10 % de las células.	3+

Normalmente, un valor de patrón de tinción de aproximadamente 2+ o superior en un ensayo IHC es diagnóstico y/o pronóstico. En algunas realizaciones, un valor de patrón de tinción de aproximadamente 1+ o superior es diagnóstico y/o pronóstico. En otras realizaciones, un valor de patrón de tinción de aproximadamente 3 o mayor es diagnóstico y/o pronóstico. Se entiende que cuando las células y/o tejido de un tumor o adenoma de colon se examinan usando IHC, la tinción generalmente se determina o evalúa en la célula y/o tejido tumoral (en oposición a tejido estromático o adyacente que puede estar presente en la muestra).

- 10 Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o tipo sándwich, están bien establecidos y se usan ampliamente en la industria comercial de diagnóstico.

15 Los ensayos competitivos dependen de la capacidad de un análogo EphB4 indicador de competir con la muestra de ensayo EphB4 por una cantidad limitada de sitios de unión a antígeno del anticuerpo anti-EphB4. El anticuerpo anti-EphB4 generalmente se insolubiliza antes o después de la competición y después el indicar y el EphB4 unido al anticuerpo anti-EphB4 se separan del indicador no unido y EphB4. Esta separación se consigue decantando (cuando el patrón de unión está pre-insolubilizado) o por centrifugación (cuando el patrón de unión se ha precipitado después de la reacción competitiva). La cantidad de muestra de ensayo EphB4 es inversamente proporcional a la cantidad de indicador unido medida por la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan curvas de respuesta a 20 dosis con cantidades conocidas de EphB4 y se comparan con los resultados de ensayo para determinar cuantitativamente la cantidad de EphB4 presente en la muestra del ensayo. Estos ensayos se llaman sistemas ELISA cuando se usan enzimas como marcadores detectables.

25 Otra especie de ensayo competitivo, llamado ensayo "homogéneo", no requiere una fase de separación. Aquí, se prepara un conjugado de una enzima con el EphB4 y se usa de modo que cuando el anticuerpo anti-EphB4 se une al EphB4 la presencia del anticuerpo anti-EphB4 modifica la actividad enzimática. En este caso, el EphB4 o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional a una enzima tal como peroxidasa. Los conjugados se seleccionan para su uso con anticuerpo anti-EphB4 de modo que la unión del anticuerpo anti-EphB4 inhibe o potencia la actividad enzimática del marcador. Este método *per se* se practica 30 ampliamente con el nombre de EMIT.

Se usan conjugados estéricos en métodos de impedancia estérica para ensayos homogéneos. Estos conjugados se sintetizan por unión covalente de un hapteno de bajo peso molecular a un fragmento pequeño de EphB4 de modo que el anticuerpo contra el hapteno es sustancialmente incapaz de unirse al conjugado al mismo que el anticuerpo 35 anti-EphB4. En este procedimiento de ensayo el EphB4 presente en la muestra de ensayo su unirá al anticuerpo anti-EphB4, permitiendo de este modo que el anti-hapteno se una al conjugado, provocando un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

40 Los ensayos tipo sándwich particularmente son útiles para la determinación de EphB4 o anticuerpos anti-EphB4. En ensayos tipo sándwich secuenciales se usa un anticuerpo anti-EphB4 inmovilizado para adsorber el EphB4 de la muestra de ensayo, la muestra de ensayo se retira como por lavado, el EphB4 unido se usa para adsorber un segundo anticuerpo anti-EphB4 marcado y el material unido después se separa del indicador residual. La cantidad de indicador unido es directamente proporcional al EphB4 de la muestra de ensayo. En ensayos tipo sándwich "simultáneos" la muestra de ensayo no se separa antes de añadir el anticuerpo anti-EphB4 marcado. Un ensayo tipo 45 sándwich secuencial usando un anticuerpo monoclonal anti-EphB4 como un anticuerpo y un anticuerpo anti-EphB4 policlonal como el otro es útil en el ensayo de muestras para EphB4.

Lo anterior son simplemente ensayos de detección ejemplares para EphB4. Otros métodos ya desarrollados o por desarrollar que usen anticuerpo anti-EphB4 para la determinación de EphB4 se incluyen dentro del alcance de los 50 mismos, incluyendo los bioensayos descritos en este documento.

Artículos de fabricación

55 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja una composición que es por sí misma o cuando se combina con otra composición o composiciones eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una vía de

acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un agente citotóxico adicional. El artículo de fabricación de esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indique que la primera y segunda composición de anticuerpo puede usarse para tratar una afección particular, por ejemplo, cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección bacteriostática (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtro, agujas, y jeringas.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras diversas realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1: generación de anticuerpos anti-EphB4

Los anticuerpos anti-EphB4 se generaron usando presentación en fagos, usando la proteína EphB4-His para seleccionar el fago. Se conoce diversos métodos en la técnica para generar bibliotecas de presentación en fagos a partir de las cuales puede obtenerse un anticuerpo de interés. Un método para generar anticuerpos de interés es a través del uso de una biblioteca de anticuerpos en fagos como se describe en Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93. Los clones seleccionados usando la presentación en fagos se exploraron frente a la proteína EphB4-His usando ELISA de fagos. Los clones únicos se seleccionaron para caracterización adicional por ELISA de competición de fagos y un ensayo de bloqueo para determinar si el clon de anticuerpo de fago podía bloquear las interacciones EphB4-efrinaB2. El clon 30.35 funcionó de forma favorable y se seleccionó para análisis adicional. Para mejorar la afinidad del clon 30.35, se generaron bibliotecas de presentación en fagos en el fondo de YW30.35, que abordan cada una HVR seleccionadas para asignación aleatoria suave o fuerte. Los clones seleccionados se exploraron por ELISA de fagos y después se expresaron como proteína Fab y se determinó su afinidad usando Biacore. Los clones seleccionados se remodelaron como IgG de longitud completa, y se determinó su afinidad usando Biacore. Las secuencias del clon precursor 30.35 y los clones de afinidad madurada se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2: caracterización de anticuerpos anti-EphB4

Para determinar la afinidad de unión de Mab anti-EphB4, se usó medición por resonancia de plasmón superficial (SRP) con un BiacoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). En resumen, se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado ((CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El anticuerpo anti-EphB4 se diluyó con acetato sódico 10mM, pH 4,8, en 5µg/ml antes de inyección a un caudal de 5µl/minuto para conseguir aproximadamente 500 unidades de respuesta (RU) del anticuerpo acoplado. A continuación, se inyectó etanolamina 1M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones de cinética, se inyectaron diluciones en serie de factor dos de moléculas EphB4-His humanas o murinas (0,7nM a 500nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % a 25°C a un caudal de 25µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo de unión simple uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} . Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3. "NA" significa que la medición no se realizó.

TABLA 3: Afinidad de unión y cinética de anticuerpos anti-EphB4 por EphB4 humano y de ratón.

Anti-EphB4	antígeno murino			antígeno humano		
	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	$K_d(nM)$	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	$K_d(nM)$
YW30.35	0,31	0,75	2,4	0,03	0,96	32
YW30.35.1D2	1,28	< 0,05	< 0,04	0,36	< 0,05	< 0,14
YW30.35.2D8	0,92	< 0,05	< 0,05	0,4	< 0,05	< 0,12
YW30.35.2D12	NA	NA	NA	0,27	< 0,05	< 0,19
YM30.35.2D13	NA	NA	NA	0,45	< 0,05	< 0,11

En diferentes experimentos, se ensayó la reactividad cruzada del clon 30.35 del anticuerpo anti-EphB4 frente a otros receptores EphB. En resumen, se transfectaron de forma transitoria células COS7 con plásmidos que expresaban EphB1 humano de longitud completa, EphB2 humano, EphB4 humano o EphB6 humano. 24 horas después de la

transfección, las células se sometieron a análisis FACS para detectar la unión por anticuerpos anti-EphB4, si los hubiera. El clon 30.35 anti-EphB4 no reaccionó de forma cruzada con EphB1 humano, EphB2 humano, EphB3 humano o EphB6 humano.

5 Ejemplo 3: el anticuerpo anti-EphB4 bloqueó la señalización del receptor EphB4 en un ensayo basado en células

Para demostrar la capacidad de anticuerpos anti-EphB4 de bloquear la interacción de EfrinaB2 unida a membrana y EphB4, se realizó un ensayo basado en células en que se presentaron EphB4 y EfrinaB2 por diferentes tipos celulares. Se usaron células 3T3 que sobreexpresaban EfrinaB2 humano para estimular células HUVEC que expresan un elevado nivel de EphB4 pero bajo nivel de EfrinaB2, y se ensayó la capacidad del anticuerpo anti-EphB4 de inhibir la activación de EphB4.

Se prepararon células 3T3 que sobreexpresaban EfrinaB2 humano del siguiente modo: se clonó EfrinaB2 de longitud completa humano en el vector pcDNA5/FRT (Invitrogen) y posteriormente se usó para generar la línea celular estable con células 3T3.Flp (Invitrogen) de acuerdo con el manual del fabricante.

Las células 3T3 que sobreexpresaban EfrinaB2 humana se recubrieron sobre células HUVEC durante 15 o 30 minutos, en presencia o ausencia de anticuerpo anti-EphB4. La activación del receptor EphB4 se evaluó por inmunoprecipitación de proteína EphB4, después detección de presencia o ausencia de fosforilación de la tirosina del receptor usando un anticuerpo anti-fosfotirosina (anticuerpo 4G10; Upstate) usando transferencia de western. En resumen, las células se lisaron con tampón RIPA. Los lisados celulares se aclararon por centrifugación y se añadió anticuerpo anti-EphB4 35.2D8 a 5 ug/muestra. Después de incubación a 4 °C durante dos horas, el inmunocomplejo se demolió usando agarosa de proteína A. se analizó la fosforilación de EphB4 por transferencia de western usando anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate) a una concentración de 1 ug/ml.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 7. El recubrimiento de células 3T3 sobre células HUVEC causó una drástica fosforilación de tirosina de EphB4 (carril 4 y 5). Una pre-incubación de 30 minutos de HUVEC con anticuerpo anti-EphB4 (clon 35.2D8 a 5 ug/ml) suprimió de forma eficaz la fosforilación de tirosina de EphB4 inducida por recubrimiento de células 3T3-EfrinaB2 (carril 69. En contraste, el tratamiento de células HUVEC con anti-EphB4 solamente no causó activación de EphB4 en HUVEC (carril 2 y 3), y células HUVEC no tratadas no demostraron activación de EphB4. Estos resultados establecieron que el anticuerpo anti-EphB4 bloqueaba la interacción ligando-receptor en el contexto del contacto célula-célula directo.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, los ejemplos no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-EphB4 aislado que comprende seis HVR, en el que cada HVR comprende o consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 1-17, y en el que las SEC ID N° 9 o 10 corresponden a una HVR-L1, las SEC ID N° 11 o 12 corresponden a una HVR-L2, las SEC ID N° 13, 14, 15, 16 o 17 corresponden a una HVR-L3, las SEC ID N° 1 o 2 corresponden a una HVR-H1, las SEC ID N° 3, 4, 5 o 6 corresponden a una HVR-H2, y las SEC ID N° 7 u 8 corresponden a una HVR-H3, en donde el anticuerpo bloquea la unión de efrinaB2 a EphB4 y bloquea la fosforilación de tirosina mediada por efrinaB2 de EphB4 y no reacciona de forma cruzada con EphB1 humano, EphB2 humano, EphB3 humano o EphB6 humano.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una, en orden, comprende:
 - (i) las SEC ID N° 9, 11, 13, 1, 3 y 7;
 - (ii) las SEC ID N° 10, 12, 14, 1, 3 y 8;
 - (iii) las SEC ID N° 9, 11, 15, 2, 4 y 7;
 - (iv) las SEC ID N° 9, 11, 16, 1, 5 y 7; o
 - (v) las SEC ID N° 9, 11, 17, 1, 6 y 7.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende la secuencia flanqueante consenso de cadena pesada humana de subgrupo III y comprende una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73 o 78, opcionalmente una o más de R71A, N73T o N78A.
4. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4, opcionalmente en donde el vector es un vector de expresión.
6. Una célula hospedadora que comprende un vector de la reivindicación 5, opcionalmente en donde la célula hospedadora es de mamífero.
7. Un método *in vitro* para preparar un anticuerpo anti-EphB4 o un inmunoconjugado anti-EphB4, comprendiendo dicho método (a) expresar un vector de expresión de la reivindicación 5 en una célula hospedadora adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo.
8. Un método para la detección de EphB4, comprendiendo el método detectar complejo EphB4-anticuerpo anti-EphB4 en una muestra biológica, en donde el anticuerpo anti-EphB4 en el complejo es un anticuerpo anti-EphB4 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-EphB4 está marcado de forma detectable.
9. Un método para diagnosticar un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular asociados con expresión de EphB4, comprendiendo el método detectar complejo EphB4-anticuerpo anti-EphB4 en una muestra biológica de un paciente que tiene o se sospecha que tiene el trastorno, en donde el anticuerpo anti-EphB4 en el complejo es un anticuerpo anti-EphB4 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-EphB4 está marcado de forma detectable.
10. Una composición que comprende un anticuerpo anti-EphB4 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o un polinucleótido o un vector de las reivindicaciones 4 o 5, opcionalmente en donde la composición comprende adicionalmente un vehículo.
11. El anticuerpo anti-EphB4 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en un método de tratamiento médico.
12. El anticuerpo anti-EphB4 para el uso de la reivindicación 11, que es para su uso en un método para inhibir la angiogénesis, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo a un sujeto que necesite dicho tratamiento, comprendiendo adicionalmente el método opcionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente anti-angiogénico, en donde el agente anti-angiogénico es opcionalmente un antagonista del factor de crecimiento celular del endotelio vascular (VEGF), opcionalmente además un anticuerpo anti-VEGF, opcionalmente además también bevacizumab.
13. El anticuerpo anti-EphB4 para el uso de la reivindicación 12, comprendiendo adicionalmente el método administrar una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.
14. El anticuerpo anti-EphB4 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, que es para su uso en un método para tratar un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

15. Uso de un anticuerpo anti-EphB4 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis y/o tratar un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular.

Clon nº	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
30.35	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.1D2	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.2D8	G	F	S	I	S	N	Y	Y	L	H
30.35.2D12	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.2D13	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H

Clon nº	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
30.35	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.1D2	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D8	G	G	I	Y	L	Y	G	S	S	S	E	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D12	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	R	G	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D13	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G

Clon nº	H3																
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102
30.35	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.1D2	A	R	S	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.2D8	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.2D12	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.2D13	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y

Clon nº	L1										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
30.35	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.1D2	R	A	S	Q	D	S	E	I	F	L	A
30.35.2D8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.2D12	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.2D13	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A

Clon nº	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
30.35	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.1D2	S	A	S	N	L	E	S
30.35.2D8	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.2D12	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.2D13	S	A	S	F	L	Y	S

Clon nº	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
30.35	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
30.35.1D2	Q	Q	S	N	A	V	P	L	T
30.35.2D8	Q	E	S	T	T	T	P	P	T
30.35.2D12	Q	K	S	E	T	I	P	P	S
30.35.2D13	Q	Q	T	A	Q	T	P	E	T

FIG. 1

I	A	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-
	B	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	C	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	D	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
II	A	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
	B	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
	C	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
	D	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Acceptor					
A	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Segundo acceptor					
A	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-

FIG. 2A

I	A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 19
	B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 20
	C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 21
	D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 22
II	A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTVTAAD	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 23
	B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTVTAAD	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 24
	C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTVTAAD	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 25
	D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTVTAAD	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 26
III	A	RFETISRDNSKNTLYLQMNLSLRAED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 27
	B	RFETISRDNSKNTLYLQMNLSLRAED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 28
	C	RFETISRDNSKNTLYLQMNLSLRAED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 29
	D	RFETISRDNSKNTLYLQMNLSLRAED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 30
Aceptor								
	A	RFETISADTSKNTAYLQMNLSLRAED	TAVVYCSR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 31
	B	RFETISADTSKNTAYLQMNLSLRAED	TAVVYCSR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 32
	C	RFETISADTSKNTAYLQMNLSLRAED	TAVVYCSR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 33
Segundo aceptor								
	A	RFETISADTSKNTAYLQMNLSLRAED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 34
	B	RFETISADTSKNTAYLQMNLSLRAED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 35
	C	RFETISADTSKNTAYLQMNLSLRAED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 36
	D	RFETISADTSKNTAYLQMNLSLRAED	TAVVYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEC ID N°	: 37

FIG. 2B

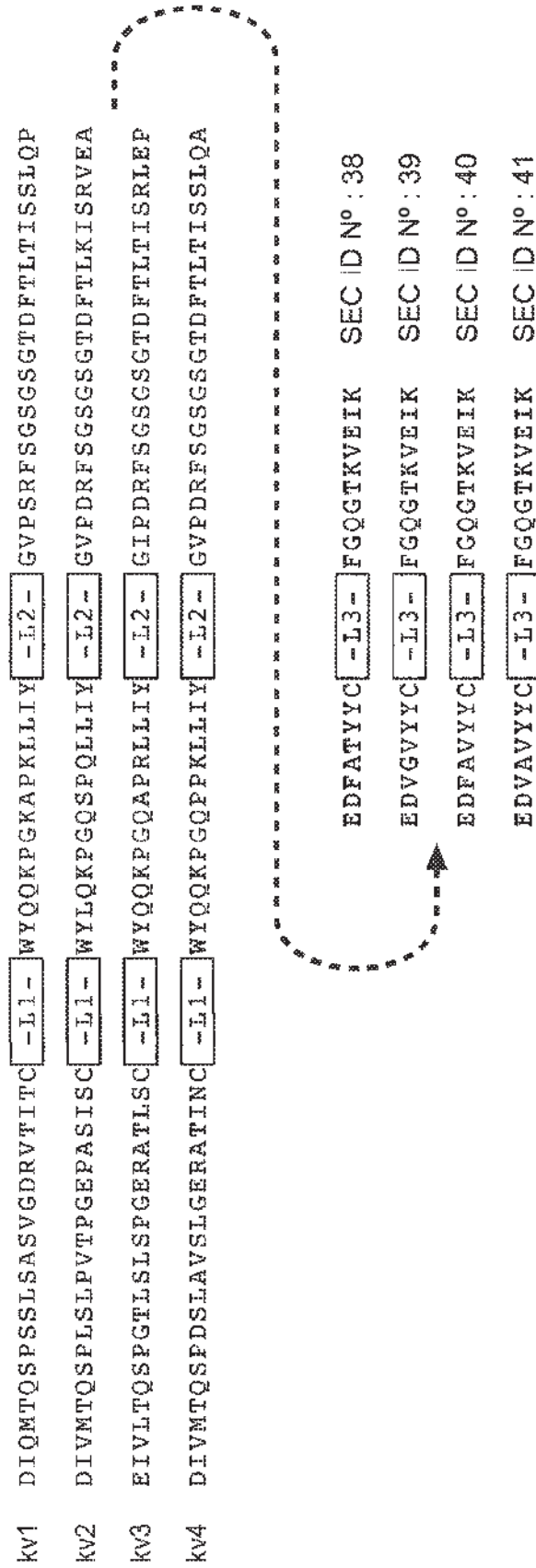


FIG. 3

Secuencias flanqueantes de cadena ligera de huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEC ID N°: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEC ID N°: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEC ID N°: 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEC ID N°: 45)

Secuencias flanqueantes de cadena pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEC ID N°: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEC ID N°: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEC ID N°: 48)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEC ID N°: 49)

FIG. 4

Secuencias flanqueantes de cadena ligera de huMAb4D5-8 modificadas en la posición 66 (subrayada)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEC ID N°: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEC ID N°: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEC ID N°: 50)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEC ID N°: 45)

Secuencias flanqueantes de cadena pesada de huMAb4D5-8 modificadas en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEC ID N°: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEC ID N°: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEC ID N°: 51)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEC ID N°: 49)

FIG. 5

30.35
 VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYPYSGSTDY
 ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSSLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
 (SEC ID N° :53)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEC ID N° :54)

30.35.1D2
 VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYPYSGSTDY
 ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSGLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
 (SEC ID N° :55)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDSEIFLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLESGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSNAPLTPFGQGTKVEIKR (SEC ID N° :56)

30.35.2D8
 VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSISNYLHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYGSSSEY
 ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSSLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
 (SEC ID N° :57)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQESTTTPPTFGQGTKVEIKR (SEC ID N° :58)

30.35.2D12
 VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYSGSRGY
 ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSSLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
 (SEC ID N° :59)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKSETIPPSFGQGTKVEIKR (SEC ID N° :60)

30.35.2D13
 VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYSGSTDY
 ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSSLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
 (SEC ID N° :61)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTAPTPETFGQGTKVEIKR (SEC ID N° :62)

FIG. 6

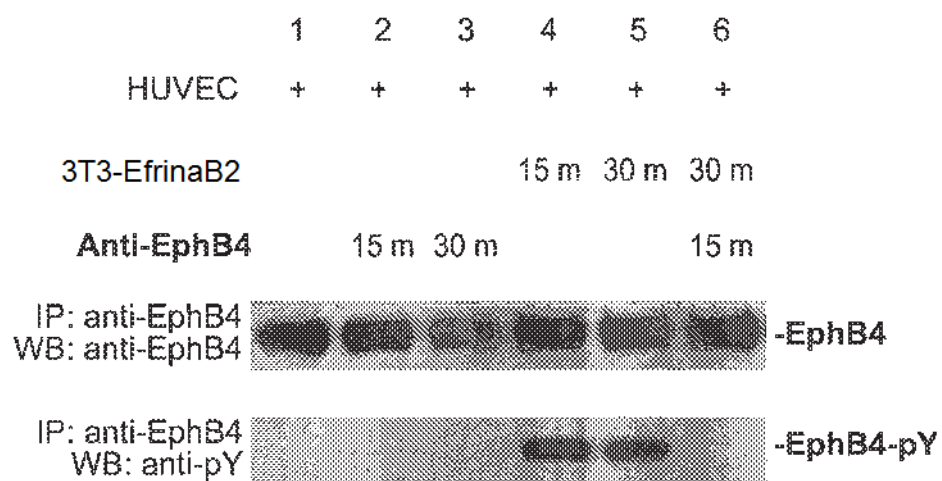


FIG. 7