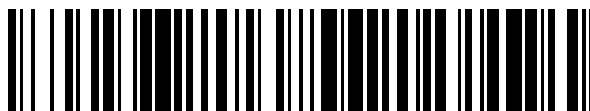


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 822**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2007 PCT/IB2007/003074**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2008 WO08010101**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2007 E 07825375 (4)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2044122**

54 Título: **Anticuerpo antagonista contra EphA2 para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

18.07.2006 EP 06291160

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

25.06.2018

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BLANC, VÉRONIQUE;
FROMOND, CLAUDIA;
PARKER, FABIENNE;
HAN, JIAWEN;
TAVARES, DANIEL;
ZHANG, CHONGHUI;
LI, MINIMUNOGEN INC.;
ZHOU, XIAO-MAI y
STREULI, MICHEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 673 822 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

Anticuerpo antagonista contra EphA2 para el tratamiento de cáncer

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona nuevos anticuerpos monoclonales murinos anti-Eph o fragmentos de éstos, y versiones de éstos humanizadas o modificadas en superficie. Más específicamente, la invención se refiere a nuevos anticuerpos monoclonales o fragmentos de éstos, y versiones de éstos humanizadas o modificadas en superficie, que interactúan con la familia del receptor EphA y que actúan como antagonistas. Más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos anti-receptor EphA2 que inhiben las funciones celulares del receptor EphA2. Aún más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos anti-receptor EphA2 que antagonizan el crecimiento y la supervivencia de células tumorales y que carecen de actividad agonista.

10 La presente invención está dirigida además a conjugados citotóxicos que comprenden un agente de unión a células y un agente citotóxico, a composiciones terapéuticas que comprenden el conjugado, a métodos para la utilización de los conjugados en la inhibición del crecimiento celular y el tratamiento de enfermedades, y a un kit que comprende el conjugado citotóxico. En particular, el agente de unión a células es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de éste que se une al epítipo, y una versión de éste humanizada o modificada en superficie que reconoce y se une a la familia de receptores EphA.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las tirosina cinasas receptoras juegan un papel diverso en el crecimiento y diferenciación celulares durante las repuestas fisiológicas normales y en la transformación oncogénica y la progresión tumoral. Los receptores Eph son una familia única de tirosina cinasas receptoras (RTK), la más grande en el genoma, que consiste en al menos 16 receptores que interactúan con nueve ligandos de efrina unidos a la membrana (Pasquale, E. B. et al., 2005, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 6: 462-475). Pueden dividirse en dos grupos, clase A y B, en base a la homología de secuencia y la afinidad de unión (Pasquale, E. B. et al., 2005, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 6: 462-475). La clase A de receptores Eph interactúa con múltiples ligandos de la familia de la efrina A, un grupo de proteínas de membrana unidas por glicosil-fosfatidilinositol (GPI), mientras que la clase B de receptores Eph se unen a ligandos de efrina B, una familia de proteínas transmembránicas. La unión de los receptores Eph a sus ligandos induce la agrupación de los receptores, la activación de la actividad de cinasa y la transfosforilación posterior de los dominios citoplasmáticos en restos de tirosina, creando sitios de acoplamiento para varias proteínas de señalización (Kullander, K. y Klein, R., 2002, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 3: 475-486; Noren, N. K. y Pasquale, E. B., 2004, Cell signal., 16: 655-666).

20 El cáncer es una enfermedad caracterizada por proliferación incontrolada, que resulta de una transducción de señales aberrante. Las formas más peligrosas de cáncer son células malignas que tienen la capacidad de diseminarse, bien por crecimiento directo en el tejido adyacente mediante invasión, o mediante implantación en sitios distantes por metástasis. Las células metastásicas han adquirido la capacidad de liberarse del tumor primario, translocarse a sitios distantes a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático, y colonizar microentornos distantes y extraños.

25 Ahora resulta claro que las moléculas Eph también tienen una función en estados patológicos tales como el cáncer. En particular, se ha dado a conocer la sobreexpresión del receptor EphA2 en cánceres de ovario, mama, próstata, pulmón, colon, esófago, células renales, cuello del útero, y melanoma. Se ha sugerido que EphA2 es un regulador positivo del crecimiento y supervivencia celulares en las células malignas (Landen, C. N. et al., 2005, Expert. Opin. Ther. Targets, 9 (6): 1179-1187). También se ha descrito una función de EphA2 en la metástasis, ya que la sobreexpresión de EphA2 sola es suficiente para transformar células epiteliales de mama en el fenotipo maligno (Zelinski et al., 2001, Cancer Res., 61: 2301-2306), e incrementa la metástasis espontánea a sitios distantes (Landen, C. N. et al., 2005, Expert. Opin. Ther. Targets, 9 (6): 1179-1187). Además, cada vez más pruebas sugieren que EphA2 está implicado en la angiogénesis tumoral (Ogawa et al., 2000, Oncogene, 19: 6043-6052; Cheng et al. 2002, Mol. Cancer Res., 1: 2-11; Cheng et al., 2003, Neoplasia, 5 (5): 445-456; Dobrzanski et al., 2004, Cancer Res., 64: 910-919).

30 Se ha mostrado que la fosforilación de EphA2 está asociada a su abundancia. El EphA2 fosforilado en tirosina se internaliza rápidamente y se degrada, mientras que el EphA2 no fosforilado demuestra una velocidad de recambio reducida, y por lo tanto se acumula en la superficie celular. Actualmente se cree que esta clase de modelo puede contribuir a la alta frecuencia de sobreexpresión de EphA2 en el cáncer (Landen, C. N. et al., 2005, Expert. Opin. Ther. Targets, 9 (6): 1179-1 187). Sin embargo, la realidad puede ser más compleja, ya que datos recientes parecen indicar que existe un papel para las funciones dependientes e independientes de la EphA2 cinasa en la progresión tumoral (Fang W. B., 2005, Oncogene, 24: 7859-7868).

35 Se han desarrollado anticuerpos agonistas que promueven la fosforilación en tirosina y la internalización de EphA2, dando finalmente como resultado la inhibición del crecimiento de las células tumorales (Dodge-Zantek et al., 1999, Cell Growth & Differ., 10: 629-638; documentos WO 01/12172, WO 03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642). Estos anticuerpos están dirigidos contra el dominio extracelular de EphA2. Debido a que estos anticuerpos agonistas no inhiben sino que estimulan la fosforilación del receptor EphA2 y las señales posteriores, estos anticuerpos pueden no ser eficaces en tumores que se aprovechan de la actividad de

- cinasa de EphA2. Por otra parte, se ha propuesto la utilización de agentes antagonistas, incluyendo anticuerpos (documento WO 2004/092343), pero no se ha descrito ningún anticuerpo antagonista en ese trabajo. Además, se propuso que dichos anticuerpos estimulan, en lugar de inhibir, la proliferación celular. La solicitud WO 2006/084226 describe anticuerpos que ni incrementan ni disminuyen la actividad de cinasa de EphA2, pero que son capaces de impedir la proliferación de las células tumorales. Sin embargo, no existe ninguna indicación en ese documento de que estos anticuerpos impidan la unión de efrinaA1 al receptor e inhiban la fosforilación de EphA2 inducida por efrinaA1. En lugar de esto, pueden influir en la proliferación de las células tumorales a través de un mecanismo totalmente diferente, por ejemplo impidiendo la agrupación de los receptores tras la unión de efrinaA1. El experto podría, de este modo, no haber concluido que estos anticuerpos son antagonistas, sino que su mecanismo de acción no está claro.
- Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos anticuerpos antagonistas anti-EphA2, que se unan a los dominios extracelulares del receptor EphA2, inhibiendo su activación por el ligando efrina A1 e inhibiendo el crecimiento de las células tumorales dependiente de la cinasa de EphA2. Dichos anticuerpos antagonistas deberían ser útiles para el tratamiento del cáncer.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

- De acuerdo con esto, es un objeto de la invención proporcionar agentes que se unan específicamente a la clase A de los miembros de la familia de receptores Eph, tales como EphA2, y que inhiban la actividad celular del receptor antagonizando el receptor. Así, la presente invención incluye anticuerpos o fragmentos de éstos que reconocen el receptor EphA2, preferiblemente humano, y que funcionan como antagonistas de dicho receptor. La invención se define en las reivindicaciones.
- El receptor EphA2 tiene un papel en el desarrollo y crecimiento de tumores, y también se ha implicado en la metástasis. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa. En algunas otras realizaciones, los anticuerpos de la invención son capaces de impedir la migración de células cancerosas metastásicas. En las realizaciones preferidas, la célula cancerosa es una célula de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas. En otra realización, los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir la angiogénesis.

- Mientras los anticuerpos anti-EphA2 descritos en la técnica anterior eran principalmente agonistas (por ejemplo, documentos WO 03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642), esta invención comprende anticuerpos que reconocen dicho receptor y que tienen una actividad agonista mínima, o, preferiblemente, que carecen de cualquier actividad agonista hacia el receptor. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención no estimulan la fosforilación en tirosina de EphA2.

- Los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir la unión de efrina A1 al receptor EphA2. Son capaces además de inhibir la fosforilación en tirosina de EphA2. En particular, la fosforilación en tirosina de EphA2 se inhibe mediante los anticuerpos de la invención incluso en presencia de efrinaA1. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden bloquear la señalización mediada por EphA2; en particular, son capaces de inhibir la fosforilación de Akt dependiente de EphA2.

Esta memoria descriptiva también proporciona anticuerpos que se unen al receptor EphA2 con una K_D de $0,3 \times 10^{-9}$ M o menor.

- Los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales. Los fragmentos que se unen al epítipo, tales como los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, o Fv, están incluidos dentro del alcance de esta invención. Se prefieren los anticuerpos anti-EphA2 monoclonales. En una realización más preferida, se proporcionan anticuerpos murinos seleccionados de 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, que están totalmente caracterizados en la presente memoria con respecto a las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, las secuencias de ADNc de los genes de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, la identificación de sus CDRs (regiones determinantes de la complementariedad), la identificación de sus aminoácidos de superficie, y los medios para su expresión en forma recombinante. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales murinos anti-EphA2 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11, y EphA2-N1 y EphA2-N2 se han depositado bajo el Tratado de Budapest el 16 de junio de 2006 y el 3 de mayo de 2007, respectivamente, en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EEUU, con los números de acceso PTA-7660, PTA-7661, PTA-7662, PTA-8407 y PTA-8408, respectivamente.

- La presente invención incluye el anticuerpo monoclonal murino anti-EphA2 seleccionado de 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2, y versiones modificadas en superficie o humanizadas de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2, en los que los restos expuestos en la superficie de los marcos de la región variable de los anticuerpos, o sus fragmentos de unión al epítipo, se han reemplazado tanto en las cadenas ligeras como pesadas para hacerlos más semejantes a superficies conocidas de anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados y los fragmentos de éstos de unión al epítipo de la presente invención presentan propiedades mejoradas, ya que son menos inmunógenos (o totalmente no inmunógenos) que las versiones murinas en sujetos

humanos a los que se administran. Así, las diferentes versiones de los anticuerpos humanizados 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, y los fragmentos de éstos de unión al epítipo de la presente invención, reconocen específicamente el receptor EphA2 y no son inmunógenos para un ser humano.

5 Las versiones humanizadas de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2 de la presente invención están completamente caracterizadas en la presente memoria respecto a sus secuencias de aminoácidos respectivas de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, a las secuencias de ADN de los genes de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, a la identificación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR_s), a la identificación de sus restos de aminoácidos de superficie del marco de la región variable, y a la descripción de un medio para su expresión en forma recombinante.

10 Esta invención también contempla la utilización de conjugados entre conjugados citotóxicos que comprenden (1) un agente de unión a células que reconoce y se une al receptor EphA, tal como el receptor EphA2, y (2) un agente citotóxico. En los conjugados citotóxicos, el agente de unión a células tiene una alta afinidad por el receptor EphA (por ejemplo, el receptor EphA2) y el agente citotóxico tiene un alto grado de citotoxicidad para las células que expresan el receptor EphA, de manera que los conjugados citotóxicos de la presente invención forman agentes eliminadores
15 eficaces.

En una realización preferida, el agente de unión a células es un anticuerpo anti-EphA2 (por ejemplo, 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, o EphA2-N2) o un fragmento de éste que se une al epítipo, más preferiblemente un anticuerpo anti-EphA2 humanizado (por ejemplo, 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, o EphA2-N2) o un fragmento de éste que se une al epítipo, en el que un agente citotóxico se une covalentemente, directamente o a través de un conector escindible o no escindible, al anticuerpo o al fragmento de éste que se une al epítipo. En realizaciones más preferidas, el agente de unión a células es el anticuerpo humanizado 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, o un fragmento de éstos que se une al epítipo, y el agente citotóxico es un taxol, maitansinoide, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina, CC-1065, o un análogo de CC-1065.

20 En las realizaciones preferidas de la invención, el agente de unión a células es el anticuerpo anti-EphA2 humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, o EphA2-N2, y el agente citotóxico es un compuesto maitansina, tal como DM1 o DM4.

La presente invención también comprende la utilización de fragmentos de anticuerpos anti-EphA2 que retienen la capacidad para unirse al receptor EphA2. En otro aspecto de la invención, se contempla la utilización de equivalentes funcionales de los anticuerpos anti-EphA2.

30 La presente memoria descriptiva también incluye un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el receptor EphA2. En aspectos preferidos de la memoria descriptiva, el método para inhibir el crecimiento de la célula que expresa el receptor EphA2 se produce *in vivo*, y da como resultado la muerte de la célula, aunque también se incluyen las aplicaciones *in vitro* y *ex vivo*.

La presente invención también proporciona una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-EphA2 o un conjugado de anticuerpo anti-EphA2-agente citotóxico según la invención, y un vehículo o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición terapéutica comprende un segundo agente terapéutico. Este segundo agente terapéutico puede elegirse del grupo que comprende los antagonistas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o receptor HER2.

40 La presente memoria descriptiva incluye además un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer utilizando la composición terapéutica. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer metastásico. En particular, la célula cancerosa es una célula de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas. En realizaciones preferidas, el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo anti-EphA2 y un agente citotóxico. En las realizaciones más preferidas, el conjugado citotóxico comprende un conjugado de anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2-DM1, anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2-DM4, un conjugado de anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2-taxano, o un conjugado de anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y
45 EphA2-N2-derivado de tomamicina, y el conjugado se administra junto con un vehículo o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto de la memoria descriptiva, los anticuerpos anti-EphA2 se utilizan para detectar la proteína EphA2 en una muestra biológica. En una realización preferida, dichos anticuerpos se utilizan para determinar los niveles de EphA2 en un tejido tumoral.

55 La presente memoria descriptiva también incluye un kit que comprende un anticuerpo anti-EphA2, o un conjugado de anticuerpo anti-EphA2-agente citotóxico, e instrucciones para su utilización. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-EphA2 son los anticuerpos humanizados 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2, el agente citotóxico es un compuesto de maitansina, tal como DM1 o DM4, un taxano, un derivado de leptomicina, o un derivado

de tomamicina, y las instrucciones son para utilizar los conjugados en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer. El kit también puede incluir componentes necesarios para la preparación de una formulación farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente si el conjugado está en estado liofilizado o en forma concentrada, y para la administración de la formulación.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el análisis de la unión específica de anticuerpos anti-EphA2 a células que sobreexpresan EphA2 humano (células 300-19/hu-EphA2) mediante análisis FACS. La Figura 1A muestra los datos para el anticuerpo 37.3D7, la Figura 1B para el anticuerpo 37.1F5, y la Figura 1C para el anticuerpo 53.2H11, respectivamente.

10 La Figura 2 muestra la unión específica del anticuerpo purificado 37.3D7 a células de cáncer pancreático humano BxPC3, células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, y células de cáncer de colon humano HT-29. Se muestran los histogramas del análisis FACS.

La Figura 3 muestra las curvas de unión para los anticuerpos 37.3D7 (Figura 3A), 37.1F5 (Figura 3B) y 53.2H11 (Figura 3C) establecidas con células murinas 300-19 que sobreexpresan EphA2 humano (300-19/hu-EphA2).

15 La Figura 4 muestra la unión específica de los anticuerpos purificados 37.3D7 y 53.2H11 a células que sobreexpresan EphA2. Se muestran los histogramas del análisis FACS. La Figura 4A muestra los datos para células que sobreexpresan EphA2 murino (300-19/mu-EphA2), y la Figura 4B muestra los datos para células que sobreexpresan EphA2 de rata (300-19/rat-EphA2).

20 La Figura 5A muestra la unión específica de los anticuerpos purificados 37.3D7, 37.1 F5 y 53.2H11 a células epiteliales de riñón de mono VERO. Se muestran los histogramas del análisis FACS.

La Figura 5B muestra las curvas de unión para los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 establecidas con células epiteliales de riñón de mono VERO.

La Figura 6 muestra la inhibición de la unión de efrinaA1 biotilada a células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 por los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11.

25 La Figura 7A muestra la inhibición de la fosforilación de EphA2 estimulada por efrinaA1 en células de mama MDA-MB-231 por los anticuerpos 37.3D7 y 37.1F5.

La Figura 7B muestra la inhibición de la fosforilación de EphA2 estimulada por efrinaA1 en células de mama MDA-MB-231 por los anticuerpos 37.3D7 y 53.2H11.

30 La Figura 7C muestra la inhibición de la fosforilación de Akt estimulada por efrinaA1 en células pancreáticas CFPAC-1 por los anticuerpos 37.3D7 y 37.1F5.

Las Figura 8A y B muestran la estimulación de la fosforilación de EphA2 por efrinaA1 y la ausencia de estimulación de la fosforilación de EphA2 por los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 en células de mama MDA-MB-231.

35 Las Figura 9A-9D muestran la inhibición del crecimiento y supervivencia estimulados por suero de células de colon HT-29 (9A), células de colon LoVo (9B), células pancreáticas CFPAC-1 (9C) y células de melanoma UACC-257 (9D) por los anticuerpos 37.3D7 y 53.2H11.

La Figura 10A muestra la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento estimulado por suero de células pancreáticas BxPC3 por el anticuerpo 37.3D7.

La Figura 10B muestra la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento estimulado por suero de células de colon LoVo por el anticuerpo 53.2H11.

40 La Figura 10C muestra la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento estimulado por EGF de células de colon LoVo por el anticuerpo 53.2H11.

La Figura 11A muestra la curva de unión del anticuerpo 37.3D7 a células HUVEC.

La Figura 11B muestra la curva de unión del anticuerpo 37.1F5 a células HUVEC.

45 La Figura 12 muestra la inhibición del crecimiento y supervivencia de células HUVEC estimulados por VEGF por el anticuerpo 37.3D7.

La Figura 13 muestra la inhibición de la fosforilación de Akt inducida por VEGF por el anticuerpo 37.3D7 en células HUVEC.

La Figura 14 muestra el efecto del tratamiento con el anticuerpo 37.3D7 sobre el crecimiento de xenoinjerto de cáncer de colon HT-29 en ratones. El efecto se compara con el de un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo IgG1

de control sin unión.

La Figura 15A muestra la inhibición del crecimiento de células de tumor de próstata PC3 por hu37.3D7-SPDB-DM4.

5 La Figura 15B muestra la inhibición del crecimiento de células de tumor de próstata PC3 por hu53.2H11-SPDB-DM4.

La Figura 16A muestra el efecto del tratamiento con hu37.3D7-SPDB-DM4 sobre el crecimiento de xenoinjerto de tumor de mama MDA-MB-231 en ratones.

La Figura 16B muestra el efecto del tratamiento con hu53.2H11-SPDB-DM4 sobre el crecimiento de xenoinjerto de tumor de mama MDA-MB-231 en ratones.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente memoria se proporcionan nuevos agentes capaces de unirse específicamente a los receptores EphA y antagonizar dichos receptores. En particular, los presentes inventores han descubierto nuevos anticuerpos que se unen específicamente a los receptores EphA en la superficie celular. Mientras que los anticuerpos conocidos previamente que se unen específicamente al receptor EphA también lo activan incluso en ausencia de sus ligandos, los anticuerpos o fragmentos de la presente invención carecen preferiblemente de cualquier actividad agonista. Por otra parte, presentan la capacidad única de inhibir las funciones celulares del receptor incluso en presencia de sus ligandos, una característica de la que carecen totalmente los anticuerpos que se unen a EphA2 conocidos previamente. Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antagonistas de la presente invención inhiben el crecimiento y/o la migración de células tumorales humanas, y/o la angiogénesis, tres propiedades que no se podían prever en absoluto en vista de la técnica anterior (Landen, C. N. et al., 2005, Expert. Opin. Ther. Targets, 9 (6): 1179-1187; documentos WO 01/12172; WO 2004/014292; WO 2004/092343).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "receptor Eph" se refiere a una tirosina cinasa que pertenece a la familia de receptores Eph (revisado en Pasquale, E. B. et al., 2005, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 6, 462-475). La "clase A de la familia de receptores Eph" o "receptores EphA", tal como se utiliza en la presente memoria, interaccionan preferiblemente con ligandos unidos por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (de la subclase A de efrina, que comprende actualmente cinco ligandos). Los receptores EphA específicos incluyen: EphA1 (también denominado Eph y Esk); EphA2 (también denominado Eck, mEck, Myk2, Sek2); EphA3 (también denominado Hek, Mek4, Tyro4 y Cek4); EphA4 (también conocido como Hek8, Sek1, Tyrol y Cek8); EphA5 (también denominado Hek7, Bsk, Ekh1, Rek7 y Cek7); EphA6 (también denominado mEhk2 y Ekh2); EphA7 (también denominado Hek11, Mdk1, Ebk, Ekh3); y EphA8 (también denominado Eek y mEek), y variantes naturales de éstos. El receptor Eph preferido en la presente memoria es el "receptor EphA2", que comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos como en los números de acceso de Genbank NM_004431 (EphA2 humano), NM_010139 (EphA2 murino), o NXM_345596 (EphA2 de rata). El término "ligando Eph", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una proteína que se une a, y opcionalmente activa (por ejemplo, estimula la autofosforilación de), un receptor Eph. Un ligando Eph preferido es "efrinaA1", que se une al receptor EphA2 y comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos como en el acceso de Genbank NM_004428 (efrina humana A1).

El término "antagonista", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula que es capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de una molécula diana, tal como un receptor EphA. Los antagonistas pueden actuar interfiriendo con la unión de un receptor a un ligando y viceversa, disminuyendo la fosforilación de EphA2, y/o incapacitando o matando a las células que han sido activadas por un ligando. El antagonista puede bloquear completamente las interacciones receptor-ligando, o puede reducir sustancialmente dichas interacciones. Todos estos puntos de intervención por un antagonista deben considerarse equivalentes para los fines de esta invención. Así, dentro del alcance de la memoria descriptiva están incluidos antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen al receptor EphA, al ligando Eph, o a un complejo de un receptor Eph y un ligando Eph; variantes o derivados de la secuencia de aminoácidos de un receptor EphA o ligando EphA que antagonizan la interacción entre un receptor EphA y un ligando EphA; receptor EphA soluble o ligando EphA soluble, opcionalmente condensado con una molécula heteróloga tal como una región de inmunoglobulina (por ejemplo, una inmuno adhesina); un complejo que comprende un receptor EphA en asociación con un ligando EphA; secuencias peptídicas sintéticas o nativas que se unen al receptor EphA o al ligando EphA.

50 El término "agonista", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto, incluyendo una proteína, polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un conjugado, una molécula grande, una molécula pequeña, capaz de activar una o más de las actividades biológicas de la molécula diana. Los agonistas de EphA actúan estimulando la fosforilación de la proteína, desencadenando de esta manera la degradación de dicha proteína.

55 Así, en un aspecto, la presente memoria descriptiva describe, entre otras características, anticuerpos monoclonales anti-EphA, anticuerpos humanizados anti-EphA, y fragmentos de los anticuerpos anti-EphA. Cada uno de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención se diseñan para reconocer y unirse específicamente al receptor EphA2 y actúa como un antagonista del receptor EphA2. Más aún, los anticuerpos y fragmentos de

anticuerpos antagonistas de la invención tienen las propiedades únicas de ser capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales humanas, y/o la migración de células cancerosas metastásicas, y/o la angiogénesis.

Un receptor EphA preferido unido por los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antagonistas de la invención es el receptor EphA2. Un receptor EphA2 preferido es EphA2 humano.

5 El receptor EphA2 pertenece a una familia de receptores cuya fosforilación de su cola citoplásmica se incrementa tras la unión del ligando para interactuar con varias proteínas adaptadoras y señalizadoras, lo que da lugar a la activación de diferentes rutas de señalización celular posteriores (Kullander, K. y Klein, R., 2002, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 3: 475-486; Noren, N. K. y Pasquale, E. B., 2004, Cell signal., 16: 655-666). Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “señalización mediada por EphA2” se refiere a todos los eventos celulares que se producen en respuesta a la unión al ligando por EphA2. Mientras que los anticuerpos descritos en la técnica anterior actúan como agonistas del receptor EphA2, y, en particular, incrementan la fosforilación en tirosina de la proteína EphA2, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención carecen preferiblemente de cualquiera de dichas propiedades agonistas. En particular, son incapaces de estimular la fosforilación de EphA2 por sí mismos.

10 Por otra parte, esta invención proporciona los primeros anticuerpos anti-EphA2 antagonistas reales. En una realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención pueden inhibir la unión de un ligando a un receptor EphA. En una realización preferida, mediante los anticuerpos y fragmentos de éstos proporcionados por esta invención, se impide la unión de efrinaA1 a EphA2. De manera extraordinaria, en otra realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención son capaces de inhibir la fosforilación en tirosina del receptor EphA2, incluso en presencia de efrinaA1. Además, dichos anticuerpos y fragmentos de éstos son capaces de inhibir la señalización mediada por EphA2. En particular, mediante los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención puede evitarse la fosforilación de Akt dependiente de efrinaA1.

Anticuerpos

El término “anticuerpo” se utiliza en la presente memoria en el sentido más amplio, y específicamente cubre anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa) de cualquier isotipo tal como 25 IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos y fragmentos de anticuerpos. Un anticuerpo reactivo con un antígeno específico puede generarse mediante métodos recombinantes, tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o similares, o mediante inmunización de un animal con el antígeno o un ácido nucleico que codifique el antígeno.

Un anticuerpo típico está comprendido por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable. Cada región variable contiene tres segmentos denominados “regiones determinantes de la complementariedad” (“CDR_s”) o “regiones hipervariables”, que son las principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Se refieren habitualmente como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N terminal. Las partes más altamente conservadas de las regiones variables se denominan “regiones marco”.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, “V_H” o “VH” se refiere a la región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un fragmento F_v, scF_v, dsF_v, Fab, Fab’, o F(ab’)₂. La referencia a “V_L” o “VL” se refiere a la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena ligera de un fragmento F_v, scF_v, dsF_v, Fab, Fab’, o F(ab’)₂.

Un “anticuerpo policlonal” es un anticuerpo que se ha producido entre o en presencia de uno o más anticuerpos no idénticos diferentes. En general, los anticuerpos policlonales se producen a partir de un linfocito B en presencia de otros muchos linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Habitualmente, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente de un animal inmunizado.

Un “anticuerpo monoclonal”, tal como se utiliza en la presente memoria, es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que forman esta población son esencialmente idénticos excepto por mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades muy pequeñas. Estos anticuerpos están dirigidos contra un único epítipo, y son, por lo tanto, altamente específicos.

Un “epítipo” es el sitio en el antígeno al que se une un anticuerpo. Puede estar formado por restos contiguos o por restos no contiguos que se aproximan mucho por el plegamiento de una proteína antigénica. Los epítipos formados por aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por aminoácidos no contiguos se pierden típicamente bajo dicha exposición.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “K_D” se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo/antígeno particular.

55 La presente invención se realiza a partir de anticuerpos murinos anti-EphA2, en la presente memoria 37.3D7; 37.1 F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, que están completamente caracterizados con respecto a las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada, a la identificación de las CDR_s, a la identificación de los aminoácidos de

superficie, y a los medios para su expresión en forma recombinante. Las secuencias primarias de aminoácidos y de ADN de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, y de las versiones humanizadas, se describen en la presente memoria.

5 Los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2 son producidos por hibridomas denominados respectivamente 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2, y que están depositados bajo el Tratado de Budapest el 16 de junio de 2006 y el 3 de mayo de 2007, respectivamente, en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EEUU, con los números de acceso PTA-7660, PTA-7661, PTA-7662, PTA-8407 y PTA-8408, respectivamente.

10 El alcance de la presente invención no está limitado a anticuerpos y fragmentos que comprenden estas secuencias. En su lugar, todos los anticuerpos y fragmentos que se unen específicamente al receptor EphA2 y que antagonizan la actividad biológica del receptor, pero que carecen de actividad agonista, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Así, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden diferir de los anticuerpos 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, o de los derivados humanizados, en las secuencias de aminoácidos de su esqueleto, en sus CDR_s, en su cadena ligera y cadena pesada, e incluso así se encuentran dentro del alcance de la
15 presente invención.

En una realización, esta memoria descriptiva describe anticuerpos o fragmentos de éstos que se unen al epítipo que comprenden una o más CDR_s que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72.

20 En un aspecto preferido, los anticuerpos como se describen aquí comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 61, 62, 63, 67, 68 y 69, y dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 64, 65, 66, 70, 71 y 72.

25 En un aspecto más preferido, los anticuerpos como se describen aquí comprenden tres CDR_s que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En una realización, se proporciona un anticuerpo 37.3D7, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 4, 5 y 6.

30 En otro aspecto más preferido, los anticuerpos como se describen aquí comprenden tres CDR_s que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 7, 8, 9, 10, 11 y 12. En una realización, se proporciona un anticuerpo 37.1F5, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 7, 8 y 9, y dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 10, 11 y 12.
35

En otro aspecto más preferido, los anticuerpos como se describen aquí comprenden tres CDR_s que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17 y 18. En una realización, se proporciona un anticuerpo 53.2H11, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 13, 14 y 15, y dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 16, 17 y 18.
40

En otro aspecto más preferido, los anticuerpos como se describen aquí comprenden tres CDR_s que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65 y 66. En una realización, se proporciona un anticuerpo EphA2-N1, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 61, 62 y 63, y dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 64, 65 y 66.
45

En otro aspecto más preferido, los anticuerpos como se describen aquí comprenden tres CDR_s que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 67, 68, 69, 70, 71 y 72. En una realización, se proporciona un anticuerpo EphA2-N2, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 67, 68 y 69, y dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 70, 71 y 72.
50

En otro aspecto, los anticuerpos como se describen aquí comprenden una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 20, 22, 24, 74 y 76. En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo 37.3D7 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 20. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo 37.1F5 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 22. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo 53.2H11 que
55

comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 24. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo EphA2-N1 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 74. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo EphA2-N2 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 76.

- 5 En otro aspecto, los anticuerpos como se describen aquí comprenden una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 26, 28, 30, 78 y 80. En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo 37.3D7 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 26. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo 37.1 F5 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 28. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo 53.2H11 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 30. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo EphA2-N1 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 78. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo EphA2-N2 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 80.

Anticuerpos Humanizados o Modificados en Superficie 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11: EphA2-N1: y EphA2-N2

- 15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima obtenida de inmunoglobulina no humana. Un "anticuerpo quimérico", tal como se utiliza en la presente memoria, es un anticuerpo en el que la región constante, o una parte de ésta, está alterada, reemplazada, o intercambiada, de manera que la región variable está enlazada a la región constante de una especie diferente, o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. "Anticuerpo quimérico" también se refiere a un anticuerpo en el que la región variable, o una parte de ésta, está alterada, reemplazada, o intercambiada, de manera que la región constante está enlazada a la región variable de una especie diferente, o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo.

- 20 La meta de la humanización es una reducción de la inmunogenicidad de un anticuerpo xenógeno, tal como un anticuerpo murino, para su introducción en un ser humano, a la vez que se mantienen intactas la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo frente al antígeno. Los anticuerpos humanizados, o anticuerpos adaptados para evitar el rechazo de otros mamíferos, pueden producirse utilizando varias tecnologías, tales como modificación en superficie y injerto de CDR. Tal como se utiliza en la presente memoria, la tecnología de modificación en superficie utiliza una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no CDR de las regiones variables del anticuerpo para que se asemejen a las superficies de anticuerpos conocidos del hospedante diana.

- 25 Las estrategias y métodos para la modificación en superficie de anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos en un hospedante diferente, están descritos en la patente de EEUU 5.639.641. Brevemente, en un método preferido, (1) se generan alineamientos de posiciones de un conjunto de regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos para dar lugar a un conjunto de posiciones expuestas en la superficie del marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera, en el que las posiciones de alineamiento para todas las regiones variables son al menos aproximadamente idénticas en un 98%; (2) se define para un anticuerpo de roedor (o fragmento de éste) un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera; (3) se identifica un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera que sea los más idéntico al conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de roedor; (4) el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera definido en la etapa (2) se sustituye por el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera definido en la etapa (3), excepto aquellos restos de aminoácidos que están en dentro de 5 Å de cualquier átomo de cualquier resto de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de unión.

- 30 Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando varias técnicas diferentes, incluyendo injerto de CDR (documentos EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de EEUU Nos. 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (documentos EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska M.A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:969-973), e intercambio de cadenas (Patente de EEUU No. 5.565.332). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse mediante varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos de presentación de fagos. Véanse también las Patentes de EEUU Nos. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; y las publicaciones de solicitudes de patente internacional números WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741).

- 35 La presente invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de éstos que reconocen el receptor EphA2 y actúan como antagonistas. En otra realización, los anticuerpos humanizados o fragmentos de éstos que se unen al epítipo tienen la capacidad adicional de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa que expresa el receptor EphA2. En una realización más, el anticuerpo humanizado o fragmento de éste que se une al epítipo tiene la capacidad adicional de inhibir la migración de una célula cancerosa metastásica que expresa el receptor EphA2.

Una realización preferida de dicho anticuerpo humanizado es un anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 o EphA2-N2, o un fragmento de éste que se une al epítipo.

En realizaciones más preferidas, se proporcionan versiones modificadas en superficie o humanizadas de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 y EphA2-N2, en las que los restos expuestos en la superficie del anticuerpo o sus fragmentos se reemplazan tanto en las cadenas ligeras como pesadas para que se asemejen mucho a superficies de anticuerpos humanos conocidos. Los anticuerpos humanizados 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 y EphA2-N2, o los fragmentos de éstos que se unen al epítipo de la presente invención, tienen propiedades mejoradas. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados 37.3D7, 37.1 F5; y 53.2H11, o los fragmentos de éstos que se unen al epítipo, reconocen específicamente el receptor EphA2. Más preferiblemente, los anticuerpos humanizados 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2, o los fragmentos de éstos que se unen al epítipo, tienen la capacidad adicional de inhibir el crecimiento de una célula que expresa el receptor EphA2.

Las versiones humanizadas de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2 también están completamente caracterizadas en la presente memoria con respecto a sus secuencias de aminoácidos respectivas de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, a las secuencias de ADN de los genes de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, a la identificación de las CDR, a la identificación de sus aminoácidos de superficie, y a la descripción de un medio para su expresión en forma recombinante. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a los anticuerpos y fragmentos que comprenden estas secuencias. En su lugar, todos los anticuerpos y fragmentos que se unen específicamente al receptor EphA2 están descritos en la presente memoria. Preferiblemente, los anticuerpos y fragmentos que se unen específicamente al receptor EphA2 antagonizan la actividad biológica del receptor. Más preferiblemente, dichos anticuerpos además carecen sustancialmente de actividad agonista. Así, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo que se unen al epítipo de la presente invención pueden diferir del anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, o de los derivados humanizados de éstos, en las secuencias de aminoácidos de su esqueleto, CDR, y/o cadena ligera y cadena pesada, e incluso así se encuentran dentro del alcance la presente invención.

Las CDR_s de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2- N1 o EphA2-N2 se identifican mediante modelado, y se han predicho sus estructuras moleculares. De nuevo, aunque las CDR_s son importantes para el reconocimiento del epítipo, no son esenciales para los anticuerpos y fragmentos de la invención. De acuerdo con esto, se proporcionan anticuerpos y fragmentos que tienen propiedades mejoradas producidos, por ejemplo, mediante maduración de la afinidad de un anticuerpo de la presente invención.

Se han identificado los genes de la línea germinal de la cadena ligera IgV_κ y J_κ de ratón, y los genes de la línea germinal de la cadena pesada IgV_h y J_h, de los que es probable que derivaran 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2, como se describe en la sección experimental de los Ejemplos. Dichas secuencias de los genes de la línea germinal son útiles para identificar mutaciones somáticas en los anticuerpos, incluyendo en las CDR_s.

Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2, y las secuencias de sus CDR_s, no se conocían previamente, y se muestran en esta solicitud. Dicha información puede utilizarse para producir versiones humanizadas de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2. Estos anticuerpos anti-EphA humanizados, o sus derivados, también pueden utilizarse como el agente de unión a células de la presente invención.

De este modo, en una realización, esta memoria descriptiva describe anticuerpos humanizados, o fragmento de éste que se une al epítipo, que comprenden una o más CDR_s que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72. En un aspecto preferido, los anticuerpos humanizados descritos aquí comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 61, 62, 63, 67, 68 y 69, y dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 64, 65, 66, 70, 71 y 72. En una realización preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 4, 5 y 6. En otra realización adicional preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 7, 8 y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 10, 11 y 12. En otra realización adicional preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14 y 15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17 y 18. En otra realización más preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 61, 62 y 63, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR_s

secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 64, 65 y 66. En otra realización más preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 67, 68 y 69, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR_s secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 70, 71 y 72.

En una realización, esta invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de éstos que comprenden una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43 y 45. En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 37.1D7 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 32, 34 y 36. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 37.1F5 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 37 y 38. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 53.2H11 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 40, 42, 43 y 45.

En otra realización, esta invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de éstos que comprenden una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 47, 48, 49, 50 y 52. En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 37.1D7 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 47. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 37.1F5 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 48, 49 y 50. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 53.2H11 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 52.

Los anticuerpos humanizados 37.3D7 y los fragmentos de éstos que se unen al epítipo de la presente invención también pueden incluir sustitución de los restos de aminoácidos de la cadena ligera y/o pesada en una o más posiciones definidas por los restos grises en la Tabla 1A y 1B que representan los restos de superficie del marco murino que se han cambiado del resto murino original al resto correspondiente de superficie del marco en el anticuerpo humano, 28E4. Los restos con asterisco (*) en la Tabla 1B corresponden a las retromutaciones murinas en las variantes humanizadas de la cadena pesada de 37.3D7 (SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO:36). Los restos de las retromutaciones están próximos a las CDR, y se eligieron como se describe en la patente de EEUU No. 5.639.641 o de manera análoga a la selección de restos que han dado como resultado, en intentos previos de humanización, una disminución de la afinidad de unión al antígeno (Roguska et al., 1996, Protein Eng.;9(10): 895-904; publicaciones de solicitud de patente de EEUU 2003/0235582 y 2005/0118183).

De forma similar, los anticuerpos humanizados 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, y fragmentos de éstos que se unen al epítipo, de la presente invención, también pueden incluir sustitución de restos de aminoácidos de la cadena ligera y/o pesada.

Polinucleótidos, vectores y células hospedantes

Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-EphA2 de la invención. En una realización, la molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y/o ligera de una inmunoglobulina anti-EphA2. En una realización preferida, un único ácido nucleico codifica una cadena pesada de una inmunoglobulina anti-EphA2, y otra molécula de ácido nucleico codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina anti-EphA2.

En otro aspecto de esta invención, se proporcionan polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 76, 78 y 80. En una realización preferida, el polinucleótido de la invención se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 39, 41, 44, 46, 51, 73, 75, 77 y 79. La invención no está limitada a dichos polinucleótidos per se, sino que también incluye todos los polinucleótidos que presentan al menos un 80 % de identidad con dichos polinucleótidos.

La invención proporciona vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención. En una realización, el vector contiene un polinucleótido que codifica una cadena pesada de una inmunoglobulina anti-EphA2. En otra realización, dicho polinucleótido codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina anti-EphA2. La invención también proporciona vectores que comprenden moléculas de polinucleótido que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos, y sondas de éstos.

Con el fin de expresar la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos anti-EphA2 de la invención, los polinucleótidos que codifican dichas cadenas pesadas y/o ligeras se insertan en vectores de expresión de manera que los genes están unidos de manera operativa a secuencias de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, YAC, cósmidos, retrovirus, episomas derivados de EBV, y todos los demás vectores que el experto en la técnica sabrá que son convenientes para asegurar la expresión de dichas cadenas pesadas y/o ligeras. El experto en la técnica se dará cuenta de que los polinucleótidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden clonarse en diferentes vectores o en el mismo vector. En una realización preferida, dichos polinucleótidos se clonan en el mismo vector.

Los polinucleótidos de la invención y los vectores que comprenden estas moléculas pueden utilizarse para la

transformación de una célula hospedante de mamífero adecuada, o cualquier otro tipo de célula hospedante conocida por el experto en la técnica. La transformación puede realizarse mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedante. Dichos métodos son muy conocidos para el experto en la técnica, e incluyen transformación mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulamiento del polinucleótido en liposomas, inyección biolística y microinyección directa de ADN en núcleos.

Fragmentos de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos de longitud completa discutidos anteriormente, así como fragmentos que se unen al epítipo. Tal como se utiliza en la presente memoria, "fragmentos de anticuerpo" incluyen cualquier parte de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo de longitud completa, denominados de manera general "fragmentos que se unen al epítipo". Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, Fv enlazados por disulfuro (dsFv), y fragmentos que comprenden una región V_L o V_H. Los fragmentos que se unen al epítipo, incluyendo los anticuerpos de cadena única, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: región bisagra, dominios C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}.

Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab, o el fragmento F(ab')₂. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpos contienen las seis CDR_s del anticuerpo completo, aunque también son funcionales los fragmentos que contienen menos de todas estas regiones, tal como tres, cuatro o cinco CDR_s. Además, los fragmentos pueden ser o pueden combinar miembros de una cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de éstas.

Los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden producirse mediante escisión proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (fragmentos Fab) o pepsina (fragmentos F(ab')₂).

Los fragmentos FVs de cadena única (scFVs) son fragmentos que se unen al epítipo que contienen al menos un fragmento de una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (V_H) enlazada a al menos un fragmento de una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (V_L). El conector puede ser un péptido corto flexible, seleccionado para asegurar que se produce el plegamiento tridimensional apropiado de las regiones (V_L) y (V_H) una vez que se han enlazado, con el fin de mantener la especificidad de unión a la molécula diana del anticuerpo completo del que se obtiene el fragmento del anticuerpo de cadena única. El extremo carboxilo terminal de la secuencia (V_L) o (V_H) puede enlazarse covalentemente mediante un conector al extremo del aminoácido de una secuencia complementaria (V_L) o (V_H).

Los fragmentos de anticuerpos de cadena única de la presente invención contienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos una de las regiones variables o determinantes de la complementariedad (CDR_s) de los anticuerpos completos descritos en esta memoria descriptiva, pero que carecen de algunos o de todos los dominios constantes de esos anticuerpos. Estos dominios constantes no son necesarios para la unión al antígeno, pero constituyen una parte importante de la estructura de los anticuerpos completos. Los fragmentos de anticuerpos de cadena única pueden, por lo tanto, solucionar algunos de los problemas asociados con la utilización de anticuerpos que contienen una parte de o todo un dominio constante. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos de cadena única normalmente no presentan interacciones no deseadas entre moléculas biológicas y la región constante de la cadena pesada, u otra actividad biológica no deseada. Adicionalmente, los fragmentos de anticuerpos de cadena única son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos, y pueden tener, por lo tanto, una mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos completos, lo que permite que los fragmentos de anticuerpos de cadena única se localicen y se unan más eficazmente a sitios diana de unión a antígenos. Además, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse en una escala relativamente grande en células procariontas, facilitando así su producción. Es más, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpos de cadena única hace que sea menos probable que provoquen una respuesta inmune en un receptor que los anticuerpos completos.

Los fragmentos de anticuerpos de cadena única pueden generarse mediante clonación molecular, biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos, o técnicas similares muy conocidas por el experto en la técnica. Estas proteínas pueden producirse, por ejemplo, en células eucariotas o células procariontas, incluyendo bacterias. Los fragmentos que se unen al epítipo de la presente invención también pueden generarse utilizando varios métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación de fagos, los dominios funcionales del anticuerpo se exponen en la superficie de las partículas del fago que contienen las secuencias polinucleotídicas que las codifican. En particular, dicho fago puede utilizarse para exponer dominios que se unen al epítipo expresados de un repertorio o de una biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). El fago que expresa un dominio que se une al epítipo que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, utilizando un antígeno marcado unido o capturado en una superficie o perla sólida. El fago utilizado en estos métodos son típicamente fagos filamentosos, incluyendo los dominios de unión de fd y M13 expresados a partir de fagos con los dominios del anticuerpo Fab, Fv, o Fv estabilizado con disulfuro, fusionados recombinantemente con la proteína del fago del gen III o gen VIII.

Los ejemplos de métodos de presentación de fagos que pueden utilizarse para obtener los fragmentos que se unen al epítipo de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50; Ames et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958; Persic et al., 1997, *Gene* 187: 9-18; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology*, 57: 191-280; solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y patentes de EEUU Nos. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Después de la selección del fago, las regiones del fago que codifican los fragmentos pueden aislarse y utilizarse para generar los fragmentos que se unen al epítipo mediante expresión en un hospedante elegido, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células de plantas, levaduras, y bacterias, utilizando tecnología de ADN recombinante, por ejemplo como se describe con detalle más adelante. Por ejemplo, también pueden utilizarse técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, *BioTechniques*, 12(6): 864-869; Sawai et al., 1995, *AJRI*, 34: 26-34; y Better et al., 1988, *Science*, 240: 1041-1043. Los ejemplos de técnicas que pueden utilizarse para producir Fv_s y anticuerpos de cadena única incluyen los descritos en las patentes de EEUU Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., 1991, *Methods in Enzymology* 203: 46-88; Shu et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 7995-7999; Skerra et al., 1988, *Science*, 240: 1038-1040.

Equivalentes funcionales

Dentro del alcance de la memoria descriptiva también están incluidos los equivalentes funcionales del anticuerpo anti-EphA y el anticuerpo humanizado anti-receptor EphA2. La expresión "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homologas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos artificiales y anticuerpos modificados, por ejemplo, en los que cada equivalente funcional está definido por su capacidad para unirse al receptor EphA2. El experto en la técnica entenderá que existe una superposición entre el grupo de moléculas denominado "fragmentos de anticuerpo" y el grupo denominado "equivalentes funcionales". Los métodos para producir equivalentes funcionales son conocidos por el experto en la técnica y están descritos, por ejemplo, en la Solicitud PCT WO 93/21319, Patente Europea No. EP 0239400; Solicitud PCT WO 89/09622; Patente Europea No. EP 0338745; y Solicitud de Patente Europea EP 0332424, que se incorporan en sus totalidades respectivas mediante referencia.

Los anticuerpos con secuencias homologas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-EphA y un anticuerpo humanizado anti-EphA de la presente memoria descriptiva. Preferiblemente, la homología es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo anti-EphA y del anticuerpo humanizado anti-EphA de la presente memoria descriptiva. "Homología de secuencia", tal como se aplica a una secuencia de aminoácidos en la presente memoria, se define como una secuencia con al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, o 94% de homología de secuencia, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de homología de secuencia con otra secuencia de aminoácidos, como se determina, por ejemplo, mediante el método de búsqueda FASTA según Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 2444-2448.

Un anticuerpo quimérico es aquel en el que diferentes partes de un anticuerpo se obtienen a partir de diferentes especies de animales. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable obtenida a partir de un anticuerpo monoclonal murino emparejada con una región constante de una inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science*, 229: 1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques*, 4: 214; Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202; patentes de EEUU Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Las formas humanizadas de los anticuerpos quiméricos se obtienen sustituyendo las regiones determinantes de la complementariedad de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, en un dominio marco humano, por ejemplo véase la Pub. PCT No. W092/22653. Los anticuerpos quiméricos humanizados tienen preferiblemente regiones constantes y regiones variables distintas de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) obtenidas sustancial o exclusivamente a partir de las regiones del anticuerpo humano correspondiente, y de las CDR_s obtenidas sustancial o exclusivamente a partir de un mamífero distinto de un ser humano.

Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos scFv, fragmentos bivalentes, fragmentos trivalentes, fragmentos tetravalentes y mru (véanse las revisiones por Winter, G. y Milstein, C., 1991, *Nature*, 349: 293-299; Hudson, P.J., 1999, *Current Opinión in Immunology*, 11: 548-557), cada uno de los cuales tienen capacidad para unirse al antígeno. En el fragmento Fv de cadena única (scFv), los dominios V_H y V_L de un anticuerpo están enlazados mediante un péptido flexible. Típicamente, este péptido conector tiene una longitud de aproximadamente 15 restos de aminoácidos. Si el conector es mucho más pequeño, por ejemplo 5 aminoácidos, se forman fragmentos divalentes, que son dímeros divalentes scFv. Si el conector se reduce a menos de tres restos de aminoácidos, se forman estructuras triméricas y tetraméricas que se denominan fragmentos trivalentes y tetravalentes. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo es una CDR, típicamente la CDR2 de la cadena pesada, que tiene un reconocimiento y unión específicos suficientes como para poder utilizarse de manera independiente. Dicho fragmento se denomina unidad de reconocimiento molecular o mru. Varios de estas mrus pueden unirse con péptidos conectores cortos, formando por lo tanto una proteína de unión artificial con una mayor avidéz que una única mru.

5 Los equivalentes funcionales de la presente solicitud también incluyen anticuerpos modificados, por ejemplo anticuerpos modificados mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. La unión covalente no impide al anticuerpo generar una respuesta anti-idiotípica. Estas modificaciones pueden realizarse mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

10 Los equivalentes funcionales pueden producirse intercambiando diferentes CDR_s en diferentes cadenas en diferentes marcos. Así, por ejemplo, son posibles diferentes clases de anticuerpo para un conjunto de CDR_s dado mediante sustitución de diferentes cadenas pesadas, con lo que pueden producirse, por ejemplo, tipos e isotipos de anticuerpos IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, e IgE. De manera similar, los anticuerpos artificiales dentro del alcance de la invención pueden producirse embebiendo un conjunto dado de CDR_s en un marco completamente sintético.

15 Los equivalentes funcionales pueden producirse mediante mutación, supresión y/o inserción en las secuencias de la región variable y/o constante que flanquean un conjunto particular de CDR_s, utilizando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica.

20 Los fragmentos de anticuerpo y los equivalentes funcionales de la presente invención comprenden aquellas moléculas con un nivel detectable de unión a EphA, cuando se comparan con el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2. Un nivel detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de al menos 10-100%, preferiblemente al menos 50%, 60% o 70%, más preferiblemente al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de la afinidad de unión del anticuerpo murino 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2 a EphA.

Anticuerpos mejorados

25 Las CDR_s son muy importantes para el reconocimiento del epítipo y la unión del anticuerpo. Sin embargo, pueden realizarse cambios en los restos que comprenden las CDR_s sin interferir con la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse a su epítipo correspondiente. Por ejemplo, pueden realizarse cambios que no afectan al reconocimiento del epítipo, pero que incrementan la capacidad de unión del anticuerpo al epítipo.

Así, también están incluidas dentro del alcance de la presente invención versiones mejoradas de anticuerpos murinos y humanizados, que también reconocen y se unen específicamente a EphA, preferiblemente con una afinidad incrementada.

30 Numerosos estudios han examinado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en diferentes posiciones en la secuencia de un anticuerpo, tomando como base el conocimiento de la secuencia del anticuerpo primario, sobre sus propiedades tales como unión y nivel de expresión (Yang, W. P. et al., 1995, *J. Mol. Biol.*, 254: 392-403; Rader, C. et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16: 535-539).

35 En estos estudios, se generaron equivalentes del anticuerpo primario cambiando las secuencias de los genes de la cadena pesada y ligera en las regiones CDR1, CDR2, CDR3, o marco, utilizando métodos tales como mutagénesis dirigida a sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis de casete, PCR tendente a error, transposición de secuencias de ADN, o cepas mutadoras de *E. coli* (Vaughan, T. J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16: 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Capítulo 16, p. 277-291, en "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Estos métodos para cambiar la secuencia del anticuerpo primario han dado como resultado afinidades mejoradas de los anticuerpos secundarios (Gram, H. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:10701-10705; Davies, J. y Riechmann, L., 1996, *Immunotechnology*, 2: 169-179; Thompson, J. et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 256: 77-88; Short, M. K. et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277: 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 27622- 27628).

45 Mediante una estrategia dirigida similar para cambiar uno o más restos de aminoácidos del anticuerpo, pueden utilizarse las secuencias de anticuerpo descritas en esta invención para desarrollar anticuerpos anti-EphA con funciones mejoradas, incluyendo afinidad mejorada por EphA.

50 Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, y (4) confieren o modifican otras propiedades físico-químicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica natural. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia natural (preferiblemente en la parte del polipéptido fuera del dominio o de los dominios que forman los contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de reemplazamiento no debe romper una hélice que está presente en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructuras secundarias que caracterizan a la secuencia parental). Los ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica están descritos en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and

Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N. Y. (1991)); y Thornton et al., 1991, Nature, 354: 105.

5 Los anticuerpos mejorados también incluyen aquellos anticuerpos que tienen características mejoradas que se preparan mediante técnicas estándar de inmunización animal, formación de hibridomas, y selección para detectar anticuerpos con características específicas.

La presente invención también incluye conjugados citotóxicos como se definen en las reivindicaciones. Estos conjugados citotóxicos comprenden dos componentes principales, un agente de unión a células y un agente citotóxico.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agente de unión a células" se refiere a un agente que reconoce y se une específicamente a los receptores EphA en la superficie celular. En una realización, el agente de unión a células reconoce específicamente el receptor EphA de manera que permite a los conjugados actuar de manera dirigida con pocos efectos secundarios que resultan de la unión no específica.

15 En otra realización, el agente de unión a células de la presente invención también reconoce específicamente el receptor EphA de manera que los conjugados estarán en contacto con la célula diana durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir a la parte del fármaco citotóxico del conjugado actuar en la célula, y/o permitir a los conjugados un tiempo suficiente como para ser internalizados por la célula.

20 En una realización preferida, los conjugados citotóxicos comprenden un anticuerpo anti-EphA como agente de unión a células, más preferiblemente el anticuerpo monoclonal murino anti-EphA 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2. En una realización más preferida, el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, o un fragmento de éste que se une al epítipo. El anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2 es capaz de reconocer específicamente un receptor EphA, tal como EphA2, y dirige al agente citotóxico hacia una célula o tejido anormal, tal como células cancerosas, de una manera dirigida.

El segundo componente de los conjugados citotóxicos de la presente invención es un agente citotóxico. La expresión "agente citotóxico", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sustancia que reduce o bloquea la función, o crecimiento, de células, y/o produce la destrucción de células.

25 En realizaciones preferidas, el agente citotóxico es un taxoide, un maitansinoide tal como DM1 o DM4, un fármaco pequeño, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina, un profármaco, CC-1065 o un análogo de CC-1065. En realizaciones preferidas, los agentes de unión a células de la presente invención están unidos covalentemente, directamente o a través de un conector escindible o no escindible, al agente citotóxico.

Los agentes de unión a células, agentes citotóxicos y conectores se discuten con más detalle a continuación.

30 Agentes de unión a células

La eficacia de los compuestos de la presente invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de unión a células apropiado. Los agentes de unión a células como se describen aquí pueden ser de cualquier clase actualmente conocida, o que llegue a conocerse, e incluyen péptidos y no péptidos. El agente de unión a células puede ser cualquier compuesto que pueda unirse a una célula, de manera específica o no específica. Generalmente, éstos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia que se una a células.

Los ejemplos más específicos de agentes de unión a células que pueden usarse incluyen:

- anticuerpos policlonales;
- 40 • anticuerpos monoclonales;
- fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab' y F(ab')₂, Fv (Parham, 1983, J. Immunol., 131:2895-2902; Spring et al., 1974, J. Immunol., 113: 470-478; Nisonoff et al., 1960, Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244).

Preferiblemente, como el agente de unión a células de la presente invención se utiliza un anticuerpo humanizado anti-EphA. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado anti-EphA se selecciona de anticuerpos humanizados o modificados en superficie 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 y EphA2-N2.

Agentes citotóxicos

50 En otra realización, el anticuerpo humanizado o un fragmento de éste que se une al epítipo puede conjugarse con un fármaco, tal como un maitansinoide o un derivado de tomamicina, para formar un profármaco que tiene una citotoxicidad específica frente a células que expresan el antígeno al dirigir el fármaco hacia el receptor EphA2. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y un fármaco pequeño altamente tóxico (por ejemplo, maitansinoides, taxanos, derivados de tomamicina, un derivado de leptomicina, CC-1065 y análogos de CC-1065) pueden utilizarse como una sustancia terapéutica para el tratamiento de tumores, tales como tumores de mama y de

ovario.

5 El agente citotóxico utilizado en el conjugado citotóxico de la presente invención puede ser cualquier compuesto que dé como resultado la muerte de una célula, o induzca la muerte celular, o de alguna manera disminuya la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, un profármaco, derivados de tomamicina, taxoides, un derivado de leptomicina, CC-1065 y análogos de CC-1065, definidos a continuación. Estos agentes citotóxicos se conjugan con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos, como se describe en la presente memoria.

10 Los conjugados citotóxicos pueden prepararse mediante métodos *in vitro*. Con el fin de enlazar un fármaco o profármaco al anticuerpo, se utiliza un grupo conector. En la técnica son muy conocidos los grupos conectores adecuados, e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas, y grupos lábiles a esterasas. Los grupos conectores preferidos son grupos disulfuro y grupos tioéter. Por ejemplo, los conjugados pueden construirse utilizando una reacción de intercambio de disulfuro, o formando un enlace de tioéter entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco.

Maitansinoides

15 Entre los agentes citotóxicos que pueden utilizarse en la presente invención para formar un conjugado citotóxico, están los maitansinoides y análogos de maitansinoide. Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides son fármacos que inhiben la formación de microtúbulos, y son altamente tóxicos para las células de mamíferos.

20 Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados están descritos en las patentes de EEUU Nos. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

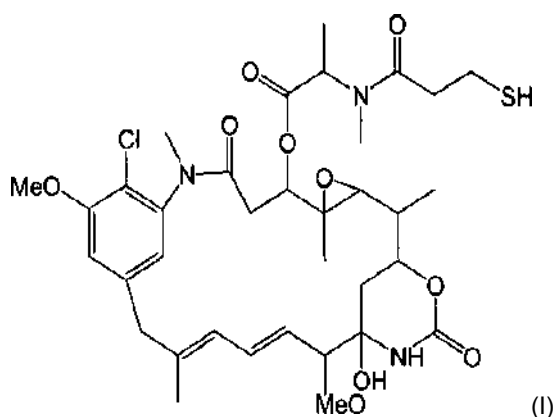
Los ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

- (1) C-19-descloro (patente de EEUU No. 4.256.746) (preparado por reducción con LAH de ansamitocina P2);
- 25 (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/-C-19-descloro (patentes de EEUU Nos. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces*, o descloración utilizando LAH); y
- (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (Pat. de EEUU No 4.294.757) (preparado por acilación utilizando cloruros de acilo).

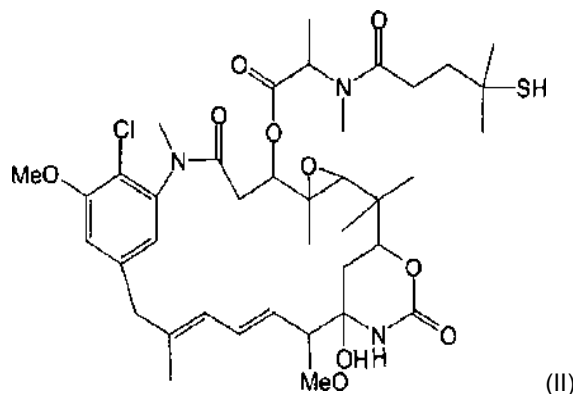
30 Los ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen modificaciones en otras posiciones incluyen:

- (1) C-9-SH (patente de EEUU No. 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);
- (2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH₂OR) (patente de EEUU No. 4.331.598);
- (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de EEUU No. 4.450.254) (preparado a partir de Nocardia);
- 35 (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente de EEUU No. 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*);
- (5) C-15-metoxi (patentes de EEUU Nos. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado a partir de *Trewia nudiflora*);
- (6) C-18-/V-desmetilo (patentes de EEUU Nos. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*), y
- 40 (7) 4,5-desoxi (patente de EEUU No 4.371.533) (preparado por la reducción de maitansinol mediante tricloruro de titanio/LAH).

En una realización preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), denominado formalmente N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. DM1 está representado por la siguiente fórmula estructural (I):



En otra realización preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol *N*²-desacetil-*N*²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina como el agente citotóxico. DM4 está representado por la siguiente fórmula estructural (II):

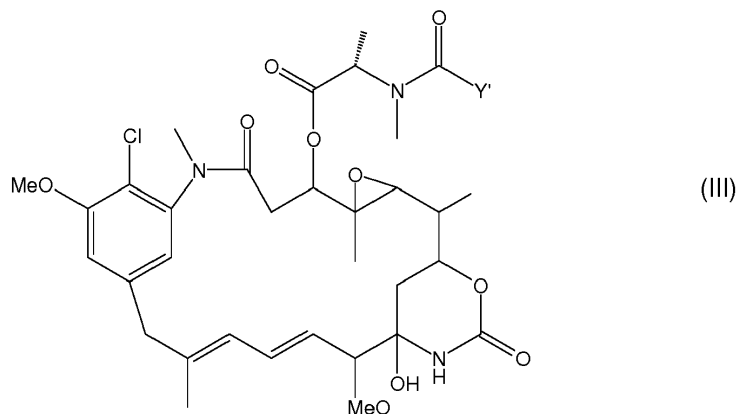


5

En realizaciones adicionales de la invención, pueden utilizarse otras maitansinas, incluyendo maitansinoides que contienen tiol y disulfuro, que presentan una mono- o dialquil sustitución en el átomo de carbono que porta al átomo de azufre. Éstos incluyen un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilada portando un grupo acilo un grupo sulfhidrilo, en el que el átomo de carbono del grupo acilo que porta la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, siendo estos sustituyentes CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y en el que además uno de los sustituyentes puede ser H, y en el que el grupo acilo tiene una cadena lineal con una longitud de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

10

15 Dichas maitansinas adicionales incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



en la que:

Y' representa (CR₇R₈)(CR₉=CR₁₀)_p(C≡C)_qA_r(CR₅R₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C≡C)_sB_t(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ,

en el que:

R₁ y R₂ son, cada uno independientemente, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y adicionalmente R₂ puede ser H;

5 A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, y R₁₂ son, cada uno independientemente, H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

10 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son, cada uno independientemente, 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en todo momento; y Z es H, SR o -COR, en el que R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

Realizaciones preferidas de fórmula (III) incluyen los compuestos de fórmula (III) en la que:

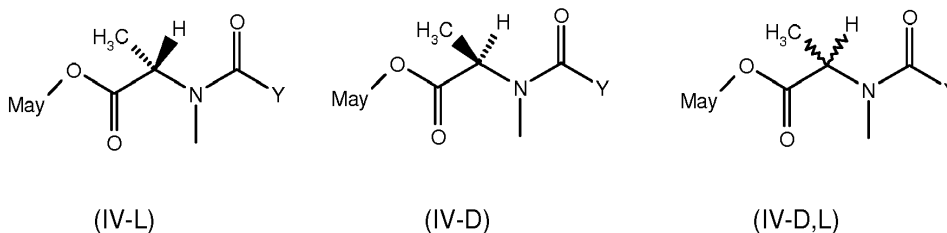
R₁ es metilo, R₂ es H y Z es H.

15 R₁ y R₂ son metilo y Z es H.

R₁ es metilo, R₂ es H, y Z es -SCH₃

R₁ y R₂ son metilo, y Z es -SCH₃.

Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D), o (IV-D,L):



20 en las que:

Y representa (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ,

en el que:

25 R₁ y R₂ son, cada uno independientemente, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y adicionalmente R₂ puede ser H;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son, cada uno independientemente, H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m y n son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 5, y adicionalmente n puede ser 0;

30 Z es H, SR o -COR, en el que R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

May representa un maitansinoide que porta la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

35 Realizaciones preferidas de fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L), en las que:

R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇, y R₈ son, cada uno, H, l y m son, cada uno, 1, n es 0, y Z es H.

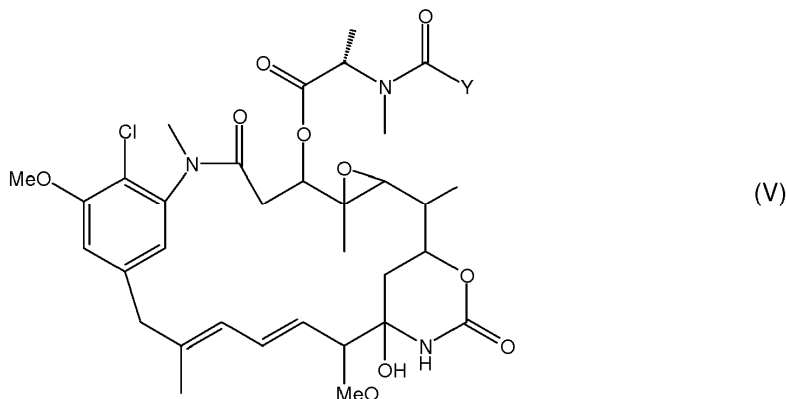
R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son, cada uno, H, l y m son 1, n es 0, y Z es H.

R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇, y R₈ son, cada uno, H, l y m son, cada uno, 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

40 R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son, cada uno, H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

Preferiblemente, el agente citotóxico está representado mediante la fórmula (IV-L).

Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



en la que:

5 Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en el que:

R₁ y R₂ son, cada uno independientemente, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y adicionalmente R₂ puede ser H;

10 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son, cada uno independientemente, H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m y n son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 5, y adicionalmente n puede ser 0; y

15 Z es H, SR o -COR, en el que R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

Realizaciones preferidas de fórmula (V) incluyen compuestos de fórmula (V) en la que:

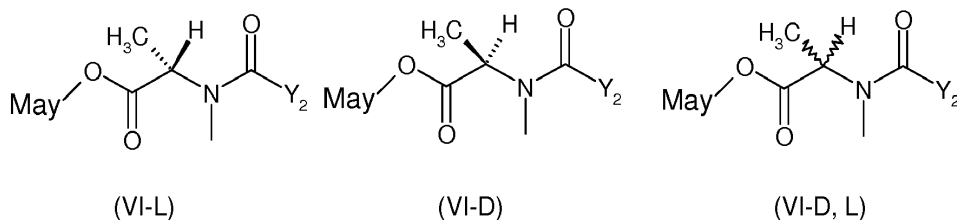
R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇, y R₈ son, cada uno, H; l y m son, cada uno, 1; n es 0; y Z es H.

R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇, R₈ son, cada uno, H, l y m son 1; n es 0; y Z es H.

20 R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇, y R₈ son, cada uno, H, l y m son, cada uno, 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son, cada uno, H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

Dichas maitansinas adicionales incluyen además compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D), o (VI-D,L):



en las que:

25 Y₂ representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

en el que:

R₁ y R₂ son, cada uno independientemente, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y adicionalmente R₂ puede ser H;

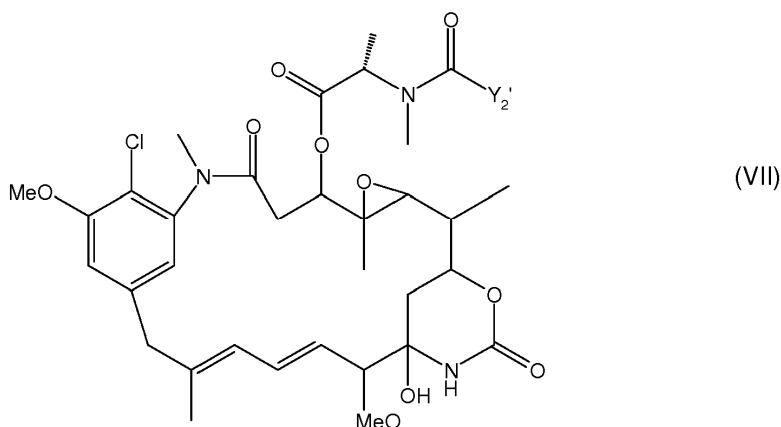
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son, cada uno independientemente, H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenido lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m y n son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 5, y adicionalmente n puede ser 0;

5 Z₂ es SR o COR, en el que R es alquilo o alquenido lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

May es un maitansinoide.

Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



10

en la que:

Y₂' representa (CR₇R₈)(CR₉=CR₁₀)_p(C≡C)_qAr(CR₅R₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C≡C)_sB_i(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ₂,

en el que:

15

R₁ y R₂ son, cada uno independientemente, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenido lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y adicionalmente R₂ puede ser H;

A, B, y D son, cada uno independientemente, cicloalquilo o cicloalquenido que tiene 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

20

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, y R₁₂ son, cada uno independientemente, H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenido lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son, cada uno independientemente, 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en todo momento; y

25

Z₂ es SR o -COR, en el que R es alquilo o alquenido lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico que tiene de 3 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

Realizaciones preferidas de fórmula (VII) incluyen compuestos de fórmula (VII) en la que: R₁ es metilo, R₂ es H.

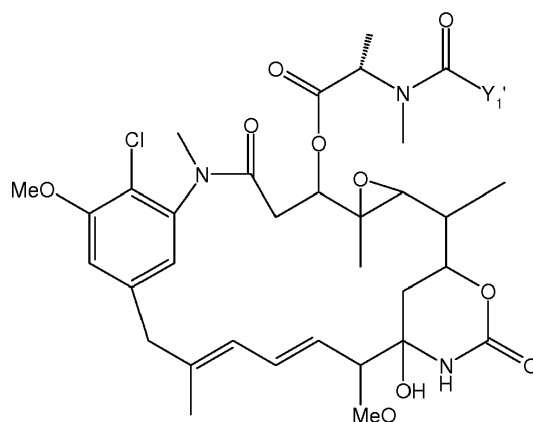
30

Los maitansinoides mencionados anteriormente pueden conjugarse con un anticuerpo anti-EphA 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, o un homólogo o fragmento de éste, en el que el anticuerpo se une al maitansinoide utilizando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácidos acilada que se encuentra en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo del maitansinoide, y en el que el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácidos acilada tiene su funcionalidad tiol o disulfuro localizada en un átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenido lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en el que el grupo acilo tiene una cadena lineal con una longitud de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

35

Un conjugado preferido de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-EphA 37.3D7, 37.1F5,

53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, o un homólogo o fragmento de éste, conjugado con un maitansinoide de fórmula (VIII):



(VIII)

5 en la que:

Y_1' representa $(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_t(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2S^-$,

en el que:

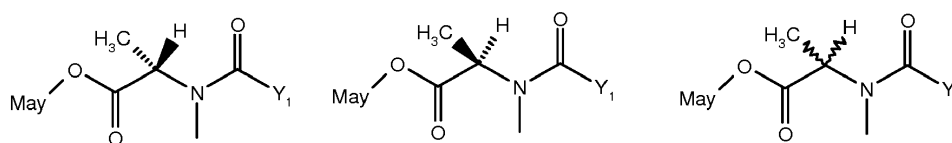
A, B, y D, cada uno independientemente, son cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

10 $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11},$ y R_{12} son, cada uno independientemente, H, CH_3, C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son, cada uno independientemente, 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en todo momento.

15 Preferiblemente, R_1 es metilo, R_2 es H, o R_1 y R_2 son metilo.

Un conjugado aún más preferido de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-EphA 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, o un homólogo o fragmento de éste, conjugado con un maitansinoide de fórmula (IX-L), (IX-D), o (IX-D,L):



(IX-L)

(IX-D)

(IX-D,L)

20 en las que:

Y_1 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S^-$,

en el que:

25 R_1 y R_2 son, cada uno independientemente, CH_3, C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y adicionalmente R_2 puede ser H;

R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8 son, cada uno independientemente, H, CH_3, C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m y n son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 5, y adicionalmente n puede ser 0; y

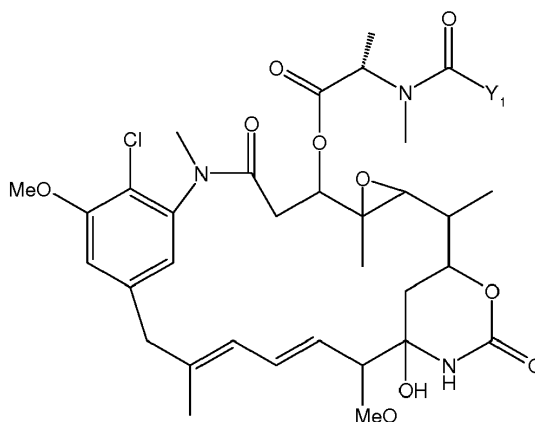
May representa un maitansinol que porta la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxi o C-20 desmetilo.

Realizaciones preferidas de fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,L) en las que:

- 5 R_1 es metilo, R_2 es H, o R_1 y R_2 son metilo,
 R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son, cada uno, H; l y m son, cada uno, 1; n es 0,
 R_1 y R_2 son metilo; R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son, cada uno, H; l y m son 1; n es 0.

Preferiblemente, el agente citotóxico está representado por la fórmula (IX-L).

- 10 Un conjugado preferido adicional de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-EphA 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, o un homólogo o fragmento de éste, conjugado con un maitansinoide de fórmula (X):



(X)

en la que los sustituyentes son como se definen para la fórmula (IX) anterior.

- 15 Especialmente preferidos son cualesquiera de los compuestos descritos anteriormente, en los que R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son, cada uno, H, l y m son, cada uno, 1, y n es 0.

Son especialmente preferidos además cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, en los que R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son, cada uno, H, l y m son 1, y n es 0.

Además, se prefiere el estereoisómero *L*-aminoacílico.

- 20 Cada uno de los maitansinoides mostrados en la solicitud de patente de EEUU número 10/849,136, en tramitación, presentada el 20 de mayo de 2004, también pueden utilizarse en el conjugado citotóxico de la presente invención.

Grupos conectores que contienen disulfuro

- 25 Con el fin de unir el maitansinoide al agente de unión a células, tal como el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, el maitansinoide comprende un resto conector. La porción conectora contiene un enlace químico que permite la liberación de maitansinoides completamente activos en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son muy conocidos en la técnica, e incluyen enlaces de disulfuro, enlaces lábiles a ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasas, y enlaces lábiles a esterasas. Se prefieren los enlaces de disulfuro.

La porción conectora también comprende un grupo químico reactivo. En una realización preferida, el grupo químico reactivo puede unirse covalentemente al maitansinoide a través de una porción conectora con enlace de disulfuro.

- 30 Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son ésteres *N*-succinimidílicos y ésteres *N*-sulfosuccinimidílicos.

Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden un resto conector que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos, en los que la porción conectora contiene un enlace de disulfuro y el grupo químico reactivo comprende un éster *N*-succinimidílico o *N*-sulfosuccinimidílico.

Muchas posiciones de los maitansinoides pueden servir como la posición para enlazar químicamente la porción

conectora. Por ejemplo, es esperable que sean útiles la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. Sin embargo, se prefiere la posición C-3, y la posición C-3 de maitansinol es especialmente preferida.

5 Aunque la síntesis de ésteres de maitansinol que tienen un resto conector se describe en términos de restos conectores con enlace de disulfuro, un experto en la técnica entenderá que también pueden utilizarse con la presente invención los restos conectores con otros enlaces químicos (como se ha descrito anteriormente), así como otros maitansinoides. Los ejemplos específicos de otros enlaces químicos incluyen enlaces lábiles a ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasas, y enlaces lábiles a esterases. La descripción de la patente de EEUU No. 5.208.020, incorporada en la presente memoria, muestra la producción de maitansinoides que portan dichos enlaces.

10 La síntesis de maitansinoides y derivados de maitansinoide que tienen un resto de disulfuro que porta un grupo reactivo se describe en las patentes de EEUU Nos. 6.441.163 y 6.333.410 y en la Solicitud de EEUU No. 10/161.651.

Los maitansinoides que contienen un grupo reactivo, tal como DM1, se hacen reaccionar con un anticuerpo, tal como el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, para producir conjugados citotóxicos. Estos conjugados pueden purificarse mediante HPLC o mediante filtración en gel.

15 Numerosos esquemas excelentes para producir tales conjugados de anticuerpo-maitansinoide se proporcionan en la patente de EEUU No. 6.333.410 y en las solicitudes de EEUU Nos. 09/867.598, 10/161.651 y 10/024.290, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria en su totalidad.

20 En general, una disolución de un anticuerpo en amortiguador acuoso puede incubarse con un exceso molar de maitansinoides que tienen un resto de disulfuro que presenta un grupo reactivo. La mezcla de reacción puede paralizarse mediante la adición de amina en exceso (tal como etanolamina, taurina, etc.). El conjugado de maitansinoide-anticuerpo puede purificarse entonces mediante filtración en gel.

El número de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo puede determinarse midiendo espectrofotométricamente la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Se prefiere un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo.

25 Los conjugados de los anticuerpos con fármacos de maitansinoide pueden evaluarse por su capacidad de suprimir *in vitro* la proliferación de varias líneas celulares no deseadas. Por ejemplo, para evaluar la citotoxicidad de estos compuestos, pueden utilizarse líneas celulares tales como la línea de carcinoma epidermoide humano A-431, la línea celular de cáncer de pulmón microcítico SW2, la línea de tumor de mama humano SKBR3, y la línea celular Namalwa de linfoma de Burkitt. Las células a evaluar pueden exponerse a los compuestos durante 24 horas, y las fracciones de células supervivientes se pueden medir en ensayos directos por métodos conocidos. Los valores de CI_{50} pueden calcularse después a partir de los resultados de los ensayos.

Grupos conectores que contienen PEG

35 Los maitansinoides también pueden enlazarse a los agentes de unión a células, utilizando grupos conectores de PEG, como se muestra en la solicitud de EEUU No. 10/024.290. Estos grupos conectores de PEG son solubles tanto en agua como en disolventes no acuosos, y pueden utilizarse para unir uno o más agentes citotóxicos a un agente de unión a células. Los grupos conectores de PEG ejemplares incluyen conectores de PEG hetero-bifuncionales que se unen a agentes citotóxicos y agentes de unión a células en extremos opuestos de los conectores a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional en un extremo y un éster activo en el otro extremo.

40 Como ejemplo general de la síntesis de un conjugado citotóxico que utiliza un grupo conector de PEG, se hace referencia de nuevo a la solicitud de EEUU No. 10/024.290 para detalles específicos. La síntesis comienza con la reacción de uno o más agentes citotóxicos que portan un resto de PEG reactivo con un agente de unión a células, lo que da como resultado el desplazamiento del éster activo terminal de cada resto de PEG reactivo por un resto de aminoácido del agente de unión a células, tal como el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, para proporcionar un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos enlazados covalentemente a un agente de unión a células a través de un grupo conector de PEG.

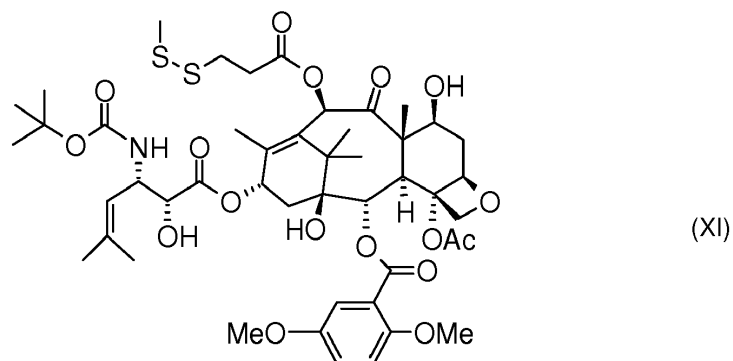
Taxanos

El agente citotóxico utilizado en los conjugados citotóxicos según la presente invención también puede ser un taxano o derivado de éste.

50 Los taxanos son una familia de compuestos que incluye paclitaxel (taxol), un producto natural citotóxico, y docetaxel (Taxotere), un derivado semisintético, dos compuestos que se utilizan ampliamente en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son tóxicos para el huso mitótico que inhiben la despolimerización de la tubulina, lo que da como resultado la muerte celular. Aunque el docetaxel y el paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral es limitada debido a su toxicidad no específica frente a las células normales. Además, los compuestos como el paclitaxel y el docetaxel por sí mismos no son suficientemente potentes como para utilizarlos en conjugados

55 con agentes de unión a células.

Un taxano preferido para utilizarlo en la preparación de conjugados citotóxicos es el taxano de fórmula (XI):



Los métodos para sintetizar taxanos que pueden utilizarse en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar los taxanos con un agente de unión a células, tal como el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, se describen con detalle en las patentes de EEUU Nos. 5.416.064, 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738 y 6.436.931, y en las solicitudes de EEUU Nos. 10/024.290, 10/144.042, 10/207.814, 10/210.112 y 10/369.563.

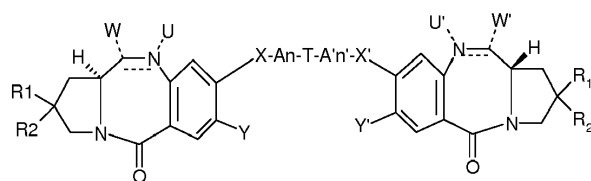
Derivados de tomaimicina

El citotóxico según la presente invención también puede ser un derivado de tomaimicina. Los derivados de tomaimicina son pirrolo[1,4]benzodiazepinas (PBDs), una clase conocida de compuestos que ejercen sus propiedades biológicas por medio de la unión covalente al N2 de la guanina en el surco menor del ADN. Las PBDs incluyen varios agentes de unión al surco menor, tales como antramicina, neotramicina y DC-81.

Los nuevos derivados de tomaimicina que retienen una alta citotoxicidad y que pueden unirse eficazmente a agentes de unión a células están descritos en la Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/000142. Los complejos de agente de unión a células-derivado de tomaimicina permiten la medida total de la acción citotóxica de los derivados de tomaimicina que se van a aplicar de forma dirigida solamente contra las células no deseadas, evitando por lo tanto los efectos secundarios debidos al daño a las células sanas que no son diana.

El agente citotóxico según la presente invención comprende uno o más derivados de tomaimicina, enlazados a un agente de unión a células, tal como el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, a través de un grupo conector. El grupo conector es parte de un resto químico que está unido covalentemente a un derivado de tomaimicina mediante métodos convencionales. En una realización preferida, el resto químico puede estar unido covalentemente al derivado de tomaimicina mediante un enlace de disulfuro.

Los derivados de tomaimicina útiles en la presente invención tienen la fórmula (XII) mostrada a continuación:



(XII)

en la que

--- representa un enlace sencillo opcional;

---- representa un enlace sencillo o un enlace doble; con la condición de que cuando represente un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representen independientemente H, y W y W', iguales o diferentes, se seleccionen independientemente del grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como -OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 sean una parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 sean una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como -SO3-, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como -NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 sean una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como -NRCOR, un azido tal como -N3, un halo, un trialkil- o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido; Preferiblemente W y W' son iguales o diferentes, y son OH, Ome, Oet, NHCONH2, SME;

y cuando ---- representa un enlace doble, U y U' están ausentes, y W y W' representan H;

■ R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes, y se eligen independientemente de Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arilo, Het, S(O)_qR, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un enlace doble =B y =B' respectivamente.

5 Preferiblemente, R1 y R2 ,y R1' y R2', forman juntos un grupo que contiene un enlace doble =B y =B' respectivamente.

■ B y B' son iguales o diferentes, y se eligen independientemente de Alqueno que está opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arilo, Het, S(O)_qR, o B y B' representan un átomo de oxígeno.

Preferiblemente, B=B'.

Más preferiblemente, B=B'= =CH₂ o =CH-CH₃,

10 ■ X, X' son iguales o diferentes, y se eligen independientemente de uno o más -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q.

Preferiblemente, X=X'.

Más preferiblemente, X=X'=0.

15 ■ A, A' son iguales o diferentes, y se eligen independientemente de Alquilo o Alqueno que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de azufre, estando cada uno de ellos opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, Arilo, Het, Alquilo, Alqueno.

Preferiblemente, A=A'.

Más preferiblemente, A=A'=alquilo lineal no sustituido.

■ Y, Y' son iguales o diferentes, y se eligen independientemente de H, OR;

Preferiblemente, Y=Y'.

20 Más preferiblemente, Y=Y'=OAlquilo, más preferiblemente OMetilo.

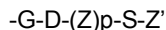
■ T es -NR-, -O-, -S(O)_q, o un arilo, cicloalquilo, grupo heterocíclico o heteroarilo de 4 a 10 miembros, estando cada uno de ellos opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, y/o conector(es), o un Alquilo ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, y/o conector(es), o un Alquilo lineal sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, y/o conector(es).

25 Preferiblemente, T es un arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, más preferiblemente fenilo o piridilo, opcionalmente sustituido con uno o más conectores.

Dicho conector comprende un grupo enlazante. Los grupos enlazantes adecuados son muy conocidos en la técnica, e incluyen grupos tiol, sulfuro, disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas, y grupos lábiles a esterasas. Se prefieren los grupos disulfuro y tioéter.

30 Cuando el grupo enlazante es un grupo que contiene tiol, sulfuro (o el denominado tioéter -S-) o disulfuro (-S-S-), la cadena lateral que tiene el grupo tiol, sulfuro o disulfuro puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. El experto en la técnica puede identificar fácilmente cadenas laterales adecuadas.

Preferiblemente, dicho conector es de fórmula:



35 en la que

G es un enlace sencillo o doble, -O-, -S- o -NR-;

D es un enlace sencillo, o -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

40 en los que E y F son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de
 -(OCH₂CH₂)_iAlquil(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil(OCH₂CH₂)_i-Alquil-, -(OCH₂CH₂)_i-,
 -(OCH₂CH₂)_iCicloalquil(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iHeterocíclico(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iAril(OCH₂CH₂)_j-,
 -(OCH₂CH₂)_iHeteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iAlquil(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_i-,
 -Alquil-(OCH₂CH₂)_iCicloalquil(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil(OCH₂CH₂)_iHeterocíclico(OCH₂CH₂)_j-,
 -Alquil-(OCH₂CH₂)_iAril(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil(OCH₂CH₂)_iHeteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -Cicloalquil-Alquilo-,
 45 -Alquil-Cicloalquilo-, -Heterocíclico-Alquilo-, -Alquil-Heterocíclico-, -AlquilArilo-, -Aril-Alquilo-, -Alquil-Heteroarilo-,
 -Heteroaril-Alquilo-, lineales o ramificados;

en los que i y j, iguales o diferentes, son números enteros, y se seleccionan independientemente de 0, 1 a 2000;

Z es -Alquilo- lineal o ramificado;

p es 0 o 1;

5 Z' representa H, un grupo protector de tiol, tal como COR, R20 o SR20, en el que R20 representa H, metilo, Alquilo, Cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo, heteroarilo o heterocíclico, con la condición de que cuando Z' sea H, dicho compuesto esté en equilibrio con el compuesto correspondiente formado por ciclación intramolecular que resulta de la adición del grupo tiol -SH al enlace de imina -NH= de uno de los restos de PBD.

- n, n', iguales o diferentes, son 0 o 1.

▪ q es 0, 1 o 2.

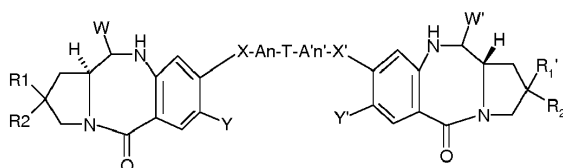
10 ▪ R, R' son iguales o diferentes, y se eligen independientemente de H, Alquilo, Arilo, estando cada uno opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF3, R, OR, S(O)_qR, Arilo, Het;

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, o sales hidratadas, o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

15 Los compuestos de fórmula general (XII) que tienen isómeros geométricos y estereoisómeros también son una parte de la invención.

Se sabe que el enlace doble N-10, C-11 de los derivados de tomamicina de fórmula (XII) puede convertirse fácilmente de manera reversible en los aductos de imina correspondientes en presencia de agua, un alcohol, un tiol, una amina primaria o secundaria, urea y otros nucleófilos. Este proceso es reversible, y puede regenerar fácilmente los derivados de tomamicina correspondientes en presencia de un agente de deshidratación, en un disolvente orgánico no prótico, en vacío o a temperaturas elevadas (Z. Tozuka, 1983, J. Antibiotics, 36: 276).

Así, los derivados reversibles de los derivados de tomamicina de fórmula general (XIII) también pueden utilizarse en la presente invención:



(XIII)

25 en la que A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' son como se definen en la fórmula (XII), y W, W' son iguales o diferentes, y se seleccionan del grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, -COOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como -OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como -SO3-, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como -NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como -NRCOR, -NRCONRR', un azido tal como -N3, un ciano, un halo, un triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido. Preferiblemente, W y W' son iguales o diferentes, y son OH, Ome, Oet, NHCONH2, SMe.

35 De este modo, los compuestos de fórmula (XIII) pueden considerarse como solvatos, incluyendo el agua cuando el disolvente sea agua; estos solvatos pueden ser particularmente útiles.

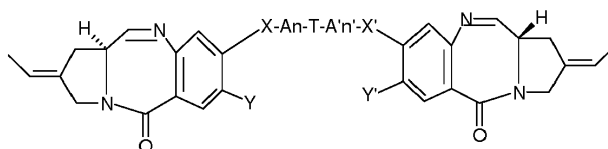
En una realización preferida, los derivados de tomamicina de la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

- 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

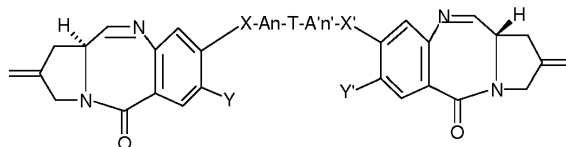
- 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 • 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10 • 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

así como los correspondientes mercapto derivados, o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, o sales hidratadas, o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

Los compuestos preferidos son los de fórmula:



o



20 en la que X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' son como se definen anteriormente.

Los compuestos de fórmula (XII) pueden prepararse de diferentes formas muy conocidas por los expertos en la técnica. Los compuestos pueden sintetizarse, por ejemplo, por aplicación o adaptación de los métodos que se describen a continuación, o variaciones de los mismos como puedan apreciarse por el experto en la técnica. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán muy obvias, y se conocerán bien o podrán obtenerse fácilmente a partir de la bibliografía científica por los expertos en la técnica. En particular, dichos métodos pueden encontrarse en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Los métodos para sintetizar los derivados de tomimicina que pueden utilizarse en la invención se describen en la Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/000142. Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante diferentes rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están disponibles comercialmente, o se sintetizan fácilmente mediante técnicas muy conocidas por el experto en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, FR1516743, M. Morí et al., 1986, Tetrahedron, 42: 3793-3806).

Las moléculas de conjugado de la invención pueden formarse usando cualquier técnica. Los derivados de tomimicina de la invención pueden enlazarse a un anticuerpo u otro agente de unión a células a través de un conector lábil de ácidos o un conector fotolábil. Los derivados pueden condensarse con un péptido que tenga una secuencia adecuada y, posteriormente, enlazarse a un agente de unión a células para producir un conector lábil a peptidasas. Los conjugados pueden prepararse de manera que contengan un grupo hidroxilo primario, que puede succinilarse y enlazarse a un agente de unión a células para producir un conjugado que pueda escindirarse por esterases intracelulares para liberar el derivado libre. Preferiblemente, los derivados se sintetizan de manera que contengan un grupo tiol libre o protegido, y después uno o más derivados que contienen disulfuro o tiol se enlazan covalentemente al agente de unión a células a través de un enlace de disulfuro o un enlace de tioéter.

En los documentos USP 5.416.064 y USP 5.475.092 se describen numerosos métodos de conjugación. Los derivados de tomimicina pueden modificarse para proporcionar un grupo amino libre, y luego enlazarse al anticuerpo o a otro agente de unión a células mediante un conector lábil de ácidos o un conector fotolábil. Los derivados de tomimicina

con un grupo amino o carboxilo libre pueden condensarse con un péptido y, posteriormente, enlazarse a un agente de unión a células para producir un conector lábil a peptidasas. Los derivados de tomamicina con un grupo hidroxilo libre en el conector pueden succinilarse y enlazarse a un agente de unión a células para producir un conjugado que puede ser escindido por esterasas intracelulares para liberar el fármaco libre. Lo más preferiblemente, los derivados de tomamicina se tratan para crear un grupo tiol libre o protegido, y luego los dímeros de tomamicina que contienen disulfuro o tiol se enlazan al agente de unión a células mediante enlaces de disulfuro.

Preferiblemente, los conjugados de derivado de tomamicina-anticuerpo monoclonal, o derivado de tomamicina-agente de unión a células, son aquellos que están unidos mediante un enlace de disulfuro, como se ha indicado anteriormente, que son capaces de suministrar los derivados de tomamicina. Dichos conjugados de unión a células se preparan mediante métodos conocidos tales como por modificación de anticuerpos monoclonales con piridil-ditiopropionato de succinimidilo (SPDP) (Carlsson et al., 1978, *Biochem. J.*, 173:723-737). El grupo tiopiridilo resultante se desplaza después por tratamiento con derivados de tomamicina que contienen tiol para producir conjugados enlazados por enlaces de disulfuro. Alternativamente, en el caso de los arilditio-derivados de tomamicina, la formación del conjugado de unión a células se realiza por desplazamiento directo del aril-tiol del derivado de tomamicina por grupos sulfhidrilo previamente introducidos en las moléculas del anticuerpo. Los conjugados que contienen 1 a 10 fármacos de derivado de tomamicina enlazados mediante un puente de disulfuro se preparan fácilmente por cualquier método.

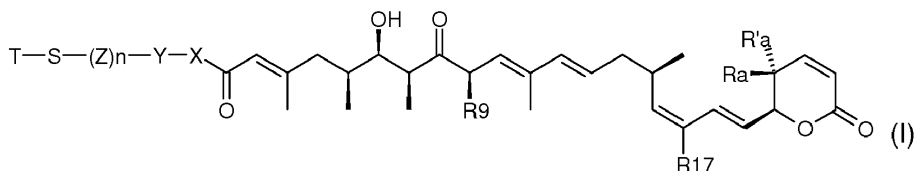
Más específicamente, una disolución del anticuerpo modificado por ditio-nitropiridilo, a una concentración de 2,5 mg/ml en amortiguador de fosfato potásico 0,05 M, a pH 7,5, que contiene EDTA 2 mM, se trata con el derivado de tomamicina que contiene tiol (1,3 eq. molares/grupo ditiopiridilo). La liberación de la tio-nitropiridina del anticuerpo modificado se sigue espectrofotométricamente a 325 nm, y se completa en aproximadamente 16 horas. El conjugado de derivado de tomamicina-anticuerpo se purifica y se libera del fármaco sin reaccionar y de otro material de bajo peso molecular mediante filtración en gel a través de una columna de Sephadex G-25 o Sephacryl S300. El número de restos de derivado de tomamicina unidos por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo la relación entre la absorbancia a 230 nm y a 275 nm. Por este método se pueden enlazar mediante enlaces de disulfuro un promedio de 1-10 moléculas de derivado de tomamicina/molécula de anticuerpo.

El efecto de la conjugación sobre la afinidad de unión frente a células que expresan el antígeno puede determinarse utilizando los métodos descritos previamente por Liu et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 8618-8623. La citotoxicidad de los derivados de tomamicina y sus conjugados con anticuerpo frente a líneas celulares se puede medir por retro-extrapolación de las curvas de proliferación celular como se describe en Goldmacher et al., 1985, *J. Immunol.*, 135:3648-3651. La citotoxicidad de estos compuestos frente a líneas celulares adherentes puede determinarse mediante ensayos clonogénicos como se describe en Goldmacher et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 1312-1319.

Derivados de leptomicina

El citotóxico según la presente invención también puede ser un derivado de leptomicina. Según la presente invención, "derivados de leptomicina" se refiere a los miembros de la familia de la leptomicina como se define en Kalesse et al. (2002, *Synthesis* 8: 981-1003), e incluyen: leptomicinas, tales como leptomicina A y leptomicina B, calistatinas, ratjadones tales como ratjadona A y ratjadona B, anguinomicinas tales como anguinomicina A, B, C, D, kasusamicinas, leptostatina, leptofuraninas, tales como leptofuranina A, B, C, D. Se prefieren los derivados de leptomicina A y B.

Más específicamente, los derivados de la invención son de la fórmula (I):



en la que

Ra y Ra' son H o -Alk; preferiblemente Ra es -Alk, preferiblemente metilo, y Ra' es H;

R17 es alquilo opcionalmente sustituido con OR, CN, NRR', perfluoroalquilo; preferiblemente, R17 es alquilo, más preferiblemente metilo o etilo;

R9 es alquilo opcionalmente sustituido con OR, CN, NRR', perfluoroalquilo; preferiblemente, R9 es alquilo, más preferiblemente metilo;

X es -O- o -NR-; preferiblemente, X es -NR-;

Y es -U-, -NR-U-, -O-U-, -NR-CO-U-, -U-NR-CO-, -U-CO-, -CO-U-;

preferiblemente, cuando X es -O-, Y es -U-, -NR-U-, -U-NR-CO-;

en el que U se selecciona de -Alk-, -Alk(OCH₂CH₂)_m-, -(OCH₂CH₂)_m-Alk-, -Alk(OCH₂CH₂)_m-Alk-, -(OCH₂CH₂)_m-, -Cicloalquilo-, -Heterocíclico-, -Cicloalquil-Alk-, -Alk-Cicloalquilo-, -Heterocíclico-Alk-, -Alk-Heterocíclico-, lineales o ramificados;

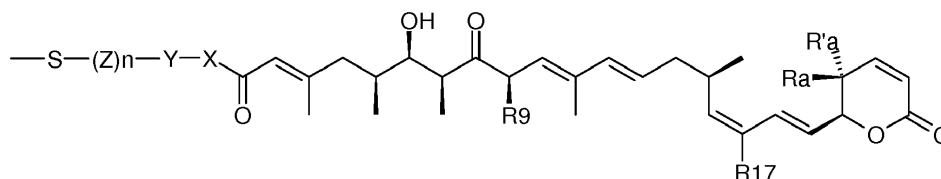
5 en los que m es un número entero seleccionado de 1 a 2000;

preferiblemente, U es -Alk- lineal o ramificado,

Z es -Alk-;

n es 0 o 1; preferiblemente n es 0;

10 T representa H, un grupo protector de tiol, tal como Ac, R₁ o SR₁, en el que R₁ representa H, metilo, Alk, Cicloalquilo, arilo opcionalmente sustituido o heterocíclico, o T representa



en la que:

Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, n son como se definen anteriormente;

preferiblemente, T es H o SR₁, en el que R₁ representa Alk, más preferiblemente metilo;

15 R, R', iguales o diferentes, son H o alquilo;

Alk representa un alquilo lineal o ramificado; preferiblemente Alk representa -(CH₂-_q(CH₃)_q)_p- en el que p representa un número entero de 1 a 10; y q representa un número entero de 0 a 2; preferiblemente, Alk representa -(CH₂)₂- o -C(CH₃)₂-.

20 o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, o sales hidratadas, o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

Los compuestos preferidos pueden elegirse de:

• (2-Metilsulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico

25 • Bis-[(2-mercaptoetil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico]

• (2-Mercapto-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico

30 • (2-Metildisulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico

35 • (2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico

• (2-Mercapto-2-metil-propil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico

40 o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, o sales hidratadas, o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos, o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

Con el fin de enlazar el derivado a un agente de unión a células, el derivado debe incluir un resto (grupo conector) que permita a los derivados enlazarse a un agente de unión a células a través de un enlace tal como un enlace de disulfuro,

un enlace de sulfuro (o llamado en la presente memoria tioéter), un grupo lábil de ácidos, un grupo fotolábil, un grupo lábil a peptidasas, o un grupo lábil a esterasas. Los derivados se preparan de manera que contengan un resto necesario para enlazar el derivado de leptomicina a un agente de unión a células, por ejemplo mediante un enlace de disulfuro, un enlace de tioéter, un grupo lábil de ácidos, un grupo fotolábil, un grupo lábil a peptidasas, o un grupo lábil a esterasas. Con el fin de aumentar más la solubilidad en disoluciones acuosas, el grupo conector puede contener un espaciador de polietilenglicol. Preferiblemente, se utiliza un enlace de sulfuro o disulfuro porque el entorno reductor de la célula seleccionada como diana da como resultado la escisión del sulfuro o disulfuro y la liberación de los derivados con un incremento asociado de la citotoxicidad.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante diferentes rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están disponibles comercialmente, o se sintetizan fácilmente mediante técnicas muy conocidas por el experto en la técnica. Los métodos para sintetizar los derivados de leptomicina que pueden utilizarse en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar dichos derivados de leptomicina a agentes de unión a células tales como anticuerpos, se describen con detalle en la Solicitud de Patente Europea No. 06290948.6.

15 Análogos de CC-1065

El agente citotóxico utilizado en los conjugados citotóxicos según la presente invención también puede ser CC-1065 o un derivado de éste.

CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1.000 veces más potente *in vitro* que los fármacos anti-cancerígenos utilizados habitualmente, tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina (B.K. Bhuyan et al., 1982, Cancer Res., 42, 3532-3537). CC-1065 y sus análogos se describen en las patentes de EEUU Nos. 6.372.738, 6.340.701, 5.846.545 y 5.585.499.

La potencia citotóxica de CC-1065 se ha correlacionado con su actividad alquilante y su actividad de unión al ADN e intercalación en el ADN. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. Así, la actividad alquilante está contenida en la subunidad de ciclopropapirroloindol (CPI), y la actividad de unión al ADN reside en las dos subunidades de pirroloindol.

Aunque CC-1065 tiene ciertas características atractivas como agente citotóxico, tiene limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones produjo una hepatotoxicidad retardada que dio lugar a mortalidad en el día 50 después de una única dosis intravenosa de 12,5 µg/kg (V. L. Reynolds et al., 1986, J. Antibiotics, XXIX: 319-334). Esto ha estimulado los esfuerzos para desarrollar análogos que no produzcan una toxicidad retardada, y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados sobre CC-1065 (M.A. Warpehoski et al., 1988, J. Med. Chem., 31: 590-603).

En otra serie de análogos, el resto de CPI se reemplazó por un resto de ciclopropabencindol (CBI) (D.L. Boger et al., 1990, J. Org. Chem., 55: 5823-5833; D.L. Boger et al., 1991, BioOrg. Med. Chem. Lett., 1: 115-120). Estos compuestos mantienen la elevada potencia *in vitro* del fármaco parental, sin causar toxicidad retardada en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen al surco menor del ADN de un modo covalente para causar la muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más prometedores, Adozelesina y Carzelesina, ha producido resultados decepcionantes (B.F. Foster et al., 1996, Investigational New Drugs, 13: 321-326; I. Wolff et al., 1996, Clin. Cancer Res., 2: 1717-1723). Estos fármacos presentan efectos terapéuticos pobres a causa de su elevada toxicidad sistémica.

La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 se puede mejorar mucho cambiando la distribución *in vivo* mediante suministro dirigido al sitio del tumor, lo que da como resultado una menor toxicidad en tejidos no diana, y de este modo, menor toxicidad sistémica. Con el fin de lograr esta meta, se han descrito conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de unión a células que se seleccionan específicamente como dianas a células tumorales (patentes de EEUU; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545). Estos conjugados presentan típicamente *in vitro* una alta citotoxicidad específica para la diana, y una actividad anti-tumoral excepcional en modelos de xenoinjertos de tumores humanos en ratones (R.V. J. Chari et al., 1995, Cancer Res., 55: 4079-4084).

Recientemente, se han descrito profármacos de análogos de CC-1065 con solubilidad incrementada en medio acuoso (Solicitud de Patente Europea No. 06290379.4). En estos profármacos, el grupo fenólico de la parte alquilante de la molécula está protegido con una funcionalidad que convierte al fármaco en estable después de almacenarlo en una disolución acuosa ácida, y confiere al fármaco una solubilidad en agua incrementada en comparación con el análogo sin proteger. El grupo protector se escinde fácilmente *in vivo* a pH fisiológico para dar el fármaco activo correspondiente. En los profármacos descritos en EP 06290379.4, el sustituyente fenólico está protegido como un ácido sulfónico que contiene carbamato de fenilo que posee una carga a pH fisiológico, y así tiene una solubilidad en agua incrementada. Con el fin de aumentar más la solubilidad en agua, se puede introducir un espaciador de polietilenglicol opcional en el conector entre la subunidad de indolilo y el enlace escindible, tal como un grupo disulfuro. La introducción de este espaciador no altera la potencia del fármaco.

Los métodos para sintetizar los análogos de CC-1065 que pueden utilizarse en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar los análogos con agentes de unión a células tales como

anticuerpos, se describen con detalle en el documento EP 06290379.4 y en las patentes de EEUU Nos. 5.475.092, 5.846.545, 5.585.499, 6.534.660 y 6.586.618, y en las solicitudes de EEUU Nos. 10/116.053 y 10/265.452.

Otros fármacos

5 Los fármacos tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, caliqueamicina, tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina también son adecuados para la preparación de los conjugados de la presente invención. Las moléculas de fármaco también pueden enlazarse a las moléculas de anticuerpo mediante una molécula transportadora intermedia, tal como seroalbúmina. Los compuestos de Doxorrubicina y Danorrubicina, como se describen, por ejemplo, en la Patente de EEUU No. 6.630.579, también pueden ser agentes citotóxicos útiles.

10 Composición terapéutica

La invención también se refiere a una composición terapéutica para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, dicha composición farmacéutica es para el tratamiento del cáncer, incluyendo (pero sin limitarse a) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de la línea linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de la línea mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomiocarcinoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomiocarcinoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactinoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma, y otros cánceres todavía por determinar en los que EphA se expresa de manera predominante. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención se utilizan para el tratamiento de cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario, cuello del útero y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, un sarcoma, cabeza y cuello, un glioma, gástrico, hígado, y otros carcinomas en los que se expresa EphA. En particular, el cáncer es un cáncer metastásico. En otra realización, dicha composición farmacéutica se refiere a otros trastornos tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injertos tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto frente a hospedante; infecciones virales tales como infección por mV, infección por VIH, SIDA etc.; e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis, y otras determinadas por un experto en la técnica.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden:

- 35 • una cantidad eficaz de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención y
- un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser inerte o fisiológicamente activo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y similares, que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, disolución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como una combinación de éstos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, o cloruro sódico. En particular, los ejemplos relevantes de vehículo adecuado incluyen: (1) disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco, pH ~ 7,4, que contiene o no aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de seroalbúmina humana, (2) disolución salina al 0,9% (cloruro sódico al 0,9% p/v (NaCl)), y (3) dextrosa al 5% (p/v); y también puede contener un antioxidante, tal como triptamina, y un agente estabilizante, tal como Tween 20.

Las composiciones de la presente memoria también pueden contener un agente terapéutico más, según sea necesario para el trastorno particular que se está tratando. Preferiblemente, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, y el compuesto activo adicional, tendrán actividades complementarias, que no se perjudiquen entre sí. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un antagonista del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o receptor HER2.

Las composiciones de la invención pueden estar en diferentes formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, aunque la forma preferida depende del modo de administración pretendido y de la aplicación terapéutica. Las composiciones típicamente preferidas están en forma de disoluciones inyectables o para infusión. El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo). En una realización preferida, las composiciones de la invención se

administran por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo. En otra realización preferida, se inyectan por vía intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos.

5 Las composiciones estériles para administración parenteral pueden prepararse incorporando el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, seguido de esterilización mediante microfiltración. Como disolvente o vehículo, puede utilizarse agua, disolución salina, disolución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como una combinación de éstos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, o cloruro sódico. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, en particular agentes humectantes, isotonicantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. Las composiciones estériles para administración parenteral también pueden prepararse en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en el momento de su utilización en agua estéril o en cualquier otro medio estéril inyectable.

15 El anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención también puede administrarse oralmente. Como composiciones sólidas para administración oral, pueden utilizarse comprimidos, pastillas, polvos (cápsulas de gelatina, sobres) o gránulos. En estas composiciones, el ingrediente activo según la invención se mezcla con uno o más diluyentes inertes, tales como almidón, celulosa, sacarosa, lactosa o sílice, bajo una corriente de argón. Estas composiciones también pueden comprender sustancias distintas de los diluyentes, por ejemplo uno o más lubricantes, tales como estearato de magnesio o talco, un colorante, un recubrimiento (comprimidos recubiertos con azúcar) o un glaseado.

20 Como composiciones líquidas para administración oral, pueden utilizarse disoluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes tales como agua, etanol, glicerol, aceites vegetales o aceite de parafina. Estas composiciones pueden comprender sustancias distintas de los diluyentes, por ejemplo productos humectantes, edulcorantes, espesantes, saporíferos o estabilizantes.

25 Las dosis dependen del efecto deseado, la duración del tratamiento y la vía de administración utilizada; generalmente están entre 5 mg y 1000 mg por día oralmente para un adulto con dosis unitarias en el intervalo de 1 mg a 250 mg de sustancia activa. En general, el médico determinará la dosis adecuada dependiendo de la edad, peso y cualquier otro factor específico del sujeto que se va a tratar.

Métodos terapéuticos de utilización

30 En otra realización, la presente memoria descriptiva proporciona un método para inhibir la actividad del receptor EphA2 mediante la administración de un anticuerpo que antagoniza dicho receptor EphA2, a un paciente que lo necesita. Pueden utilizarse terapéuticamente cualquiera de los tipos de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, o conjugados citotóxicos de la invención. La invención incluye así la utilización de anticuerpos antagonistas anti-EphA2, fragmentos de éstos, o conjugados citotóxicos de éstos como medicamentos.

35 En un aspecto de la memoria descriptiva, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados citotóxicos de la invención se utilizan para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una realización más preferida, una de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, y que contiene un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado citotóxico de la invención, se utiliza para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una realización, el trastorno es un cáncer. En particular, el cáncer es un cáncer metastásico. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y conjugados citotóxicos de la invención también pueden utilizarse para tratar la neovascularización de dicho tumor canceroso.

40 En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento o prevención de diferentes cánceres, incluyendo (pero sin limitarse a) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroide y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de la línea linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de la línea mieloides, incluyendo leucemias mielogenosas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactinoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma, y otros cánceres todavía por determinar en los que EphA se expresa de manera predominante. En una realización preferida, el cáncer es un cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, útero, ovario, cuello del útero y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, sarcoma, cabeza y cuello, glioma, gástrico, hígado, y otros carcinomas en los que se expresa EphA. En otra realización, dicha composición farmacéutica se refiere a otros trastornos tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple; rechazos de injertos, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardiaco, y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto frente a hospedante; infecciones virales, tales como infección por mV, infección por VIH, SIDA etc.; e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis,

esquistosomiasis, y otras determinadas por un experto en la técnica.

De manera similar, la presente memoria descriptiva proporciona un método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas, que comprende poner en contacto las células diana, o tejido que contiene las células diana, con una cantidad eficaz de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente terapéutico que comprende un conjugado citotóxico, bien solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos.

Como se describe aquí, el método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede ponerse en práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Tal como se utiliza en la presente memoria, "inhibir el crecimiento" significa ralentizar el crecimiento de una célula, disminuir la viabilidad celular, producir la muerte de una célula, lisar una célula e inducir la muerte celular, en un periodo de tiempo ya sea corto o largo.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente a fin de destruir células enfermas o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante a fin de destruir células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto frente a hospedante (GVHD); tratamientos de cultivos celulares a fin de eliminar todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o para destruir variantes que expresan un antígeno indeseado.

Las condiciones de la utilización no clínica *in vitro* las determina fácilmente el experto en la técnica.

Los ejemplos de utilización clínica *ex vivo* son para eliminar células tumorales o células linfoides de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, o para eliminar células T y otras células linfoides de médula ósea autóloga o alogénica o de tejidos antes del trasplante para prevenir la enfermedad de injerto frente a hospedante (GVHD). El tratamiento puede realizarse como sigue. Se recoge la médula ósea del paciente o de otro individuo y entonces se incuba en medio que contiene suero, al que se añade el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían de aproximadamente 10 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, las determinará fácilmente un experto en la técnica. Después de la incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero, y se devuelven al paciente por infusión i.v. según métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento, tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de todo el cuerpo entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula ósea tratadas se conservan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico convencional.

Para la utilización clínica *in vivo*, el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo que se une al epítipo, o el conjugado citotóxico de la invención se proporcionará como disoluciones que se han ensayado para determinar su esterilidad y niveles de endotoxinas. Los ejemplos de protocolos adecuados para la administración de los conjugados citotóxicos son los siguientes. Los conjugados se administran semanalmente durante 4 semanas como un bolo i.v. cada semana. Las dosis del bolo se proporcionan en 50 a 100 ml de disolución salina normal, a la que pueden añadirse 5 a 10 ml de seroalbúmina humana. Las dosis serán 10 μ g a 100 mg por administración, i.v. (intervalo de 100 ng a 1 mg/kg por día). Más preferiblemente, las dosis variarán de 50 μ g a 30 mg. Lo más preferiblemente, las dosis variarán de 1 mg a 20 mg. Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo el tratamiento semanalmente. El experto en la técnica puede determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., cuando lo permita la situación clínica.

40 Diagnóstico

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención también pueden utilizarse para detectar EphA2 *in vitro* o *in vivo* en una muestra biológica. En una realización, el anti-EphA2 de la invención se utiliza para determinar el nivel de EphA2 en un tejido o en células obtenidas del tejido. En una realización preferida, el tejido es un tejido enfermo. En una realización preferida del método, el tejido es un tumor o una biopsia del mismo. En una realización preferida del método, en primer lugar se obtiene un tejido o una biopsia de éste de un paciente, y los niveles de EphA2 en el tejido o biopsia pueden determinarse entonces en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. El tejido o biopsia de éste puede congelarse o fijarse. El mismo método puede utilizarse para determinar otras propiedades de la proteína EphA2, tales como su nivel de fosforilación en tirosina, niveles en la superficie celular, o localización celular.

El método descrito anteriormente puede utilizarse para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o sospecha que tiene un cáncer, en el que el nivel de EphA2 determinado en dicho paciente se compara con el de un sujeto o estándar de referencia normal. Dicho método puede utilizarse para determinar si un tumor expresa EphA2, lo que puede sugerir que el tumor responderá bien al tratamiento con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el tumor es un cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, útero, ovario, cuello del útero, y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, un sarcoma, un glioma, gástrico, hígado, cabeza y cuello, u otros carcinomas en los que se expresa EphA2, y otros cánceres todavía por determinar en los que EphA2 se expresa de manera predominante.

La presente memoria descriptiva proporciona además anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de éstos que se unen al epítipo, que se marcan además para utilizarse en aplicaciones de investigación o diagnósticas. En realizaciones preferidas, el marcador es un marcador radiactivo, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imagen, o un ion metálico.

- 5 También se proporciona un método para diagnóstico, en el que dichos anticuerpos marcados o fragmentos de éstos que se unen al epítipo se administran a un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, y se determina o monitoriza la distribución del marcador en el cuerpo del sujeto.

Kit

- 10 La presente memoria descriptiva también describe kits que comprenden, por ejemplo, un conjugado citotóxico descrito, e instrucciones para la utilización del conjugado citotóxico para eliminar tipos celulares particulares. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para utilizar los conjugados citotóxicos *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

- 15 Típicamente, el kit tendrá un compartimento que contiene el conjugado citotóxico. El conjugado citotóxico puede estar en forma liofilizada, en forma líquida, o en otra forma adecuada para incluirla en un kit. El kit también puede contener elementos adicionales necesarios para llevar a la práctica el método descrito en las instrucciones en el kit, tal como solución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinarlos con el conjugado citotóxico antes de administrarlo a un paciente, y medios que faciliten la administración del conjugado a un paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de hibridomas de anticuerpo monoclonal anti-EphA2

- 20 Se inmunizaron cuatro ratones BALB/c VAF con células 300-19 transfectadas con EphA2 humano, una línea celular pre-B obtenida de un ratón BALB/c. Las células transfectadas de manera estable que sobreexpresan el antígeno se generaron mediante transfección de células 300-19 con el ADNc de longitud completa de EphA2 humano, y se seleccionaron en busca de los clones con una alta expresión mediante citometría de flujo. El clon 4-6, un clon que expresa fuertemente el receptor EphA2 humano en la superficie celular, se seleccionó como inmunógeno para la inmunización de ratones y para el cribado de anticuerpos de hibridomas. Las células transfectadas con EphA2 se mantuvieron en el medio de selección que contiene G418 a una concentración final de 1 mg/ml, y se analizaron regularmente para detectar la expresión de EphA2 utilizando un anticuerpo comercialmente disponible.

- 30 Se les inyectaron subcutáneamente a los ratones Balb/c aproximadamente 5×10^6 células 300-19 transfectadas con EphA2 en 200 μ l de disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) por ratón. Las inyecciones se realizan cada 2-3 semanas mediante protocolos de inmunización estándar utilizados en ImmunoGen, Inc. Tres días antes de la fusión celular, los ratones se reforzaron intraperitonealmente una vez más con la misma dosis de antígeno, y se sacrificaron para la preparación de células de bazo según los protocolos estándar para los procedimientos de utilización de animales en el día de la fusión celular.

- 35 Se recogió el bazo del ratón inmunizado en condiciones quirúrgicas estériles y se trituró entre dos portaobjetos microscópicos estériles y fríos para obtener una suspensión de células individuales en medio RPMI-1640. Los esplenocitos se pelletizaron y se lavaron dos veces con medio RPMI-1640 antes de la fusión celular. Las células del bazo se mezclaron y se fusionaron con células de mieloma murino P3X63Ag8.653 (Kearney, J.F. et al., 1979. J. Immunol., 123: 1548-1550) utilizando polietilenglicol-1500 como fusógeno (Roche 783 641). Después de la fusión celular y centrifugación, las células se suspendieron en medio RPMI-1640 completo (200 ml), que contiene suplemento de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma H-0262), y se sembraron en diez placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning-Costar 3596, 200 μ l de suspensión celular por pocillo). Después de incubar a 37°C, 5% de CO₂ durante 5 días, se eliminaron 100 μ l del sobrenadante del cultivo de cada pocillo de las placas y se reemplazaron por un volumen igual de medio RPMI-1640 completo que contiene suplemento de hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). La incubación (en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C) se continuó hasta que los clones de hibridoma hubieron formado colonias lo suficientemente grandes para cribar el anticuerpo.

- 45 En el día 10 después de la fusión, cuando las células de hibridoma hubieron crecido hasta la mitad de la confluencia en los pocillos y el sobrenadante hubo cambiado a un color naranja, los sobrenadantes de los hibridomas se muestrearon de las placas de fusión para el cribado de anticuerpos mediante inmunoensayos. Para el cribado preliminar, los sobrenadantes de hibridomas se analizaron en células transfectadas con EphA2 frente a las células 300-19 parentales, mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron con 50 μ l de sobrenadante de hibridoma, seguido de incubación con conjugado de IgG de cabra anti-ratón-fluoresceína (H+L), y se analizaron mediante citometría de flujo con un equipo Becton Dickinson FACSCalibur o FACSArray. Los clones de hibridoma que resultaron positivos para las células transfectadas con EphA2 pero negativos para las células 300-19 se seleccionaron, se expandieron, se congelaron para almacenarlos, o se subclonaron mediante diluciones limitantes, para obtener una población monoclonal. Los anticuerpos específicos segregados por las células de hibridoma se isotiparon utilizando reactivos de isotipado comercialmente disponibles (Roche 1493027).

En base a los datos de citometría de flujo, se identificaron y seleccionaron 29 clones de hibridoma, que fueron reactivos específicamente con células transfectadas con EphA2 humano pero no con las células 300-19 parentales, de la inmunización de ratones con antígenos EphA2 humanos.

Ejemplo 2

5 Caracterización de la unión de los anticuerpos anti-EphA2. 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11. EphA2-N1 y EphA2-N2.

La unión específica de cada uno de los anticuerpos anti-EphA2 purificados, 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11, se demostró mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) utilizando células que sobreexpresan EphA2 humano y mediante la utilización de células que no expresan EphA2 (FIG. 1A, B y C). La incubación del anticuerpo 37.3D7, o del anticuerpo 37.1 F5 o del anticuerpo 53.2H11 (60 nM) en 100 μ l de amortiguador de FACS frío (1 mg/ml BSA en medio MEM de Dulbecco) se realizó utilizando células que sobreexpresan EphA2 y células que no expresan EphA2, en una placa de 96 pocillos de fondo redondo en hielo. Después de 1 h, las células se peletizaron mediante centrifugación y se lavaron con amortiguador de FACS frío, y se incubaron con el conjugado de anticuerpo IgG de cabra anti-ratón-FITC (100 μ l, 6 μ g/ml en amortiguador de FACS) en hielo durante 1 h. Las células se peletizaron, se lavaron y se resuspendieron en 200 μ l de disolución de formaldehído al 1% en PBS. Las muestras de células se analizaron utilizando un lector FACSCalibur (BD Biosciences).

Se obtuvo un fuerte desplazamiento de la fluorescencia después de la incubación de células que sobreexpresan EphA2 humano con el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H11, en contraste con un desplazamiento insignificante después de la incubación de las células que no expresan EphA2 humano con el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H11 (FIG. 1A, 1B y 1C), lo que demuestra que los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 se unían selectivamente a EphA2 humano. El anticuerpo anti-EphA2 utilizado como control positivo, B2D6 (Upstate), mostró un desplazamiento de la fluorescencia similar después de incubaciones con células que sobreexpresaban EphA2 humano (FIG. 1A). También se observó un fuerte desplazamiento de la fluorescencia mediante el ensayo de FACS utilizando 37.3D7 y células de cáncer humano, tal como células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, células de cáncer de colon humano HT-29, células de cáncer pancreático humano BxPC3, lo que muestra que el anticuerpo 37.3D7 se une a EphA2 humano en la superficie de células tumorales humanas (FIG. 2). También se obtuvieron datos similares utilizando los anticuerpos 37.1F5 y 53.2H11 con líneas celulares tumorales humanas.

Las constantes de disociación aparentes (K_D) para la unión de los anticuerpos 37.3D7, 37.1 F5 y 53.2H11 a EphA2 humano en la superficie de las células se determinaron mediante ensayos de FACS de la unión del anticuerpo a diferentes concentraciones a células que sobreexpresan EphA2 humano y a células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (FIG. 3). Los valores de K_D se estimaron mediante regresión no lineal para la unión a un sitio. Las curvas de unión proporcionaron los valores de K_D aparente de 0,3 nM para el anticuerpo 37.3D7, 0,07 nM para el anticuerpo 37.1F5, y 0,14 nM para el anticuerpo 53.2H11 (FIG. 3A, 3C y 3E).

Utilizando el mismo protocolo experimental, se determinaron los valores de K_D aparente de 0,18 nM y 0,05 nM para EphA2-N1 y EphA2-N2, respectivamente.

Se obtuvo un fuerte desplazamiento de la fluorescencia después de la incubación de células que sobreexpresan EphA2 murino o EphA2 de rata con el anticuerpo 37.3D7 o el anticuerpo 53.2H11, en contraste con un desplazamiento insignificante después de la incubación de células que no expresan EphA2 murino o EphA2 de rata con el anticuerpo 37.3D7 o el anticuerpo 53.2H11 (FIG. 4), lo que demuestra que los anticuerpos 37.3D7 y 53.2H11 también se unen a EphA2 murino y EphA2 de rata. También se observó un fuerte desplazamiento de la fluorescencia mediante el ensayo de FACS utilizando el anticuerpo 37.3D7 o 37.1F5 o 53.2H11 con células epiteliales de mono (*Cercopithecus aethiops*) VERO (FIG. 5A), lo que muestra que 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 también se unen a EphA2 de mono. Los valores aparentes de K_D se estimaron mediante regresión no lineal para la unión a un sitio. Las curvas de unión mediante el ensayo de FACS proporcionaron valores de K_D de 0,15 nM para 37.3D7, 0,05 nM para 37.1F5 y 0,07 nM para 53.2H11 en células de mono (FIG. 5B, 5D y 5F).

45 Ejemplo 3

Inhibición de la unión de efrina A1 a células MDA-MB-231 por los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2

La unión de efrinaA1 a células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 fue inhibida por los anticuerpos 37.3D7, 37.1 F5 y 53.2H11 (FIG. 6). Células MDA-MB-231 se incubaron con o sin 5 μ g/ml del anticuerpo 37.3D7, 37.1 F5, o 53.2H11 durante 2 h, seguido de la incubación con 100 ng/ml de efrinaA1 biotinilada, durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron entonces dos veces con medio libre de suero, para eliminar la efrinaA1 biotinilada sin unir, y se lisaron entonces en amortiguador de HEPES 50 mM, pH 7,4, que contiene NP-40 al 1% e inhibidores de proteasas. Se recubrieron placas de ELISA Immulon-2HB con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-EphA2 (D7, Upstate), y se utilizaron para capturar del lisado el EphA2 y la biotina-efrinaA1 unida. La unión del anticuerpo recubierto al dominio citoplásmico C terminal de EphA2 no interfirió con la unión de biotina-efrinaA1 al dominio extracelular de EphA2. Los pocillos se lavaron, se incubaron con conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano, se lavaron de nuevo, y después se revelaron con el sustrato ABTS/H₂O₂. La inhibición de la unión de efrinaA1 a las células MDA-MB-231 por

5 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H1 fue esencialmente cuantitativa; la señal fue prácticamente equivalente a la de la señal de fondo del ELISA obtenida utilizando un control que carecía de efrinaA1 (FIG. 6A, 6B y 6C).

5 Tanto EphA2-N1 como EphA2-N2 fueron capaces de inhibir la unión de efrinaA1 humana a células MDA-MB-231, en el mismo grado que 37.3D7.

Ejemplo 4

Inhibición de la señalización celular mediada por EphA2 por los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2

10 El tratamiento de células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 con el anticuerpo 37.3D7, o 37.1F5, inhibió completamente la señalización intracelular del receptor EphA2, como se muestra mediante la inhibición de la autofosforilación del receptor EphA2 (FIG. 7A) y mediante la inhibición de la fosforilación de efectores aguas abajo, tal como Akt (FIG. 7B). El tratamiento de células de cáncer pancreático CFPAC-1 con el anticuerpo 37.3D7 o el anticuerpo 53.2H11 inhibió completamente la señalización intracelular del receptor EphA2, como se muestra mediante la inhibición de la autofosforilación del receptor EphA2 (FIG. 7C).

15 En las FIG. 7A y 7C, las células mamarias MDA-MB-231 o las células pancreáticas CFPAC-1 se hicieron crecer en medio regular (como sugiere la ATCC para cada línea celular) con suero durante 3 días y después se cultivaron en medio libre de suero durante 12-14 h. Las células desprovistas de suero se trataron con 15 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H11, o con IgG₁ de control, durante 2 h, seguido de la estimulación con 1 $\mu\text{g/ml}$ de efrina A1-Fc (R&D) durante 10 min a 37°C. Las células se lisaron entonces en amortiguador de lisis enfriado en hielo que contiene inhibidores de proteasas y fosfatasas (amortiguador de HEPES 50 mM, pH 7,4, 1% de NP-40, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro sódico 100 mM, pirofosfato sódico 10 mM, EDTA 2,5 mM, leupeptina 10 μM , pepstatina 5 μM , PMSF 1 mM, benzamidina 5 mM y aprotinina 5 $\mu\text{g/ml}$). Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-EphA2 D7 (Upstate) acoplado a perlas de proteína A/G. El EphA2 inmunoprecipitado se resolvió en un gel de poliacrilamida con SDS, y se transfirieron mediante transferencia Northern con anticuerpo monoclonal específico de fosfotirosina, 4G10 (Cell Signaling Technology). Para evaluar el nivel de la proteína EphA2 en cada muestra inmunoprecipitada, la misma membrana se volvió a transferir con anticuerpo anti-EphA2, D7 (Upstate). La utilización de un anticuerpo de control no mostró inhibición de la autofosforilación del receptor EphA2 estimulada por efrina A1 (Fig. 7C). Por el contrario, se obtuvo una inhibición completa de la autofosforilación del receptor EphA2 estimulada por efrinaA1 después del tratamiento con el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H11 (Fig. 7A y 7C). La activación estimulada por efrina A1 de los efectores aguas abajo, tal como Akt, también se inhibió en células MDA-MB-231 por el anticuerpo 37.3D7 o 37.1F5, como se muestra utilizando transferencias Western de los lisados y anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-Ser⁴⁷³ Akt (Cell Signaling Technology) (FIG. 7B).

35 Los anticuerpos 37.3D7 y 53.2H11 no estimularon por sí mismos la autofosforilación de EphA2 en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, en contraste con el efecto estimulador de efrinaA1 sobre la autofosforilación de EphA2 en células MDA-MB-231 (FIG. 8A y 8B). Se obtuvieron datos similares para el anticuerpo 37.1 F5 utilizando células MDA-MB-231. En la FIG. 8, las células MDA-MB-231 se hicieron crecer en medio regular con suero durante 3 días, y entonces se cultivaron en medio libre de suero durante 12-14 h. Las células desprovistas de suero se trataron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de efrinaA1-Fc, o 15 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo 37.3D7 o 53.2H11, durante 10 min. Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-EphA2, D7 (Upstate). Después de separar en un gel de poliacrilamida con SDS, la transferencia se sondó con el anticuerpo anti-fosfotirosina, 4G10 (Cell Signaling Technology) y con el anticuerpo D7 anti-EphA2 (Upstate). Se obtuvieron resultados similares tanto con EphA2-N1 como con EphA2-N2 en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, ya que ningún anticuerpo estimula la autofosforilación de EphA2 por sí mismo, mientras que cada uno de ellos impide la fosforilación del receptor EphA2 dependiente de efrinaA1.

45 Los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2 son, por lo tanto, únicos entre todos los anticuerpos anti-EphA2 conocidos, ya que inhiben eficazmente la señalización intracelular de EphA2 estimulada por efrinaA1.

Ejemplo 5

Inhibición del crecimiento y supervivencia, estimulados por suero, de células tumorales humanas por los anticuerpos 37.3D7 y 53.2H11

50 Se analizaron diferentes líneas celulares tumorales humanas en condiciones libres de suero para determinar su respuesta de crecimiento y supervivencia al suero en presencia del anticuerpo 37.3D7 o 53.2H11. Se sembraron aproximadamente 3000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio regular (como sugiere la ATCC para cada línea celular) con suero, que se reemplazó al día siguiente por medio libre de suero. Después de un día de crecimiento en medio libre de suero, las células se incubaron con 15 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo 37.3D7 o el anticuerpo 53.2H11, o IgG₁ de control, seguido de la adición de suero para obtener una concentración final de 1% o 1,5% de suero. Se dejó que las células crecieran durante 3 días más. Entonces se añadió una disolución de MTT [bromuro de 3-(4,5)-dimetiltiliazol-2-il-2,3-difeniltetrazolio; 25 μl de una disolución 5 mg/ml en PBS], y las células se volvieron a poner en el incubador durante 2-3 h. El medio se eliminó entonces y se reemplazó por 100 μl de DMSO, se mezcló, y se

determinó la absorbancia de la placa a 545 nm. Diferentes líneas celulares tumorales humanas mostraron una respuesta de crecimiento y supervivencia después de la adición de suero, que fue inhibida significativamente por el anticuerpo 37.3D7 o 53.2H11. Como ejemplos, se muestran los descubrimientos con las líneas celulares tumorales de colon, HT-29, LoVo; la línea celular de tumor pancreático, CFPAC-2, BxPC3; y melanoma UACC-257.

- 5 El anticuerpo 37.3D7 inhibió fuertemente el crecimiento y supervivencia, estimulados por suero, de células de cáncer de colon humano HT-29 (FIG. 9A). En otro experimento, el anticuerpo 37.3D7 inhibió fuertemente el crecimiento y supervivencia, estimulados por suero, de células de cáncer pancreático humano BxPC3, de una manera dependiente de la dosis, con un valor de CI_{50} de 4 nM (FIG. 10A). Además, el anticuerpo 37.3D7 o 53.2H11 inhibió fuertemente el crecimiento y supervivencia, estimulados por suero, de células de cáncer de colon humano LoVo (FIG. 9B), de células de cáncer pancreático humano CFPAC-1 (FIG. 9C), y de células de cáncer de melanoma UACC-257 (FIG. 9D), y el anticuerpo 53.2H11 inhibió el crecimiento y supervivencia, estimulados por suero o EGF, de células LoVo, de una manera dependiente de la dosis, con un valor de CI_{50} de 2 nM (FIG. 10B y 10C). En la FIG. 10, los valores de DO_{545} para muestras tratadas con 0% de suero se ajustaron al 100% de inhibición, y el 0% de inhibición se ajustó utilizando muestras tratadas con 1,5% de suero o 10 ng/ml de EGF. Ninguno de los anticuerpos anti-EphA2 dados a conocer previamente tiene actividades inhibitoras sobre el crecimiento, dependiente del anclaje (monocapa), de células tumorales humanas. Por lo tanto, los anticuerpos 37.3D7 y 53.2H11 son únicos en su capacidad para inhibir el crecimiento, dependiente del anclaje (crecimiento en monocapa), de células tumorales humanas.

Ejemplo 6

- 20 Inhibición de la señalización celular mediada por VEGF, y del crecimiento y supervivencia estimulados por VEGF, de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) por el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11

Se obtuvo un fuerte desplazamiento de la fluorescencia después de la incubación de células HUVEC con el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H11 mediante análisis de FACS, lo que indica que los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 se unen a los receptores EphA2 expresados en células HUVEC. Las constantes de disociación aparentes (K_D) para la unión de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 a EphA2 en la superficie de las células se determinaron a partir de las curvas de unión establecidas con ensayos de unión de FACS realizados a diferentes concentraciones, y se muestran en la FIG. 11. Se estimó un valor de $K_D = 0,3$ nM para el anticuerpo 37.3D7 mediante regresión no lineal para la unión a un sitio (FIG. 11), que es similar al valor de K_D de la unión del anticuerpo 37.3D7 a células cancerosas humanas. De manera similar, se obtuvo un valor de $K_D = 0,01$ nM para el anticuerpo 37.1F5 y un valor de $K_D = 0,06$ nM para el anticuerpo 53.2H11. Esto indica que los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 se unen específicamente a las células HUVEC a través del receptor EphA2.

El anticuerpo 37.3D7 inhibió fuertemente el crecimiento y supervivencia de HUVEC inducidos por VEGF. La actividad es similar o mejor que la de Avastin®, un anticuerpo bloqueante anti-VEGF (Genentech) (FIG. 12). Un anticuerpo agonista anti-EphA2 no inhibió el crecimiento y supervivencia de HUVEC inducidos por VEGF (FIG. 12). En la FIG. 12, las células HUVEC se hicieron crecer en medio EBM-2 con suero y suplementos de células endoteliales (EC) (Clonetics) durante 3 días. Las células se cultivaron en medio libre de suero más suplementos de crecimiento de EC que carece de VEGF, durante 12-14 h. Después de estar sin suero, las células se estimularon con 5 ng/ml de VEGF más 0,4% de suero con o sin los anticuerpos indicados (100 μ g/ml). Los efectos de los anticuerpos sobre el crecimiento y supervivencia de las células HUVEC inducidos por VEGF se determinaron 3 días después de la adición de los anticuerpos y VEGF utilizando el ensayo de MTT como se describe en el Ejemplo 5. El porcentaje de inhibición del crecimiento y supervivencia mediados por VEGF por los anticuerpos se muestra en la FIG. 12. Los valores de DO_{545} para las muestras tratadas con vehículo se ajustaron al 0% de inhibición, y el 100% de inhibición se ajustó utilizando muestras que carecen de VEGF.

El hecho de que el tratamiento de células HUVEC con el anticuerpo 37.3D7 inhiba la señalización intracelular del receptor EphA2 se mostró midiendo la inhibición de la fosforilación de sus efectores aguas abajo, tal como Akt.

- 45 La inhibición es similar a la de Avastin®, un anticuerpo bloqueante anti-VEGF (Genentech) (FIG. 13). El anticuerpo agonista anti-EphA2 no inhibió la fosforilación de Akt inducida por VEGF en las células HUVEC. En la FIG. 13, las células HUVEC se pusieron durante 12-14 h en medio libre de suero más suplementos de EC que carece de VEGF. Las células se trataron con anticuerpos (20 μ g/ml) durante 1 h antes de la adición de VEGF (100 ng/ml). Las células se lisaron 15 min después de la adición de VEGF, y las inmunotransferencias se sondaron con los anticuerpos indicados.

50 Ejemplo 7

Supresión del crecimiento del xenoinjerto de cáncer de colon humano HT-29 en ratones por el anticuerpo 37.3D7 (FIG. 14)

Se establecieron xenoinjertos de cáncer de colon humano HT-29 en ratones SCID mediante inyección subcutánea de 2×10^6 células HT-29. Cuando los ratones mostraron xenoinjertos de tumores HT-29 palpables (50 mm³), se trataron con el anticuerpo 37.3D7 o con un anticuerpo de control (IgG₁) (1 mg/ratón, i. v., dos veces por semana) o con PBS sola (100 μ l/ratón, i. v., dos veces por semana). El crecimiento de los tumores se ralentizó significativamente por el tratamiento con el anticuerpo 37.3D7, comparado con un tratamiento con el anticuerpo de control o PBS sola. No se

observó toxicidad del anticuerpo 37.3D7, en base a determinaciones de los pesos de los ratones.

Ejemplo 8

Inhibición de metástasis mamarias tempranas MDA-MB-231 por el anticuerpo anti-EphA2 hu53.2H11

5 Se evaluó la actividad anti-tumoral del anticuerpo anti-EphA2 hu532H11 a nivel de una dosis frente a tumor mamario temprano MDA-MB-231 implantado subcutáneamente en ratones SCID hembra. También se investigó el efecto de este anticuerpo en la invasión del tumor MDA-MB-231 en los ganglios linfáticos axial e inguinal superficiales. Para llevar esto a cabo, se administró hu532H11 a 40 mg/kg/adm mediante vía iv, en los días 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 y 26 después del implante del tumor. El grupo de control no se trató.

10 Para la evaluación de la actividad anti-tumoral de hu532H11, los animales se pesaron diariamente y los tumores se midieron 2-3 veces por semana mediante un calibre. Los pesos de los tumores se calcularon utilizando la fórmula: masa (mg) = [longitud (mm) x anchura (mm)²]/2. La actividad antitumoral se evaluó según 3 criterios: 1) incluyendo T/C, definido como el peso mediano del tumor (mg) de un grupo tratado dividido entre el peso mediano del tumor del control no tratado; 2) la determinación del retraso del crecimiento tumoral (T-C), en el que T se define como el tiempo mediano en días requerido para que los tumores del grupo de tratamiento alcancen 750 mg, y C es el tiempo mediano para que los tumores del grupo de control alcancen el mismo tamaño, y 3) la muerte de la célula tumoral se define como log₁₀ de la muerte celular (bruto) = [valor de T-C en días]/(Td x 3,32). T-C se ha definido anteriormente, y Td es el tiempo en el que el volumen del tumor se duplica, en días, de los tumores del control, que se estima a partir de la línea recta mejor ajustada a partir de una gráfica logarítmica de crecimiento lineal de los tumores del grupo de control en crecimiento exponencial (intervalo 100-1.000 mg).

20 En un estudio paralelo, los animales se trataron como se ha descrito anteriormente, y en el día 28, después del implante del tumor, todos los ratones se sacrificaron y se recogieron los ganglios linfáticos axilares e inguinales (tamaño tumoral mediano en el grupo de control = 1558 mg). Se utilizó el anticuerpo humano Ki67 para identificar específicamente mediante inmunotinción las células tumorales MDA-MB-231 en los ganglios linfáticos. El área superficial de las metástasis en los ganglios linfáticos se calculó (media de 2 secciones) como S = área superficial de Ki67 humano x 100 / área superficial del ganglio linfático.

- Eficacia en tumor primario:

hu532H11 se toleró bien a 40 mg/kg/adm (dosis total 320 mg/kg) con un cambio de +8,9% en el peso corporal en el día 27. Esta dosis retrasó el crecimiento tumoral del tumor primario (T/C = 27% y 1,0 log de muerte celular bruta), incluso aunque el tumor no respondió a terapia.

- Actividad anti-metastásica:

hu532H11 indujo una reducción de la superficie de las metástasis (> 50 %) tanto en los ganglios linfáticos axilares como inguinales.

35 En conclusión, en ratones que portan tumor mamario MDA-MB-231, hu532H11 retrasa el crecimiento del tumor primario tratado en una etapa temprana del desarrollo del tumor (T/C = 27% y 1,0 log de muerte celular bruta), y reduce la superficie de las metástasis (> 50 %) tanto en los ganglios linfáticos axilares como inguinales.

40 En otro estudio, la actividad de un anticuerpo anti-EphA2 puede evaluarse en el modelo de "metástasis" de hígado de cáncer de colon humano HT29. El anticuerpo murino anti-EphA2 53.2H11 se administra iv, dos veces por semana, desde el día 4 después del implante intraesplénico de células HT29 en ratones SCID hembra (n = 20 ratones por grupo para animales que no portan tumores (NTBA), tratados y de control). En el día 50, 3 días después de la 13^a administración de anti-EphA2, los ratones se necropsiaron, y sus bazo e hígados se pesaron para evaluar la masa tumoral en el sitio del tumor primario (bazo) o en el sitio de la metástasis (hígado). También se evaluó el número de metástasis. Los datos se analizaron utilizando herramientas estadísticas conocidas por el experto en la técnica.

- El tratamiento con anti-EphA2 a 40 mg/kg/iny (dosis total de 520 mg/kg) se tolera bien.

45 • Peso del tumor primario (bazo): Se observa una diferencia significativa en el peso del bazo entre los ratones NTBA y de control implantados, siendo mayor el de estos últimos. No existe una diferencia significativa entre el peso del bazo de los ratones de control implantados y el de los ratones tratados con anti-EphA2.

• Peso de las metástasis (hígado): el peso del hígado de los ratones de control implantados es significativamente mayor que el peso del hígado de NTBA; por otra parte, es significativamente menor en los ratones tratados con anti-EphA2 que en los ratones de control implantados.

50 • Número de metástasis hepáticas: no se observa diferencia significativa entre los ratones de control implantados y los ratones tratados con anti-EphA2.

En conclusión, el implante intraesplénico de adenocarcinoma de colon humano HT-29 induce significativamente un

incremento del peso del hígado debido a la carga metastásica tumoral. El tratamiento con anti-EphA2 es capaz de disminuir significativamente la carga metastásica tumoral, como se observa por la reducción del peso del hígado de los ratones implantados, sin verse afectado el número de metástasis contadas en el hígado.

Ejemplo 9

5 Clonación y secuenciación de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 37.1F5.

Preparación de ARN a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo 37.1F5

Las preparaciones de ARN total se obtuvieron a partir de 5×10^6 células de hibridoma, que producen anticuerpo 37.1 F5, utilizando el kit RNeasy miniprep de Qiagen. Brevemente, se peletizaron 5×10^6 células y se resuspendieron en 350 μ l de amortiguador RLT (que contiene 1% de β -mercaptoetanol). La suspensión se homogeneizó haciéndola pasar a través de una aguja y jeringa de calibre 21,5 aproximadamente 10 - 20 veces, o hasta que dejó de ser viscosa. Se añadió etanol (350 μ l de etanol acuoso al 70%) al homogenado, que se mezcló bien. La disolución se transfirió a una columna de centrifugado, colocada en un tubo de recogida de 2 ml, y se centrifugó a $>8000 \times g$ durante 15 segundos. La columna se lavó dos veces con 500 μ l de amortiguador RPE, después se transfirió a un tubo nuevo y se eluyó con 30 μ l de agua libre de RNasa y una centrifugación de 1 minuto. El eluato (30 μ l) se colocó de nuevo en la columna para un segundo centrifugado de elución de 1 minuto. Una alícuota del eluato de 30 μ l se diluyó con agua y se utilizó para determinar la absorción de UV a 260 nm para la cuantificación del ARN.

Preparación de ADNc con la reacción de la transcriptasa inversa (RT)

El ADNc de la región variable del anticuerpo 37.1F5 se generó a partir del ARN total utilizando el kit SuperscriptII de Invitrogen. Se siguieron exactamente los protocolos del kit, utilizando hasta 5 μ g de ARN total de las mini prep de Qiagen. Brevemente, el ARN, 1 μ l de cebadores aleatorios y 1 μ l de mezcla de dNTP se llevaron hasta 12 μ l con agua destilada estéril libre de RNasa, y se incubaron a 65 °C durante 5 minutos. La mezcla se puso en hielo durante al menos 1 minuto. Después, se añadieron 4 μ l de amortiguador de reacción 5 x, 2 μ l de DTT 0,1 M, y 1 μ l de RNasaOUT, y la mezcla se incubó a 25 °C durante 2 minutos en un termociclador MJ Research. El termociclador se detuvo de manera que se pudo añadir 1 μ l de enzima SuperscriptII, y entonces se volvió a poner en marcha durante 10 minutos adicionales a 25 °C antes de cambiar a 55 °C durante 50 minutos. La reacción se inactivó con calor calentándola hasta 70 °C durante 15 min, y el ARN se eliminó por adición de 1 μ l de RNasa H e incubando a 37 °C durante 20 minutos.

Reacciones de PCR degenerada

El procedimiento para la primera ronda de reacción de PCR degenerada en el ADNc obtenido a partir de células de hibridoma se basó en los métodos descritos en Wang et al. (2000; J Immunol Methods.; 233(1-2):167-77) y Co et al. (1992; J Immunol.; 148(4):1149-54). Los cebadores para esta ronda (Tabla 2) contienen sitios de restricción para facilitar la clonación en los plásmidos pBluescriptII.

Los componentes de la reacción de PCR (Tabla 3) se mezclaron en hielo en tubos de PCR de paredes finas, y después se transfirieron a un termociclador MJ research precalentado y detenido a 94 °C. Las reacciones se realizaron utilizando un programa obtenido de Wang et al. (2000; J Immunol Methods.; 233(1-2):167-77), como sigue:

Nombre: Wang45

- 1) 94°C 3:00 min
- 2) 94°C 0:15 seg
- 3) 45°C 1:00 min
- 4) 72°C 2:00 min
- 5) Ir a 2 29 veces
- 6) 72°C 6:00 min
- 7) 4°C hasta el final
- 8) final

Las mezclas de la reacción de PCR se llevaron entonces a un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, las bandas de 300 a 400 pb se escindieron, se purificaron utilizando mini columnas de ADN de Zymo, y se mandaron a

Agencourt Biosciences para la secuenciación. Los cebadores de PCR 5' y 3' respectivos se utilizaron como cebadores de secuenciación para generar los ADNc de la región variable de 37.1F5 a partir de ambas direcciones.

Clonación de la secuencia del extremo 5'

Debido a que los cebadores degenerados utilizados para clonar las secuencias de ADNc de la región variable de la cadena ligera y pesada de 37.1F5 alteran las secuencias del extremo 5', se necesitaron trabajos de secuenciación adicionales para descifrar las secuencias completas. La secuencia de ADNc preliminar obtenida mediante los métodos descritos anteriormente se utilizó para buscar en el sitio NCBI IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) las secuencias de la línea germinal murina de las que se deriva la secuencia de 37.1 F5. Se diseñaron cebadores de PCR (Tabla 4) para hibridar con la secuencia líder del anticuerpo murino, de manera que una nueva reacción de PCR pudiera proporcionar el ADNc completo de la región variable, sin alteraciones debidas a los cebadores de PCR. Las reacciones de PCR, las purificaciones de las bandas y la secuenciación se realizaron como se ha descrito anteriormente. Las secuencias de la línea germinal de las que probablemente derivan la cadena ligera y la cadena pesada de mu37.1F5 son accesibles con los números de registro de Genbank MUSIGKVR3 y AF303839, respectivamente.

15 Análisis peptídico para la confirmación de la secuencia

La información de la secuencia de ADNc de la región variable se combinó con la secuencia de la región constante de la línea germinal para obtener secuencias de ADNc del anticuerpo de longitud completa. Los pesos moleculares de la cadena pesada y de la cadena ligera se calcularon entonces y se compararon con los pesos moleculares obtenidos mediante análisis de LC/MS del anticuerpo murino 37.1F5.

20 La Tabla 5 proporciona la masa calculada de las secuencias de ADNc de LC y HC de 37.1F5, junto con los valores determinados mediante LC/MS. Las determinaciones del peso molecular son consistentes con las secuencias de ADNc tanto de la cadena ligera como pesada de 37.1 F5.

Se utilizó esencialmente el mismo método para clonar las cadenas ligera y pesada de 37.3D7 y 53.2H11. Los números de registro de Genbank de las secuencias de la línea germinal de las que probablemente derivan la cadena ligera y la cadena pesada de 37.3D7 son, respectivamente, MMU231217 y AF303868. Para 53.2H11, son respectivamente MMU231196 y AF303833; para EphA2-N1, K02161 y J00488 respectivamente; y para EphA2-N2, AJ231222 y J00488 respectivamente.

Ejemplo 10

30 Inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan EphA2 por 37.3D7-SPDB-DM4 humanizado y 53.2H11-SPDB-DM4 humanizado

Los anticuerpos 37.3D7 humanizado y 53.2H11 humanizado se conjugaron con L-DM4 N² desacetil-N² (4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina utilizando el conector SPDB (éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-[2-piridilditio]butanoico). Brevemente, el anticuerpo se modificó a 8 mg/ml con un exceso molar de 5,5 o 6,5 veces de SPDB para hu53.2H11 y hu37.3D7 respectivamente. La reacción se llevó a cabo en el Amortiguador A (50 mM KP/50 mM NaCl/2 mM EDTA, pH 6,5, 95% v/v) con EtOH (5% v/v) durante 90 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo modificado se purificó entonces mediante una columna desaladora SephadexG25 con el Amortiguador A. Después, el anticuerpo modificado se hizo reaccionar con un exceso molar de 1,7 veces de DM4 sobre el conector SPDB. La reacción se llevó a cabo a 2,5 mg/ml del anticuerpo en el Amortiguador A (97% v/v) y DMA (dimetilacetamida, 3% v/v) a temperatura ambiente durante 20 horas. El conjugado se purificó mediante una columna desaladora SephadexG25 con 10 mM Histidina, 130 mM Glicina, 5% de sacarosa, pH 5,5. La relación del fármaco al anticuerpo fue 4,0 para hu37.3D7-SPDB-DM4 y 3,1 para hu53.2H11-SPDB-DM4.

Los efectos de hu37.3D7-SPDB-DM4 y hu53.2H11-SPDB-DM4 sobre el crecimiento de células tumorales que expresan EphA2 se ensayó en primer lugar utilizando el ensayo de proliferación celular *in vitro* WST-8 ((2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) (nº de catálogo CK04-11, Dojindo Molecular Technologies, Inc). Se analizaron numerosas líneas celulares tumorales. Se sembraron aproximadamente 2000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio regular (como sugiere la ATCC para cada línea celular) con 10% de suero en presencia de diferentes concentraciones de hu37.3D7-SPDB-DM4 o hu53.2H11-SPDB-DM4. Se dejó que las células crecieran durante 5 días. Se añadió una disolución de WST-8 [20 µl de disolución], y las células se volvieron a poner en el incubador durante 2-3 h. La absorbancia de la placa se determinó a 450 nm y 650 nm. En los experimentos se utilizaron dos grupos de control. 0% de supervivencia es el control sólo con el medio. 100% de supervivencia es el control sólo con las células. Para el análisis de los datos, en primer lugar se restaron los valores de A650 nm (longitud de onda de referencia) de los valores de A450 nm correspondientes. Después, los valores de A450 nm de cada muestra se normalizaron restando de los valores de A450 nm el control de fondo (sólo medio). Las fracciones supervivientes se calcularon mediante los valores de A450 normalizados de las muestras divididos entre los valores de A450 normalizados de los controles sólo con células (100% de supervivencia-0% de supervivencia). Los valores de log [Ab-DM4] se representaron en el eje de las x, y las fracciones supervivientes se representaron en el eje y.

Hu37.3D7-SPDB-DM4 y hu53.2H11-SPDB-DM4 inhibieron significativamente el crecimiento de células tumorales humanas que expresan EphA2, incluyendo células de tumor de próstata PC3, células de tumor de mama MDA-MDA-MB-231, células de melanoma WM-115, células de melanoma A375, y células de tumor de colon LoVo. Como ejemplo, se muestran los hallazgos con las células de tumor de próstata PC3. El hu37.3D7-SPDB-DM4 o hu53.2H11-SPDB-DM4 inhibió fuertemente el crecimiento de las células PC3 de una manera dependiente de la dosis, con un valor de CI_{50} similar de 0,02 nM (FIG. 15A y 15B). La potencia de los conjugados estuvo correlacionada con los niveles de expresión de EphA2. Se requirió una concentración 50 veces mayor de hu37.3D7-SPDB-DM4 o hu53.2H11-SPDB-DM4 para inhibir el crecimiento de las células SK-Mel28 (valores de CI_{50} : 1,3 nM y >5 nM, respectivamente; FIG. 15A y 15B), que expresaron un nivel casi indetectable de EphA2 en la superficie celular (determinado mediante datos de FACS no mostrados) (FIG. 15A y 15B). Por lo tanto, los resultados de los ensayos de inhibición del crecimiento *in vitro* demostraron la capacidad de los conjugados de anticuerpo antagonista anti-EphA2 para inhibir específicamente el crecimiento de líneas celulares tumorales que expresan EphA2.

Se analizaron los efectos de hu37.3D7-SPDB-DM4 y hu53.2H11-SPDB-DM4 sobre el crecimiento de xenoinjertos tumorales que expresan EphA2. Se muestra como ejemplo un estudio utilizando el modelo de xenoinjerto de tumor de mama MDA-MB-231. Los xenoinjertos de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se establecieron en ratones SCID hembra CB17 de 5 semanas de edad mediante inyección subcutánea de 1×10^7 células MDA-MB-231. Cuando los xenoinjertos de tumores MDA-MB-231 estaban establecidos (tamaño promedio de 83 mm³), los ratones se trataron con una única inyección i.v. de hu3D7-SPDB-DM4 o hu2H11-SPDB-DM4 o PBS. Las dosis de los anticuerpos fueron 15 mg/kg de peso corporal del ratón, 7,5 mg/kg de peso corporal del ratón y 3,25 mg/kg de peso corporal del ratón. Los crecimientos de los tumores MDA-MB-231 se inhibieron completamente por los conjugados de anticuerpo hu3D7-SPDB-DM4 o hu2H11-SPDB-DM4 a todas las concentraciones ensayadas, excepto a 3,25 mg/kg de hu2H11-SPDB-DM4, lo que muestra el retraso marcado del crecimiento de las células tumorales con respecto al control de PBS (FIG. 16A y 16B). Los volúmenes medianos de los tumores en cada grupo (6 ratones por grupo) se muestran en las FIG. 16A y B. En resumen, tanto hu3D7-SPDB-DM4 como hu2H11-SPDB-DM4 tienen *in vivo* potentes actividades inhibitoras del crecimiento de tumores que expresan EphA2. No se observaron toxicidades de ninguno de los conjugados de anticuerpo, en base a las determinaciones del peso corporal.

TABLAS

Tabla 1A:

Los restos de superficie del marco de la cadena ligera de mu37.3D7 y los restos correspondientes en la misma posición de Kabat en el anticuerpo humano 28E4. Los restos que son diferentes, y que por lo tanto están cambiados en el anticuerpo hu37.3D7, están en recuadros sombreados.

Restos Superficiales del Marco de la Cadena Ligera de mu37.3D7 y Restos Correspondientes en el Anticuerpo Humano 28E4		
Posición de Kabat	mu37.3D7	28E4
1	Q	E
3	V	V
5	T	T
9	A	A
10	I	T
15	L	P
18	R	R
40	P	P
41	G	G
57	G	G
60	A	A
67	S	S
80	S	S
81	E	E

ES 2 673 822 T3

100	S	G
107	K	K
108	R	R

Tabla 1B:

Los restos de superficie del marco de la cadena pesada de mu37.3D7 y los restos correspondientes en la misma posición de Kabat en el anticuerpo humano 28E4. Los restos que son diferentes, y que por lo tanto están cambiados en el anticuerpo hu37.3D7, están en recuadros sombreados. Los restos con asterisco (*) están retromutados al resto de mu37.3D7 en una o más variantes de hu37.3D7.

5

Restos Superficiales del Marco de la Cadena Pesada de mu37.3D7 y Restos Correspondientes en el Anticuerpo Humano 28E4		
Posición de Kabat	mu37.3D7	28 ^E 4
1	Q	Q
3	Q	Q
5	Q	V
9	S	A
11	L	V
13	R	K
14	P	P
15	G	G
19	Q	K
23	K	K
28*	S*	N*
41	P	P
42	G	G
43	Q	Q
61	E	Q
62	K	K
64	M	Q
65	N	G
73	T	T
74*	Y*	S*
75	S	T
82B	S	S
84	S	S
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

Tabla 2:

Los cebadores utilizados para las reacciones de PCR degenerada se basan en los que aparecen en Wang et al., 2000, excepto HindKL (SEQ ID NO: 58), que se basa en Co et al. 1992. Las bases mixtas se definen como sigue: H=A+T+C, S=g+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+g,	
W=A+T, V = A+C+G.	
Cebador	Secuencia
BamI _g G1 (SEQ ID NO: 53)	GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
I _g G2A _{bam} (SEQ ID NO: 54)	GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
EcoMH1 (SEQ ID NO: 55)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
EcoMH2 (SEQ ID NO: 56)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
SacI _{MK} (SEQ ID NO: 57)	GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
HindKL (SEQ ID NO: 58)	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTG GTGC

Tabla 3:

Las mezclas de la reacción de PCR de la cadena ligera y pesada para la clonación de las secuencias de ADNc de la región variable de 37.1 F5	
<p>Mezcla de Reacción de la Cadena Ligera</p> <p>5 µl de amortiguador de reacción de PCR 10 X (Roche)</p> <p>4 µl de mezcla de dNTP 10mM (2,5 mM cada uno)</p> <p>2 µl de Molde (reacción de RT)</p> <p>5 µl de cebador izquierdo Sac1MK 10 µM</p> <p>5 µl de cebador derecho HindKL 10 µM</p> <p>5 µl de DMSO</p> <p>0,5 µl de Taq Polimerasa (Roche)</p> <p><u>23,5 µl</u> de H₂O destilada estéril</p>	<p>Mezcla de Reacción de la Cadena Pesada</p> <p>5 µl de amortiguador de reacción de PCR 10 X (Roche)</p> <p>4 µl de mezcla de dNTP 10 mM (2,5mM cada uno)</p> <p>2 µl de Molde (reacción de RT)</p> <p>2,5 µl de cebador izquierdo EcoMH1 10 µM</p> <p>2,5 µl de cebador izquierdo EcoMH2 10 µM</p> <p>5 µl de cebador derecho BamI_gG1 10 µM</p> <p>5 µl de DMSO</p> <p>0,5 µl de Taq Polimerasa (Roche)</p> <p><u>23,5 µl</u> de H₂O destilada estéril</p>
50 µl Total	50 µl Total

Tabla 4:

Los cebadores de la secuencia líder murina del extremo 5' utilizados para de reacciones de PCR de la segunda ronda de 37.1F5. Los cebadores del extremo 3' son idénticos a los utilizados en las reacciones de la primera ronda, ya que ceban las secuencias respectivas de la región constante.	
Cebador	Secuencia
Cadena ligera 38SB13 LC Líder (SEQ ID NO: 59)	GACAGACACACTCCTGCTATGGG
Cadena pesada 5F85 HC Líder (SEQ ID NO: 60)	GCAGAATTCATGGGATGGAGCYGGATCTTTCT

Tabla 5:

Los pesos moleculares del ADNc calculados y determinados por LC/MS de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo murino 37.1 F5.						
	Cadena ligera			Cadena pesada		
	ADNc	LC/MS	Diferencia	ADNc	LC/MS	Diferencia
37.1F5	24031 Da	24029 Da	2 Da	49316 Da	49333 Da	17 Da

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> SANOFI-AVENTIS
 <120> Anticuerpo antagonista para el tratamiento de cáncer
 <130> FR2006030 PCT
 5 <150> EP 06291160,7
 <151> 2006-07-18
 <160> 80
 <170> PatentIn version 3,3
 <210> 1
 10 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 1
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 15 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 2
 Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Met
 1 5 10 15
 20 Asn
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 25 <400> 3
 Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Mus sp.
 <400> 4
 Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 5
 Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser
 1 5
 5 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 6
 10 His Gln Tyr His Arg Ser Pro Gln Phe Thr
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 15 <400> 7
 Gly Tyr Thr Met Asn
 1 5
 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Mus sp.
 <400> 8
 Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 9
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 9
 Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
 1 5
 30 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 10

ES 2 673 822 T3

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 11

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 12

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 12

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr

1 5

15 <210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 13

20 Ala Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

25 <400> 14

Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Glu
 1 5 10 15

Asp

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Mus sp.

<400> 15

Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 16

ES 2 673 822 T3

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 16

5 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

10 <400> 17

Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Mus sp.

<400> 18

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 19

<211> 363

20 <212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

25 <400> 19

ES 2 673 822 T3

cag gtc caa ctg caa caa cct ggg tct gaa ctg gtg agg cct gga gct 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg cag ctg tcc tgt aag gct tct ggc tac tca ttc acc agc tac 96
 Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

tgg atg cac tgg gtg aga cag agg cct gga caa ggc ctt caa tgg att 144
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

gga aat att tat cct ggt act ggt aat act aat tac gat gag aaa ttc 192
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe
 50 55 60

atg aac aag gcc aca ctg act gta gac aca tat tcc agc aca acc tac 240
 Met Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Ser Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga tgg ggg tta gta cgg tat ttc ttt gca atg gac tac tgg ggt 336
 Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe
 50 55 60

Met Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Ser Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

10 <211> 354

<212> ADN

ES 2 673 822 T3

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

5 <400> 21

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

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

10 <213> Mus sp.

<400> 22

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 673 822 T3

85

90

95

Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 23

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 23

gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act gcc tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

tac atg cac tgg gtg aag caa agt cat gta aag agt ctt gag tgg att 144
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga ctt gtt aat cct tac aat ggt ttt agt agc tac aac cag aat ttc 192
 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

gag gac aag gcc agc ttg act gta gat aag ttc tcc agc acc gcc tac 240
 Glu Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Phe Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gaa ctc cac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga gaa ttc tac ggc tac cgg tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg 336
 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 100 105 110

10 acc gcg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus sp.

15 <400> 24

ES 2 673 822 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Glu Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Phe Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 100 105 110
 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25

5 <211> 333

<212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(333)

<400> 25

caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cta ggg	48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
gaa cgg gtc acc atg acc tgc act gtc agc tca agt gtg aat tcc agt	96
Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser	
20 25 30	
tac ttg cac tgg tac cag cag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg	144
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp	
35 40 45	
att tat agc aca tcc aac ctg cct tct gga gtc cca gct cgc ttc agt	192
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser	
50 55 60	
ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc acc ata gag	240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu	
65 70 75 80	
tct gaa gat gct gcc act tat tac tgt cac cag tat cat cgt tcc cca	288
Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro	
85 90 95	
caa ttc acg ttc gcc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa cgg gct	333
Gln Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala	
100 105 110	

<210> 26

ES 2 673 822 T3

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 26

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
20 25 30

5 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

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

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

Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
85 90 95

Gln Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105 110

<210> 27

<211> 336

10 <212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

15 <400> 27

ES 2 673 822 T3

gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat act ttt 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

ggc tat agt ttt ata tac tgg tac cag cag aag cca gga cag cca ccc 144
 Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc 192
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gac ttc acc ctc acc att aat 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa agt aat 288
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

gag gat cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg 336
 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 28

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

10 <210> 29

<211> 339

<212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

15 <221> CDS

ES 2 673 822 T3

<222> (1)..(339)

<400> 29

gat gtt gtg atg tcc cag att cca ctc act ttg tcg gtc acc att gga	48
Asp Val Val Met Ser Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly	
1 5 10 15	
caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc ata cat agt	96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser	
20 25 30	
gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct	144
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
cca aag cgc cta att tat ctg gtg tct aga ctg gac tct gga gtc cct	192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc	240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	
agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly	
85 90 95	
tca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa	336
Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	
cgg	339
Arg	

<210> 30

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 30

Asp Val Val Met Ser Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95
Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

10 Arg

<210> 31

<211> 363

- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado
- 5 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(363)
- <220>
- <221> fuente
- 10 <222> (1)..(90)
- <223> homo sapiens
- <220>
- <221> fuente
- <222> (91)..(105)
- 15 <223> Mus sp.
- <220>
- <221> fuente
- <222> (106)..(147)
- <223> homo sapiens
- 20 <220>
- <221> fuente
- <222> (148)..(192)
- <223> Mus sp.
- <220>
- 25 <221> fuente
- <222> (193)..(294)
- <223> homo sapiens
- <220>
- <221> fuente
- 30 <222> (295)..(330)
- <223> Mus sp.
- <220>
- <221> fuente
- <222> (331)..(363)
- 35 <223> homo sapiens
- <400> 31

ES 2 673 822 T3

cag gtt cag ctt gtc cag cct gga gct gaa gtg gta aag cca gga gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tct gtg aag ctc tct tgt aaa gca agc ggc tac aac ttc acc agc tat 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

tgg atg cac tgg gtg cgt cag cgt ccc ggc cag gga ctc cag tgg ata 144
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

ggc aac atc tac ccc ggc acc ggt aat aca aac tat gac cag aag ttc 192
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

caa ggc aag gct acc ctt aca gtt gac acc tct acc agc act act tat 240
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

atg caa ttg tcc agc ctg act agc gag gat tcc gcc gtg tat tat tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcc agg tgg ggc ctt gtt agg tac ttc ttc gct atg gat tac tgg ggg 336
 Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

cag ggt act agc gtt aca gtt tcc agt 363
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 32

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 33

<211> 363
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
5 <223> Anticuerpo humanizado
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)
<220>
10 <221> fuente
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens
<220>
<221> fuente
15 <222> (91)..(105)
<223> Mus sp.
<220>
<221> fuente
<222> (106)..(147)
20 <223> homo sapiens
<220>
<221> fuente
<222> (148)..(192)
<223> Mus sp.
25 <220>
<221> fuente
<222> (193)..(294)
<223> homo sapiens
<220>
30 <221> fuente
<222> (295)..(330)
<223> Mus sp.
<220>
<221> fuente
35 <222> (331)..(363)
<223> homo sapiens
<400> 33

ES 2 673 822 T3

cag gtg cag ctc gtc cag ccc ggt gcc gaa gtg gtg aaa ccc ggt gct 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tct gtg aag ctg tca tgc aag gcc tca ggc tat agt ttc acc tca tat 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

tgg atg cat tgg gtc cgc cag agg cca ggc cag ggc ctc caa tgg atc 144
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

gga aac atc tac cct ggc aca gga aat acc aat tat gac cag aaa ttc 192
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

caa ggt aag gcc act ctg acc gtg gac act agc aca tca acc aca tac 240
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

atg cag ctg tct tct ctc act tca gaa gac agt gct gtc tac tac tgc 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca cga tgg ggc ctc gtt cgt tat ttc ttc gca atg gat tat tgg ggt 336
 Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

caa ggc aca tca gtt acc gtg tcc tct 363
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 34

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 35

<211> 363
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
5 <223> Anticuerpo humanizado
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)
<220>
10 <221> fuente
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens
<220>
<221> fuente
15 <222> (91)..(105)
<223> Mus sp.
<220>
<221> fuente
<222> (106)..(147)
20 <223> homo sapiens
<220>
<221> fuente
<222> (148)..(192)
<223> Mus sp.
25 <220>
<221> fuente
<222> (193)..(294)
<223> homo sapiens
<220>
30 <221> fuente
<222> (295)..(330)
<223> Mus sp.
<220>
<221> fuente
35 <222> (331)..(363)
<223> homo sapiens
<400> 35

ES 2 673 822 T3

cag gtg cag ctg gtg cag ccc ggg gct gag gtg gta aag cca gga gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

agt gtg aag ttg tcc tgc aag gcc tcc ggg tac aat ttc acc tct tac 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

tgg atg cat tgg gtg cgt cag cgg cct ggg caa gga ctt caa tgg atc 144
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

ggg aat att tac ccc ggt acc ggc aat aca aat tat gat cag aag ttc 192
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

cag ggc aag gct aca ttg acc gtg gat acc tac act tct act act tac 240
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

atg caa ctg agc tca ctg acc tcc gag gac tca gcc gtg tac tat tgc 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca cgc tgg gga ctc gtc agg tat ttc ttt gcc atg gat tac tgg gga 336
 Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

cag ggg acc tct gtc acc gtg agc agt 363
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 36

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 37

ES 2 673 822 T3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Anticuerpo humanizado

<400> 37

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

Ser Met Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Asp Ser Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38

<211> 118

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<400> 38

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

Ser Met Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

15 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

ES 2 673 822 T3

35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Asp Ser Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(357)

<220>

<221> fuente

<222> (1)..(90)

<223> homo sapiens

15 <220>

<221> fuente

<222> (91)..(105)

<223> Mus sp.

<220>

20 <221> fuente

<222> (106)..(147)

<223> homo sapiens

<220>

<221> fuente

25 <222> (148)..(195)

<223> Mus sp.

<220>

<221> fuente
 <222> (196)..(294)
 <223> homo sapiens
 <220>

5 <221> fuente
 <222> (295)..(324)
 <223> Mus sp.
 <220>
 <221> fuente

10 <222> (325)..(357)
 <223> homo sapiens
 <400> 39

cag	gtg	caa	ctg	gtg	caa	tcc	ggt	gcc	gag	gtc	gtc	aaa	ccc	gga	gca	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tct	gtg	aag	ata	tcc	tgt	aag	gcc	tcc	ggc	tac	act	ttt	aca	gcc	tac	96
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ala	Tyr	
			20					25					30			
tat	atg	cat	tgg	ggt	aaa	cag	agt	ccc	gtg	cag	tcc	ctg	gaa	tgg	atc	144
Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Val	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35				40						45				
ggc	ttg	gtg	aac	cct	tat	aac	gga	ttc	tca	agt	tac	aat	caa	aag	ttt	192
Gly	Leu	Val	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Phe	Ser	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
cag	ggc	aag	gct	tcc	ctg	act	gta	gac	aag	agc	agt	tcc	aca	gcc	tac	240
Gln	Gly	Lys	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70				75					80		
atg	gag	ctc	cat	tca	ctg	aca	tca	gaa	gac	agc	gcc	gta	tac	tat	tgc	288
Met	Glu	Leu	His	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gca	cgt	gag	ttc	tac	ggc	tat	aga	tac	ttt	gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggc	336
Ala	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
aca	gcc	gtc	aca	gtg	agc	tct										357
Thr	Ala	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115													

15 <210> 40
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

20 <223> Construcción sintética
 <400> 40

ES 2 673 822 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223>, Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(357)

<220>

<221> fuente

<222> (1)..(90)

<223> homo sapiens

15 <220>

<221> fuente

<222> (91)..(105)

<223> Mus sp.

<220>

20 <221> fuente

<222> (106)..(147)

<223> homo sapiens

<220>

<221> fuente

ES 2 673 822 T3

<222> (148)..(195)
 <223> Mus sp.
 <220>
 <221> fuente

5 <222> (196)..(294)
 <223> homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> (295)..(324)

10 <223> Mus sp.
 <220>
 <221> fuente
 <222> (325)..(357)
 <223> homo sapiens

15 <400> 41

cag gtc cag ttg gtg cag tct gga gca gag gtt gtg aaa cca ggc gca	48
Gln Val Gln Leu Val 5 Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	
1	
agt gtc aaa atc agc tgt aag gct agc gga tac tcc ttt aca gca tat	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr	
20	
25	
30	
tat atg cac tgg gtg aag cag agc cct gtt cag agc ctg gaa tgg atc	144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile	
35	
40	
45	
ggc ctc gtc aac cct tat aat gga ttt tct tct tat aac caa aag ttc	192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	
50	
55	
60	
cag ggc aaa gcc agc ctg aca gtg gat aag agt agc agc act gcc tat	240
Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65	
70	
75	
80	
atg gaa ctg cat tct ctc acc tct gaa gat agt gca gtg tac tat tgt	288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85	
90	
95	
gct cgc gag ttc tac ggt tat cga tat ttc gac gtg tgg ggc cag ggt	336
Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly	
100	
105	
110	
act gcc gtg aca gta agc agt	357
Thr Ala Val Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 42
 <211> 119
 <212> PRT

20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 42

ES 2 673 822 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<400> 43

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 44

<211> 357

- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado
- 5 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(357)
- <220>
- <221> fuente
- 10 <222> (1)..(90)
- <223> homo sapiens
- <220>
- <221> fuente
- <222> (91)..(105)
- 15 <223> Mus sp.
- <220>
- <221> fuente
- <222> (106)..(147)
- <223> homo sapiens
- 20 <220>
- <221> fuente
- <222> (148)..(195)
- <223> Mus sp.
- <220>
- 25 <221> fuente
- <222> (196)..(294)
- <223> homo sapiens
- <220>
- <221> fuente
- 30 <222> (295)..(324)
- <223> Mus sp.
- <220>
- <221> fuente
- <222> (325)..(357)
- 35 <223> homo sapiens
- <400> 44

ES 2 673 822 T3

cag gtt caa ctg gtt cag agt ggg gca gaa gtc gta aag ccc gga gct 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tcc gtt aag att agc tgt aaa gcc tcc ggc tat agc ttt aca gct tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

tat atg cac tgg gtc aag caa tct cct ggg cag agc ctg gag tgg atc 144
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggc ctg gtc aat cca tac aat ggc ttc tct agt tac aac caa aaa ttt 192
 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

cag gga aaa gcc tcc ctt aca gta gac aag tca tct tcc act gcc tac 240
 Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gaa ctt cac tcc ctt aca agc gag gat agc gcc gtt tat tat tgt 288
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcc aga gaa ttt tac gga tat cgg tat ttc gat gtc tgg ggg cag ggg 336
 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

act gcc gtg acc gtc agt tct 357
 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 45

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

10

- <210> 46
<211> 330
<212> ADN
<213> Artificial
- 5 <220>
<223> Anticuerpo humanizado
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(330)
- 10 <220>
<221> fuente
<222> (1)..(71)
<223> homo sapiens
<220>
- 15 <221> fuente
<222> (72)..(105)
<223> Mus sp.
<220>
<221> fuente
- 20 <222> (106)..(150)
<223> homo sapiens
<220>
<221> fuente
<222> (151)..(171)
- 25 <223> Mus sp.
<220>
<221> fuente
<222> (172)..(269)
<223> homo sapiens
- 30 <220>
<221> fuente
<222> (270)..(299)
<223> Mus sp.
<220>
- 35 <221> fuente
<222> (300)..(330)
<223> homo sapiens

ES 2 673 822 T3

<400> 46

gag atc gtt ctc aca cag tca cca gcc acc atg agc gcc tct ccc ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa cga gtg acc atg act tgt aca gta tcc tcc tct gtg aac tct tct 96
 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
 20 25 30

tac ctg cat tgg tac cag cag aag cct ggt tcc agc ccc aaa ctc tgg 144
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

atc tac agt aca agc aat ctg ccc tca ggc gtt ccc gct agg ttc tcc 192
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

ggt tca ggt tct ggc act agt tac tct ctg acc atc agc acc atc gaa 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu
 65 70 75 80

tcc gaa gat gct gca aca tac tac tgt cac cag tat cac agg tcc ccc 288
 Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95

cag ttt aca ttc ggt ggc ggc acc aaa ctt gag att aag cgt 330
 Gln Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 47

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 47

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

10 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

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

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

Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95

Gln Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Artificial

ES 2 673 822 T3

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<400> 48

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

5 <210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Anticuerpo humanizado

<400> 49

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

15 <210> 50

<211> 112

ES 2 673 822 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

5 <400> 50

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

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 51

<211> 339

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CDS

15 <222> (1)..(339)

<220>

<221> fuente

<222> (1)..(69)

<223> homo sapiens

20 <220>

<221> fuente

<222> (70)..(117)

<223> Mus sp.

<220>

25 <221> fuente

ES 2 673 822 T3

<222> (118)..(162)
 <223> homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 5 <222> (163)..(183)
 <223> Mus sp.
 <220>
 <221> fuente
 <222> (184)..(279)
 10 <223> homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> (280)..(306)
 <223> Mus sp.
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> (307)..(339)
 <223> homo sapiens
 <400> 51

gac Asp 1	gtc Val	gtg Val	atg Met	aca Thr 5	caa Gln	acc Thr	cct Pro	ctg Leu	tcc Ser 10	ctg Leu	agc Ser	gtc Val	act Thr	ctg Leu 15	gga Gly	48
caa Gln	ccc Pro	gct Ala	tcc Ser 20	att Ile	agc Ser	tgc Cys	aaa Lys	tca Ser 25	tca Ser	caa Gln	tct Ser	ctc Leu	atc Ile 30	cac His	tca Ser	96
gac Asp	ggc Gly	aaa Lys 35	aca Thr	tac Tyr	ctc Leu	aat Asn	tgg Trp 40	ctg Leu	ctg Leu	cag Gln	aga Arg	cca Pro 45	gga Gly	cag Gln	tcc Ser	144
cct Pro	aaa Lys 50	agg Arg	ctt Leu	atc Ile	tac Tyr 55	ctg Leu	gtc Val	tct Ser	cgt Arg	ttg Leu	gac Asp 60	tct Ser	ggt Gly	gta Val	cca Pro	192
gac Asp 65	cgg Arg	ttt Phe	act Thr	ggt Gly	tcc Ser 70	ggg Gly	gcc Ala	gga Gly	acc Thr	gat Asp 75	ttc Phe	act Thr	ctg Leu	aag Lys	att Ile 80	240
tcc Ser	agg Arg	gtg Val	gaa Glu 85	gct Ala	gaa Glu	gat Asp	ctc Leu	gga Gly	gtg Val 90	tat Tyr	tat Tyr	tgc Cys	tgg Trp	cag Gln 95	ggc Gly	288
agc Ser	cat His	ttc Phe	ccc Pro 100	cgt Arg	act Thr	ttt Phe	ggt Gly	ggg Gly 105	ggt Gly	acc Thr	aaa Lys	ttg Leu	gaa Glu 110	att Ile	aag Lys	336
cgt Arg																339

20 <210> 52
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 673 822 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 52

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

5 Arg

<210> 53

<211> 36

<212> ADN

<213> Mus sp.

10 <400> 53

ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt ttggc 36

<210> 54

<211> 32

<212> ADN

15 <213> Mus sp.

<400> 54

ggaggatccc tgaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 55

<211> 32

20 <212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(32)

ES 2 673 822 T3

<223> las bases mixtas se definen como sigue: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 55

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

5 <210> 56

<211> 35

<212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

10 <221> característica diversa

<222> (18)..(18)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 56

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

15 <210> 57

<211> 31

<212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

20 <221> característica diversa

<222> (1)..(31)

<223> mixed bases are defined as follows: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 57

25 ggagctcgay attgtgmsa cmcarwctmc a 31

<210> 58

<211> 46

<212> ADN

<213> Mus sp.

30 <400> 58

tatagagctc aagcttggat ggtggaaga tggatacagt tgggtc 46

<210> 59

<211> 23

<212> ADN

35 <213> Mus sp.

<400> 59

gacagacaca ctctgctat ggg 23

ES 2 673 822 T3

- <210> 60
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
- 5 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(32)
 <223> las bases mixtas se definen como sigue: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T
- 10 <400> 60
 gcagaattca tgggatggag cyggatcttt ct 32
 <210> 61
 <211> 5
 <212> PRT
- 15 <213> Mus sp.
 <400> 61
 Glu Tyr Asn Met His
 1 5
 <210> 62
 <211> 17
- 20 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 62
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asn
- 25 <210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 63
- 30 Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
- 35 <400> 64

ES 2 673 822 T3

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
 1 5 10 15

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 65

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 66

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 66

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 67

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 67

Asp Tyr Asn Met His
 1 5

20 <210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 68

Phe Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 1 5 10 15

25 Asn

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

30 <400> 69

Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 70

<211> 10

ES 2 673 822 T3

<212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 70
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10
 5 <210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 71
 10 Ile Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 15 <400> 72
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 73
 <211> 360
 <212> ADN
 20 <213> Mus sp.
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)
 <400> 73
 gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gac ctg gtg aaa cct ggg gcc 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct gga tac aga ttc act gaa tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 aat atg cac tgg atg aag cag agc cat gga gag agc ctt gag tgg att 144
 Asn Met His Trp Met Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga tat att tat cct tac aat ggt gat act ggc tac agg cag aaa ttc 192
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe
 50 60
 aag aac atg gcc aca ttg act gca gac att tcc tcc aat aca gcc tac 240
 Lys Asn Met Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gaa ctc cgc agc ctg aca tct gac gac tct gca gtc tat ttc tgt 288
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 25

ES 2 673 822 T3

gca aga tgg ggc tac ggt agt ggc ggg ggg ttt act tac tgg ggc caa 336
 Ala Arg Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggg act ctg gtc act gtc tct gca 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 74

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 74

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Met Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 75

<211> 357

10 <212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

15 <400> 75

ES 2 673 822 T3

gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gag ctg gtg aaa cct ggg gcc 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct gga tac aca ttc act gac tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

aac atg cac tgg gtg aaa cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga ttt att tat cct tac aat ggt ggt act ggc tac aac cag agg ttc 192
 Gly Phe Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

aag aac aag gcc aca ttg act gta gac act tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag gtc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt 288
 Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

gca agg gga tat tac tac ggt agg cac ttt gac tac tgg ggc caa ggc 336
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc act ctc aca gtc tcc tca 357
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 76

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Phe Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 77

10 <211> 336

<212> ADN

ES 2 673 822 T3

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

5 <400> 77

```

gac att gtg ctg acc caa tct cca ggt tct ttg gct gtg tct cta ggg      48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gac act tat      96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
20 25 30

ggc aat agt ttc atg cac tgg tac cag cag aaa gca gga cag ccg ccc      144
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc      192
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gac ttc acc ctc acc att aat      240
Gly Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa agt aat      288
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

gag gat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgg      336
Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

```

<210> 78

<211> 112

10 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 78

```

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

```

<210> 79

ES 2 673 822 T3

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 79

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

10 <210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 80

ES 2 673 822 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ile Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo que se une específicamente a un receptor EphA2, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es capaz de inhibir la unión de efrinaA1 a dicho receptor, y es capaz de inhibir la fosforilación de tirosina de EphA2 en presencia de efrinaA1,

5 (i) en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 4, 5 y 6;

10 (ii) en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 7, 8 y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 10, 11 y 12;

15 (iii) en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14 y 15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17 y 18;

20 (iv) en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 61, 62 y 63, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 64, 65 y 66;

25 (v) en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 67, 68 y 69, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 70, 71 y 72; o

30 (vi) en el que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es una versión humanizada o modificada en superficie de un anticuerpo murino o fragmento de éste que se une al epítipo, y en el que dicho anticuerpo murino o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14 y 15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17 y 18.

2. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es un anticuerpo monoclonal.

35 3. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o F_v.

4. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es capaz de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa.

50 5. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es capaz de inhibir la migración de una célula cancerosa.

55 6. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado por que dicha célula cancerosa es una célula de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, un sarcoma, un glioma, cáncer de cabeza y

cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas.

7. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es capaz de inhibir la angiogénesis.

5 8. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo se une a EphA2 con una K_D de 3×10^{-10} M o menor.

9. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho receptor EphA2 es humano.

10 10. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, y en el que dicho anticuerpo o
15 fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 26.

20 11. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, y en el que dicho anticuerpo o
fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 20.

25 12. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 7, 8 y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que
30 tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 10, 11 y 12, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 28.

35 13. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 12, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 7, 8 y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que
40 tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 10, 11 y 12, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 22.

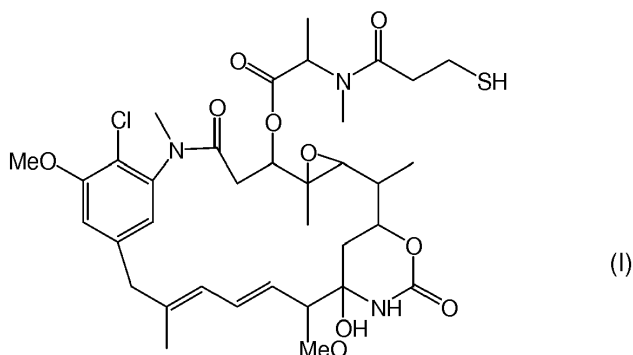
45 14. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14 y
15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17 y 18, y en el que dicho anticuerpo o
fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 30.

50 15. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 14, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14 y
15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17 y 18, y en el que dicho anticuerpo o
55 fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 24.

16. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena

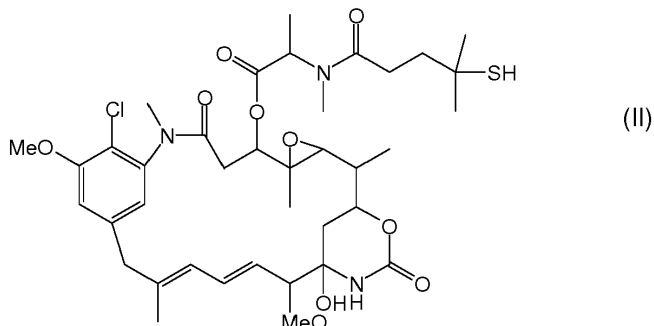
- 5 pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 61, 62 y 63, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 64, 65 y 66, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 78.
- 10 17. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 16, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 61, 62 y 63, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 64, 65 y 66, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO:74.
- 15 18. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 67, 68 y 69, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 70, 71 y 72, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 80.
- 20 19. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 18, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 67, 68 y 69, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 70, 71 y 72, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO:76.
- 25 20. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es un anticuerpo murino o fragmento de éste que se une al epítipo, y es producido por un hibridoma denominado 37.307, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7660; un hibridoma denominado 35 37.1F5, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7661; un hibridoma denominado 53.2H11, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7662; un hibridoma denominado EphA2-N1, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTM-8407; o un hibridoma denominado EphA2-N2, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTM-8408.
- 40 21. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es un anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o un fragmento de éste que se une al epítipo.
- 45 22. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 21, caracterizado por que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, y en el que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia representada por la SEQ ID NO: 47.
- 50 23. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 21 o 22, caracterizado por que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, y en el que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 32, 34 y 36.
- 55 60

24. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 21, caracterizado por que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 7, 8 y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 10, 11 y 12, y en el que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 48, 49 y 50.
25. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 21 o 24, caracterizado por que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 7, 8 y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 10, 11 y 12, y en el que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 37 y 38.
26. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 21, caracterizado por que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, es una versión humanizada o modificada en superficie de un anticuerpo murino o fragmento de éste que se une al epítipo, y en el que dicho anticuerpo murino o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14 y 15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17 y 18, y en el que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 52.
27. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 21 o 26, caracterizado por que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, es una versión humanizada o modificada en superficie de un anticuerpo murino o fragmento de éste que se une al epítipo, y en el que dicho anticuerpo murino o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14 y 15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17 y 18, y en el que dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie, o fragmento de éste que se une al epítipo, comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 40, 42, 43, y 45.
28. Un conjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-27, enlazado a un agente citotóxico.
29. El conjugado de la reivindicación 28, caracterizado por que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide, un fármaco pequeño, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina, un profármaco, un taxoide, CC-1065 y un análogo de CC-1065.
30. El conjugado de la reivindicación 28, caracterizado por que dicho agente citotóxico es la maitansina DM1 de fórmula:



31. El conjugado de la reivindicación 28, caracterizado por que dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de

fórmula:



32. El conjugado de la reivindicación 28, caracterizado por que dicho agente citotóxico es un derivado de tomamicina seleccionado del grupo que consiste en:

- 5
- 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10
- 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15
- 8,8'-[2,6-piridindiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridindiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20
- 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25
- 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - Éster terc-butílico del ácido
bis-{2-[(S)-2-metilen-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico
- 30
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 35
- 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino)-1,3-bencenodiil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiol(metilenoxi))-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 • 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10 • 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 • 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 • 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 • 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30 • 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona].

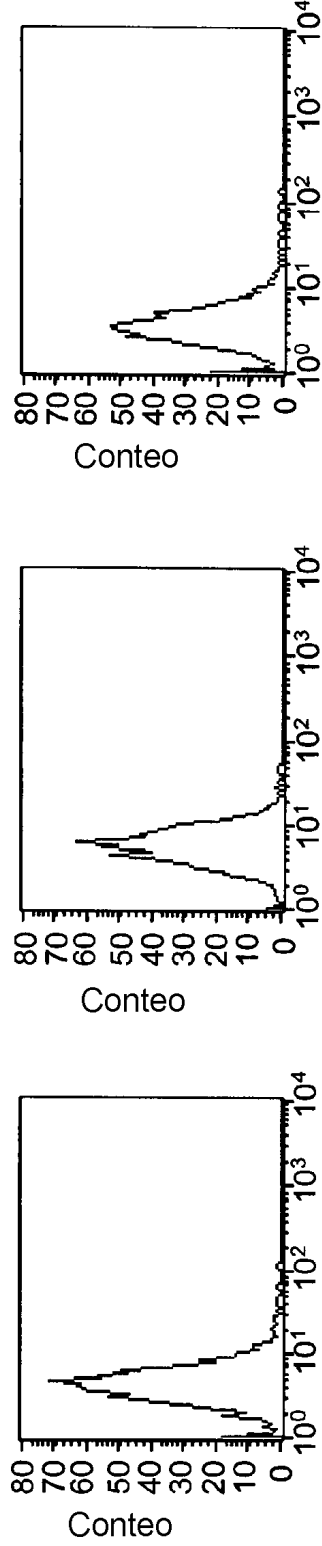
33. El conjugado de la reivindicación 28, caracterizado por que el agente citotóxico es un derivado de leptomicina seleccionado del grupo que consiste en:

- 35 • (2-Metilsulfanil-etil)-amida de (2-Metilsulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico
- Bis-[(2-mercaptoetil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico]
- 40 • (2-Mercapto-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico
- (2-Metildisulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico
- 45 • (2-Metildisulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico

- (2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-amida del ácido
(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico
 - 5 • (2-Mercapto-2-metil-propil)-amida del ácido
(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentenoico.
34. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 28-33, y un vehículo o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 35. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 28-33, para uso como un medicamento.
36. El uso de un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o del conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 28-33, o la composición según la reivindicación 34, para fabricar un medicamento para tratar cáncer.
- 15 37. El uso de la reivindicación 36, caracterizado por que dicho cáncer es un cáncer metastásico.
38. El uso de las reivindicaciones 36 o 37, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo, o dicho conjugado, inhibe la neovascularización tumoral.
39. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 36-38, caracterizado por que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer endometrial, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, un sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas.
- 20 40. Un polinucleótido que codifica el dominio de cadena pesada y ligera de un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1-27.
41. Un vector recombinante que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 40.
- 25 42. Una célula hospedante que comprende un vector de la reivindicación 41.
43. Una línea celular de hibridoma caracterizada por que se selecciona del grupo que consiste en la línea celular de hibridoma denominada 37.3D7, en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7660; la línea celular de hibridoma denominada 37.1F5, en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7661; la línea celular de hibridoma denominada 53.2H11, en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7662; la línea celular de hibridoma denominada EphA2-N1, en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture Collection con el número de registro PTM-8407; o la línea celular de hibridoma denominada EphA2-N2, en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture Collection con el número de registro PTM-8408.
- 30
- 35

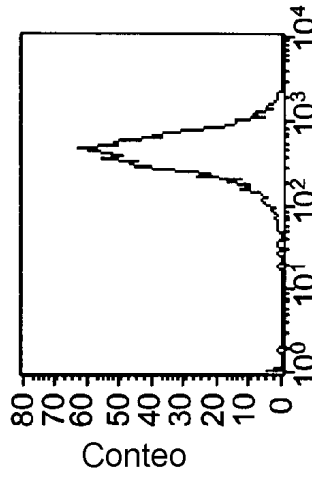
Fig. 1A

IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo



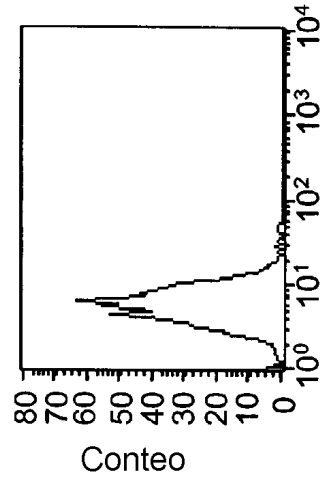
Altura de FL1

60nM 37.3D7



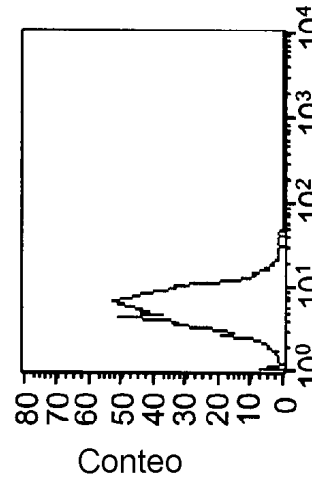
Altura de FL1

300-19/hu-EphA2



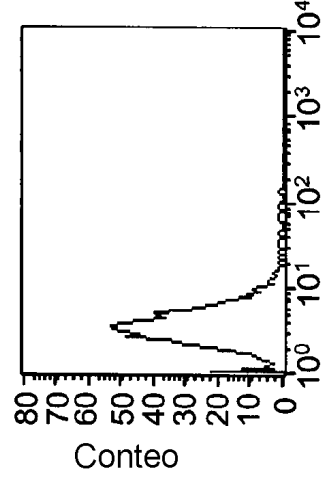
Altura de FL1

60nM 37.3D7



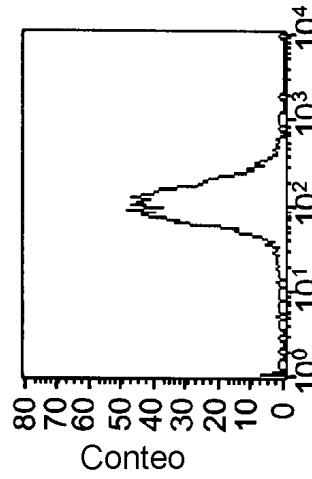
Altura de FL1

Células 300-19



Altura de FL1

60nM B2D6

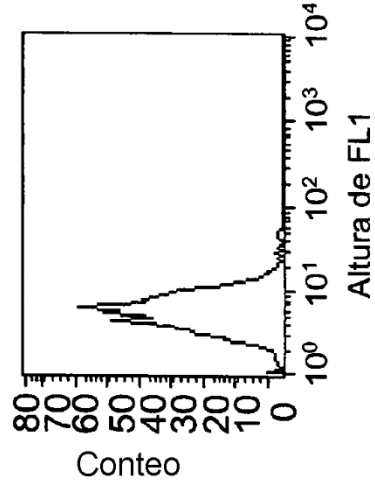


Altura de FL1

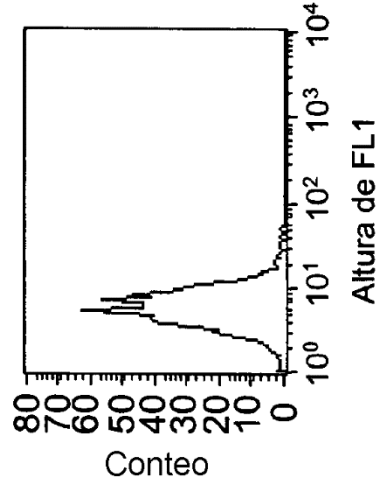
300-19/hu-EphA2

Fig. 1B

IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo

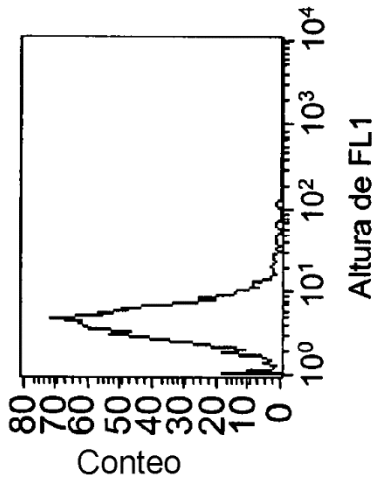


60nM 37.1F5

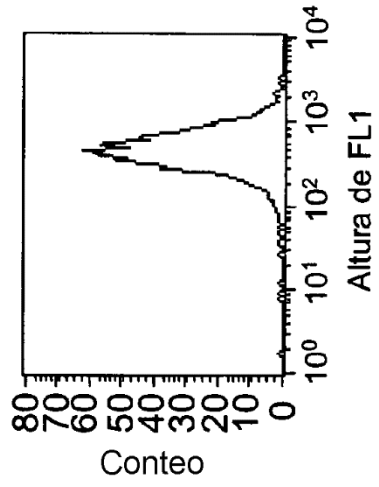


Células 300-19

IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo

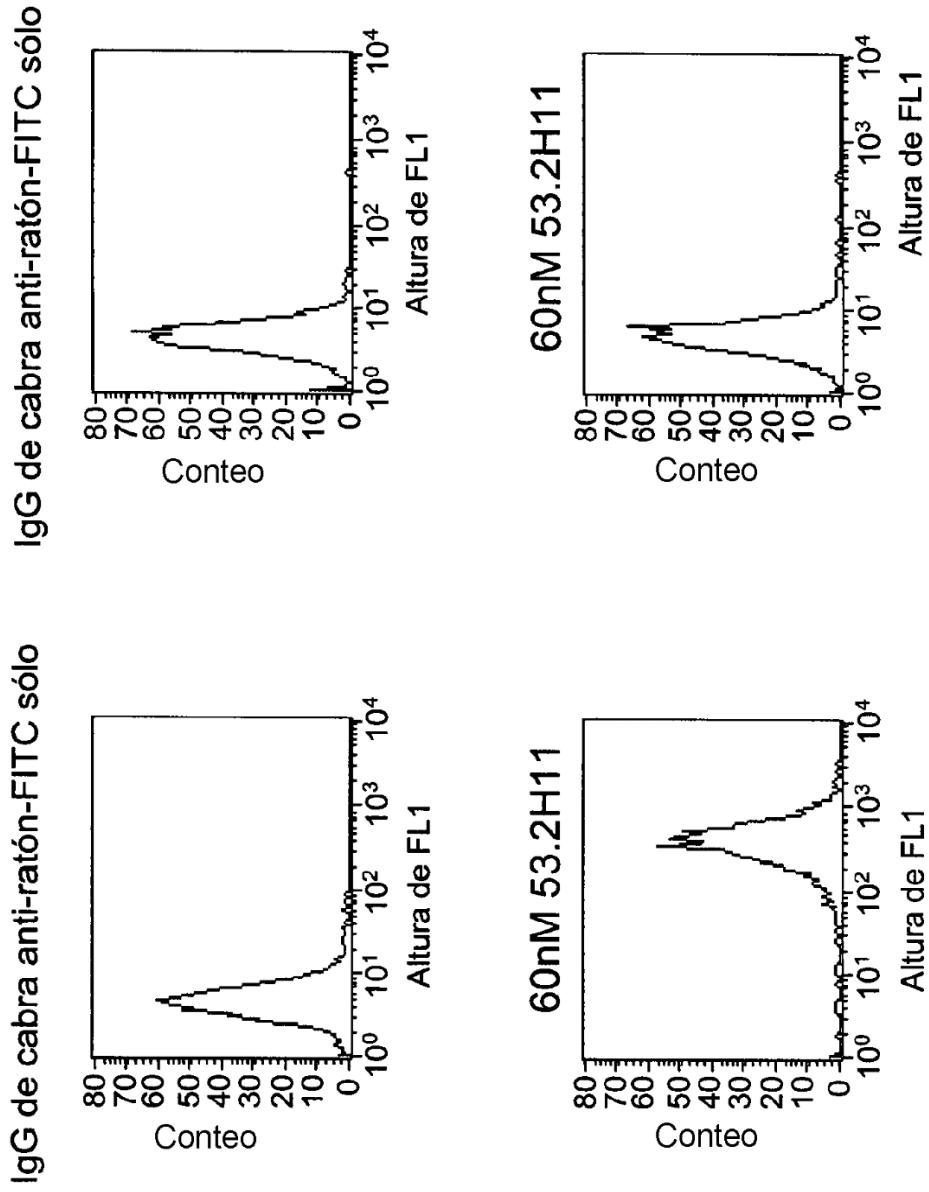


60nM 37.1F5



300-19/hu-EphA2

Fig. 1C



Células 300-19

300-19/hu-EphA2

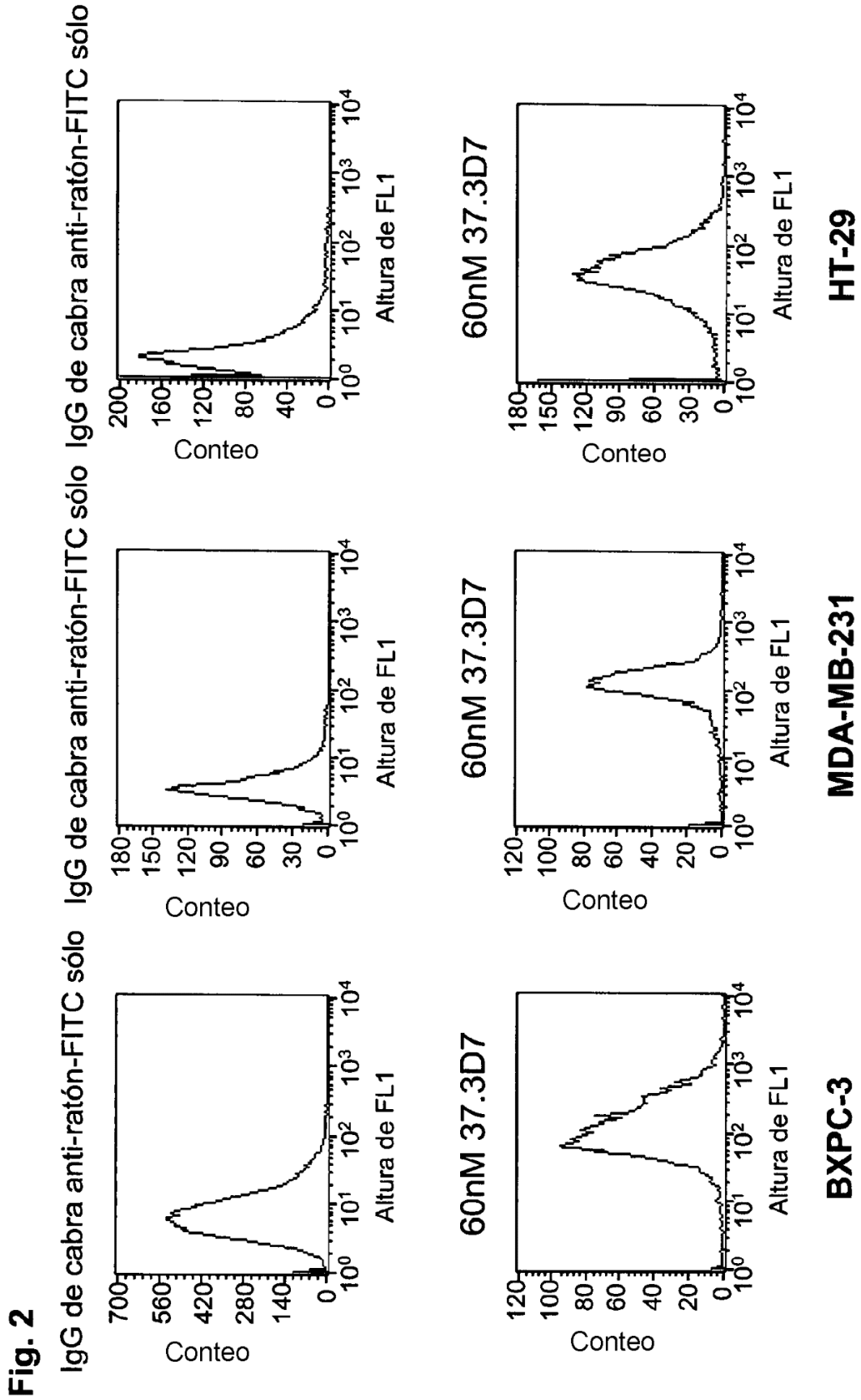
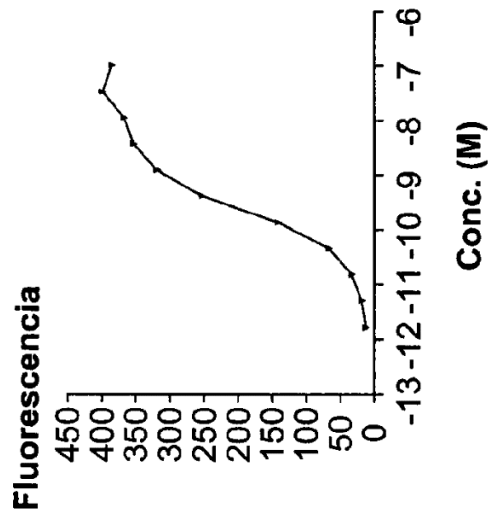


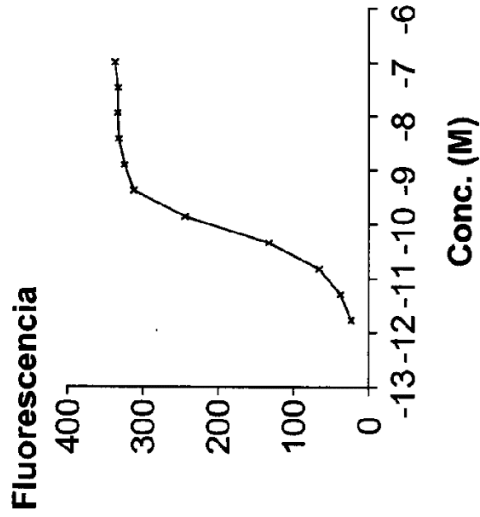
Fig. 3A



37.3D7

300-19/hu-EphA2

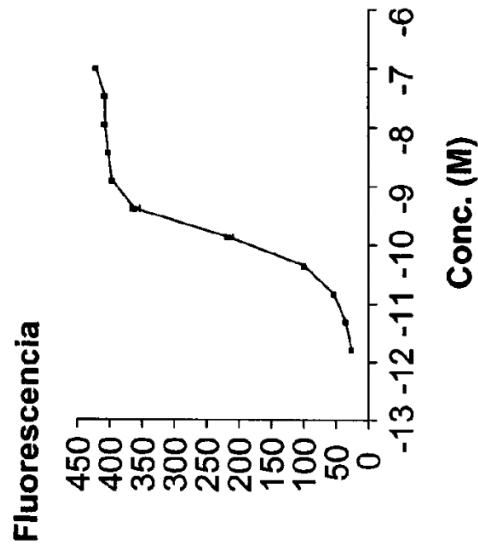
Fig. 3B



37.1F5

300-19/hu-EphA2

Fig. 3C



53.2H11

300-19/hu-EphA2

Fig. 4A

300-19/ μ -EphA2

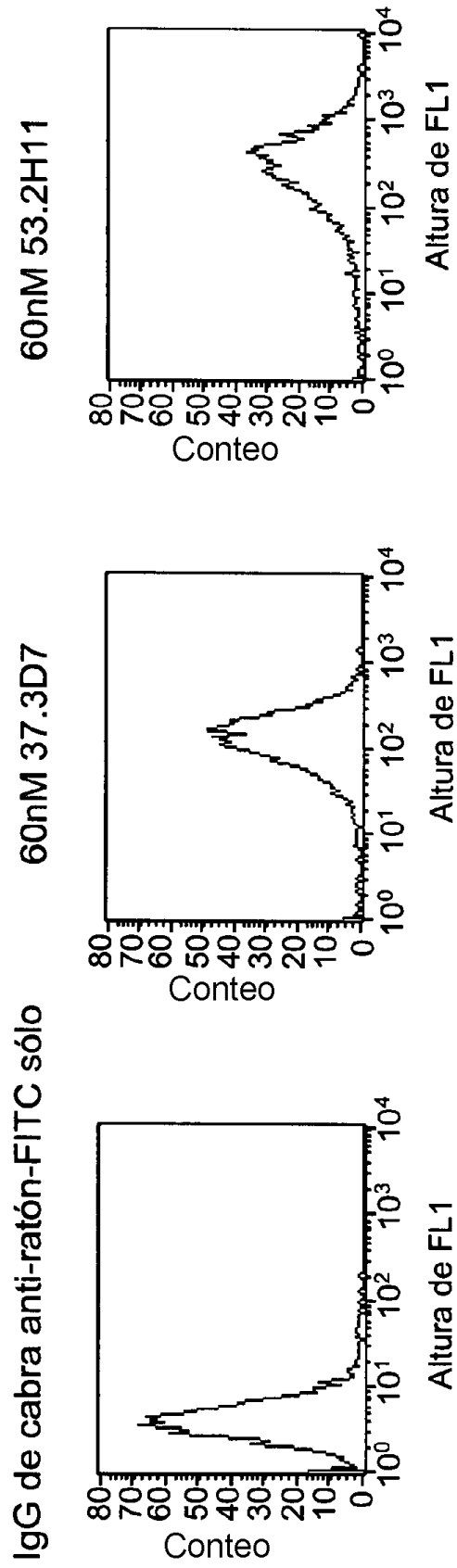


Fig. 4B

300-19/Rat-EphA2

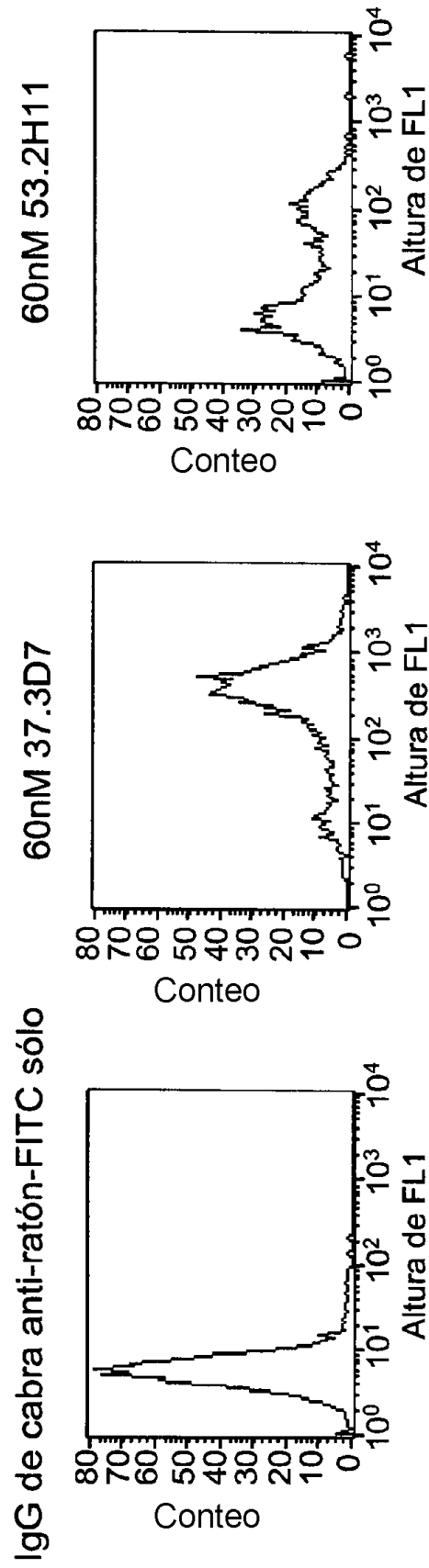


Fig. 5 A

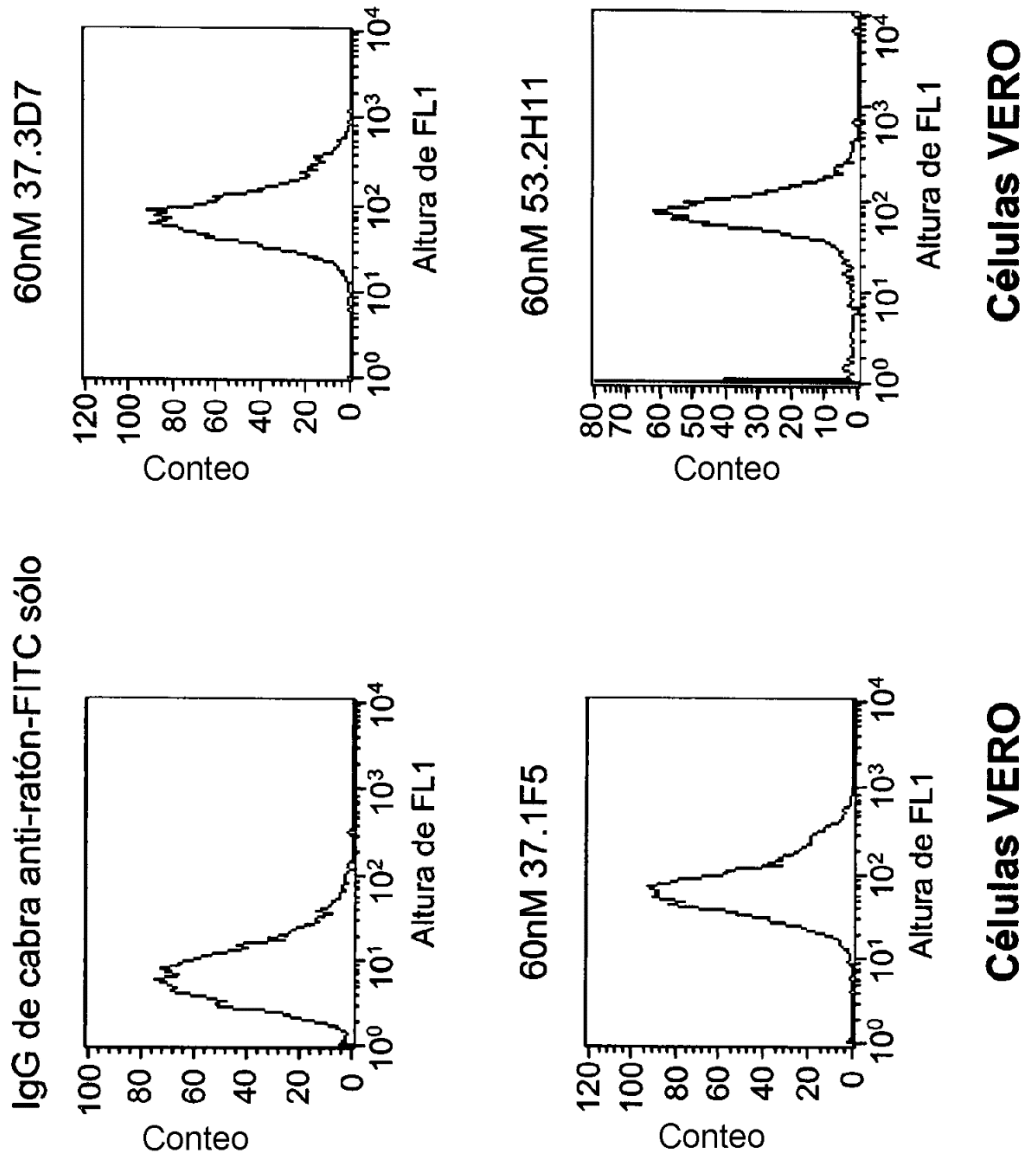
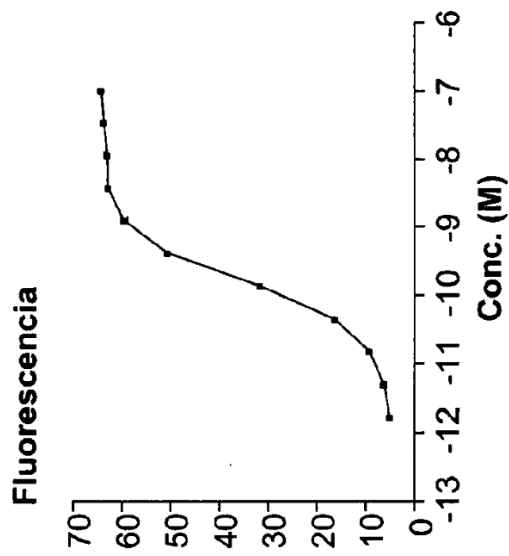


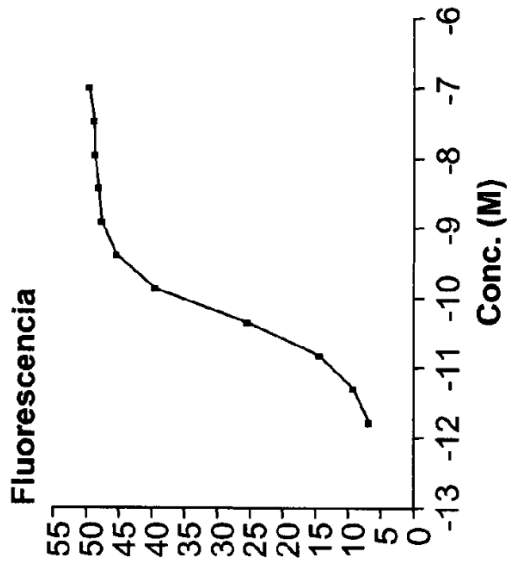
Fig. 5 B

37.3D7



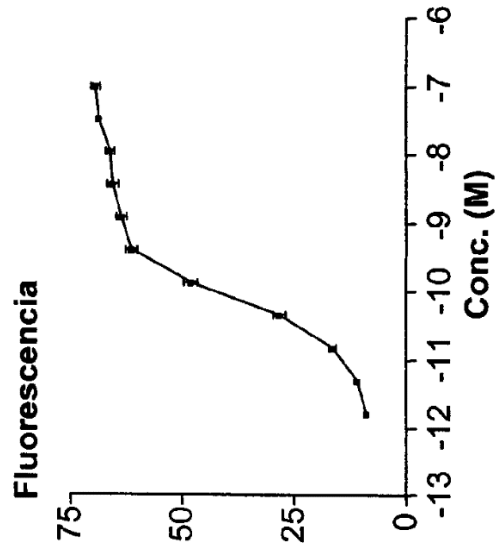
Células VERO

37.1F5



Células VERO

53.2H11



Células VERO

Fig. 6

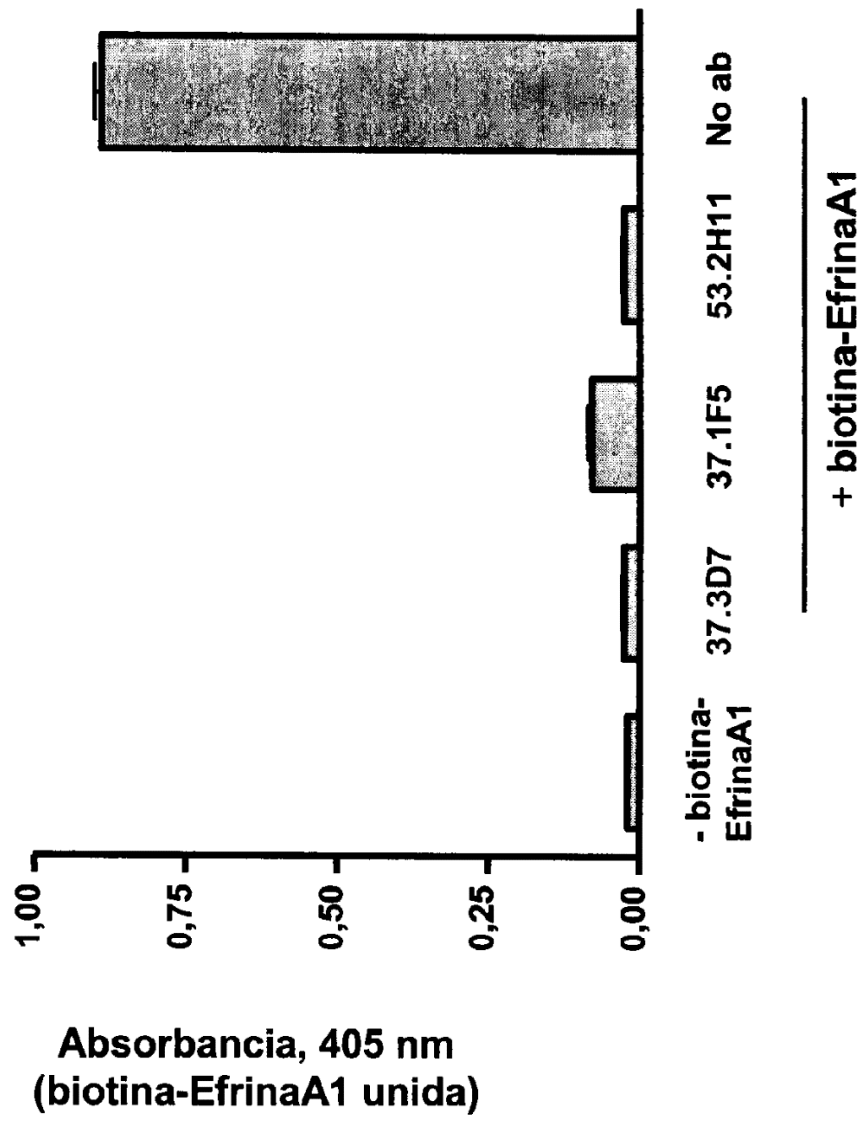


Fig. 7A

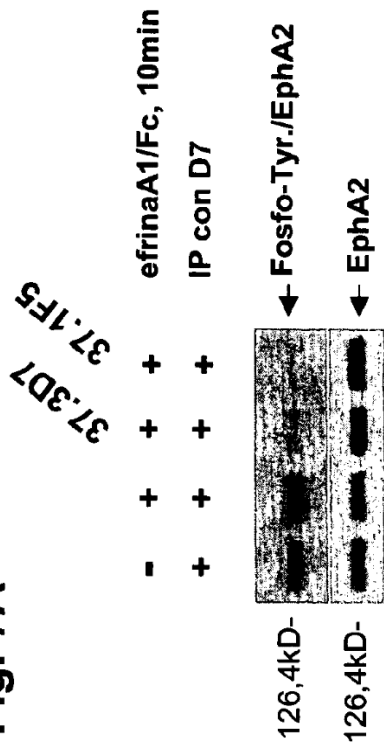


Fig. 7B

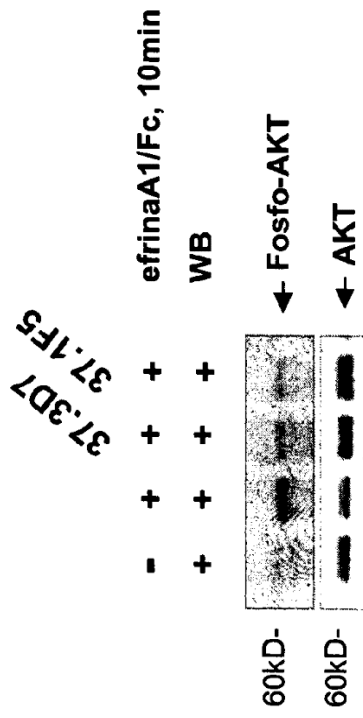
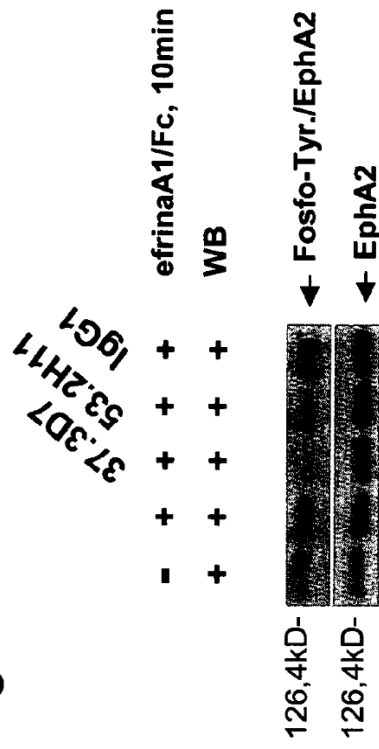


Fig. 7C



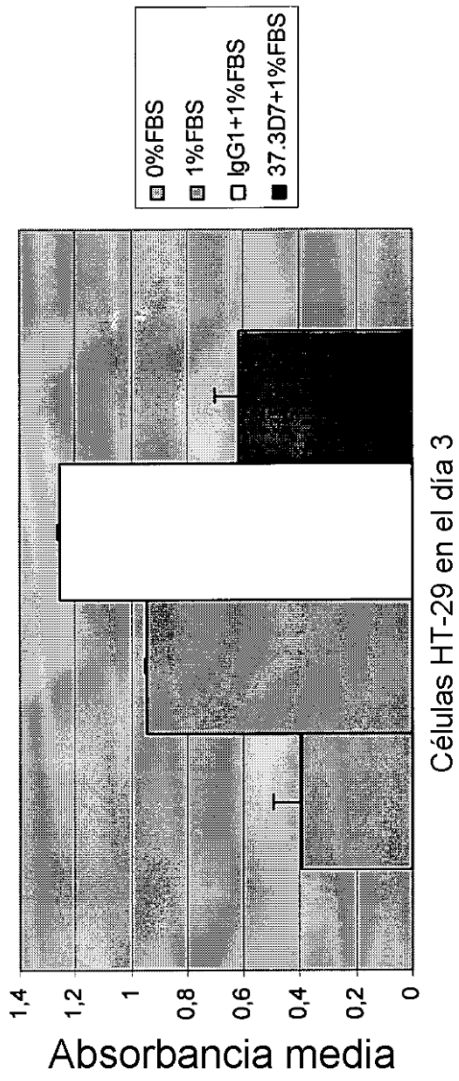


Fig. 9A

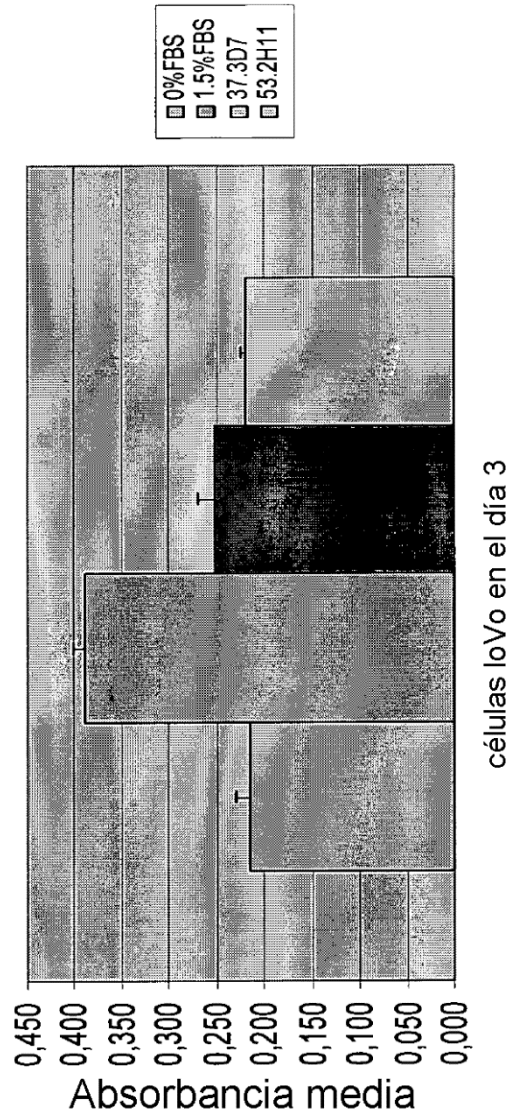


Fig. 9B

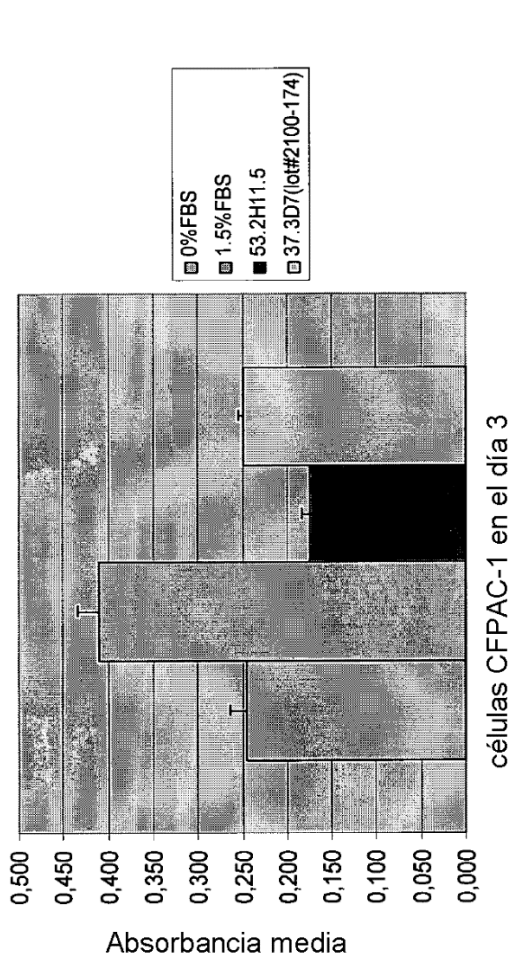


Fig. 9C

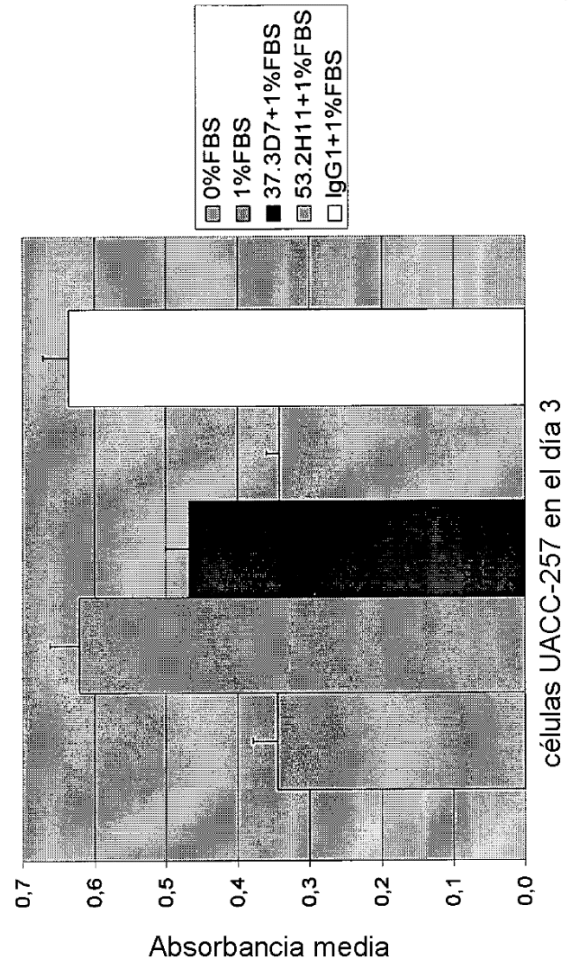


Fig. 9D

Fig. 10A

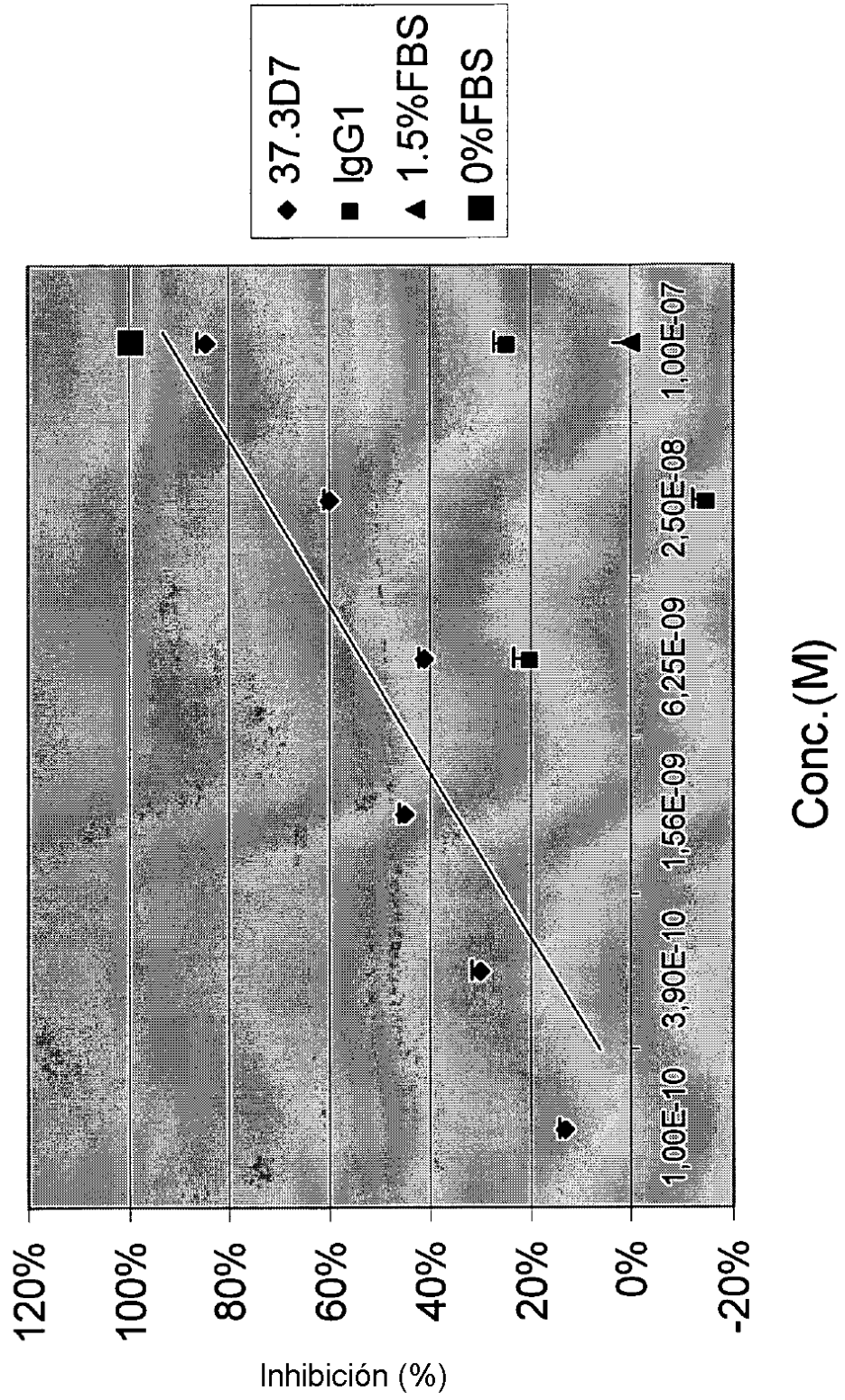


Fig. 10B

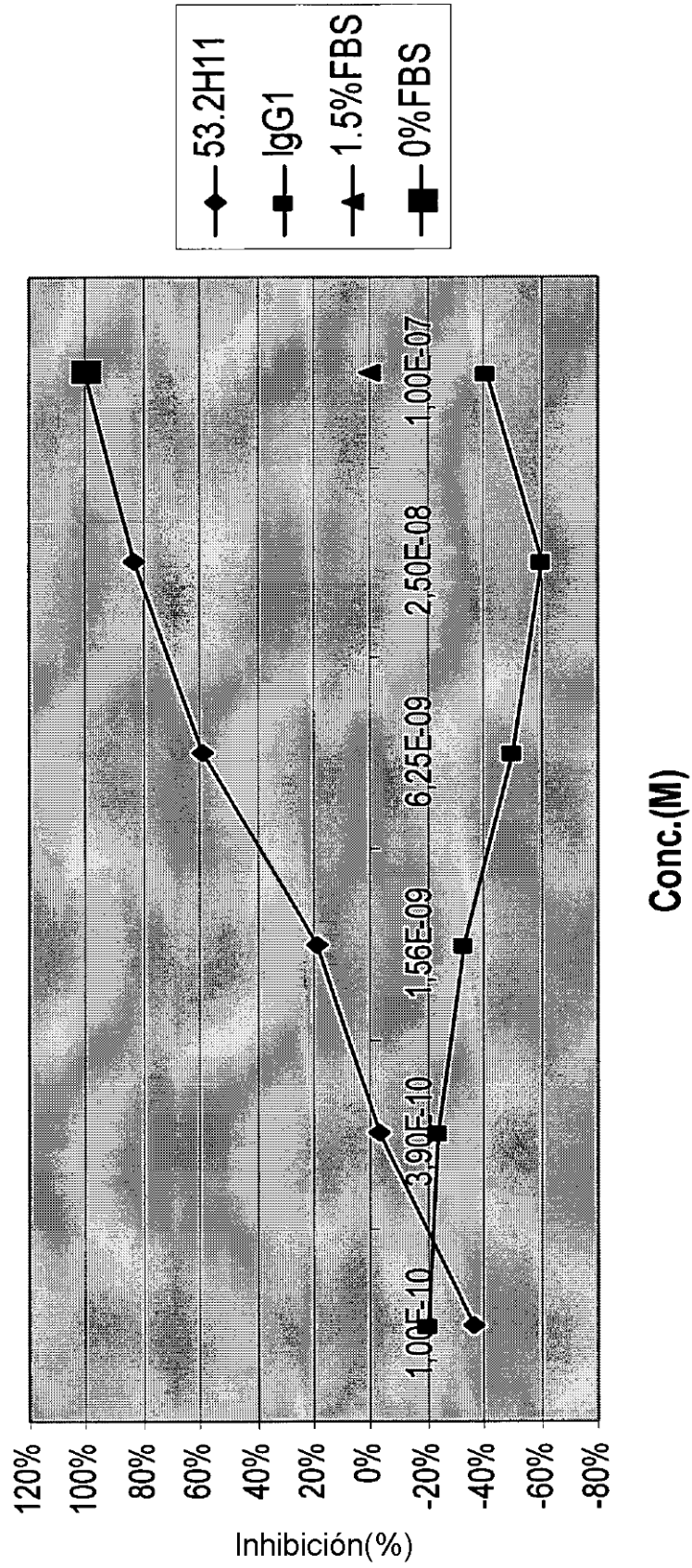


Fig. 10C

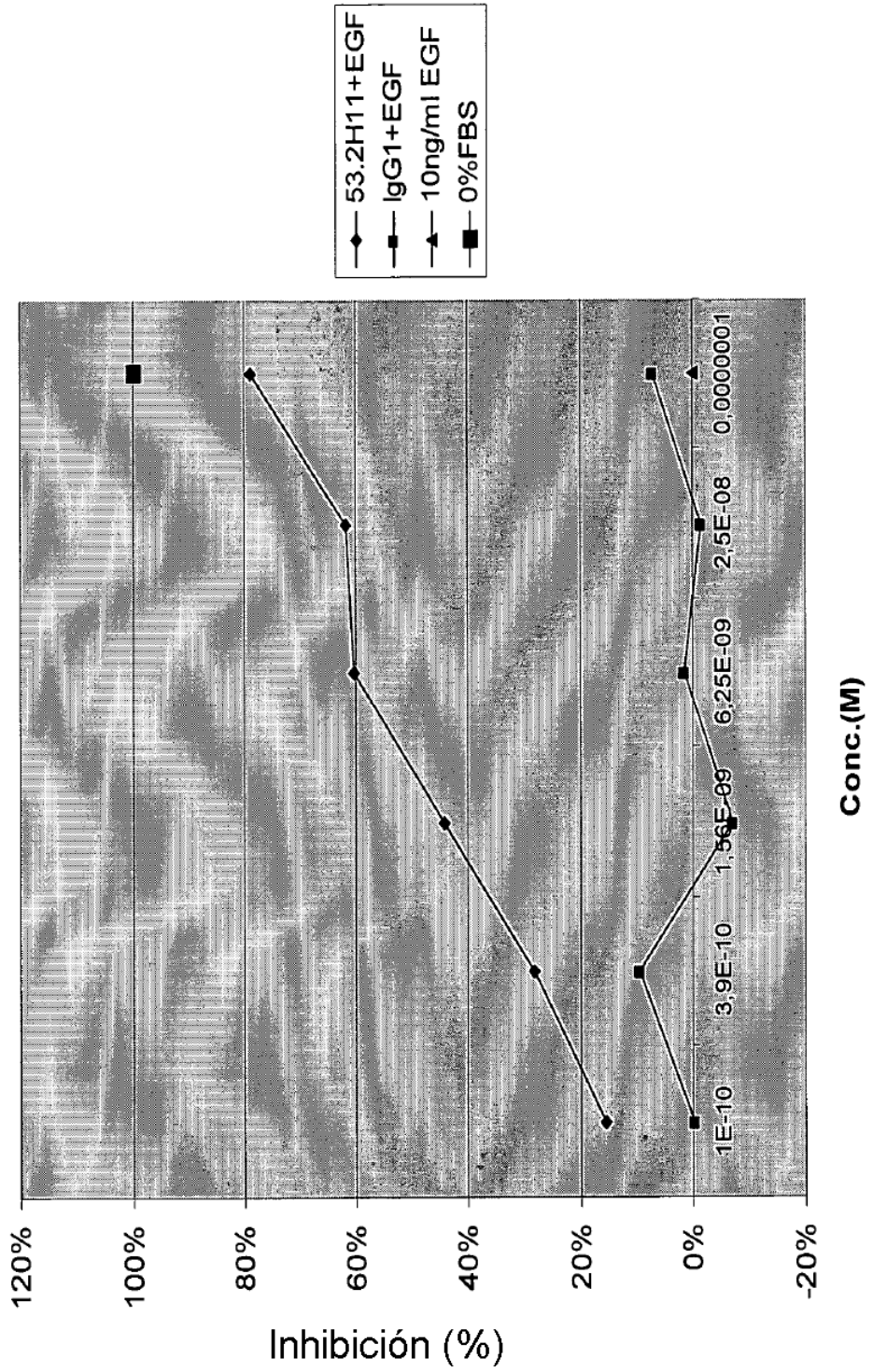


Fig. 11A

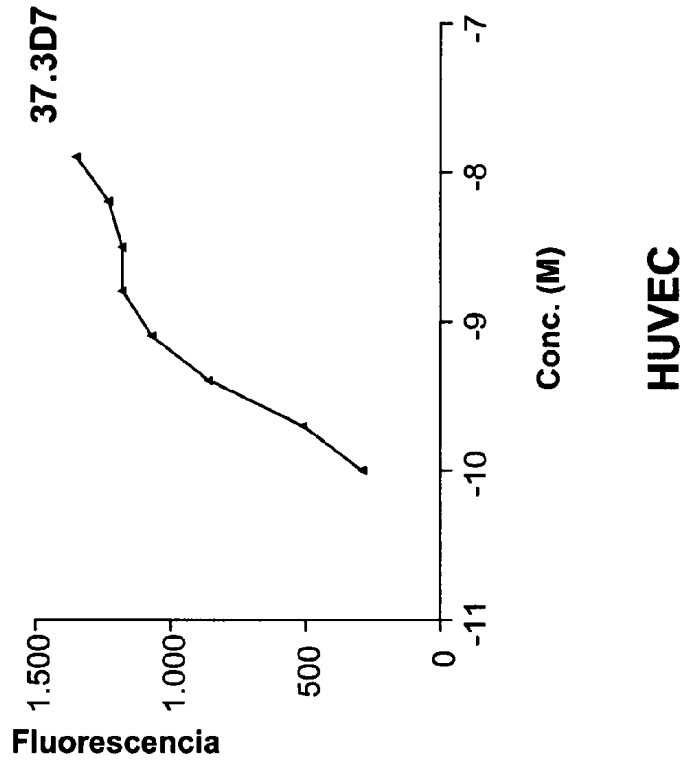
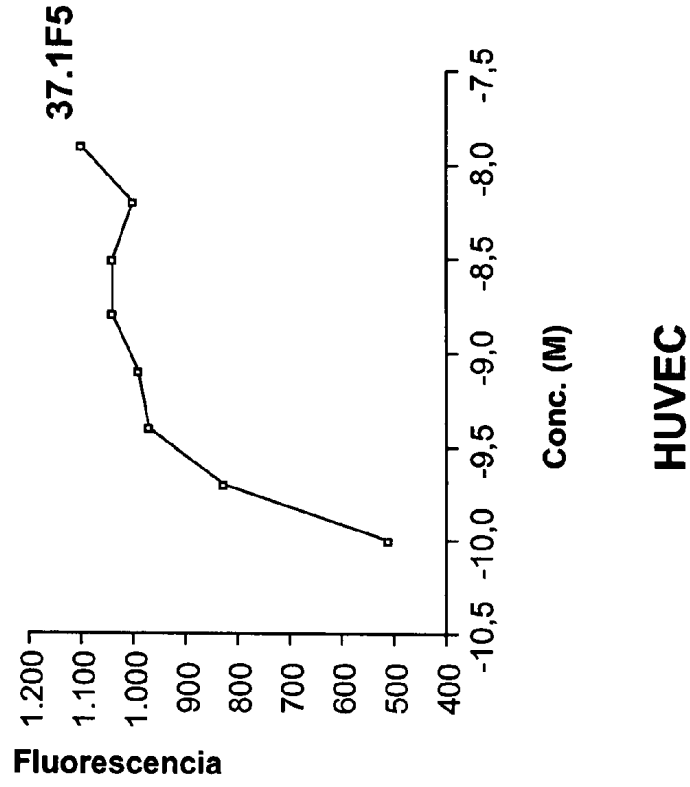


Fig. 11B



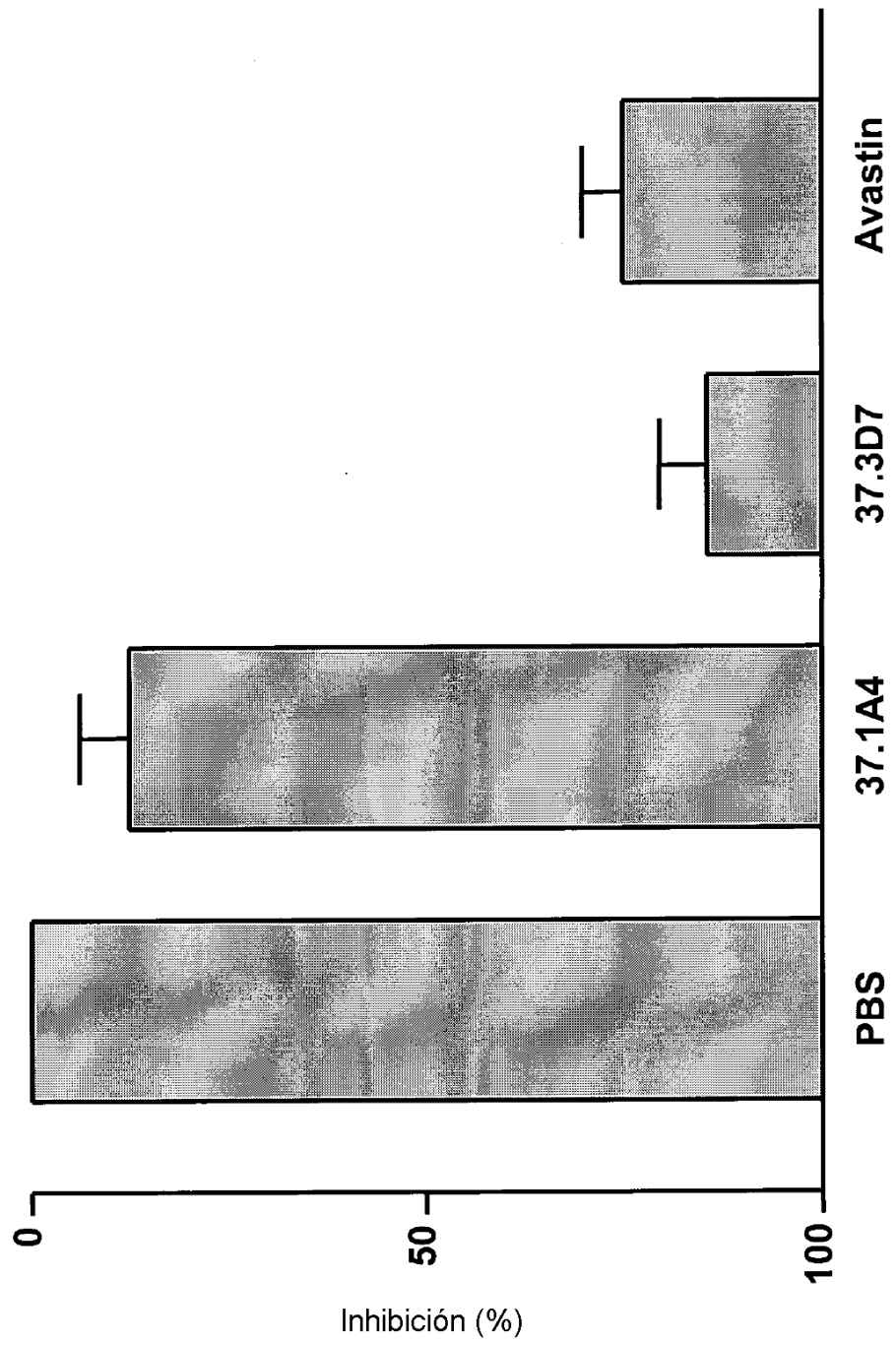


Fig. 12

Fig. 13

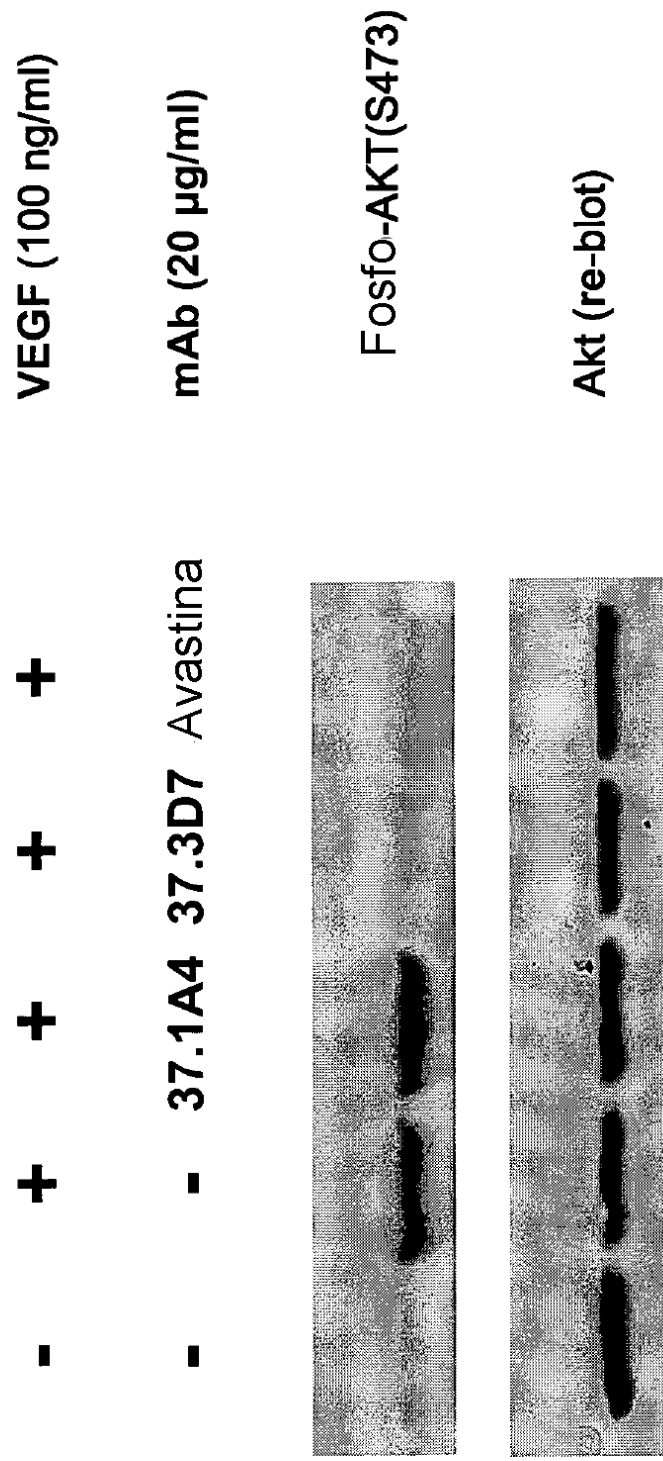


Fig. 14

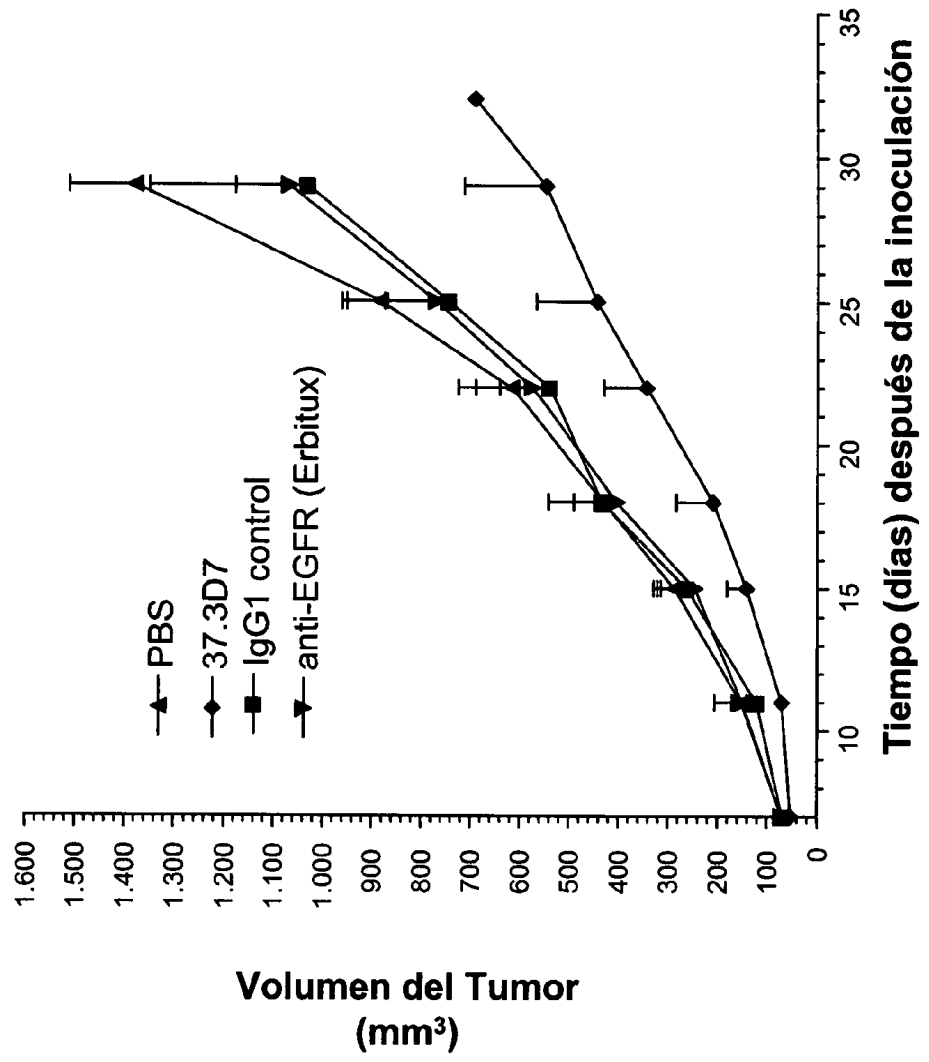


Fig. 15A

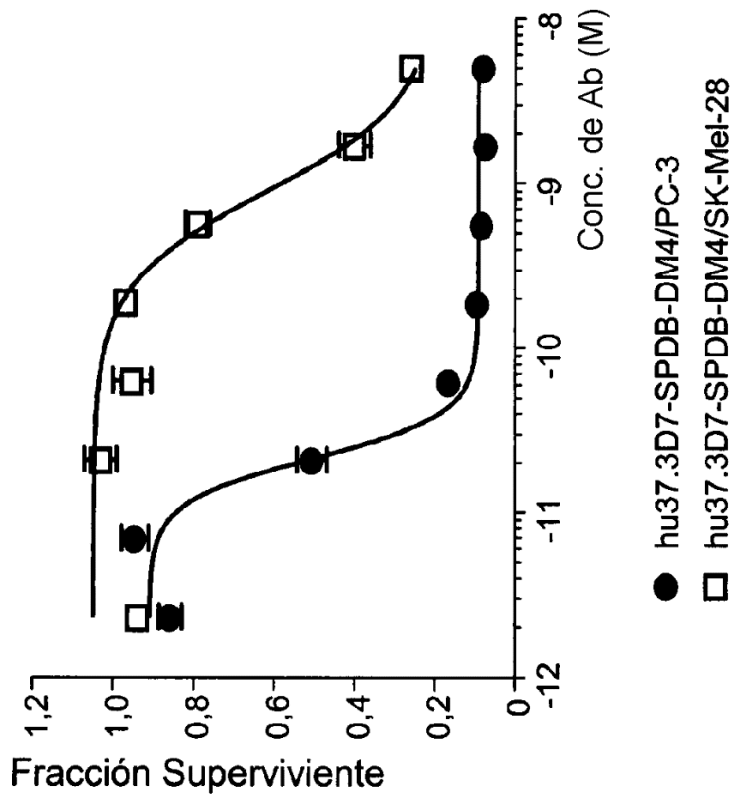


Fig. 15B

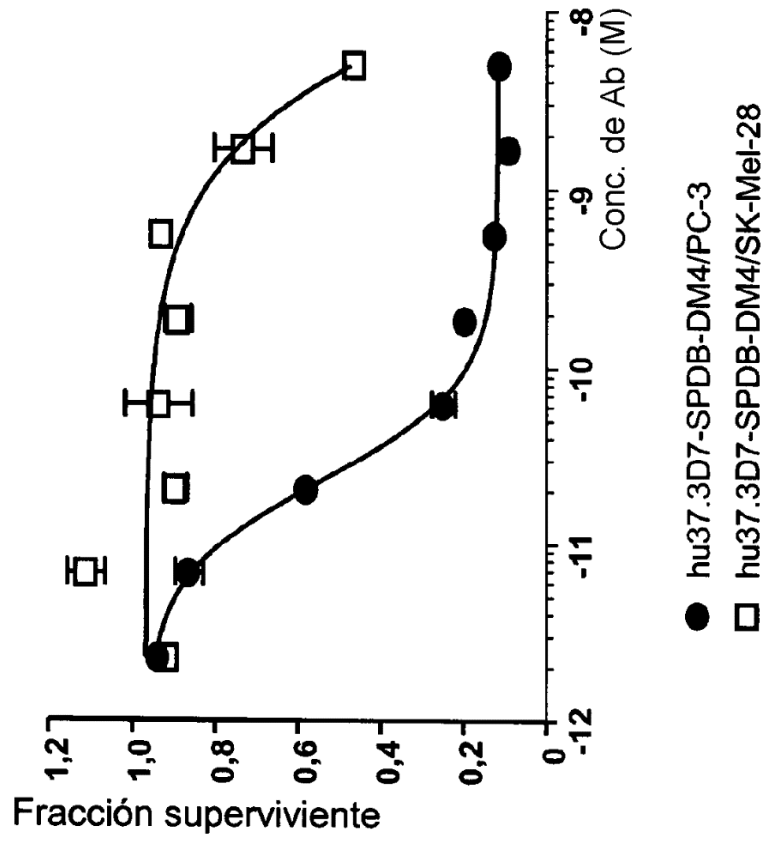


Fig. 16A

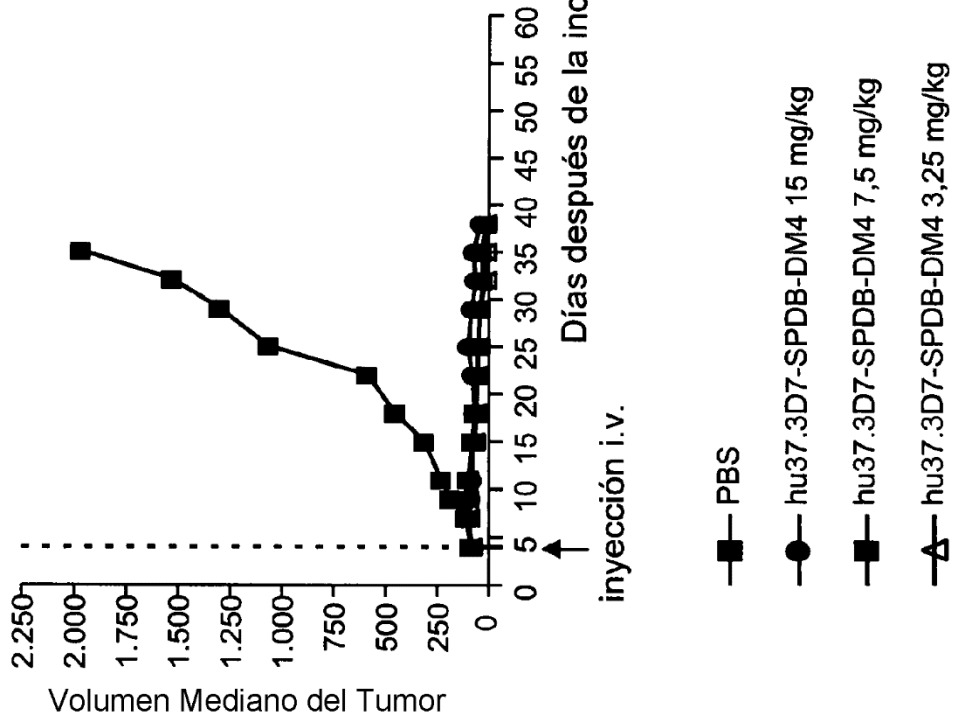


Fig. 16B

