

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 558**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2010 PCT/US2010/052725**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11053465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 10777137 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2488554**

54 Título: **Anticuerpos de-EphA3**

30 Prioridad:

14.10.2009 US 251668 P

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

19.02.2020

73 Titular/es:

**HUMANIGEN, INC. (100.0%)
533 Airport Boulevard, Suite 400
Burlingame, CA 94010, US**

72 Inventor/es:

**LUEHRSEN, KENNETH;
MARTINEZ, DAVID;
YI, CHRISTINA;
BEBBINGTON, CHRISTOPHER R. y
YARRANTON, GEOFFREY T.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 558 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de-EphA3

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/251.668, presentada el 14 de octubre de 2009.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las tirosina cinasas receptoras Eph (Eph) pertenecen a un amplio grupo de tirosina cinasas receptoras (RTK), cinasas que fosforilan proteínas en residuos de tirosina. Las Eph y sus ligandos efrina unidos a membrana (efrinas) controlan el posicionamiento celular y la organización tisular (Poliakov, A., et al., *Dev Cell* 7: 465-80 (2004)). En contraposición con otras tirosina cinasas receptoras, la activación del receptor Eph no solo requiere la unión de ligando y dimerización, sino que implica también oligómeros de ligando preformados. Por tanto, la fosforilación en tirosina de receptores Eph requiere la presentación de ligandos efrina en sus formas agrupadas o enlazadas a membrana (Davis et al., *Science* 266: 816-819 (1994)). Aparecen respuestas de Eph funcionales y bioquímicas en los estados de oligomerización de ligando superiores (Stein et al., *Genes Dev* 12: 667-678 (1998)).

15 Entre otras funciones de caracterización, diversos Eph y efrinas han mostrado desempeñar un papel en el desarrollo vascular. Se ha observado también que la reemergencia desregulada de algunas efrinas y sus receptores en adultos contribuye a la invasión, metástasis y neoangiogénesis tumoral. Por ejemplo, las proteínas EphA2 o A3 solubles dominantes negativas exhiben efectos sobre la función de células endoteliales inducida por efrina *in vitro*, y la angiogénesis y progresión tumoral *in vivo* (Nakamoto, et al., *Microsc Res Tech* 59: 58-67 (2002); Brantley-Sieders, et al., *Curr Pharm Des* 10:3431-42 (2004); Brantley, et al. *Oncogene* 21: 7011-26 (2002); Cheng, et al. *Neoplasia* 5: 445-56 (2003), Dobrzanski, et al. *Cancer Res* 64: 910-9 (2004)). Además, se han encontrado miembros de la familia Eph que se sobreexpresan en células tumorales de una amplia variedad de tumores sólidos humanos (Brantley-Sieders, et al., *Curr Pharm Des* 10: 3431-42 (2004); Marme, D. *Ann Hematol* 81 Supl 2: S66 (2002); Booth, C. et al., *Nat Med* 8: 1360-1 (2002)).

20 Se ha reseñado también que EphA3 está activada y sobreexpresada en células CD34⁺ en pacientes de leucemia mieloide crónica (LMC) en la fase acelerada y el estadio de crisis blástica (Cilloni et al., *American Society of Hematology*, Resumen 1092, 2008 (disponible en línea, 14 de noviembre de 2008)). Cilloni et al. reseñaron que cuando se incubaban células de LMC primarias o células normales transfectadas con EphA3 con un anticuerpo monoclonal específico, el anticuerpo inducía una reducción significativa de la proliferación en células primarias y células transfectadas, un crecimiento de colonias reducido y cambios inducidos en las propiedades de adhesión. El anticuerpo no inducía ningún cambio significativo en las células de control normales ni células de pacientes de LMC en el estadio crónico.

25 Esta invención está basada, en parte, en el descubrimiento de nuevos anticuerpos anti-EphA3.

BREVE COMPENDIO

35 La divulgación está dirigida a potentes anticuerpos anti-EphA3 y a usos de tales anticuerpos, p. ej. para el tratamiento de una enfermedad que implica EphA3. La invención proporciona un anticuerpo anti-EphA3 que se une a EphA3 con una K_D monovalente de menos de 10 nM como se determina por resonancia de plasmón de superficie efectuada a 37 °C, en la que el anticuerpo comprende:

(a) una región V_H que tiene

40 (i) una secuencia de CDR1 GYWMN, una secuencia de CDR2 DIYPGSGNTNYDEKFGG y una secuencia de CDR3 GGYEDFDS;

(ii) una secuencia de segmento V que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia aminoacídica del segmento V de línea germinal VH1 1-02 humana o al menos un 90 % de identidad con el segmento V de SEQ ID NO:5; y

45 (iii) una secuencia de FR4 que difiere en no más de un aminoácido de WGQGTTVTVSS; y

(b) una región V_L que tiene

(i) una secuencia de CDR1 RASQGIISYLA, una secuencia de CDR2 AASSLQS y una secuencia de CDR3 GQYANYPYT;

50 (ii) un segmento V que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia aminoacídica del segmento V_L L15 de línea germinal humana o al menos un 90 % de identidad con el segmento V de SEQ ID NO:13; y

(iii) una secuencia de FR4 que difiere en no más de un aminoácido de FGQGKLEIK.

En un aspecto adicional, un anticuerpo de la divulgación comprende una región V_H que comprende una CDR3 que comprende la secuencia aminoacídica $X_1GX_2YEX_3FDX_4$, en la que X_1 es S o G, X_2 es Y o V, X_3 es E o D y X_4 es S, V o I, con la condición de que cuando la secuencia aminoacídica es SGYYEDFDS, la CDR1 no sea SYWIN y cuando la secuencia aminoacídica es SGYYEEFDS, la CDR1 no sea TYWIS. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una CDR3 que comprende la secuencia aminoacídica GGYEDFDS, SGYYEEFDS, SGVYEDFDS, SGYYEDFDV o SGYYEDFDI. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene un segmento J que comprende al menos un 80 % de identidad, típicamente un 85 % o al menos un 90 % de identidad, con una secuencia aminoacídica de segmento J de línea germinal humana, o que difiere de un segmento J de línea germinal humana en no más de dos posiciones; y un segmento V que comprende al menos un 80 % de identidad, típicamente al menos un 85 % de identidad, y preferiblemente un 90 % de identidad, o más, con una secuencia aminoacídica de segmento V de línea germinal humana. En algunos aspectos, el segmento J comprende al menos un 90 % de identidad con la secuencia aminoacídica JH6 humana, y el segmento V comprende al menos un 90 % de identidad con la secuencia aminoacídica VH1 1-02 humana. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una FR4 que comprende WGQGTTVTVS, o una FR4 que difiere en no más de un aminoácido de WGQGTTVTVS. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR 1 de V_H o una CDR2 de V_H , o tanto una CDR1 de V_H como una CDR2 de V_H , como se muestra en la región V_H expuesta en la Figura 1. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede tener una CDR₁ de V_H que tiene la secuencia aminoacídica GYWMN, TYWIS o SYWIN y/o una CDR2 que tiene la secuencia aminoacídica DIYPGSGNTNYDEKFGG, DIYPGSGNTNYAQKFGG, DIYPGSGNTNYAQEFRG, DIYPGSGNTNYAQKFLG, DIYPGSGNTNYDEKFEFEG o DIYPGSGNTNYDEKFKR. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una CDR1 de V_H GYWMN y una CDR2 DIYPGSGNTNYDEKFGG. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una CDR1 de V_H TYWIS y una CDR2 de V_H DIYPGSGNTNYAQ(K/E)F(Q/R/L)G. En algunos aspectos, el anticuerpo de la divulgación tiene las CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H de una de las regiones V como se muestra en la Figura 1. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una secuencia aminoacídica del segmento V de V_H de una secuencia del segmento V mostrada en la Figura 1. En algunos aspectos, la V_H tiene la secuencia de una región V_H expuesta en la Figura 1.

La divulgación proporciona también un anticuerpo que tiene una región V_L que comprende un determinante de especificidad de unión a CDR3 que tiene la secuencia $X_1X_2YX_3X_4YPYT$, en la que X_1 es G, V o A; X_2 es Q, R o G; X_3 es A, S o L y X_4 es N o K. En algunos aspectos, la CDR3 comprende GQYANYPYT, VQYAKYPYT, AQYANYPYT, VQYSNYPYT, VQYANYPYT, VGYANYPYT, VRYANYPYT o VQYLNYPYT. En algunos aspectos, cuando la CDR3 es VQYANYPYT, la CDR1 no es RASQEISGYLG ni RASQGIISYLA y/o la CDR2 no es AASTLDS ni AASSLQS. En algunos aspectos, la región V_L comprende un segmento J que comprende al menos un 80 % de identidad, típicamente al menos un 85 % o 90 % de identidad, con una secuencia aminoacídica del segmento J de línea germinal humana, o que difiere en no más de dos aminoácidos de un segmento de línea germinal humana; y un segmento V que comprende al menos un 80 % de identidad, típicamente al menos un 90 % de identidad o más, con una secuencia aminoacídica del segmento V de línea germinal humana. En algunos aspectos, el segmento J tiene no más de dos cambios aminoacídicos, a menudo no más de un cambio aminoacídico, respecto a la secuencia FGQGKLEIK de la secuencia aminoacídica Jk2 de línea germinal humana y el segmento V comprende al menos un 90 % de identidad con la secuencia aminoacídica de Jk1 L15 de línea germinal humana. En algunos aspectos, la FR4 del anticuerpo tiene la secuencia aminoacídica FGQGKLEIK, o tiene no más de un residuo aminoacídico cambiado respecto a la secuencia FGQGKLEIK. En algunos aspectos, la región V_L comprende una CDR1 o una CDR2, o tanto una CDR1 como una CDR2 de una región V_L de secuencia mostrada en la Figura 1. Por ejemplo, una CDR1 puede tener la secuencia RASQGIISYLA, QASQDISTYLN, RASQEISGYLG o RASQSISSYLA; y/o una CDR2 puede tener la secuencia AASSLQS, GASSLQS, AASSLQR o AASTLDS. En algunos aspectos, la CDR1 tiene la secuencia RASQGIISYLA y la CDR2 tiene la secuencia GASSLQS. En algunos aspectos, la CDR1 tiene la secuencia QASQDISTYLN y la CDR2 tiene la secuencia AASSLQR o AASSLQS. En algunos aspectos, la CDR1 tiene la secuencia RASQSISSYLA y la CDR2 tiene la secuencia AASSLQR. En algunos aspectos, la región V_L comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de una de las regiones V_L expuestas en la Figura 1. En algunos aspectos, la región V_L comprende un segmento V que tiene una secuencia de segmento V como se muestra en la Figura 1. En algunos aspectos, la región V_L tiene la secuencia de una región V_L expuesta en la Figura 1. En aspectos típicos, la región V_H del anticuerpo comprende cualquiera de las regiones V_H descritas en el párrafo anterior.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo que comprende una región V_L que tiene una CDR3 que comprende GQYANYPYT, VQYAKYPYT, AQYANYPYT, VQYSNYPYT, VGYANYPYT, VRYANYPYT o VQYLNYPYT. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia aminoacídica $X_1GX_2YEX_3FDX_4$, en la que X_1 es S o G, X_2 es Y o V, X_3 es E o D y X_4 es S, V o I. En algunos aspectos, la CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia aminoacídica GGYEDFDS, SGYYEEFDS, SGVYEDFDS, SGYYEDFDV o SGYYEDFDI. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR1 o CDR2 de cadena ligera expuesta en la Figura 1, o una CDR1 o CDR2 de cadena pesada expuesta en la Figura 1. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende CDR1 y CDR2 de cadena ligera como se expone en la Figura 1 y/o CDR1 y CDR2 de cadena pesada como se expone en la Figura 1. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende un segmento V de V_L expuesto en la Figura 1.

La divulgación proporciona adicionalmente un anticuerpo que comprende una región V_H que comprende una CDR3 que tiene la secuencia SGYYE(E/D)FDS y una secuencia de CDR3 de la región V_L expuesta en el párrafo anterior, con la condición de que la secuencia de CDR3 de la región V_L no sea VQYANYPYT ni VQYMNYPYT. En algunos

aspectos, el anticuerpo comprende una CDR1 o CDR2 de cadena pesada expuesta en la Figura 1, o una CDR1 o CDR2 de cadena ligera expuesta en la Figura 1. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR1 o CDR2 de cadena pesada expuesta en la Figura 1 y/o una CDR1 y CDR2 de cadena ligera expuesta en la Figura 1.

5 En algunos aspectos, un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H de una de las regiones V_H expuestas en la Figura 1 y las CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L de una de las regiones V_L expuestas en la Figura 1.

10 Un anticuerpo de la divulgación puede comprender una región V_H como se expone en la Figura 1 o una región V_L como se expone en la Figura 1. A menudo, el anticuerpo comprende una región V_H como se expone en la Figura 1 y una región V_L como se expone en la Figura 1. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende combinaciones de regiones V_H y V_L que comprenden: a) SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:20, b) SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:11, c) SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO:12, d) SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:19, e) SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:21, f) SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:22, g) SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:23, h) SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:11, i) SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:12, j) SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:21, k) SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:22, l) SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:11, m) SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:13, n) SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:11, o) SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:13, p) SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:21, q) SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:14, r) SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:15, s) SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:14, t) SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:15, u) SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:14, v) SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:15, w) SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:16, x) SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:17, y) SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:19, z) SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:17, aa) SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:18 o bb) SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:20.

20 En algunos aspectos, un anticuerpo de la divulgación, p. ej., que tiene una secuencia de la región V_H seleccionada de las secuencias de la región V_H en la Figura 1 y una región V_L seleccionada de las secuencias de la región V_L en la Figura 1, tiene una afinidad monovalente mejor de aproximadamente 10 nM, y a menudo mejor de aproximadamente 5 nM o 1 nM como se determina por análisis de resonancia de plasmón de superficie efectuado a 37 °C. Por tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos de la divulgación tienen una afinidad (medida usando resonancia de plasmón de superficie) de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 0,5 nM, aproximadamente 0,25 nM o aproximadamente 0,1 nM o mejor.

25 Un anticuerpo de la divulgación como se describe en la presente memoria puede tener una región V_H y/o una región V_L que comprende una metionina en el extremo N.

En algunos aspectos, el anticuerpo es una IgG. En algunos aspectos, el anticuerpo es una IgG1 o una IgG3. En algunos aspectos, el anticuerpo es una IgG2 o una IgG4.

30 En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO:24 y/o una región constante de cadena ligera kappa que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO:25.

En algunos aspectos, la región constante de cadena pesada de un anticuerpo está afucosilada. En algunos aspectos, la preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo de la divulgación está hipofucosilada o afucosilada.

35 En algunos aspectos, un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación tiene una secuencia aminoacídica de cadena pesada y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 y SEQ ID NO:35 o SEQ ID NO:36 y SEQ ID NO:27, respectivamente; y el anticuerpo está afucosilado.

En algunos aspectos, el anticuerpo es un (Fab')₂.

40 En algunos aspectos, el anticuerpo está PEGilado.

En algunos aspectos, el anticuerpo activa EphA3.

En algunos aspectos, el anticuerpo no compite con un ligando natural, p. ej. efrina A5, por la unión a EphA3.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad dependiente de EphA3, comprendiendo el método administrar un anticuerpo de la divulgación como se describe en la presente memoria al paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. El paciente puede tener, p.ej., un cáncer. En algunos aspectos, el anticuerpo se administra a un paciente que tiene un tumor sólido que comprende células tumorales que expresan EphA3. En otros aspectos, el anticuerpo se administra a un paciente que tiene un tumor que no tiene células tumorales que expresan EphA3.

50 En algunos aspectos, el anticuerpo se administra a un paciente que tiene un trastorno mieloproliferativo. En algunos aspectos, el anticuerpo se administra a un paciente que tiene leucemia mieloide aguda o leucemia mieloide crónica. En algunos aspectos, el anticuerpo se administra a un paciente que tiene un linfoma. En algunos aspectos, el anticuerpo se administra a un paciente que tiene síndrome mielodisplásico, policitemia vera, trombocitemia esencial o mielofibrosis idiopática.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 proporciona secuencias de V_H y V_L ejemplares de anticuerpos anti-EphA3 de la divulgación.

La Figura 2 proporciona un esquema de construcción de módulo de CDR2/FR3 de cadena pesada.

5 La Figura 3 muestra los resultados de un ELISA de unión a antígeno con IgG anti-EphA3. Se trataron placas de ELISA recubiertas con EphA3-Fc con IIIA4 quimérico (círculos), un anticuerpo genomanipulado ejemplar de la divulgación (cuadrados) o una IgG de control (triángulos) y se sondeó la unión con un conjugado de cadena kappa-HRP anti-humano.

10 La Figura 4 muestra la especificidad de un anticuerpo genomanipulado de la divulgación por EphA3. Se recubrieron diversas proteínas Eph sobre una placa ELISA, se trataron con anticuerpo genomanipulado y se sondeó la unión con un conjugado de cadena kappa-HRP anti-humano.

15 La Figura 5 muestra los datos del análisis citométrico de flujo de tres estirpes celulares en un experimento que evaluaba la capacidad de un anticuerpo anti-EphA3 genomanipulado ejemplar de la divulgación de unirse a EphA3 expresado en la superficie celular. Se bloquearon células B16, SKmel28 y LnCAP con BSA al 2 % e IgG de rata y se sondearon con IgG anti-EphA3 genomanipulado, IgG IIIA4 quimérica o una IgG de control isotópico. Se detectó el anticuerpo unido mediante un conjugado de IgG-ficoeritina anti-humano usando citometría de flujo Facs Caliber (BD). Se excluyeron las células muertas por tinción con yoduro de propidio. Para cada gráfica, el perfil del anticuerpo de control es la curva más a la izquierda mostrada en la gráfica.

La Figura 6 proporciona datos que muestran que un anticuerpo anti-EphA3 afucosilado tiene actividad ADCC potenciada frente a células de LMA en comparación con el anticuerpo anti-EphA3 fucosilado.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

Como se usa en la presente memoria, "EphA3" hace referencia al receptor EphA3. Se ha hecho referencia también a este receptor como "embriocinasa humana", "hek", "tirosina cinasa 1 de tipo eph", "etk1" o "tyro4". El EphA3 pertenece a la subfamilia de receptores de efrina de la familia de proteína-tirosina cinasas. Los receptores de EPH y relacionados con EPH se han implicado en la mediación de eventos de desarrollo. Los receptores de la subfamilia de EPH tienen típicamente un solo dominio cinasa y una región extracelular que contiene un dominio rico en Cys y 2 repeticiones de fibronectina de tipo III. Los receptores de efrina se dividen en 2 grupos basados en la similitud de sus secuencias de dominio extracelular y sus afinidades por la unión a los ligandos efrina-A y efrina-B. EphA3 se une a ligandos efrina-A. Las secuencias de ácido nucleico y proteína de EphA3 son conocidas. Está disponible una secuencia aminoacídica de EphA3 humana ejemplar con el número de acceso (EAW68857).

30 En la presente divulgación, la "activación" de EphA3 causa la fosforilación de EphA3. Un anticuerpo que activa EphA3, concretamente que causa la fosforilación de EphA3, se considera por lo tanto que es un agonista en el contexto de esta divulgación. El EphA3 puede activarse por dimerización. Tal activación puede conducir a fosforilación y apoptosis, aunque no necesariamente a redondeamiento celular. La activación, p. ej. cuando aparece agrupación de EphA3, puede conducir adicionalmente a cambios morfológicos, típicamente redondeamiento de la célula.

35 En la presente divulgación, "anticuerpo de EphA3" o "anticuerpo anti-EphA3" se usan intercambiamente para hacer referencia a un anticuerpo que se une específicamente a EphA3. En algunos aspectos, el anticuerpo puede dimerizar EphA3. El término engloba anticuerpos que se unen a EphA3 en presencia de unión a ligando efrina (p. ej., efrina A5), así como anticuerpos que se unen al sitio de unión a ligando y compiten con la unión de ligando a EphA3.

40 Un "anticuerpo de EphA3" que se une a EphA3 en presencia de unión de un ligando efrina" hace referencia a un anticuerpo que no evita significativamente la unión de un ligando efrina, tal como efrina A5, a EphA3. La presencia de tal anticuerpo en una reacción de unión que comprende EphA3 y un ligando efrina, p. ej. efrina A5, reduce la unión de ligando efrina a EphA3 en menos de aproximadamente un 30 %, típicamente menos de 20 % o 10 %.

45 El término "mAb IIIA4" hace referencia al anticuerpo monoclonal IIIA4 que se creó originalmente contra células de leucemia pre-B aguda humana LK63 para aislar por afinidad EphA3 (Boyd, *et al. J Biol Chem* 267: 3262-3267, 1992). El mAb IIIA4 se une al dominio de unión a efrina globular de EphA3 nativo (p. ej., Smith, *et al., J. Biol. Chem* 279: 9522-9531, 2004). Está depositado en la European Collection of Animal Cell Cultures con número de acceso 91061920 (véase, p. ej., la patente EP n°. EP0590030).

50 Un "anticuerpo que tiene un isotipo activo", como se usa en la presente memoria, hace referencia a un anticuerpo que tiene una región Fc humana que se une a un receptor de Fc presente en células inmunoefectoras. Los "isotipos activos" incluyen IgG1, IgG3, IgM, IgA e IgE. El término engloba anticuerpos que tienen una región Fc humana que comprende modificaciones, tales como mutaciones o cambios en la composición de azúcar y/o el nivel de glicosilación, que modulan la función efectora de Fc.

Una "región Fc" hace referencia a la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante. Por tanto, Fc hace referencia a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de

región constante de IgA, IgD e IgG, y a los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y a la bisagra flexible N-terminal de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C γ 2 y C γ 3 y la bisagra entre C γ 1 y C γ . Se entiende en la materia que los límites de la región Fc pueden variar, sin embargo, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente que comprende los residuos C226 o P230 hasta su extremo carboxilo, usando la numeración según el índice EU como en Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). El término "región Fc" puede hacer referencia a esta región en aislamiento o a esta región en el contexto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. "Región Fc" incluye variantes alélicas de origen natural de la región Fc así como modificaciones que modulan la función efectora. Las regiones Fc incluyen también variantes que no dan como resultado alteraciones en la función biológica. Por ejemplo, puede eliminarse uno o más aminoácidos del extremo N o el extremo C de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de la función biológica. Tales variantes pueden seleccionarse según normas generales conocidas en la materia para que tengan un efecto mínimo sobre la actividad (véase, p. ej., Bowie, *et al.*, *Science* 247: 306-1310, 1990).

El término "constante de disociación en equilibrio" o "afinidad", abreviado (K_D), hace referencia a la constante de tasa de disociación (k_d , tiempo $^{-1}$) dividida por la constante de tasa de asociación (k_a , tiempo $^{-1}$ M $^{-1}$). Las constantes de disociación en equilibrio pueden medirse usando cualquier método conocido en la materia. Los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos de alta afinidad. Tales anticuerpos tienen una afinidad monovalente (de menos) de aproximadamente 50 nM y a menudo menos de aproximadamente 10 nM, como se determina por análisis de resonancia de plasmón de superficie efectuado a 37 °C. Por tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos de la divulgación tienen una afinidad (como se mide usando resonancia de plasmón de superficie) de menos de aproximadamente 50 nM, típicamente menos de aproximadamente 25 nM, o incluso menos de 10 nM, p. ej., aproximadamente 5 nM o aproximadamente 1 nM. En el contexto de la divulgación, una afinidad es "mejor" si tiene una alta afinidad, p. ej. como se evidencia por una K_D numérica menor.

La frase "se une específica (o selectivamente)" a un anticuerpo o "es específica (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando hace referencia a una proteína o péptido, hace referencia a una reacción de unión donde el anticuerpo se une a la proteína de interés. En el contexto de esta divulgación, el anticuerpo se une típicamente a EphA3 con una afinidad que es al menos 100 veces mayor que su afinidad por otros antígenos.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo" hace referencia a una proteína definida funcionalmente como una proteína de unión y definida estructuralmente como que comprende una secuencia aminoacídica que es reconocida por un especialista como derivada de la región marco de un gen que codifica inmunoglobulina de un animal productor de anticuerpos. Un anticuerpo puede consistir en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) es conocida por comprender un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) hacen referencia a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, incluye fragmentos de anticuerpo que retienen especificidad de unión. Por ejemplo, hay una serie de fragmentos de anticuerpo bien caracterizados. Por tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo de forma C-terminal hasta los grupos de enlace disulfuro en la región de bisagra para producir F(ab)'2, un dímero de Fab que es en sí mismo una cadena ligera unida a V_H -CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab)'2 puede reducirse en condiciones suaves para romper el grupo de enlace disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo así el dímero (Fab)'2 en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (véase *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en términos de digestión de un anticuerpo intacto, un especialista apreciará que los fragmentos pueden sintetizarse de novo químicamente o utilizando metodología de ARN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en la presente memoria, incluye también fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados usando metodologías de ADN recombinante.

Los anticuerpos incluyen dímeros de V_H - V_L , incluyendo anticuerpos monocatenarios (anticuerpos que existen como una sola cadena polipeptídica), tales como anticuerpos Fv monocatenarios (sFv o scFv) en que se unen conjuntamente una región pesada variable y una ligera variable (directamente o a través de un ligador peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv monocatenario es un V_H - V_L ligado covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican V_H y V_L unidas directamente o unidas por un ligador que codifica péptido (p. ej., Huston, *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883, 1988). Aunque V_H y V_L están conectados entre sí como una sola cadena polipeptídica, los dominios V_H y V_L se asocian no covalentemente. Como

alternativa, el anticuerpo puede ser otro fragmento. Pueden generarse también otros fragmentos, p. ej., usando técnicas recombinantes, como proteínas solubles o como fragmentos obtenidos a partir de métodos de presentación. Los anticuerpos pueden incluir también dianticuerpos y minianticuerpos. Los anticuerpos de la divulgación incluyen también dímeros de cadena pesada, tales como anticuerpos de camélidos.

5 Como se usa en la presente memoria, "región V" hace referencia a un dominio de región variable de anticuerpo que comprende los segmentos de marco 1, CDR1, marco 2, CDR2 y marco 3, incluyendo CDR3 y marco 4, cuyos segmentos se añaden al segmento V como consecuencia de la transposición de los genes de región V de cadena pesada y cadena ligera durante la diferenciación de linfocitos B. Un "segmento V", como se usa en la presente memoria, hace referencia a la región de la región V (cadena pesada o ligera) que está codificada por un gen V. El
10 segmento V de la región variable de cadena pesada codifica FR1-CDR1-FR2-CDR2 y FR3. Con los fines de esta divulgación, el segmento V de la región variable de cadena ligera se define como extendida a través de FR3 hasta CDR3.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "segmento J" hace referencia a una subsecuencia de la región variable codificada que comprende una porción C-terminal de CDR3 y FR4. Un segmento J de línea germinal está codificado por un segmento de gen J de inmunoglobulina.

20 Como se usa en la presente memoria, "región determinante de la complementariedad (CDR)" hace referencia a las tres regiones hipervariables en cada cadena que interrumpen las cuatro regiones "marco" establecidas por las regiones variables de cadena ligera y pesada. Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Se hace referencia típicamente a las CDR de cada cadena como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N, y se identifican también típicamente por la cadena en que está localizada la CDR particular. Por tanto, una CDR3 de V_H está localizada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en que se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en que se encuentra.

25 Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas en una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para localizar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

30 Las secuencias aminoacídicas de las regiones CDR y marco pueden determinarse usando diversas definiciones bien conocidas en la materia, p. ej., Kabat, Chothia, the international ImMunoGeneTics database (IMGT) y AbM (véase, p. ej., Johnson *et al.*, *supra*; Chothia y Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917; Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883; Chothia C. et al., 1992, structural repertoire of the human VH segments *J. Mol. Biol.* 227, 799-817; Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1997, 273(4)). Se describen también definiciones de sitios de combinación de antígenos en los siguientes: Ruiz et al., IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.*, 28, 219-221 (2000) y Lefranc, M.-P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 1 de enero; 29(1): 207-9
35 (2001); MacCallum *et al.*, Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, *J. Mol. Biol.*, 262 (5), 732-745 (1996) y Martin *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272 (1989); Martin, *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203, 121-153, (1991); Pedersen *et al.*, *Immunomethods*, 1, 126, (1992) y Rees *et al.*, en Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172, 1996).

40 "Epítipo" o "determinante antigénico" hace referencia a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítipos pueden estar formados tanto por aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente tras exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente por tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, y más habitualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial. Los métodos de
45 determinación de la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

50 Como se usa en la presente memoria, "anticuerpo quimérico" hace referencia a una molécula de inmunoglobulina en que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o intercambiada de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) esté ligado a una región constante de clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o a una molécula enteramente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o intercambiada por una región variable, o porción de la misma, que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada; o por las correspondientes secuencias de otra especie o de otra clase
55 o subclase de anticuerpos.

Como se usa en la presente memoria, "anticuerpo humanizado" hace referencia a una molécula de inmunoglobulina en que se injertan CDR de un anticuerpo donante en secuencias marco humanas. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también residuos de origen donante en las secuencias marco. El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos

humanizados pueden comprender también residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR ni marco importadas. La humanización puede efectuarse usando métodos conocidos en la materia (p. ej., Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525; 1986; Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327, 1988; Verhoeven *et al.*, *Science* 239: 1534-1536, 1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596, 1992; patente de EE. UU. n.º 4.816.567), incluyendo técnicas tales como anticuerpos "superhumanizantes" (Tan *et al.*, *J. Immunol.* 169: 1119, 2002) y "remodeladores de superficie" (p. ej., Staelens *et al.*, *Mol. Immunol.* 43: 1243, 2006 y Roguska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 969, 1994).

Un anticuerpo "Humaneered™", en el contexto de esta divulgación, hace referencia a un anticuerpo humano genomanipulado que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia. Un anticuerpo "Humaneered™" para uso en esta divulgación tiene una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina donante. Típicamente, un anticuerpo se vuelve "Humaneered™" uniendo una secuencia de ADN que codifica un determinante de la especificidad de unión (BSD) de la región CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo de referencia a la secuencia del segmento V_H humano y un BSD de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo de referencia a una secuencia del segmento V_L. Se proporcionan métodos para "Humaneering" en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20050255552 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20060134098.

El término "determinante de especificidad de unión" o "BSD", como se usa en el contexto de la presente divulgación, hace referencia a la secuencia aminoacídica contigua o no contigua mínima en una región CDR necesaria para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo. En la actual divulgación, los determinantes de especificidad de unión mínimos residen en una porción o la longitud completa de las secuencias de CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

Un anticuerpo "humano", como se usa en la presente memoria, engloba anticuerpos humanizados y Humaneered™, así como anticuerpos monoclonales humanos que se obtienen usando técnicas conocidas.

Una preparación de anticuerpo "hipofucosilado" hace referencia a una preparación de anticuerpo en que menos de un 50 % de las cadenas de oligosacárido contienen α 1,6-fucosa. Típicamente, menos de aproximadamente un 40 %, menos de aproximadamente un 30 %, menos de aproximadamente un 20 %, menos de aproximadamente un 10 % o menos de un 5 % o menos de un 1 % de las cadenas de oligosacárido contienen α 1,6-fucosa en una preparación de anticuerpo "hipofucosilado".

Un anticuerpo "afucosilado" carece de α 1,6-fucosa en el carbohidrato enlazado con el dominio CH2 de la cadena pesada de IgG.

El término "homólogo", cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran normalmente en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias, p. ej., de genes no relacionados dispuestas para crear un nuevo ácido nucleico funcional. De forma similar, una proteína heteróloga hará referencia a menudo a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza.

El término "recombinante", cuando se usa con referencia, p. ej., a una célula o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo, o que la célula deriva de una célula así modificada. Por tanto, p. ej., las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otra manera, se subexpresan o no se expresan en absoluto. Se entiende por el término "ácido nucleico recombinante" en la presente memoria un ácido nucleico originalmente formado in vitro, en general mediante la manipulación de ácido nucleico, p. ej., usando polimerasas y endonucleasas, en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. De esta manera, se consigue el ligamiento operativo de diferentes secuencias. Por tanto, un ácido nucleico aislado en forma lineal, o un vector de expresión formado in vitro ligando moléculas de ADN que no están normalmente unidas, se consideran ambos recombinantes con los fines de esta divulgación. Se entiende que, una vez se elabora un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula u organismo hospedador, se replicará no recombinantemente, concretamente usando la maquinaria celular in vivo de la célula hospedadora en lugar de manipulaciones in vitro; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos recombinantemente, aunque posteriormente se repliquen no recombinantemente, siguen considerándose recombinantes con los fines de la divulgación. De forma similar, una "proteína recombinante" es una proteína elaborada usando técnicas recombinantes, concretamente mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.

Una enfermedad dependiente de EphA3, como se usa en la presente memoria, hace referencia a una enfermedad en que una célula que expresa EphA3 es una diana para terapia para tratar la enfermedad.

El término "células precursoras de médula ósea vasculogénicas" hace referencia a células precursoras endoteliales derivadas de médula ósea y/o células precursoras endoteliales circulantes.

El término "célula cancerosa" o "célula tumoral", como se usa en la presente memoria, hace referencia a una célula neoplásica. El término incluye células cancerosas que son benignas así como malignas. La transformación neoplásica

está asociada con cambios fenotípicos de la célula tumoral respecto al tipo celular del que deriva. Los cambios pueden incluir pérdida de inhibición por contacto, cambios morfológicos y crecimiento aberrante (véase Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique* (3ª edición, 1994).

5 “Inhibición del crecimiento de un cáncer”, en el contexto de la divulgación, hace referencia a retardar el crecimiento y/o reducir la carga de células cancerosas de un paciente que tiene cáncer. “Inhibir el crecimiento de un cáncer” incluye por tanto destruir las células cancerosas así como retardar o detener el crecimiento de células cancerosas.

Como se usa en la presente memoria, “agente terapéutico” hace referencia a un agente que, cuando se administra a un paciente que padece una enfermedad, en una dosis terapéuticamente eficaz, curará, o al menos detendrá parcialmente los síntomas de la enfermedad y las complicaciones asociadas con la enfermedad.

10 Los términos “idéntico” o “identidad” porcentual, en el contexto de dos o más secuencias de polipéptido (o ácido nucleico), hacen referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos aminoácidos (o nucleótidos) que son iguales (concretamente, aproximadamente un 60 % de identidad, preferiblemente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad en una región especificada, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada) como se mide usando algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos a continuación, o por alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., el sitio web de NCBI). Se dice entonces que tales secuencias son “sustancialmente idénticas”. Las secuencias “sustancialmente idénticas” incluyen también secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones, así como variantes de origen natural, p. ej. polimórficas o alélicas, y variantes artificiales. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden dar cuenta de huecos y similares. Preferiblemente, existe identidad de secuencia de proteína en una región que es de al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o más preferiblemente, en una región que es de 50-100 aminoácidos de longitud, o en toda la longitud de una proteína.

25 Una “ventana de comparación”, como se usa en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de una de la serie de posiciones contiguas seleccionadas del grupo consistente típicamente en 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinear óptimamente las dos secuencias. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la materia. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, p. ej., por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. suplemento de 1995)).

40 Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar la identidad de secuencia y la similitud de secuencia porcentuales incluyen los algoritmos BLAST y BLAST2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1977) y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). BLAST y BLAST2.0 se usan, con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar la identidad de secuencia porcentual para los ácidos nucleicos y proteínas de la divulgación. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M= 5, N= -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias aminoácidas, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)), alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M= 5, N= -4 y comparación de ambas hebras.

45 Un indicativo de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido sea inmunológicamente reactivo de forma cruzada con los anticuerpos creados contra el segundo polipéptido. Por tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, p. ej., cuando los dos péptidos difieren solo en sustituciones conservativas.

50 Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” hacen referencia a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que lo acompañan normalmente cuando se encuentra en su estado nativo. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliácridamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. El término “purificada” en algunos aspectos designa que una proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. Preferiblemente, significa que la proteína es al menos un 85 % pura, más preferiblemente al menos un 95 % pura y lo más preferiblemente al menos un 99 % pura.

55 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan intercambiabilmente en la presente memoria para hacer referencia a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros aminoácidos en que uno o más residuos aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros aminoácidos de origen natural, aquellos que contienen residuos modificados y polímeros

aminoacídicos de origen no natural.

El término “aminoácido” hace referencia a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican después, p. ej. hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos aminoacídicos hace referencia a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, p. ej. un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p. ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina y metioninametil sulfonio. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (p. ej. norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Mimético de aminoácidos hace referencia a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de forma similar a un aminoácido de origen natural.

Puede hacerse referencia a los aminoácidos en la presente memoria por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Puede hacerse referencia a los nucleótidos, igualmente, por sus códigos de una letra comúnmente aceptados.

“Variantes modificadas conservativamente” se aplica tanto a secuencias aminoacídicas como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas hacen referencia a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias aminoacídicas idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia aminoacídica, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas, p. ej. contiguas naturales. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en que una alanina está especificada por un codón, el codón puede alterarse a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente memoria que codifica un polipéptido describe también variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un especialista en la materia reconocerá que, en ciertos contextos, cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) puede modificarse para procurar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, a menudo las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sondeo reales.

En cuanto a las secuencias aminoacídicas, un especialista en la materia reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteran, añaden o eliminan un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada son una “variante modificada conservativamente”, donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la materia. Tales variantes modificadas conservativamente son, además de y sin exclusión, variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de la divulgación. Típicamente, son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T) y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, Proteins (1984)).

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto imponga claramente otra cosa.

I. Introducción

La divulgación se refiere a anticuerpos que se unen a EphA3 con alta afinidad y, típicamente, activan EphA3. Los anticuerpos comprenden regiones variables con un alto grado de identidad de secuencia aminoacídica con las secuencias V_H y V_L de línea germinal humana. En aspectos preferidos, la CDRH3 de un anticuerpo de la divulgación comprende la secuencia aminoacídica $X_1GX_2YE(X_3)FDX_4$, en la que X_1 es S o G, X_2 es Y o V, X_3 es E o D, y X_4 es S, V o I, con la condición de que la secuencia aminoacídica no sea SGYYEDFDS. En algunos aspectos, la CDRL3 de un anticuerpo de la divulgación comprende la secuencia aminoacídica $X_1X_2YX_3X_4YPYT$, en la que X_1 es V o A, X_2 es Q, R o G, X_3 es A, S o L y X_4 es N o K.

Típicamente, la porción de CDR3 que excluye el BSD y la FR4 completa están compuestas por secuencias de línea germinal humanas. En algunos aspectos, la secuencia CDR3-FR4 que excluye el BSD difiere de las secuencias de línea germinal humana en no más de 2 aminoácidos en cada cadena. En algunos aspectos, el segmento J comprende un segmento J de línea germinal humana. Las secuencias de línea germinal humana pueden determinarse, por ejemplo, mediante la base de datos International ImMunoGeneTics (IMGT) disponible públicamente y la V-base (en www.vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

El repertorio del segmento V de línea germinal humana consiste en 51 regiones V de cadena pesada, 40 segmentos

V de cadena ligera κ y 31 segmentos V de cadena ligera λ , haciendo un total de 3.621 pares de región V de línea germinal. Además, hay variantes alélicas estables para la mayoría de estos segmentos V, pero la contribución de estas variantes a la diversidad estructural del repertorio de línea germinal es limitada. Las secuencias de todos los genes de segmento V de línea germinal humana son conocidas y puede accederse a ellas en la base de datos V-base, proporcionada por el MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido (véanse también Chothia et al., 1992, J Mol Biol 227: 776-798; Tomlinson et al., 1995, EMBO J 14: 4628-4638 y Williamset al., 1996, J Mol Biol 264: 220-232).

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo como se describen en la presente memoria pueden expresarse en sistemas microbianos procarióticos o eucarióticos o en las células de eucariotas superiores tales como células de mamífero.

Un anticuerpo que se emplea en la divulgación puede estar en cualquier formato. Por ejemplo, en algunos aspectos, el anticuerpo puede ser uno que incluye una región constante, p. ej. una región constante humana, p. ej. una Ig intacta, un Fab, Fab', F(ab')₂ o un fragmento de una inmunoglobulina intacta, p. ej. un SCFV o Fv.

II. Cadenas pesadas

Una cadena pesada de un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación comprende una región V de cadena pesada que comprende los siguientes elementos:

- 1) secuencias de segmento V de cadena pesada humana que comprenden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3
- 2) una región CDRH3 que comprende la secuencia aminoacídica X₁GX₂YEX₃FDX₄, en la que X₁ es S o G, X₂ es Y o V, X₃ es E o D y X₄ es S, V o I, con la condición de que la secuencia aminoacídica no sea SGYYEDFDS; y
- 3) una FR4 contribuida por un segmento de gen J de línea germinal humana.

En algunos aspectos, la CDR3 comprende GGYEDFDS, SGYYEEFDS, SGVYEDFDS, SGYYEDFDV o SGYYEDFDI.

El segmento V tiene típicamente al menos un 80 % de identidad, o un 85 %, 90 % o 95 % o más de identidad con un segmento V de línea germinal humana, p. ej. una subclase VH1 humana. Por tanto, en algunos aspectos, el segmento V es un segmento V_{H1} 1-02 humano con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad con el segmento de línea germinal VH1 1-02. En algunos aspectos, el segmento V difiere en no más de 15 residuos de VH1 1-02 y preferiblemente no más de 10 residuos.

En algunos aspectos, un anticuerpo de la divulgación comprende un segmento V que tiene al menos un 90 % de identidad, o al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con el segmento de línea germinal VH 1-02; o con uno de los segmentos V de las regiones V_H mostradas en la Figura 1.

La secuencia de FR4 de los anticuerpos de la divulgación se proporciona por un segmento de línea germinal del gen JH1, JH3, JH4, JH5 o JH6 humano, o una secuencia que tiene un alto grado de identidad de secuencia aminoacídica, p. ej. al menos un 90 % o 95 % de identidad, o difiere en no más de 3, típicamente en no más de 2 residuos aminoacídicos en comparación con un segmento JH de línea germinal humana. En algunos aspectos, el segmento J es de una secuencia JH6 de línea germinal humana y la FR4 tiene la secuencia WGQGTTVTVSS.

En algunos aspectos, el segmento V de la región V_H tiene unas CDR1 y/o CDR2 como se muestran en la Figura 1. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede tener una CDR1 que tiene la secuencia GYWMN, TYWIS o SYWIN.

Un anticuerpo de la divulgación puede tener una CDR2 que tiene la secuencia DIYPGSGNTNYDEKFQG, DIYPGSGNTNYAQKFQG, DIYPGSGNTNYAQEFRG, DIYPGSGNTNYAQKFLG o DIYPGSGNTNYDEKFKR. Por tanto, en algunos aspectos, un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación puede tener una región CDR3 de V_H que tiene la secuencia GGYEDFDS, SGYYEEFDS, SGVYEDFDS, SGYYEDFDV o SGYYEDFDI, y una secuencia de CDR1 GYWMN, TYWIS o SYWIN y una CDR2 DIYPGSGNTNYDEKFQG, DIYPGSGNTNYAQKFQG, DIYPGSGNTNYAQEFRG, DIYPGSGNTNYAQKELG o DIYPGSGNTNYDEKFKR.

En algunos aspectos, un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación puede tener una región CDR3 de V_H que tiene la secuencia SGYYEDFDS y una CDR1 y/o CDR2 de una región V_H expuesta en la Figura 1.

En algunos aspectos, un segmento V de la región V_H de un anticuerpo de la divulgación tiene una secuencia de segmento V mostrada en la Figura 1.

En aspectos típicos, un anticuerpo de la divulgación tiene una secuencia de la región V_H expuesta en la Figura 1.

III. Cadenas ligeras

Una cadena ligera de un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación comprende una región V de cadena ligera que comprende los siguientes elementos:

- 1) secuencias de segmento V de cadena ligera humana que comprenden FR1-CDR1-FR2-CDR2-
FR3
- 2) una región CDRL3 que tiene la secuencia de CDR3 que comprende la secuencia $X_1X_2YX_3X_4PYT$, en la que X_1 es V o A; X_2 es Q, R o G; X_3 es A, S o L; y X_4 es N o K; y
- 3) una FR4 contribuida por un segmento de gen J de línea germinal humana.

En algunos aspectos, la CDR3 tiene una secuencia $X_1X_2YX_3X_4YPYT$, en la que X_1 es V, X_2 es Q, X_3 es A y X_4 es N. En algunos aspectos, la CDR3 de V_L es GQYANYPYT, VQYAKYPYT, AQYANYPYT, VQYSNYPYT, VQYANYPYT, VGYANYPYT, VRYANYPYT o VQYLNYPYT.

La región V_L comprende un segmento V de V_{λ} o V_{κ} . Se proporciona en la Figura 1 un ejemplo de una secuencia de V_{κ} que soporta la unión en combinación con una región V_H complementaria.

Los segmentos de V_{κ} pueden ser de cualquier subclase, p. ej., y son a menudo de la subclase $V_{\kappa 1}$. En algunos aspectos, los segmentos tienen al menos un 80 % de identidad de secuencia con una $V_{\kappa 1}$ de línea germinal humana, p. ej. al menos un 80 % de identidad con la secuencia de $V_{\kappa 1}$ L15 de línea germinal humana. En algunos aspectos, el segmento V_{κ} puede diferir en no más de 5 residuos de $V_{\kappa 1}$ L15. En otros aspectos, el segmento V de la región V_L de un anticuerpo de la divulgación tiene al menos un 85 % de identidad, o al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia del segmento V de V_{κ} humana de una región V_L mostrada en la Figura 1.

La secuencia de FR4 de la región V_L de un anticuerpo de la divulgación se proporciona por un segmento J de línea germinal humana, p. ej., o una secuencia que tiene un alto grado de identidad de secuencia aminoacídica con un segmento J de línea germinal humana. En algunos aspectos, el segmento J es una secuencia $J_{\kappa 2}$ de línea germinal humana y la FR4 del anticuerpo tiene la secuencia FGQGKLEIK.

En algunos aspectos, el segmento V de la región V_L tiene CDR1 y/o CDR2 como se muestran en la Figura 1. Por tanto, un anticuerpo de la divulgación puede tener una secuencia de CDR1 RASQGIISYLA, QASQDISTYLN, RASQEISGYLG o RASQSISSYLA y/o una secuencia de CDR2 AASSLQS, GASSLQS, AASSLQR o AASTLDS.

En aspectos particulares, un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación puede tener una CDR1 y CDR2 de la región V_L en combinación como se muestra en uno de los segmentos V de las regiones V_L expuestas en la Figura 1 y una secuencia de CDR3 de la región V_L que comprende GQYANYPYT, VQYAKYPYT, AQYANYPYT, VQYSNYPYT, VQYANYPYT, VGYANYPYT, VRYANYPYT o VQYLNYPYT. En algunos aspectos, tal anticuerpo anti-EphA3 puede comprender una región FR4 de la región V_L que es FGQGKLEIK. Por tanto, una región V_L de un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación puede comprender, p. ej. una CDR3 GQYANYPYT, VQYAKYPYT, AQYANYPYT, VQYSNYPYT, VQYANYPYT, VGYANYPYT, VRYANYPYT o VQYLNYPYT; una secuencia de CDR1 RASQGIISYLA, QASQDISTYLN, RASQEISGYLG o RASQSISSYLA; y una secuencia de CDR2 AASSLQS, GASSLQS, AASSLQR o AASTLDS.

En algunos aspectos, un segmento V de la región V_L de un anticuerpo de la divulgación tiene una secuencia de segmento V mostrada en la Figura 1.

En un aspecto típico, un anticuerpo de la divulgación tiene una secuencia de la región V_L como se expone en la Figura 1.

En algunos aspectos, un anticuerpo de la divulgación comprende una cualquiera de las regiones V_L expuestas en las SEQ ID NO:11-23 con una cualquiera de las regiones V_H expuestas en las SEQ ID NO:1-10.

IV. Preparación de anticuerpos de EphA3

La afinidad de un anticuerpo puede valorarse usando ensayos bien conocidos para determinar la actividad y afinidad de unión. Tales técnicas incluyen ensayos de ELISA así como determinaciones de unión que emplean resonancia de plasmón de superficie o interferometría. Por ejemplo, pueden determinarse las afinidades por interferometría de biocapa usando un biosensor Octet ForteBio (Mountain View, CA).

Los anticuerpos de la divulgación compiten típicamente con mIIIA4 por la unión a EphA3. La capacidad de un anticuerpo descrito en la presente memoria de bloquear o competir con mIIIA4 para unión a EphA3 indica que el anticuerpo se une al mismo epítipo o a un epítipo que es cercano a, p. ej. superpuesto con, el epítipo que se une por mIIIA4 para unión a EphA3. En otros aspectos, puede usarse un anticuerpo descrito en la presente memoria, p. ej. un anticuerpo que comprende una combinación de regiones V_L y V_H como se muestra en la tabla proporcionada en

la Figura 1, como anticuerpo de referencia para valorar si otro anticuerpo compite por la unión a EphA3. Se considera que un anticuerpo de prueba inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia si la unión del anticuerpo de referencia al antígeno se reduce en al menos un 30 %, habitualmente al menos aproximadamente un 40 %, 50 %, 60 % o 75 %, y a menudo en al menos aproximadamente un 90 %, en presencia del anticuerpo de prueba. Pueden emplearse muchos ensayos para valorar la unión, incluyendo ELISA, así como otros ensayos tales como inmunotransferencias.

En aspectos típicos, el anticuerpo es un anticuerpo activante. Puede ensayarse un anticuerpo para confirmar que el anticuerpo retiene la actividad de activación de EphA3. La actividad puede determinarse usando cualquier número de criterios de valoración, incluyendo ensayos de fosforilación, o un criterio de valoración indirecto tal como la apoptosis.

Se han descrito anteriormente métodos para el aislamiento de anticuerpos con secuencias de la región V cercanas a las secuencias de línea germinal humana (publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20050255552 y 20060134098). Las colecciones de anticuerpos pueden expresarse en una célula hospedadora adecuada que incluye células de mamífero, células de levadura o células procarióticas. Para expresión en algunos sistemas celulares, puede introducirse un péptido señal en el extremo N para dirigir la secreción al medio extracelular. Los anticuerpos pueden secretarse de células bacterianas tales como *E. coli* con o sin un péptido señal. Se describen métodos para la secreción sin señal de fragmentos de anticuerpo a partir de *E. coli* en la solicitud de patente de EE. UU. 20070020685.

Para generar un anticuerpo de unión a EphA3, se combina una de las regiones V_H de la divulgación, p.ej. mostrada en la Figura 1, con una de las regiones V_L de la divulgación, p. ej. mostrada en la Figura 1, y se expresa en cualquiera de una serie de formatos en un sistema de expresión adecuado. Por tanto, el anticuerpo puede expresarse como scFv, Fab, Fab' (que contiene una secuencia bisagra de inmunoglobulina), $F(ab')_2$, (formado por formación de enlace disulfuro entre las secuencias de bisagra de dos moléculas de Fab'), inmunoglobulina completa o inmunoglobulina troncada o como proteína de fusión en una célula hospedadora procariótica o eucariótica, dentro de la célula hospedadora o por secreción. Puede estar opcionalmente presente un residuo de metionina en el extremo N, por ejemplo, en polipéptidos producidos en sistemas de expresión sin señal. Cada una de las regiones V_H descritas en la presente memoria puede emparejarse con cada una de las regiones V_L para generar un anticuerpo anti-EphA3.

Pueden producirse anticuerpos usando cualquier serie de sistemas de expresión, incluyendo tanto sistemas de expresión procarióticos como eucarióticos. En algunos aspectos, el sistema de expresión es una expresión en células de mamífero, tal como un sistema de expresión en células CHO. Muchos de tales sistemas están ampliamente disponibles de suministradores comerciales. En aspectos en que un anticuerpo comprende tanto una región V_H como V_L , las regiones V_H y V_L pueden expresarse usando un solo vector, p. ej., en una unidad de expresión dicistrónica, o bajo el control de diferentes promotores. En otros aspectos, la región V_H y V_L puede expresarse usando vectores separados. Una región V_H o V_L como se describe en la presente memoria puede comprender opcionalmente una metionina en el extremo N.

Puede producirse un anticuerpo de la divulgación en cualquier serie de formatos, incluyendo como Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv o dAb. Un anticuerpo de la divulgación puede incluir también una región constante humana. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada es a menudo una región constante de cadena gamma, por ejemplo una región constante gamma-1, gamma-2, gamma-3 o gamma-4. En otros aspectos, el anticuerpo puede ser una IgA o IgM.

En algunos aspectos de la divulgación, se combina la región V_L de anticuerpo, p. ej. una región V_L expuesta en la Figura 1, con una región constante kappa humana (p. ej. de SEQ ID NO:25) formando la cadena ligera completa.

En algunos aspectos de la divulgación, se combina la región V_H con una región constante gamma-1 humana. Puede elegirse cualquier alotipo de gamma-1 adecuado. Por tanto, en algunos aspectos, el anticuerpo es una IgG que tiene una región constante, p. ej. de SEQ ID NO:24, que tiene una V_H seleccionada de la secuencia de la región V_H expuesta en la Figura 1. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una V_L seleccionada de las secuencias de la región V_L expuestas en la Figura 1. En aspectos particulares, el anticuerpo tiene una región constante kappa como se expone en la SEQ ID NO:25, y una región constante de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO:24, donde las regiones variables de cadena pesada y ligera comprenden una de las siguientes combinaciones de secuencias expuestas en la Figura 1.

En algunos aspectos, p. ej. cuando el anticuerpo es un fragmento, el anticuerpo puede conjugarse con otra molécula, p. ej. polietilenglicol (PEGilación) o seroalbúmina, para proporcionar una semivida *in vivo* alargada. Se proporcionan ejemplos de PEGilación de fragmentos de anticuerpo en Knight *et al. Platelets* 15: 409, 2004 (para abciximab); Pedley *et al., Br. J. Cancer* 70: 1126, 1994 (para un anticuerpo anti-CEA); Chapman *et al., Nature Biotech.* 17: 780, 1999 y Humphreys, *et al., Protein Eng. Des.* 20: 227, 2007).

En algunos aspectos, los anticuerpos de la divulgación están en forma de un Fab' o un $(Fab')_2$.

Se genera una cadena ligera de longitud completa por fusión de una región V_L con una región constante kappa o lambda humana. Puede usarse cualquier región constante para cualquier cadena ligera; sin embargo, en aspectos típicos, se usa una región constante kappa en combinación con una región variable V_kappa y se usa una región constante lambda con una región variable V_lambda .

La cadena pesada de Fab' es un fragmento Fd' generado por fusión de una región V_H de la divulgación con secuencias de región constante de cadena pesada humana, el primer dominio constante (CH1) y la región bisagra. Las secuencias de región constante de cadena pesada pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, pero son a menudo de una IgG, y pueden ser de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos Fab' de la divulgación pueden ser también secuencias híbridas, p. ej. una secuencia bisagra puede ser de una subclase de inmunoglobulina y el dominio CH1 puede ser de una subclase diferente.

Un anticuerpo que se emplea en la divulgación puede estar en numerosos formatos. En algunos aspectos, el anticuerpo puede incluir una región Fc, p. ej. una región Fc humana. Por ejemplo, tales anticuerpos incluyen anticuerpos de IgG que se unen a EphA3 y que tienen un isotipo activo. En algunos aspectos, el anticuerpo puede ser un fragmento activo (p. ej., puede dimerizar EphA3) o derivado de un anticuerpo tal como un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv o un anticuerpo de un solo dominio ("dAb"). Por ejemplo, en algunos aspectos, el anticuerpo puede ser un F(ab')₂. Otros aspectos ejemplares de anticuerpos que pueden emplearse en la divulgación incluyen nanocuerpos activadores o anticuerpos camélicos activadores. Tales anticuerpos pueden adicionalmente genomanipularse recombinantemente mediante métodos bien conocidos por el especialista en la materia. Como se señala anteriormente, tales anticuerpos pueden producirse usando técnicas conocidas. Como se aprecia por un especialista en la materia, en algunos aspectos, cuando el anticuerpo está en un formato que puede ser monovalente, p. ej. un formato de Fv o Fab, el anticuerpo puede emplearse como un anticuerpo multivalente, tal como un anticuerpo trivalente o tetravalente. Son conocidos métodos de generación de anticuerpos multivalentes (véase, p. ej., King *et al.*, *Cancer Res.* 54: 6176-6185, 1994).

En muchos aspectos, un anticuerpo para uso en la divulgación tiene una región constante Fc que tiene una función efectora, p. ej., se une a un receptor de Fc presente en células inmunoefectoras. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q, citotoxicidad dependiente de complemento, unión a receptor de Fc, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, regulación negativa de los receptores de superficie celular (p. ej., receptor de linfocitos B) y similares. Tales funciones efectoras requieren generalmente combinar la región Fc con un dominio de unión (p. ej., un dominio variable de anticuerpo) y pueden valorarse usando ensayos conocidos (véanse, p. ej., las referencias citadas a continuación).

Los anticuerpos anti-EphA3 que tienen un isotipo activo y están unidos a receptores de Fc en células efectoras, tales como macrófagos, monocitos, neutrófilos y células NK, pueden inducir la muerte celular por ADCC.

La región Fc puede ser de una IgG1 de origen natural u otros isotipos activos, incluyendo IgG3, IgM, IgA e IgE. "Isotipos activos" incluyen anticuerpos donde la región Fc comprende modificaciones para aumentar la unión al receptor de Fc o mejorar de otro modo la potencia del anticuerpo. Tal región constante de Fc puede comprender modificaciones, tales como mutaciones, cambios del nivel de glicosilación y similares, que aumentan la unión al receptor de Fc. Hay muchos métodos de modificar las regiones Fc que son conocidos en la materia. Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20060039904 describe variantes de receptores de Fc que tienen una función efectora potenciada, incluyendo afinidad de unión modificada por uno o más ligandos de Fc (p. ej., FcγR, C1q). Adicionalmente, tales variantes de Fc tienen citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) alteradas. Otras variantes de Fc incluyen aquellas divulgadas por Ghetie *et al.*, *Nat Biotech.* 15: 637-40, 1997; Duncan *et al.*, *Nature* 332: 563-564, 1988; Lund *et al.*, *J. Immunol* 147: 2657-2662, 1991; Lund *et al.*, *Mol Immunol* 29: 53-59, 1992; Alegre *et al.*, *Transplantation* 57: 1537-1543, 1994; Hutchins *et al.*, *Proc Natl. Acad Sci USA* 92: 11980-11984, 1995; Jefferis *et al.*, *Immunol Lett.* 44: 111-117, 1995; Lund *et al.*, *FASEB J* 9: 115-119, 1995; Jefferis *et al.*, *Immunol Lett* 54: 101-104, 1996; Lund *et al.*, *J Immunol* 157: 4963-4969, 1996; Armour *et al.*, *Eur J Immunol* 29: 2613-2624, 1999; Idusogie *et al.*, *J Immunol* 164: 4178-4184, 2000; Reddy *et al.*, *J Immunol* 164: 1925-1933, 2000; Xu *et al.*, *Cell Immunol* 200: 16-26, 2000; Idusogie *et al.*, *J Immunol* 166: 2571-2575, 2001; Shields *et al.*, *J Biol Chem* 276: 6591-6604, 2001; Jefferis *et al.*, *Immunol Lett* 82: 57-65, 2002; Presta *et al.*, *Biochem Soc Trans* 30: 487-490, 2002; Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4005-4010, 2006; patentes de EE. UU. n.º 5.624.821; 5.885.573; 5.677.425; 6.165.745; 6.277.375; 5.869.046; 6.121.022; 5.624.821; 5.648.260; 6.194.551; 6.737.056; 6.821.505; 6.277.375; 7.335.742 y 7.317.091; y las publicaciones PCT WO 94/2935; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919 y WO 04/029207.

La glicosilación es una forma de modificación postraducciona mediante la que se ligan enzimáticamente carbohidratos (azúcares) con macromoléculas para producir glicanos. En el contexto de la presente divulgación, los carbohidratos se enlazan típicamente con la región Fc de anticuerpo a través de uno o más ligamientos de N (a través de un nitrógeno de cadenas laterales de asparagina o arginina); sin embargo, son también posibles ligamientos de O (a través de un oxígeno de hidroxilo de cadenas laterales de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina o hidroxiprolina). Generalmente, los anticuerpos de IgG tienen un sitio de glicosilación N-ligado conservado en el dominio CH2 en el residuo Asn297, mientras que algunas clases y subclases tienen también azúcares ligados por O, a menudo en la región de bisagra, p. ej. IgD e IgA de algunas especies. Los azúcares son típicamente azúcares ramificados complejos ricos en manosa; en el caso de ligamientos de N, el azúcar que se enlaza directamente con el nitrógeno de cadena lateral de aminoácido es típicamente N-acetilglucosamina.

En algunos aspectos, puede modificarse la glicosilación de regiones Fc. Por ejemplo, una modificación puede ser la aglicosilación, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia de anticuerpo. Se describe tal enfoque con detalles adicionales en las patentes de EE. UU. n.º 5.714.350 y 6.350.861. Puede elaborarse también

una región Fc que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como una variante de Fc hipofucosilada que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo, o una variante de Fc afucosilada que carece de residuos de fucosilo, o una variante de Fc que tiene estructuras de GlcNAc bisectrices aumentadas. Tales modificaciones de carbohidrato pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en la materia células con maquinaria de glicosilación alterada, incluyendo células de mieloma de rata así como de levaduras y plantas, y pueden usarse como células hospedadoras en que expresar anticuerpos recombinantes de la divulgación para producir así un anticuerpo con glicosilación alterada.

Umana *et al*, *Nat. Biotechnol* 17: 176-180, 1999, describe GlcNAc bisectrices que dan como resultado ADCC 10 veces mayor. Umana señala que tales moléculas bisectrices dan como resultado menos fucosilación.

Davies, *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 74: 288-294, 2001, describen células CHO con la enzima β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) insertada (que causa la estructura de GlcNAc bisectriz) que dan como resultado una ADCC aumentada de los anticuerpos anti-CD20. La patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana) describe células genomanipuladas para producir glicoproteínas con GlcNAc bisectrices.

Se proporcionan ejemplos de métodos para reducir la fucosilación de una preparación de anticuerpos en Shields *et al*, *J Biol Chem* 277: 26733-26740, 2002, que describe células CHO (Lec13) deficientes en fucosilación para producir IgG1 y describe además que la unión de la IgG1 deficiente en fucosa a Fc γ RIIIA humana mejoraba hasta 50 veces y aumentaba la ADCC. Además, Shinkawa *et al.*, *J Biol Chem* 278: 3466-3473, 2003, comparan la IgG producida en células YB2/0 y CHO. Las células YB2/0 tienen una fucosilación reducida y un contenido de GlcNAc bisectrices aumentado. Niwa *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 1-: 6248-6255, 2004, comparan anticuerpos anti-CD20 con anticuerpos elaborados en células YB2/0 (baja fucosilación) y observaron ADCC potenciada en las últimas. Se proporcionan ejemplos de técnicas para producir anticuerpos afucosilados, por ejemplo, en Kanda *et al*, *Glycobiology* 17: 104-118, 2006. La patente de EE. UU. n.º 6.946.292 (Kanda) describe células con desactivación génica de fucosiltransferasa para producir anticuerpos afucosilados. La patente de EE. UU. n.º 7.214.775 y el documento WO 00/61739 describen preparaciones de anticuerpo en que el 100 % de los anticuerpos están afucosilados.

Son también conocidas otras técnicas para modificar la glicosilación. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20070248600 y 20070178551 (Métodos de tecnología GlycoFi que emplean células eucarióticas genomanipuladas (levadura) para producir estructuras de glicosilación "humanas"); 20080060092 (Métodos de tecnología Biolex que emplean plantas genomanipuladas para producir estructuras de glicosilación "humanas"); 20060253928 (que describía también la genomanipulación de plantas para producir anticuerpos "humanos").

Las técnicas adicionales para reducir fucosa incluyen la tecnología ProBioGen (von Horsten *et al.*, *Glycobiology*, (publicación con acceso adelantado de 23 de julio de 2010); tecnología Potelligent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.) y tecnología de genomanipulación de la glicosilación GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza).

El contenido de oligosacárido ligado por N de un anticuerpo puede analizarse mediante métodos conocidos en la materia. El siguiente es un ejemplo de tal método: se someten los anticuerpos a digestión con la enzima N-glicosidasa F (Roche; TaKaRa). Se analizan los carbohidratos liberados por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) con modo iónico positivo (Papac *et al.*, *Glycobiol.* 8: 445-454, 1998). Se caracteriza entonces la composición de monosacáridos mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución modificada (HPAEC) (Shinkawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278: 3466-3473, 2003).

En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo se genomanipula adicionalmente para reducir la inmunogenicidad, p. ej., de modo que el anticuerpo sea adecuado para administración repetida. Los métodos para generar anticuerpos con inmunogenicidad reducida incluyen procedimientos de humanización y Humaneering y técnicas de modificación tales como desimmunización, en que un anticuerpo se genomanipula adicionalmente, p. ej. en una o más regiones marco, para retirar los epítomos de linfocitos T.

En algunos aspectos, se emplean anticuerpos en una forma que puede activar el EphA3 presente sobre la superficie de células que expresan EphA3, p. ej., células precursoras de médula ósea vasculogénicas, o que pueden destruir tales células por ADCC. Por tanto, en algunos aspectos, un anticuerpo es dimérico. En otros aspectos, el anticuerpo puede estar en una forma monomérica que tiene un isotipo activo. En algunos aspectos, el anticuerpo está en una forma multivalente, p. ej. una forma trivalente o tetravalente, que puede reticular EphA3.

V. Administración de anticuerpos anti-EphA3 para el tratamiento de enfermedades en que EphA3 es una diana

La divulgación proporciona también métodos de tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad en que es deseable destruir células que expresan EphA3. En algunos aspectos, tal enfermedad puede ser una enfermedad neoplásica. Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica usando un anticuerpo de la divulgación, donde el método comprende administrar un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación a un paciente (que tiene un tumor) para inhibir el crecimiento tumoral. Los tumores que pueden tratarse incluyen tumores de mama, pulmón, colon, estómago, hígado, riñón, ovario, esófago y próstata y otros. Un tumor sólido tratado con un anticuerpo de la divulgación puede ser, por lo tanto, un carcinoma de mama, carcinoma

- pulmonar, carcinoma de próstata, carcinoma gástrico, carcinoma esofágico, carcinoma colorrectal, carcinoma hepático, carcinoma ovárico, carcinoma vulvar, carcinoma renal, carcinoma cervicouterino, carcinoma endométrico, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma laríngeo, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoma cutáneo, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinoma pancreático, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas, sarcomas incluyendo fibrosarcomas, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomyosarcoma, carcinoma de tracto urinario, carcinoma tiroideo y tumor de Wilm. Pueden tratarse también la proliferación vascular anormal asociada con facomatosis y edema (tal como el asociado con tumores cerebrales) con un anticuerpo de la divulgación.
- 5
- 10 En algunos aspectos, se administra el anticuerpo anti-EphA3 a un paciente que expresa EphA3 sobre la superficie de células tumorales. En algunos aspectos, se administra anti-EphA3 a un paciente que expresa EphA3 sobre el endotelio de vasos sanguíneos en el tumor. En algunos aspectos, el paciente puede expresar EphA3 tanto sobre la superficie de células tumorales como el endotelio. En algunos aspectos, el anticuerpo está en un formato como se describe, p. ej., en el documento WO/2008/112192.
- 15 En algunos aspectos, se trata una afección no neoplásica usando un anticuerpo de la divulgación. La afección no neoplásica se selecciona del grupo consistente en hipertrofia indeseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas psoriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, edema por infarto de miocardio, retinopatía diabética y otras proliferativas, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, rechazo de injerto corneal, neovascularización retiniana-coroidea, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/SDRA, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, derrames pulmonares malignos, edema cerebral (p. ej., asociado con apoplejía aguda/lesión cerebral cerrada/traumatismo), inflamación sinovial, formación de paño en AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, enfermedades del tercer espacio de fluidos (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica tal como EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrótico, crecimiento de masa de tejido indeseado o aberrante (no canceroso), obesidad, crecimiento de masa de tejido adiposo, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del cabello, síndrome de Osier-Weber, granuloma piogénico, fibroplasias retrolentales, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico y derrame pleural.
- 20
- 25
- 30 En algunos aspectos, se administra un anticuerpo de la divulgación a un paciente que padece un trastorno mieloproliferativo. En algunos aspectos, el trastorno mieloproliferativo es leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico, policitemia vera (PV), trombocitopenia esencial (TE) o mielofibrosis idiopática (MI). En algunos aspectos, puede usarse un anticuerpo anti-EphA3 de la divulgación en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar un paciente que tiene leucemia mieloide crónica donde los citoblastos leucémicos del paciente expresan EphA3. Tales agentes terapéuticos incluyen diversos agentes quimioterapéuticos y mesilato de imatinib (GLEEVEC®).
- 35
- 40 El anticuerpo puede administrarse solo o en combinación con otras terapias para tratar la enfermedad de interés. En algunos aspectos, se administra el anticuerpo anti-EphA3 en combinación con un antagonista de Bv8, p. ej., un antagonista anticuerpo de Bv8. Los antagonistas de Bv8 son conocidos (véanse, p. ej., el documento WO 2009039337 y las referencias relativas a antagonistas de Bv8 citadas en el mismo). Por ejemplo, los antagonistas de Bv8 incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a un polipéptido Bv8 de secuencia nativa, o a un polipéptido receptor de Bv8 de secuencia nativa (PKR-1/EG-VEGFR1 o PKR-2/EG-VEGFR2). En algunos aspectos, un paciente puede tratarse también con agentes terapéuticos adicionales, incluyendo un antagonista de VEGF, p. ej. un antagonista anticuerpo anti-VEGF, así como otros agentes terapéuticos cuyos ejemplos se describen adicionalmente a continuación.
- 45
- 50 En algunos aspectos, se administra el anticuerpo anti-EphA3 a un paciente que se ha tratado anteriormente con un antagonista de VEGF, p. ej. un antagonista anticuerpo anti-VEGF. En algunos aspectos, el tumor puede ser resistente al tratamiento con un antagonista de VEGF. En algunos aspectos, se administra el anticuerpo anti-EphA3 a un paciente que tiene un tumor de estadio temprano, p. ej. un tumor de estadio I, estadio II o estadio III.
- 55 Un paciente que se considera resistente al tratamiento con un antagonista de VEGF, p. ej. un antagonista anticuerpo de VEGF, o que tiene un tumor que es resistente al tratamiento con un antagonista de VEGF como se usa en la presente memoria hace referencia a un paciente que responde a la terapia pero padece efectos secundarios, desarrolla resistencia, no responde a la terapia, no responde satisfactoriamente a la terapia, etc. Por tanto, en tales pacientes, o los tumores de tales pacientes, el número de células tumorales no se ha reducido significativamente, o ha aumentado, o el tamaño tumoral no se ha reducido significativamente, o ha aumentado, o no hay una reducción adicional del tamaño o número de células cancerosas. La determinación de que el paciente es resistente al tratamiento puede realizarse *in vivo* o *in vitro* por cualquier método conocido en la materia para ensayar la eficacia del tratamiento
- 60

sobre células cancerosas. De forma similar, un paciente que tiene una afección no neoplásica que es resistente al tratamiento con un antagonista de VEGF, p. ej. un anticuerpo de VEGF, en el contexto de esta divulgación, hace referencia a un paciente que no responde satisfactoriamente al tratamiento con el antagonista de VEGF, por ejemplo el paciente padece efectos secundarios, desarrolla resistencia o no exhibe reducción de los indicadores terapéuticos para la afección.

Los métodos de la divulgación comprenden administrar un anticuerpo anti-EphA3 como composición farmacéutica a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz usando un régimen de dosificación adecuado para el tratamiento de la enfermedad. La composición puede formularse para uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Pueden incluirse también uno o más excipientes o portadores fisiológicamente aceptables en las composiciones para formulación apropiada. Se encuentran formulaciones adecuadas para uso en la presente divulgación en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª edición, Filadelfia, PA. Lippincott Williams y Wilkins, 2005.

Se proporciona el anticuerpo anti-EphA3 en una solución adecuada para inyección en el paciente tal como una solución acuosa isotónica estéril para inyecciones. Se disuelve o suspende el anticuerpo a una concentración adecuada en un portador aceptable. En algunos aspectos, el portador es acuoso, p. ej. agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato y similares. Las composiciones pueden contener sustancias farmacéuticas auxiliares según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se administran a un paciente, p. ej. un paciente que tiene un tumor o una afección no neoplásica, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad o síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Se define una cantidad adecuada para lograr esto como una "dosis terapéuticamente eficaz". Se determina una dosis terapéuticamente eficaz monitorizando la respuesta del paciente a la terapia. Los criterios típicos indicativos de una dosis terapéuticamente eficaz incluyen la mejora de los síntomas de la enfermedad en el paciente. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente, incluyendo otros factores tales como edad, peso, género, vía de administración, etc. Pueden administrarse administraciones únicas o múltiples del anticuerpo dependiendo de la dosificación y frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. En cualquier caso, los métodos proporcionan una cantidad suficiente de anticuerpo anti-EphA3 para tratar eficazmente al paciente.

El anticuerpo puede administrarse por inyección o infusión por cualquier vía adecuada incluyendo, pero sin limitación, las vías intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. En algunos aspectos, puede administrarse el anticuerpo por insuflación. En un aspecto ejemplar, puede almacenarse el anticuerpo a 10 mg/ml en solución salina acuosa isotónica estéril para inyección a 4 °C y se diluye en 100 ml o 200 ml de cloruro de sodio al 0,9 % para inyección antes de la administración al paciente. Se administra el anticuerpo por infusión intravenosa en el transcurso de 1 hora a una dosis de entre 0,2 y 10 mg/kg. En otros aspectos, se administra el anticuerpo por infusión intravenosa durante un periodo de entre 15 minutos y 2 horas. En aún otros aspectos, el procedimiento de administración es por inyección en embolada subcutánea.

Se elige la dosis de anticuerpo para proporcionar una terapia eficaz para el paciente y está en el intervalo de menos de 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 1 mg-2 g por paciente. Preferiblemente, la dosis está en el intervalo de 1-10 mg/kg o de aproximadamente 50 mg-1000 mg/paciente. La dosis puede repetirse a una frecuencia apropiada que puede estar en el intervalo de una vez al día a una vez cada tres meses, dependiendo de la farmacocinética del anticuerpo (p. ej., semivida del anticuerpo en la circulación) y la respuesta farmacodinámica (p. ej., la duración del efecto terapéutico del anticuerpo). En algunos aspectos, la semivida *in vivo* es de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 25 días y la dosificación de anticuerpo se repite entre aproximadamente una vez por semana y una vez cada 3 meses. En otros aspectos, se administra el anticuerpo aproximadamente una vez al mes.

Pueden usarse también una región V_H y/o una región V_L de la divulgación con fines de diagnóstico. Por ejemplo, la región V_H y/o la región V_L pueden usarse para análisis clínico, tal como la detección de los niveles de EphA3 en células de un paciente. Puede usarse también una región V_H o V_L de la divulgación, p. ej., para producir anticuerpos anti-Id.

EJEMPLOS

Metodología

Subclonación de regiones V de murino

Se proporcionaron los ADN de la región V de mIIIA4 monoclonal de murino por el Dr. Martin Lackmann (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Victoria, Australia). Se usó PCR para amplificar los genes V de las regiones V-pesada y V-kappa e incorporar sitios de enzimas de restricción adecuados para clonación en los vectores deseados. Se clonaron las regiones V como fragmentos Fab y se expresaron en *E. coli*. Se ensayó en este Fab la unión a antígeno de EphA3-Fc y se hace referencia como secuencia de referencia FA4 en estos ejemplos.

Purificación de anticuerpo

Se expresaron fragmentos Fab por secreción a partir de *E. coli*. Se hicieron crecer células en medio 2xYT hasta una DO₆₀₀ de 0,6. Se indujo la expresión usando IPTG durante 3 horas a 33 °C. Se obtuvieron los Fab ensamblados a partir de fracciones periplásmicas y se purificaron por cromatografía de afinidad usando la proteína G estreptocócica (columnas HP de proteína G HiTrap; GE Healthcare) según métodos estándares. Se eluyeron los Fab en tampón de pH 2,0, se ajustó inmediatamente a pH 7,0 y se dializó frente a PBS a pH 7,4 (PBS sin calcio ni magnesio).

ELISA

Se unieron típicamente 50 ng de antígeno a una placa de microvaloración de 96 pocillos por incubación durante una noche a 4 °C. Se bloqueó la placa con una solución de leche al 5 % en PBS durante 1 hora a 33 °C. Se añadió a cada pocillo medio inducido (50 µl) de *E. coli* que expresa cada Fab Humanereed o Fab FA106 de referencia optimizado. Después de 1 hora de incubación a 33 °C, se aclaró la placa tres veces con PBS + 0,1 % de Tween 20 (PBST), se añadieron a cada pocillo 50 µl de conjugado de cadena kappa-HRP anti-humano (Sigma; diluido a 0,1 ng/ml en PBST) y se incubó la placa durante 40 min a 33 °C. Se lavó la placa 3 veces con PBST y una vez con PBS. Se añadió el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 100 µl (Sigma), a cada pocillo y se incubó la placa durante ~5 min a temperatura ambiente. Para detener la reacción, se añadieron 100 µl de H₂SO₄ 0,2 N a cada pocillo. Se leyeron las reacciones a 450 nm por espectrofotometría.

Para la detección de la unión a miembros de la familia de Eph, se obtuvieron dominios extracelulares (ec) de Eph humano recombinante de R&D Systems Inc: proteína de fusión EphA1-Fc, dominio ec de EphA2, dominio ec de EphA5, dominio ec de EphB4 y proteína de fusión EphB6-Fc. Se recubrieron las placas ELISA con 100 ng de proteína Eph durante 1 h a 37 °C. Después de lavar una vez con PBST, se bloquearon los pocillos con leche al 5 % en PBST a 37 °C durante 1 hora. Se lavaron los pocillos una vez y se añadió una serie de dilución doble de anticuerpo Humanereed candidato a cada conjunto de proteínas Eph recubiertas. Después de 1 hora, se lavaron los pocillos 3 veces con PBST y se añadieron a cada pocillo 50 µl de conjugado de cadena kappa-HRP anti-humano (Sigma; diluido a 0,1 ng/ml en PBST). Se incubó la placa durante 45 minutos, se lavó 3 veces con PBST, se lavó una vez con PBS y se añadieron a cada pocillo 100 µl de TMB. Se detuvo la reacción por adición de H₂SO₄ 0,2 N y se midió la unión mediante la absorbancia a 450 nm.

Ensayo de unión por transferencia de colonias (CLBA)

Se llevó a cabo el cribado de colecciones Humanereed de fragmentos Fab como se describe (publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20050255552 y 20060134098) usando filtros de nitrocelulosa recubiertos con antígeno.

Medidas de afinidad

Se analizaron las cinéticas de unión de fragmentos Fab usando análisis de resonancia de plasmón de superficie (spr; Biacore T100) en Biosensor Tools Inc. Se calcularon las afinidades a partir de las constantes de asociación y disociación determinadas a tres concentraciones de Fab diferentes.

Construcción de IgG

Se construyó IgG IIIA4 quimérica que contenía regiones constantes de IgG1 humana y regiones variables del anticuerpo IIIA4 de ratón original. Se usó PCR para amplificar las cadenas pesada y ligera de ADN de IIIA4 de ratón proporcionadas por Martin Lackmann y también para incorporar sitios de restricción para clonación. Se clonó la región variable de cadena pesada en un vector que expresa la cadena pesada de IgG1 completa expresada a partir de un promotor de CMV localizado posteriormente a una secuencia UCOE. El plásmido contiene el gen Neo para selección en células de mamífero y el gen Amp para producción de plásmido en *E. coli*. De forma similar, se clonó la región variable de cadena ligera en un vector que expresaba la región constante de cadena ligera kappa humana, expresada a partir de un promotor de CMV posterior a una secuencia UCOE. El plásmido contiene un gen para selección por higromicina en células de mamífero y el gen Amp para producción en *E. coli*. Se construyeron de forma similar vectores de cadena pesada y ligera de IgG de anticuerpos genomanipulados, excepto porque el ADN de las regiones variables se obtuvo a partir de vectores de expresión de *E. coli* descritos anteriormente y porque el vector de expresión de cadena pesada contenía el gen de resistencia a puromicina en lugar de neomicina. Se expresaron las IgG de anticuerpo Humanereed e IgG IIIA4 quimérica en una línea celular CHO modificada mediante contranfección de los constructos de cadena pesada y ligera usando el reactivo Fugene 6 (Promega).

Citometría de flujo

Se recogieron típicamente 3 x 10⁶ células SKmel28, LnCAP y B16-F10 por centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos. Se retiraron los medios y se bloquearon las células con BSA al 2 % en PBS durante 30 minutos a 4 °C, seguido de un segundo bloqueo con 10 µg/ml de IgG de rata durante 30 minutos a 4 °C. Se sedimentaron las células, se resuspendieron en 1,5 ml de PBS y se dividieron en alícuotas de 500 µl. Se sondeó cada alícuota separadamente con 5 µg/ml de IgG de control, IgG Humanereed o IgG IIIA4 quimérica durante 45 minutos a 4 °C. Se lavaron las muestras una vez en PBS y se añadió conjugado de IgG-ficoeritrina anti-humano. Después de 45 minutos, se lavaron las células una vez, se resuspendieron en PBS y se analizaron por citometría de flujo usando un citómetro de flujo

FACS Caliber. Se añadió yoduro de propidio justo antes del análisis para excluir células muertas.

Ejemplo 1. Identificación de anticuerpos anti-EphA3 humanos genomanipulados

Secuencias aminoacídicas de la región V de murido y de referencia

5 Se muestran a continuación las secuencias de la región V de murido (mIIIA4) y de referencia (FA4). Las secuencias de CDR están subrayadas.

Vh de mIIIA4 y FA4:

EVKLEESGAELVKPGSSVKLSCKASGYNFTSYWINWVRLRPGQGLEWIGDIYPGSGN
TNYDEKFKRKATLTVDTSSSTAYMQLSSLASEDSALYYCTRSGYYEDFDSWGQGT
 LIVSS

Vk de mIIIA4 y FA4:

EVKLEESGAELVKPGSSVKLSCKASGYNFTSYWINWVRLRPGQGLEWIGDIYPGSGN
TNYDEKFKRKATLTVDTSSSTAYMQLSSLASEDSALYYCTRSGYYEDFDSWGQGT
 LIVSS

10 El Fab FA4 tiene regiones V de murido intactas de mIIIA4 fusionadas con regiones constantes humanas y se purificó a partir de *E. coli*. Un ELISA de dilución de fragmentos Fab que se unen al antígeno producía curvas de unión que dependían de la concentración de anticuerpo.

15 Además del Fab de referencia (FA4), se construyó un Fab de referencia optimizado (FA106). Se cambiaron varios residuos aminoacídicos marco en FA4 a la línea germinal humana en el Fab FA106 de referencia optimizado. Se proporcionan a continuación las secuencias de la región V del Fab de referencia optimizado. Se muestran los residuos alterados a la línea germinal humana como fuente en negrita. Las secuencias de CDR están subrayadas.

Vh de FA106:

EVKLEESGAELVKPGSSVKLSCKASGYNFTSYWINWVRLRPGQGLEWIGDIYPGSGN
TNYDEKFKRKATLTVDTSSSTAYMQLSSLASEDSALYYCTRSGYYEDFDSWGQGT
 LIVSS

Vk de FA106:

EVKLEESGAELVKPGSSVKLSCKASGYNFTSYWINWVRLRPGQGLEWIGDIYPGSGN
TNYDEKFKRKATLTVDTSSSTAYMQLSSLASEDSALYYCTRSGYYEDFDSWGQGT
 LIVSS

20 *Construcción de colección y módulos de la región V*

25 Se construyeron colecciones centradas en epítopos a partir de secuencias de colección de segmento V humano ligadas con la región CDR3-FR4 única que contiene el BSD y secuencias del segmento J de línea germinal humana. Se usaron colecciones de Vh “de longitud completa” (Vh1 y Vh5) y Vk (Vkl) como base para la construcción de colecciones de “módulos” en que solo parte del segmento V de murido se reemplaza inicialmente por una colección de secuencias humanas. Se construyeron varios tipos de “colecciones” de módulos para ambas cadenas Vh y Vk. Se elaboraron módulos para las cadenas V-pesada y V-kappa por PCR de puente con secuencias comunes superpuestas en la región marco 2. De este modo, se construyeron colecciones de módulos humanos “de parte delantera” para ambas subclases humanas Vh1 y Vh5 y se construyó una colección de módulos humanos “media” para Vh1 humano.

30 Se construyeron colecciones de módulos “de parte delantera” y “media” para la subclase Vkl.

Adicionalmente, se construyó una colección de módulos consistente en CDR2-FR3 de Vh. Se muestra un esquema en la Figura 2. Los primeros cuatro residuos (recuadrados) de la CDR2 de referencia se codificaban por el cebador de PCR 5'. También se variaron los residuos aminoacídicos subrayados en la CDR2 de mIIIA4 y la CDR2 de Vh1-58 de línea germinal humana en combinación por pares en el cebador directo (mostrado por los residuos aminoacídicos por

encima y por debajo de la línea). El cebador de PCR 3' es complementario de FR3 de Vh1 de línea germinal humana. Se usaron los cebadores para amplificar y adjuntar una colección de FR3 de Vh1 Hu (derivada de ARNm de bazo) a la colección de CDR2 genomanipulados. Se usaron reacciones de PCR de puente consecutivas para enlazar los módulos "de parte delantera" y CDR3-FR4 para construir una región V funcional.

5 Se identificaron los módulos de Vh o Vk humanos que apoyaban la unión al antígeno por un ensayo de unión por transferencia de colonias y se determinó un orden de rangos según la afinidad por ELISA. El cribado de V-pesada identificó los módulos "de parte delantera", "media" y CDR2/FR3 que apoyaban la unión a antígeno de la proteína de fusión recombinante EphA3-Fc. El cribado de V-kappa identificó los módulos "de parte delantera" y "media" que apoyaban la unión a antígeno. Se recombinaron los módulos funcionales para cada cadena para construir un Fab de alta afinidad totalmente genomanipulado que se unía a antígeno.

10 Después de la identificación de un agrupamiento de Fab genomanipulados de alta afinidad, se construyeron colecciones de maduración por afinidad de CDR3. Se mutaron las secuencias de BSD de CDR3 comunes de un panel de clones de Fab genomanipulados usando cebadores de PCR degenerados para generar colecciones. Se cribaron estas colecciones mutagénicas usando unión por transferencia de colonias y ensayos ELISA. Se clasificaron los Fab seleccionados por afinidad con ELISA. Se identificaron las mutaciones que apoyaban una afinidad similar o mejorada por antígeno en comparación con el Fab FA106. Las mutaciones de CDR3 de cadena pesada y cadena ligera que apoyan o mejoran la unión a antígeno ayudan a definir la región de BSD para cada CDR.

Alineamiento de secuencia de Fab de referencia y Humaneered

20 Se compararon segmentos V alineados de referencia de murino y dos secuencias aminoacídicas de Fab genomanipulado con el gen V de línea germinal humana único más cercano, Vh1-02 o Vkl L15. La FR4 para las regiones Vh de Fab Humaneered es de JH6 de línea germinal humana y tiene la secuencia WGQGTTVTVSS. La FR4 para las regiones Vk de Fab Humaneered es de Jk2 de línea germinal humana y tiene la secuencia FGQGKLEIK.

Cada una de las regiones Vh y Vk de los Fab genomanipulados tiene una alta homología con la secuencia aminoacídica de línea germinal humana. Se muestran homologías ejemplares en la Tabla 1.

25 Tabla 1: Identidad porcentual con la secuencia de línea germinal humana para dos regiones V genomanipuladas: todos los porcentajes representan identidad con una única secuencia de línea germinal humana en la región V y excluyen las secuencias BSD de CDR3.

Fab Humaneered	Vh frente a Vh1-02	Vk frente a Vkl L15
1	93 %	95 %
2	91 %	95 %

Ejemplo 2: Cinética de unión de anticuerpos genomanipulados

30 Se aislaron Fab genomanipulados de ensayos de unión por transferencia de colonias y se confirmó la afinidad por ELISA de unión a antígeno. Se purificaron los clones de Fab genomanipulados con señales positivas fuertes en ELISA de unión a antígeno y se caracterizaron adicionalmente por comparación cinética con el Fab FA106 de referencia optimizado.

35 Se analizaron las cinéticas de unión de dos Fab genomanipulados y el Fab FA106 de referencia usando un Biacore. Se diluyeron los tres Fab a partir de la concentración de partida de 500 nM a 100 nM y se ensayaron adicionalmente en una serie de dilución triple usando PBS, pH 7,4 con Tween-20 al 0,005 % y BSA 0,1 mg/ml. Se ensayó cada una de las cinco concentraciones tres veces sobre las tres superficies de densidad diferente. Se ejecutaron los ensayos a 25 °C. Se ajustaron los datos de respuesta de cada superficie a un modelo de interacción 1:1. Se muestran en la Tabla 2 las constantes de asociación y disociación calculadas. El análisis cinético de los clones 1 y 2 de Fab genomanipulado y el clon de referencia FA106 mostraban todas bajas afinidades nanomolares por el antígeno.

Tabla 2: Constantes de unión de Fab Humaneered determinadas a 25 °C

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
Baja	1,83E6	0,00193	1,052
Media	1,01E6	0,001513	1,5
Alta	1,60E6	0,00186	1,16
Media de Fab 1 genomanipulado	1,4(4)E6	1,7(2)E-3	1,2(2)

Baja	4,10E6	0,0058	1,4
Media	6,11E5	0,00178	2,91
Alta	1,67E6	0,00345	2,06
Media de FA106	2(1)E6	3(2)E-3	2,1(8)
Baja	5,14E5	0,00332	6,45
Media	6,50E5	0,00399	6,16
Alta	3,52E5	0,00279	7,92
Media de Fab 2 Humaneered	5(1)E5	3,3(6)E-3	6,8(9)

El número entre paréntesis representa el error estándar en el último dígito reseñado basado en los datos de las tres superficies de densidad diferente. Los términos “baja”, “media” y “alta” en la columna izquierda hacen referencia a densidades de chip.

5 Se expresó Fab1 Humaneered como una IgG en células de mamífero y se purificó a partir de sobrenadante de cultivo. Se generó el fragmento Fab por digestión con papaína para análisis de la afinidad de unión monovalente. Se midió la unión de Fab a EphA3-Fc humano y de ratón en un Biacore 3000 usando variantes de EphA3 biotiniladas capturadas en un chip de estreptavidina. Se diluyó Fab en tampón de desarrollo HBSP de 50 nM a 0,62 nM con diluciones triples. Se hicieron dobles blancos de los resultados con una celda de referencia vacía y múltiples inyecciones de tampón HBSP. Se llevó a cabo el análisis Global Ifit de los datos de Biacore suponiendo una interacción 1:1. Se muestran los parámetros cinéticos en la Tabla 3. Los datos muestran que el Fab1 Humaneered producido a partir de células de mamífero se une con alta afinidad tanto a EphA3 humano como de murino.

Tabla 3: El Fab 1 genomanipulado se une a EphA3 humano y de ratón con afinidad comparable

Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
EphA3-Fc humana	$2,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-3}$	930
EphA3-Fc de ratón	$2,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^{-3}$	800

15 Se analizó la unión de Fab 1 a proteínas de fusión EphA3-Fc de ratón y humana inmovilizadas por análisis de resonancia de plasmón de superficie usando un instrumento Biacore 3000 y análisis Global fit.

k_a = constante de asociación; k_d = constante de disociación; K_D = afinidad global.

Unión y especificidad

20 Se construyó un anticuerpo de longitud completa (IgG1 κ), se expresó a partir de células CHO y se purificó por cromatografía de afinidad de proteína A. Se recubrieron placas ELISA con EphA3-Fc y se compararon la unión de IgG clIIA4, una IgG genomanipulada ejemplar y una IgG1 de control (Figura 3). La CE_{50} en este ensayo era aproximadamente 3 veces menor para la IgG genomanipulada que para el anticuerpo quimérico original.

El EphA3 es un miembro de la familia de receptores Eph que se une a ligandos de efrina. Los miembros más homólogos de la familia son los receptores EphA cuyos dominios extracelulares varían entre 39 % y 62 % de identidad de secuencia con EphA3.

25 Para confirmar la especificidad de la IgG genomanipulada ejemplar, se valoró la unión frente a tres proteínas EphA y dos proteínas EphB relacionadas más distantemente (véase la Figura 4). La homología de EphA5 con EphA3 es de un 61 % y representa uno de los miembros de la familia más homólogos de EphA3. El anticuerpo genomanipulado se unía a EphA3 específicamente; no se observaba unión a EphA1, EphA2 ni EphA5. No había unión detectable a ninguno de los dos receptores EphB ensayados (EphB4 y EphB6).

30 Se ensayó también en el anticuerpo genomanipulado ejemplar la unión a EphA3 expresado sobre la superficie de células vivas. Se usaron tres estirpes celulares tumorales conocidas por expresar EphA3: una estirpe de melanoma de ratón (B16), melanoma humano (SKmel28) y cáncer de próstata (LnCAP). Se sondearon las células vivas con la IgG genomanipulada, IIIA4 quimérico o un anticuerpo de control. Se detectó el anticuerpo unido usando citometría de flujo por un conjugado de IgG-ficoeritina anti-humano (Figura 5). Se observó una fuerte unión tanto por IgG genomanipulada como IIIA4 quimérico a células B16 y SKmel28. Ambas IgG se unían también a LnCAP.

Ejemplo 3. Evaluación de la capacidad de los fragmentos Fab y F(ab')₂ de inducir la apoptosis

Se generaron fragmentos Fab por digestión con papaína de un anticuerpo de IgG1 genomanipulado ejemplar de la

5 divulgación (Ab1) o un anticuerpo de IgG1 humano de control. Se incubó 1 mg de anticuerpo con 0,01 mg de papaína (Roche n.º 10108014001) en acetato de sodio 100 mM pH 5,0 a 37 °C durante 18 h. Se produjo F(ab')₂ por digestión con pepsina. Se incubaron 5 mg de IgG con 250 µl de suspensión de pepsina inmovilizada en agarosa (Pierce n.º 20343) a 37 °C durante 18 h en acetato de sodio 100 mM pH 4,0. Tras la escisión, se incubaron ambas digestiones con resina de proteína A durante 30 minutos para retirar los fragmentos Fc y se recogieron los sobrenadantes. Se dializaron los fragmentos Fab y F(ab')₂ en succinato de sodio 50 mM pH 6,0, NaCl 145 mM y Tween 80 al 0,05 %.

10 Para evaluar la capacidad de los fragmentos Fab y F(ab')₂ de Ab1 de inducir la apoptosis en células primarias aisladas de pacientes de leucemia, se sembraron las células a 2 x 10⁵ células/pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos en 0,1 ml de medio de cultivo (RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10 %). Se añadió anticuerpo o fragmento de anticuerpo a concentraciones finales de 10 µg/ml y se incubaron las placas a 37 °C y 5 % de dióxido de carbono en una incubadora de cultivo de tejido durante 24 horas. Como control positivo para la inducción de apoptosis, se recolectaron las células y se lavaron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min seguido de incubación en 0,1 ml de tampón que contenía 10 µl de anexina V conjugada con FITC (BD Pharmingen) durante 30 minutos sobre hielo. Se lavaron las células una vez por centrifugación y se resuspendieron en tampón de citometría de flujo que contenía yoduro de propidio (Sigma) diluido 1:1000. Se identificaron por citometría de flujo las células con tinción de anexina V que experimentan apoptosis.

Tabla 4: Inducción de la apoptosis por anticuerpo Ab1 y fragmentos de anticuerpo

Tratamiento	Apoptosis (%)	Apoptosis (%)
	Experimento 1	Experimento 2
IgG Ab1 genomanipulado	82,0	85
Control de hIgG1	1,8	-
(Fab') ₂	16,3	23
Control de (Fab') ₂	1,3	0,8
Fab de Ab1 genomanipulado	1,1	1,1
Control de Fab	0	0
Camptotecina	91,0	97,0

20 Los resultados de la Tabla 4 muestran que un fragmento F(ab')₂ del anticuerpo (Ab1) ejemplar inducía la inducción directa de apoptosis en células de leucemia primarias que expresan EphA3. Se destruían aproximadamente un 20 % de las células diana al cabo de 24 horas usando F(ab')₂ de Ab1 10 µg/ml. En contraposición, el fragmento Fab monovalente no era capaz de inducir niveles detectables de apoptosis, indicando que es necesaria y suficiente la dimerización de EphA3 para inducir niveles significativos de apoptosis en estas células y que las funciones efectoras de Fc no se requieren para la inducción de apoptosis.

25 Ejemplo 4. Evaluación de un anticuerpo afucosilado

Se produjo el anticuerpo 1 en dos formas de glicosilación mediante expresión en diferentes estirpes celulares CHO. Una forma (anticuerpo 1 fucosilado) tiene patrones de glicosilación típicos de un anticuerpo terapéutico de IgG1k (alotipo f) que incluye α1,6-fucosa. La otra forma (designada anticuerpo 1 afucosilado) se produce en una estirpe celular CHO que contiene una delección homocigótica del gen de α1,6-fucosil transferasa FUT8 para evitar la adición de α1,6-fucosa y está por lo tanto afucosilada. Se compararon estas preparaciones de anticuerpo en ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK.

30 Se incubaron diferentes concentraciones de preparaciones de anticuerpo anti-EphA3 con células diana primarias de leucemia y células efectoras PBMC humanas normales (capa leucocítica del Stanford University Blood Bank). Se ensayaron tanto el anticuerpo 1 fucosilado como el anticuerpo 1 afucosilado a 0,0001 µg/ml a 10,0 µg/ml con 1x10⁴ células diana de un paciente con leucemia mieloide aguda (LMA) y 1x10⁶ células efectoras PBMC normales (relación de célula efectora/diana 100:1). Después de 16 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se midió la liberación de LDH en comparación con la LDH de células lisadas con detergente para determinar la citotoxicidad porcentual (usando un kit Promega Cytotox 96).

40 El anticuerpo 1 afucosilado muestra actividad ADCC aumentada frente a células diana positivas de EphA3 en comparación con el anticuerpo 1 fucosilado (Figura 6).

Secuencias de la región V_H ejemplares de anticuerpos anti-EphA3 de la divulgación:

SEQ ID NO:1

QVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQASGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSQVYEDFDSWGQ
GTTVTVSS

SEQ ID NO:2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSQVYEEFDSWGQ
GTTVTVSS

SEQ ID NO:3

QVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQASGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSQVYEEFDSWGQ
GTTVTVSS

SEQ ID NO:4

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKTSGYTFTGYWMNWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSQVYEEFDSWGQ
GTTVTVSS

5

SEQ ID NO:5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGGYEDFDSWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO:6

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWISWVRQMPGQGLEWMGDIYPGSG
NTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMGLSSLRSEDVAVYYCARSQVYEDFDSWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO:7

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWISWVRQMPGQGLEWMGDIYPGSG
NTNYAQEFGRVTITADESTSTAYVELSSLRSEDVAVYYCARSQVYEDFDSWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO:8

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWISWVRQMPGQGLEWMGDIYPGSG
NTNYAQKFLGRVTITADESTSTAYMELSSLRYDDTAVYYCARSGYYEDFDSWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO:9

EVKLEESGAELVKPGSSVKLSCKASGYNFTSYWINWVRLRPGQGLEWIGDIYPGSGN
TNYDEKFKRKATLTVDTSSSTAYMQLSSLASEDTAVYYCARSGYYEDFDVWGQGT
VTVSS

SEQ ID NO:10

EVKLEESGAELVKPGSSVKLSCKASGYNFTSYWINWVRLRPGQGLEWIGDIYPGSGN
TNYDEKFKRKATLTVDTSSSTAYMQLSSLASEDTAVYYCARSGYYEDFDIWGQGT
VTVSS

Secuencias de la región VL ejemplares de anticuerpos anti-EphA3 de la divulgación:

SEQ ID NO:11

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK

5

SEQ ID NO:12

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCVQYSNYPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:13

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCGQYANYPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:14

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:15

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYGASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:16

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQDISTYLNWIQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:17

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQDISTYLNWIQQKPGKAPKRLIYAASSLQRGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:18

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLAWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQRGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:19

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCAQYANYPYTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:20

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVQYAKYPYTFGQGKLEIK

5

SEQ ID NO:21

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVGYANYPYTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:22

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVRYANYPYTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:23

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVQYLNYPYTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:24: Región constante de cadena pesada ejemplar

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:25: Región constante de cadena ligera ejemplar

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Anticuerpos ejemplares de la divulgación (secuencias de cadena pesada y cadena ligera):

5 **SEQ ID NO:26 (cadena pesada, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:26/27)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLSDDTAVYYCARSGYEEFDSWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:27 (cadena ligera, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:26/27)

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 **SEQ ID NO: 28 (cadena pesada, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:28/29)**

QVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQASGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSQGVYEDFDSWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:29 (cadena ligera, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:28/29)

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVQYAKYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:30 (cadena pesada, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:30/31)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGGYYEDFDSWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
5 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:31 (cadena ligera, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:30/31)

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCGQYANYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:32 (cadena pesada, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:32/33)

QVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQASGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSGYEYEFDSWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:33 (cadena ligera, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:32/33)

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:34 (cadena pesada anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:34/35)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMNWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
SGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSGYEYEFDSWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:35 (cadena ligera, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:34/35)

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCAQYANYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:36 (cadena pesada, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:36/37)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWISWVRQMPGQGLEWMGDIYPGSG
NTNYAQEFRGRVTITADESTSTAYVELSSLRSEDNAVYYCARSGYYEDFDSWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:37 (cadena ligera, anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:36/37)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIISYLAWYQQKPEKAPKRLIYGASSLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-EphA3 que se une a EphA3 con una K_D monovalente de menos de 10 nM como se determina por resonancia de plasmón de superficie efectuada a 37 °C, en el que el anticuerpo comprende:

(a) una región V_H que tiene

5 (i) una secuencia CDR1 GYWMN, una secuencia CDR2 DIYPGSGNTNYDEKFQG y una secuencia CDR3 GGYEDFDS;

(ii) una secuencia de segmento V que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia aminoacídica de segmento V de línea germinal VH1 1-02 o al menos un 90 % de identidad de secuencia con el segmento V de la SEQ ID NO:5; y

10 (iii) una secuencia FR4 que difiere en no más de un aminoácido de WGQGTTTVSS; y

(b) una región V_L que tiene

(i) una secuencia CDR1 RASQGIISYLA, una secuencia CDR2 AASSLQS y una secuencia CDR3 GQYANYPYT;

15 (ii) un segmento V que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia aminoacídica del segmento Vkl L15 de línea germinal humana o al menos un 90 % de identidad con el segmento V de la SEQ ID NO:13; y

(iii) una secuencia FR4 que difiere en no más de un aminoácido de FGQGKLEIK.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que:

20 la V_H comprende un segmento V que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia aminoacídica del segmento V de línea germinal VH1 1-02 humana, y una secuencia FR4 que difiere en no más de un aminoácido de WGQGTTTVSS; y

la V_L comprende un segmento V que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia aminoacídica del segmento Vkl L15 de línea germinal humana, y una secuencia FR4 que difiere en no más de un aminoácido de FGQGKLEIK.

25 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que la FR4 de la región V_H comprende la secuencia aminoacídica WGQGTTTVSS y la FR4 de la región V_L comprende la secuencia aminoacídica FGQGKLEIK.

4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región V_H comprende un segmento V que tiene la secuencia aminoacídica del segmento V de SEQ ID NO:5.

30 5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que la región V_H comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:5.

6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región V_L comprende un segmento V que tiene la secuencia aminoacídica del segmento V de SEQ ID NO:13.

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que la región V_L comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:13.

35 8. Un anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende una V_H que tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:5 y una región V_L que tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:13.

9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es una IgG.

40 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 25 y una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO:24.

11. Una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo de la reivindicación 9 o 10, en la que la preparación de anticuerpo está hipofucosilada.

12. Un anticuerpo que tiene una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 30 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 31.

45 13. Una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo de la reivindicación 12, en la que la preparación de anticuerpo está hipofucosilada.

14. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 12 o la preparación de anticuerpo de la reivindicación 11 o 13 para uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad dependiente de EphA3, en que la célula que expresa EphA3 es una diana para terapia para tratar la enfermedad, comprendiendo el método administrar el anticuerpo al paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz, en el que la enfermedad es:
- 5 (a) un cáncer;
- (b) un cáncer y el paciente ha experimentado tratamiento, o está experimentando tratamiento, con un antagonista de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y opcionalmente en el que el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF;
- (c) un cáncer y el método comprende además administrar un antagonista anticuerpo anti-Bv8 al paciente;
- 10 (d) un cáncer y el paciente tiene un tumor sólido donde no se expresa EphA3 en células cancerosas y se expresa en el endotelio de vasos sanguíneos en el tumor;
- (e) un cáncer y el paciente tiene un tumor sólido donde las células tumorales expresan EphA3;
- (f) leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica o linfoma; o
- (g) síndrome mielodisplásico, policitemia vera, trombocitopenia esencial o mielofibrosis idiopática.
- 15 15. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 12, o una preparación de anticuerpo de la reivindicación 11 o 13.

FIG. 1

Regiones V de cadena pesada

SEQ

ID:

- 1 QVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYTF^TGYWNNWVRQASGQGLEWMGDIYPGSGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARGVYEDFDSWGQGT^TTVTVSS
- 2 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF^TGYWNNWVRQAPGQGLEWMGDIYPGSGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARGYEEFFDSWGQGT^TTVTVSS
- 3 QVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYTF^TGYWNNWVRQASGQGLEWMGDIYPGSGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARGYEEFFDSWGQGT^TTVTVSS
- 4 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTF^TGYWNNWVRQAPGQGLEWMGDIYPGSGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARGYEEFFDSWGQGT^TTVTVSS
- 5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF^TGYWNNWVRQAPGQGLEWMGDIYPGSGNTNYDEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARGYEDFDSWGQGT^TTVTVSS
- 6 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTF^TTYWISWVRQMPGQGLEWMGDIYPGSGNTNYAOKFQGRVTITADKSTISTAYMGLSSLRSEDTAVYYCARGYEDFDSWGQGT^TTVTVSS
- 7 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTF^TTYWISWVRQMPGQGLEWMGDIYPGSGNTNYAOEFRGRVTITADESTAYVELSSLRSEDTAVYYCARGYEDFDSWGQGT^TTVTVSS
- 8 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTF^TTYWISWVRQMPGQGLEWMGDIYPGSGNTNYAOKFLGRVTITADESTAYMELSSLRYDDTAVYYCARGYEDFDSWGQGT^TTVTVSS
- 9 EVKLEESGAELVKPGSSVKLSCKASGYNFTSYWLNWVRLRPPGQGLEWIGDIYPGSGNTNYDEKFKRKATLTVDTSSSTAYMQLSSLASEDTAVYYCARGYEDFDWVGQGT^TTVTVSS
- 10 EVKLEESGAELVKPGSSVKLSCKASGYNFTSYWLNWVRLRPPGQGLEWIGDIYPGSGNTNYDEKFKRKATLTVDTSSSTAYMQLSSLASEDTAVYYCARGYEDFDIWGQGT^TTVTVSS

FIG. 1 (cont.)

Regiones V de cadena ligera

SEQ

ID:

- 11 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 12 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 13 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 14 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 15 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 16 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 17 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 18 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 19 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCAQYANYPYTFGQGTKLEIK
- 20 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYAKYYPYTFGQGTKLEIK
- 21 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVGYANYPYTFGQGTKLEIK
- 22 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVRYANYPYTFGQGTKLEIK
- 23 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGIISYLAWYQKPEKAPKRLIYAASLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCVQYLNYPYTFGQGTKLEIK

FIG. 2

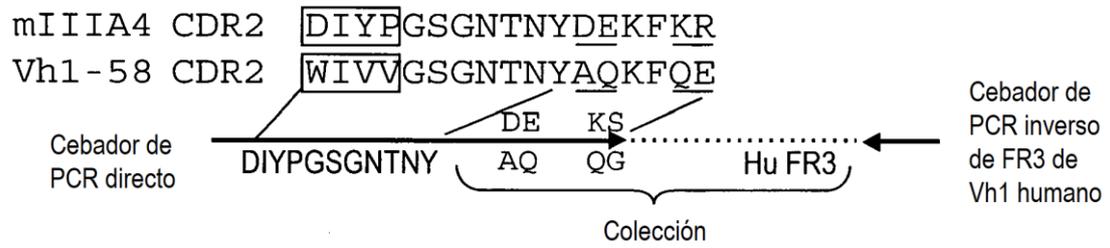


FIG. 3

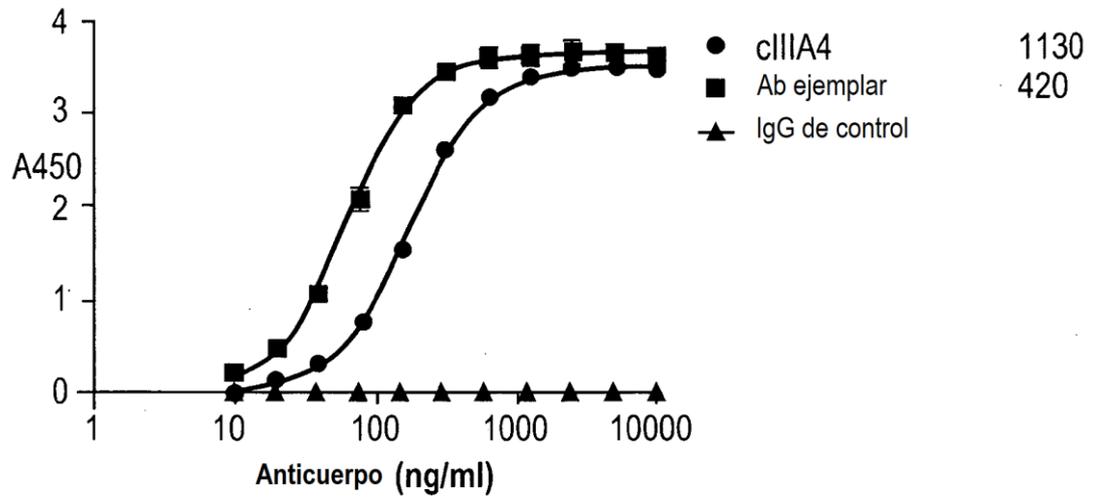


FIG. 4

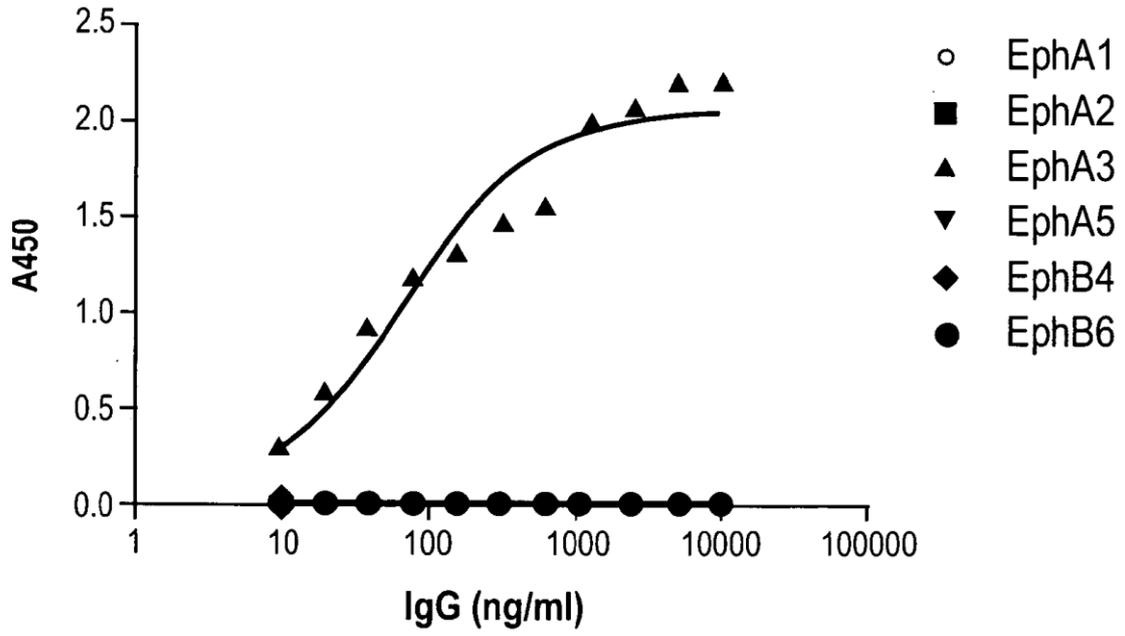
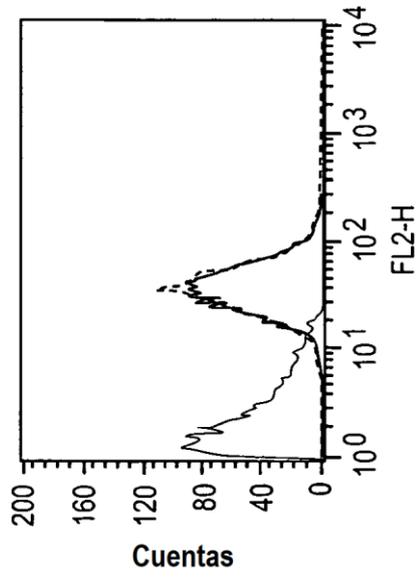
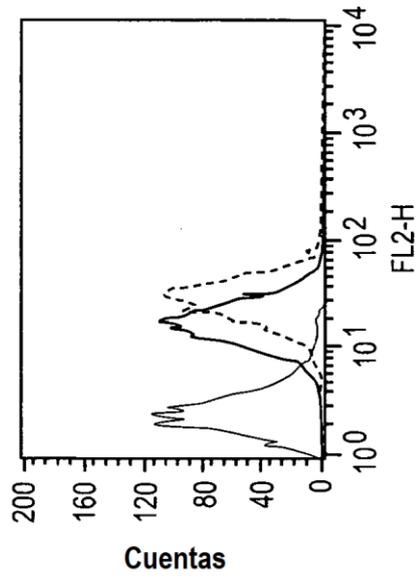


FIG. 5

B16



SKmel-28



LnCAP

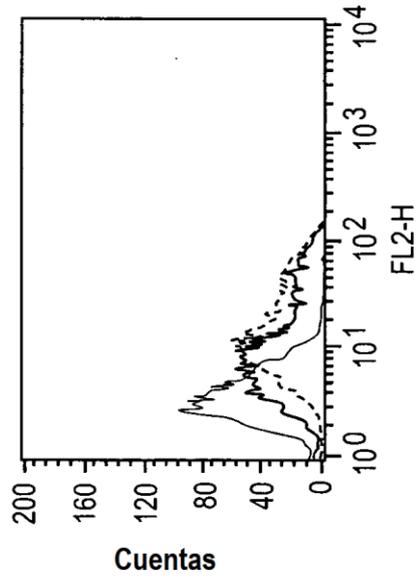


FIG. 6

