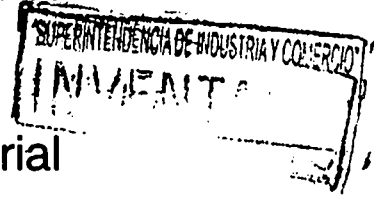




Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda



Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07- 78090

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO ANTICUERPOS QUE LIGAN AL EPHA2
Y SUS METODOS DE USO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE BAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALCANTARA

22. BOGOTÁ, D. C., JULIO 31/2007



PETITIO

FORMULARIO ÚNICO DE S
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-078090- -00000-0000
Fecha: 2007-07-31 16:08:16 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 261

- 1) SOLICITUD DE: sept 04 | 2007
- ☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

2) SOLICITANTE (71)	Nombre: RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC.	IDENTIFICACIÓN
	Dirección: Britannia Oyster Point, 1140 Veterans Blvd., South San Francisco, California 94080 USA	C.C. ☐ NIT: ☐
	Nacionalidad o domicilio: South San Francisco, California USA	C.E. ☐ OTRO ☐
	Lugar de constitución: California, USA	NÚMERO Cual _____
	Teléfono: Fax:	
	E. Mail:	

3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN	IDENTIFICACIÓN
	Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C.	C.C. ☒ NIT: ☐
	Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	C.E. ☐ OTRO ☐
		NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ

4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. MATHER, Jennie, P.; 2. ROBERTS, Penélope, E.
	Dirección: 1. 269 La Prenda Drive, Millbrae, California 94030 USA; 2. 269 La Prenda Drive, Millbrae, California 94030 USA Nacionalidad o Domicilio: 1. Todos los anteriores, Estadounidenses

5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2006/004057 Fecha: FEBRERO 6, 2006
Publicación Internacional No. Wo2006/084226 A2 Fecha: Agosto 10 de 2006

6) Título (54) ANTICUERPOS QUE LIGAN AL EPHA2 Y SUS MÉTODOS DE USO

7) Clasificación Internacional: A61K39/395; C07K16/30; C12P21/06

8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	Estados Unidos	Febrero 4, 2005	60/650,047

9) Comprobante de pago N°.

10)

ANEXOS

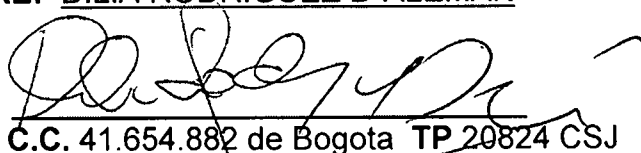
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 - 1. Reporte internacional de búsqueda
 - 2. IB/304

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

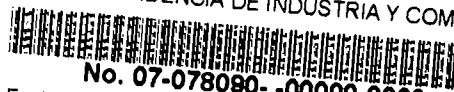

C.C. 41.654.882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-078080-00000-0000

Fecha: 2007-07-31 16:08:16

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEYII

Eve: 378 FASENACIONAL

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 261

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 53,877

FECHA : JULIO 4 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	VR. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	66415410	03/07/2007	10,382,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

3

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 August 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/084226 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/004057

(22) International Filing Date: 6 February 2006 (06.02.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/650,047 4 February 2005 (04.02.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC.** [US/US]; Britannia Oyster Point, 1140 Veterans Blvd., South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MATHER, Jennie, P.** [US/US]; 269 La Prenda Drive, Millbrae, California 94030 (US). **ROBERTS, Penelope, E.** [US/US]; 269 La Prenda Drive, Millbrae, California 94030 (US).

(74) Agents: **ZHOU, Jie et al.**; Morrison & Foerster LLP, 755 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304-1018 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTIBODIES THAT BIND TO EPHA2 AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: Provided herein is disclosure about the development and characterization of an antibody that binds to antigen EphA2 which is present on a variety of human cancers from breast, lung, prostate, and colons. Methods of diagnosing and treating various cancers by using such antibodies directed against this antigen are also disclosed.

WO 2006/084226 A2

4

ANTIBODIES THAT BIND TO EPHA2 AND METHODS OF USE THEREOF

TECHNICAL FIELD

[0001] This invention is in the fields of biology and immunotherapy. More specifically, it concerns the discovery of a family of antibodies that bind to EphA2. The invention further provides the diagnosis and/or treatment of a variety of human diseases and cancers associated with EphA2 using anti- EphA2 family antibodies.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] In addition to their known uses in diagnostics, antibodies have been shown to be useful as therapeutic agents. For example, immunotherapy, or the use of antibodies for therapeutic purposes has been used in recent years to treat cancer. Passive immunotherapy involves the use of monoclonal antibodies in cancer treatments. See for example, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6th Edition (2001) Chapt. 20 pp. 495-508. These antibodies can have inherent therapeutic biological activity both by direct inhibition of tumor cell growth or survival and by their ability to recruit the natural cell killing activity of the body's immune system. These agents can be administered alone or in conjunction with radiation or chemotherapeutic agents. Rituximab and Trastuzumab, approved for treatment of non-Hodgkin's lymphoma and breast cancer, respectively, are two examples of such therapeutics. Alternatively, antibodies can be used to make antibody conjugates where the antibody is linked to a toxic agent and directs that agent to the tumor by specifically binding to the tumor. Gemtuzumab ozogamicin is an example of an approved antibody conjugate used for the treatment of leukemia. Monoclonal antibodies that bind to cancer cells and have potential uses for diagnosis and therapy have been disclosed in publications. See, for example, the following patent applications which disclose, *inter alia*, some molecular weights of target proteins: U.S. Patent No. 6,054,561 (200 KD c-erbB-2 (Her2), and other unknown antigens 40-200 KD in size) and U.S. Patent No. 5,656,444 (50 KD and 55 KD, oncofetal protein). Example of antibodies in clinical trials and/or approved for treatment of solid

tumors include: Trastuzumab (antigen: 180 kD, HER2/neu), Edrecolomab (antigen: 40-50 kD, Ep-CAM), Anti-human milk fat globules (HMFG1) (antigen >200 kD, HMW Mucin), Cetuximab (antigens: 150 kD and 170 kD, EGF receptor), Alemtuzumab (antigen: 21-28 kD, CD52), and Rituximab (antigen: 35 kD, CD20).

[0003] The antigen targets of trastuzumab (Her-2 receptor), which is used to treat breast cancer, and cetuximab (EGF receptor), which is in clinical trials for the treatment of several cancers, are present at some detectable level on a large number of normal human adult tissues including skin, colon, lung, ovary, liver, and pancreas. The margin of safety in using these therapeutics is possibly provided by the difference in the level of expression or in access of or activity of the antibody at these sites.

[0004] Another type of immunotherapy is active immunotherapy, or vaccination, with an antigen present on a specific cancer(s) or a DNA construct that directs the expression of the antigen, which then evokes the immune response in the individual, *i.e.*, to induce the individual to actively produce antibodies against their own cancer. Active immunization has not been used as often as passive immunotherapy or immunotoxins.

[0005] Several models of disease (including cancer) progression have been suggested. Theories range from causation by a single infective/transforming event to the evolution of an increasingly "disease-like" or 'cancer-like' tissue type leading ultimately to one with fully pathogenic or malignant capability. Some argue that with cancer, for example, a single mutational event is sufficient to cause malignancy, while others argue that subsequent alterations are also necessary. Some others have suggested that increasing mutational load and tumor grade are necessary for both initiation as well as progression of neoplasia via a continuum of mutation-selection events at the cellular level. Some cancer targets are found only in tumor tissues, while others are present in normal tissues and are up-regulated and/or over-expressed in tumor tissues. In such situations, some researchers have suggested that the over-expression is linked to the acquisition of malignancy, while others suggest that the over-expression is merely a marker of a trend along a path to an increasing disease state.

[0006] One aspect required for the ideal diagnostic and/or therapeutic antibody is the discovery and characterization of an antigen that is associated

with a variety of cancers. There are few antigens that are expressed on a number of types of cancer (e.g., "pan-cancer" antigen) that have limited expression on non-cancerous cells. The isolation and purification of such an antigen would be useful for making antibodies (e.g., diagnostic or therapeutic) targeting the antigen. An antibody binding to the "pan-cancer" antigen could be able to target a variety of cancers found in different tissues in contrast to an antibody against an antigen associated with only one specific type of cancer. The antigen would also be useful for drug discovery (e.g., small molecules) and for further characterization of cellular regulation, growth, and differentiation.

[0007] What is needed are novel targets on the surface of diseased and/or cancer cells that may be used to treat such diseases and/or cancers with antibodies and other agents which specifically recognize the cell surface targets. There exists a further need, based on the discoveries disclosed herein, for novel antibodies and other agents which specifically recognize targets on the surface of cells that can modulate, either by reducing or enhancing, the disease-promoting activities of EphA2.

[0008] EphA2, previously known as ECK, is a 130 kD transmembrane receptor tyrosine kinase that is expressed on adult epithelial cells. See Lindberg, et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 6316-6324. EphA2 is one member of the Eph family of receptor tyrosine kinases, which are unique in that they recognize ligands, known as ephrins, which are anchored to the membrane of adjacent cells. See Bartley, et al. (1994) *Nature* 368: 558-560. The sequence of the human receptor EphA2 is known in the literature. It encompasses an extracellular domain of 534 amino acids, a transmembrane domain of 24 amino acids, and a cytoplasmic domain of 418 amino acids that contains the tyrosine kinase domain.

[0009] EphA2 is over-expressed in a large number of cancer cells, for example, in breast, prostate, lung, and colon carcinomas, and in aggressive melanomas, but reportedly is not over-expressed in non-cancerous lesions of these same tissues. See, for example, Rosenberg, et al. (1997) *Am. J. Physiol.* 273: G824-G832; Easty, et al., (1995) *Int. J. Cancer* 60: 129-136; Walker-Daniels, et al. (1999) *Prostate* 41: 275-280; Zantek et al. (1999) *Cell Growth & Differ.* 10: 629-638; Zantek et al. (2001) *Clin. Cancer Res.* 7: 3640-3648; Zelniski et al. (2001) *Cancer Res.* 61: 2301-2306; WO 01/121172; and WO 01/12840. Moreover, cells that have been

transformed to over-express EphA2 demonstrate malignant growth and ligand binding, which causes EphA2 to be internalized and degraded, and reverses the oncogenic effect of EphA2 over-expression. See Zelniski et al. (2001) *Cancer Res.* 61: 2301-2306; and Walker-Daniels, et al. (2002) *Mol. Cancer Res.* 1: 79-87.

[0010] Using EphA2 as a therapeutic target has been proposed by others in the art. One author suggested using EphA2 ligands such as an Ephrin A1 fusion to human immunoglobulin G. Exposure of cells expressing EphA2 to the Ephrin A1-Fc fusion protein resulted in a down-regulation of EphA2 expression. See Duxbury, et al. (2004) *BBRC* 320:1096-1102.

[0011] Antibodies to eck/EphA2 are known, see e.g., Lindberg, et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 6316-6324. The use of antibody-based targeting using anti-EphA2 antibodies has been described by others, see e.g., Charles-Kinch et al. (2002) *Cancer Res.* 62:2840-2847, which describes using extracellular domain of EphA2 fused to human immunoglobulin to generated monoclonal antibodies against EphA2. Treatment of cancer cells with these anti-EphA2 monoclonal antibodies resulted in morphological changes and inhibition of cell growth on soft agar.

[0012] Antibodies to EphA2 have been made and proposed to be useful in the treatment of cancer (see e. g., U.S. Patent 6,927,203; International Patent Publication Nos. WO01/12840 and WO01/12172 ; US Provisional Patent Application Nos. 60/379,322 and 60/379,368; US Patent 5,824, 303). WO2003US15044 describes methods comprising the administration of an effective amount of an antibody that binds to EphA2 and agonizes EphA2, thereby increasing EphA2 phosphorylation and decreasing EphA2 levels. In other embodiments, that application describes the administration of an effective amount of an antibody that binds to EphA2 and inhibits cancer cell colony formation in soft agar, inhibits tubular network formation in three-dimensional basement membrane or extracellular matrix preparation, preferentially binds to an EphA2 epitope that is exposed on cancer cells but not non-cancer cells, and/or has a low Koff, thereby, inhibiting tumor cell growth and/or metastasis. U.S. Patent 6,927,203 describes antibodies that impede proliferation of tumor cells using an antibody that increases the phosphotyrosine content of EphA2.

[0013] PCT patent application WO 200391383 describes peptides derived from EphA2 and their use in anti-tumor immunotherapy. It describes peptide vaccination or immunotherapy based on an EphA2 epitope that may be used to induce or mimic a cytotoxic T lymphocyte cell response to tumor cells that over-express EphA2.

[0014] While EphA2 antibodies are known, there remains a need for particular anti-EphA2 antibodies that are extremely effective in inhibiting tumor cell growth, beyond the level of effectiveness shown by the EphA2 antibodies shown in the prior art.

[0015] All references, publications, and patent applications disclosed herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0016] The invention disclosed herein concerns antibodies that bind to an antigen, EphA2, which is expressed on a variety of human cancers. Accordingly, in one aspect, the invention is a family of antibodies, or an antibody or a polypeptide (which may or may not be an antibody) that binds preferentially to the antigen EphA2. The antibodies claimed in the present invention are surprisingly and very effective in inhibiting tumor cell growth, beyond the level of effectiveness shown by the EphA2 antibodies shown in the prior art. Some of these antibodies are referred to herein as LUCA19, SPL1, LUCA40, or SG5. In aspects of this invention, certain antibodies have been discovered that have the ability to impede proliferation of tumor cells while not increasing the phosphotyrosine content of EphA2.

[0017] In another aspect, the invention is a monoclonal antibody anti-EphA2 that is produced by any one of the following host cell lines: PTA-5070 deposited March 20, 2003 at the American Type Culture Collection, PTA-6056 deposited June 8, 2004 at the American Type Culture Collection, PTA-6059 deposited June 8, 2004 at the American Type Culture Collection, and an SG5-producing host cell line (SG.3.15.B4.1F9) was deposited at the American Type Culture Collection on February 2, 2006.

[0018] In another aspect, the invention is an antibody or a polypeptide (which may or may not be an antibody) that competitively inhibits specific

binding of the anti-EphA2 antibody to EphA2. In another aspect, the invention is an antibody or a polypeptide (which may or may not be an antibody) that binds preferentially to the same epitope on EphA2 as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 binds preferentially.

[0019] In another aspect, the invention is an antibody comprising a fragment or a region of the anti-EphA2 antibody. In one embodiment, the fragment is a light chain of the anti-EphA2 antibody. In another embodiment, the fragment is a heavy chain of the anti-EphA2 antibody. In yet another embodiment, the fragment contains one or more variable regions from a light chain and/or a heavy chain of the anti-EphA2 antibody. In yet another embodiment, the fragment contains one or more complementarity determining regions (CDRs) from a light chain and/or a heavy chain of the anti-EphA2 antibody.

[0020] In another aspect, the invention provides polypeptides (which may or may not be antibodies) comprising any of the following: a) one or more CDRs; b) three CDRs from the light chain; c) three CDRs from the heavy chain; d) three CDRs from the light chain and three CDRs from the heavy chain; e) the light chain variable region; f) the heavy chain variable region of the anti-EphA2 antibody.

[0021] In another aspect, the invention is a humanized antibody derived from LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. In some embodiments, the humanized antibody comprises one or more CDRs of the anti-EphA2 antibody. In another aspect, the invention provides a humanized antibody that binds to the same epitope(s) as anti-EphA2 antibody. Generally, a humanized antibody of the invention comprises one or more (one, two, three, four, five, six) CDRs that are the same and/or derived from the CDR(s) of anti-EphA2 antibody. In other aspect, the invention provides a human antibody that binds to the same epitope(s) on EphA2 as anti-EphA2 antibody.

[0022] In another aspect, the invention is a chimeric antibody comprising variable regions derived from variable regions of a heavy chain and a light chain of anti-EphA2 antibody and constant regions derived from constant regions of a heavy chain and a light chain of a human antibody.

[0023] In yet another aspect, the invention is a host cell (ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, PTA-6059, or SG.3.15.B4.1F9 (ATCC No. PTA-XXXX)) or progeny thereof which produces monoclonal anti-EphA2 antibody.

[0024] In another aspect, the invention is an isolated polynucleotide that encodes for anti-EphA2 antibody that is produced by a host cell with a deposit number of ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, or PTA-6059 or host cell SG.3.15.B4.1F9 (ATCC No. PTA-XXXX) or progeny thereof. In another aspect, the invention provides polynucleotides encoding any of the antibodies (including antibody fragments) as well as any other polypeptides described herein.

[0025] In another aspect, the invention is a complex of EphA2 bound by any of the antibody or polypeptides described herein. In some embodiments, the EphA2 is present on melanomas, breast, colon, lung, or prostate cancer cells. In some embodiments, the invention is a complex of EphA2 bound by anti-EphA2 antibody or an antibody that binds preferentially to the epitope that anti-EphA2 antibody binds preferentially. In one embodiment, anti-EphA2 antibody or any antibody that binds preferentially to the epitope that anti-EphA2 antibody binds preferentially is linked to a therapeutic agent (such as a toxin).

[0026] In another aspect, the invention is a complex of a cancer cell expressing EphA2 bound by any of the antibody or polypeptides described herein. In some embodiments, the cancer cell is melanomas, breast, colon, lung, or prostate cancer cell. In some embodiments, the antibody is SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40 or any antibody that binds preferentially to an epitope that any of these anti-EphA2 antibodies bind preferentially. In some embodiments, SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40 antibody or any antibody that binds preferentially to an epitope that any of these anti-EphA2 antibodies bind preferentially is linked to a therapeutic agent (such as a toxin).

[0027] In another aspect, the invention is a complex of an epitope on EphA2 that SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40 preferentially binds, which is in turn bound by any of the antibody or polypeptides described herein. In some embodiments, the epitope is on melanomas, breast, colon, lung, or prostate cancer cell. In some embodiments, the antibody is SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40 or any antibody that binds preferentially to an epitope that any of these

anti-EphA2 antibodies bind preferentially. In some embodiments, SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40 or any antibody that binds preferentially to an epitope that any of these anti-EphA2 antibodies bind preferentially is linked to a therapeutic agent (such as a toxin).

[0028] In another aspect, the invention is a pharmaceutical composition comprising any of the polypeptides (including any of the antibodies such as anti-EphA2 antibody) or polynucleotides described herein, such as pharmaceutical compositions comprising the anti-EphA2 antibody, the anti-EphA2 antibody linked to a therapeutic agent, an antibody comprising a fragment of the anti-EphA2 antibody, a humanized antibody of the anti-EphA2 antibody, a chimeric antibody comprising variable regions derived from variable regions of the anti-EphA2 antibody and constant regions derived from constant regions of a human antibody, or a human antibody with one or more properties of the anti-EphA2 antibody, and a pharmaceutically acceptable excipient.

[0029] In yet another aspect, the invention is a method of generating monoclonal antibody anti-EphA2 reactive with diseased and/or cancerous cells comprising the steps of: (a) immunizing a host mammal with an immunogen; (b) obtaining lymphocytes from the mammal; (c) fusing lymphocytes (b) with a myeloma cell line to produce a hybridoma; (d) culturing the hybridoma of (c) to produce monoclonal antibodies; and (e) screening the antibodies to select only those antibodies which bind to diseased and/or cancerous cells or cell lines but do not bind to non-cancerous or normal cells or cell lines, or bind to normal cells at a lower level or in a different fashion.

[0030] In another aspect, the invention is a method of generating an anti-EphA2 family antibody comprising culturing a host cell encoding such antibody or progeny thereof under conditions that allow production of the antibody, and purifying the anti-EphA2 antibody.

[0031] In another aspect, the invention is a method of generating an anti-EphA2 family antibody comprising culturing a host cell or progeny thereof under conditions that allow production of the antibody, and purifying the anti-EphA2 antibody.

[0032] In another aspect, the invention provides methods of generating any of the antibodies (or polypeptides) described herein by expressing one or

more polynucleotides encoding the antibody (which may be separately expressed as a single light or heavy chain, or both a light and a heavy chain are expressed from one vector) in a suitable cell, generally followed by recovering and/or isolating the antibody or polypeptides of interest.

[0033] In another aspect, the invention is an anti- EphA2 antibody or a polypeptide (which may or may not be an antibody) that competitively inhibits preferential binding of an anti-EphA2 antibody to EphA2. In some embodiments, the invention is an antibody or a polypeptide (which may or may not be an antibody) that binds preferentially to the same or different epitopes on EphA2 as other anti- EphA2 antibodies.

[0034] In yet another aspect, the invention is a composition comprising EphA2 bound by an antibody specific for an epitope of EphA2. In one embodiment, the antibody is anti-EphA2. In other embodiments, two or more anti-EphA2 antibodies are administered, with such antibodies mapping to two or more different epitopes of EphA2. In some embodiments, the anti-EphA2 antibody is linked to a therapeutic agent or a detectable label.

[0035] In another aspect, the invention is an antibody comprising a fragment or a region of an anti-EphA2 antibody. In one embodiment, the fragment is a light chain of the antibody. In another embodiment, the fragment is a heavy chain of the antibody. In yet another embodiment, the fragment contains one or more variable regions from a light chain and/or a heavy chain of the antibody. In yet another embodiment, the fragment contains one or more complementarity determining regions (CDRs) from a light chain and/or a heavy chain of the antibody.

[0036] In another aspect, the invention provides polypeptides (which may or may not be antibodies) comprising any of the following: a) one or more CDRs (or fragments thereof) from the light or heavy chain; b) three CDRs from the light chain; c) three CDRs from the heavy chain; d) three CDRs from the light chain and three CDRs from the heavy chain; e) the light chain variable region; f) the heavy chain variable region of the anti-EphA2 antibody.

[0037] In another aspect, the invention is a humanized antibody. In some embodiments, the humanized antibody comprises one or more CDRs of a non-human anti-EphA2 antibody. In some embodiments, the humanized antibody

binds to the same or different epitope(s) as other anti- EphA2 antibodies. Generally, a humanized antibody of the invention comprises one or more (one, two, three, four, five, six, or fragments thereof) CDRs which are the same and/or derived from the CDR(s) of the original non-human anti- EphA2 antibody. In some embodiments, the human antibody binds to the same or different epitope(s) as other anti- EphA2 antibodies. In another aspect, the invention is a chimeric antibody comprising variable regions derived from variable regions of a heavy chain and a light chain of a non-human anti- EphA2 antibody and constant regions derived from constant regions of a heavy chain and a light chain of a human antibody.

[0038] In another aspect, the invention is an isolated polynucleotide that encodes any one of antibodies SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40 that is produced by a host cell with a deposit number of ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, or PTA-6059, respectively, and host cell SG.3.15.B4.1F9 (ATCC No. PTA-XXXX) or progeny thereof. This invention encompasses antibody polypeptides having the inherent binding or biological activities of any of the above-specified antibodies. In another aspect, the invention provides polynucleotides encoding any of the antibodies (including antibody fragments) as well as any other polypeptides described herein.

[0039] In another aspect, the invention is a pharmaceutical composition comprising any of the polypeptides (including any of the antibodies described herein) or polynucleotides described herein, such as pharmaceutical compositions comprising an anti-EphA2 antibody linked to a chemotherapeutic agent, an antibody comprising a fragment of an anti-EphA2 antibody, a humanized antibody of a non-human anti- EphA2 antibody, a chimeric antibody comprising variable regions derived from variable regions of a non-human anti- EphA2 antibody and constant regions derived from constant regions of a human antibody, or a human antibody with one or more properties of a non-human anti-EphA2 antibody, or any of the anti-EphA2 antibody described herein linked to a chemotherapeutic agent (such as a radioactive moiety), and a pharmaceutically acceptable excipient.

[0040] In one aspect, the invention is a composition comprising an anti-EphA2 antibody bound to EphA2 present on a diseased or cancerous cell. In

preferred embodiments, the cancer cell is selected from the group consisting of ovarian, lung, prostate, pancreatic, colon, and breast cancer cells. In some embodiments, the cancer cell is isolated. In some embodiments, the cancer cell is in a biological sample. Generally, the biological sample is from an individual, such as a human.

[0041] In another aspect, the invention is a method of diagnosing disease in an individual by detecting EphA2 on cells from the individual, particularly diseases or disorders associated with inflammatory or autoimmune responses in individuals. In other aspects of the invention, methods are provided for modulating inflammatory or autoimmune responses in individuals. Diseases and conditions resulting from inflammation and autoimmune disorders that may be subject to treatment using the compositions and methods of the invention include, by way of illustration and not of limitation, multiple sclerosis, meningitis, encephalitis, stroke, other cerebral traumas, inflammatory bowel disease including ulcerative colitis and Crohn's disease, myasthenia gravis, lupus, rheumatoid arthritis, asthma, acute juvenile onset diabetes, AIDS dementia, atherosclerosis, nephritis, retinitis, atopic dermatitis, psoriasis, myocardial ischemia and acute leukocyte-mediated lung injury.

[0042] Still other indications for therapeutic use of antibodies and other therapeutic agents of the invention include administration to individuals at risk of organ or graft rejection. Over recent years there has been a considerable improvement in the efficiency of surgical techniques for transplanting tissues and organs such as skin, kidney, liver, heart, lung, pancreas and bone marrow. Perhaps the principal outstanding problem is the lack of satisfactory agents for inducing immunotolerance in the recipient to the transplanted allograft or organ. When allogeneic cells or organs are transplanted into a host (i.e., the donor and donee are different individuals from the same species), the host immune system is likely to mount an immune response to foreign antigens in the transplant (host-versus-graft disease) leading to destruction of the transplanted tissue.

[0043] In another aspect, the invention is a method for diagnosing whether an individual has cancer, comprising determining whether there is expression of EphA2 on selected cells from the individual, wherein the expression of EphA2 on said cells is indicative of said cancer. In some

embodiments, the expression of EphA2 is determined using an anti-EphA2 antibody. In some embodiments, the method involves detecting the level of EphA2 expression from cells. The term "detection" as used herein includes qualitative and/or quantitative detection (measuring levels) with or without reference to a control.

[0044] In yet another aspect, the invention is a method of diagnosing cancer in an individual by detecting EphA2 on or released from cells from the individual, wherein the cancer is selected from the group including but not limited to adrenal gland tumors, AIDS-associated cancers, alveolar soft part sarcoma, astrocytic tumors, bladder cancer (squamous cell carcinoma and transitional cell carcinoma), bone cancer (adamantinoma, aneurismal bone cysts, osteochondroma, osteosarcoma), brain and spinal cord cancers, metastatic brain tumors, breast cancer, carotid body tumors, cervical cancer, chondrosarcoma, chordoma, chromophobe renal cell carcinoma, clear cell carcinoma, colon cancer, colorectal cancer, cutaneous benign fibrous histiocytomas, desmoplastic small round cell tumors, ependymomas, Ewing's tumors, extraskeletal myxoid chondrosarcoma, fibrogenesis imperfecta ossium, fibrous dysplasia of the bone, gallbladder and bile duct cancers, gestational trophoblastic disease, germ cell tumors, head and neck cancers, islet cell tumors, Kaposi's Sarcoma, kidney cancer (nephroblastoma, papillary renal cell carcinoma), leukemias, lipoma/benign lipomatous tumors, liposarcoma/malignant lipomatous tumors, liver cancer (hepatoblastoma, hepatocellular carcinoma), lymphomas, lung cancers (small cell carcinoma, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, large cell carcinoma, etc.), medulloblastoma, melanoma, meningiomas, multiple endocrine neoplasia, multiple myeloma, myelodysplastic syndrome, neuroblastoma, neuroendocrine tumors, ovarian cancer, pancreatic cancers, papillary thyroid carcinomas, parathyroid tumors, pediatric cancers, peripheral nerve sheath tumors, pheochromocytoma, pituitary tumors, prostate cancer, posterior uveal melanoma, rare hematologic disorders, renal metastatic cancer, rhabdoid tumor, rhabdomyosarcoma, sarcomas, skin cancer, soft-tissue sarcomas, squamous cell cancer, stomach cancer, synovial sarcoma, testicular cancer, thymic carcinoma, thymoma, thyroid metastatic cancer, and uterine cancers (carcinoma of the cervix, endometrial carcinoma, and leiomyoma).

[0045] In another aspect, the invention is a method for aiding diagnosis of cancer (such as but not limited to ovarian, lung, prostate, pancreatic, colon, or breast cancer) in an individual comprising determining the expression of EphA2 in a biological sample from the individual. In some embodiments, the expression of EphA2 is determined using an anti-EphA2 antibody. In some embodiments, the anti-EphA2 antibody is a family member specifically named herein. In some embodiments, the method is detecting the level of EphA2 expression from cells.

[0046] In yet another aspect, the invention is a method of treating cancer by administering an effective amount of an antibody that binds to EphA2 sufficient to reduce growth of cancerous cells. In some embodiments, the antibody is an anti-EphA2 antibody. In certain embodiments, the cancerous cells are selected from the group including but not limited to adrenal gland tumors, AIDS-associated cancers, alveolar soft part sarcoma, astrocytic tumors, bladder cancer (squamous cell carcinoma and transitional cell carcinoma), bone cancer (adamantinoma, aneurismal bone cysts, osteochondroma, osteosarcoma), brain and spinal cord cancers, metastatic brain tumors, breast cancer, carotid body tumors, cervical cancer, chondrosarcoma, chordoma, chromophobe renal cell carcinoma, clear cell carcinoma, colon cancer, colorectal cancer, cutaneous benign fibrous histiocyctomas, desmoplastic small round cell tumors, ependymomas, Ewing's tumors, extraskeletal myxoid chondrosarcoma, fibrogenesis imperfecta ossium, fibrous dysplasia of the bone, gallbladder and bile duct cancers, gestational trophoblastic disease, germ cell tumors, head and neck cancers, islet cell tumors, Kaposi's Sarcoma, kidney cancer (nephroblastoma, papillary renal cell carcinoma), leukemias, lipoma/benign lipomatous tumors, liposarcoma/malignant lipomatous tumors, liver cancer (hepatoblastoma, hepatocellular carcinoma), lymphomas, lung cancers (small cell carcinoma, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, large carcinoma, etc.), medulloblastoma, melanoma, meningiomas, multiple endocrine neoplasia, multiple myeloma, myelodysplastic syndrome, neuroblastoma, neuroendocrine tumors, ovarian cancer, pancreatic cancers, papillary thyroid carcinomas, parathyroid tumors, pediatric cancers, peripheral nerve sheath tumors, pheochromocytoma, pituitary tumors, prostate cancer, posterior uveal melanoma, rare hematologic disorders, renal metastatic cancer, rhabdoid tumor,

rhabdomyosarcoma, sarcomas, skin cancer, soft-tissue sarcomas, squamous cell cancer, stomach cancer, synovial sarcoma, testicular cancer, thymic carcinoma, thymoma, thyroid metastatic cancer, and uterine cancers (carcinoma of the cervix, endometrial carcinoma, and leiomyoma). In certain preferred embodiments, the cancerous cells are selected from the group of solid tumors including but not limited to breast cancer, colon cancer, prostate cancer, lung cancer, sarcoma, renal metastatic cancer, thyroid metastatic cancer, and clear cell carcinoma.

[0047] In yet another aspect, the invention is a method of delaying development of metastasis in an individual having cancer comprising administering an effective amount of at least one of a family of antibodies that bind specifically to EphA2. In one embodiment, the antibody is an anti-EphA2 antibody. In another aspect, the invention is a method of inhibiting growth and/or proliferation of cancer cells *in vitro* or in an individual comprising administering an effective amount of a composition comprising an anti-EphA2 antibody associated with (including linked to) a chemotherapeutic agent to the cell culture or sample, or to the individual.

[0048] In yet another aspect, the invention is a method of delivering a therapeutic agent to a cancerous cell in an individual by administering to the individual an effective amount of at least one member of a family of antibodies, which bind specifically to EphA2. In other embodiments, an anti-EphA2 antibody is delivered to an individual in combination with (including linked to) another therapeutic agent.

[0049] In some embodiments, the anti-EphA2 antibody is a humanized antibody derived from a named antibody family member herein (generally, but not necessarily, comprising one or more partial or intact CDRs of the antibody). In some embodiments, the anti-EphA2 antibody is a human antibody with one or more properties of the named antibody family member. In some embodiments, the chemotherapeutic agent (such as a toxin or a radioactive molecule) is delivered into the cancer cells (is internalized). In some embodiments, the agent is saporin.

[0050] In another aspect, the invention is a method of treating cancer in an individual comprising administering an effective amount of a composition

comprising an anti-EphA2 antibody associated with (including linked to) a chemotherapeutic agent to the individual.

[0051] The present invention further provides methods for modulating, either by enhancing or reducing, the association of EphA2 with a cytoplasmic signaling partner. The association of EphA2 with a cytoplasmic signaling partner can be impacted by contacting an EphA2 molecule presenting on a cell surface, with an agent that modulates the binding of the signaling partner to EphA2. Agents which block or reduce EphA2 association with its binding and/or signaling partners can be used to modulate biological and pathological processes which are involved in EphA2-mediated inflammation or immune responses. Pathological processes involving this action include tumor-associated cell growth.

[0052] Agents can be tested for their ability to block, reduce, enhance or otherwise modulate the association of EphA2 with a binding partner, such as an anti-EphA2 antibody. Specifically, an agent can be tested for the ability to modulate such an interaction by incubating a peptide comprising the EphA2 interaction site (typically in its native conformation as it exists on intact living cells) with a binding partner and a test agent, and determining whether the test agent reduces or enhances the binding of the binding partner to the EphA2 peptide. Agonists, antagonists, and other modulators are expressly contemplated.

[0053] In certain aspects, the invention is a method for aiding in the diagnosis of disease in an individual comprising the steps of (i) assaying for the presence of EphA2 in a blood or tissue sample obtained from an individual; (ii) detecting whether said sample has an increased amount of a EphA2 marker relative to a normal (non-diseased) blood or tissue sample; and (iii) correlating an increased amount of said marker to a positive diagnosis or correlating the absence of an increased amount of said marker to a negative diagnosis for disease. In certain embodiments, the marker is detected using an anti-EphA2 antibody. In certain embodiments, the method is effected by a technique selected from the group consisting of radionuclide imaging, flow cytometry, and immunohistochemistry.

[0054] In another aspect, the invention is a method of diagnosing cancer or metastatic cancer in an individual by detecting EphA2 on cells from the individual using the anti-EphA2 antibody or any EphA2 binding moiety (polypeptides, including, but not limited to, various antibodies and antibody derivatives) described herein. In some embodiments, the cancer is melanomas, breast, colon, lung, and prostate. In some embodiments, the method is detecting the level of EphA2 from cells. The presence of EphA2 is detected by detecting a complex between EphA2 and an EphA2 binding moiety. The term "detection" as used herein includes qualitative and/or quantitative detection (measuring levels) with or without reference to a control.

[0055] In another aspect, the invention is a method of treating cancer by administering an effective amount of a composition comprising the anti-EphA2 antibody, or any of the antibodies (including polypeptides) or polynucleotides embodiments described herein, including but not limited to the anti-EphA2 antibody associated with a therapeutic agent, an antibody comprising a fragment or a region of the anti-EphA2 antibody, a humanized antibody (generally, but not necessarily, comprising one or more CDRs of the anti-EphA2 antibody), a chimeric antibody comprising variable regions derived from variable regions of the anti-EphA2 antibody and constant regions derived from constant regions of a human antibody, or a human antibody with one or more properties of the anti-EphA2 antibody, sufficient to reduce growth of cancerous cells. In some embodiments, the cancer is melanomas, breast, colon, lung, or prostate.

[0056] In certain embodiments, the invention is a method of treating cancer in a patient, said method comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of an EphA2 antibody that specifically binds to EphA2, and has at least one, and preferably two or more, of the following characteristics of SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40:

- a. the ability to bind to EphA2 on a cancer cell;
- b. the ability to bind to a portion of EphA2 that is exposed on the surface of a living cancer cell *in vitro* or *in vivo*;
- c. the ability to impede proliferation of tumor cells without increasing the phosphotyrosine content of EphA2;

- d. the ability to deliver a therapeutic agent or detectable marker to a cancer cell expressing EphA2; and
- e. the ability to deliver a therapeutic agent or detectable marker into a cancer cell expressing EphA2.

[0057] In another aspect, the invention is a method of inhibiting growth and/or proliferation of cancerous cells in an individual by administering to the individual an effective amount of a composition comprising the anti-EphA2 antibody, or any of the antibodies (including polypeptides) or polynucleotides embodiments described herein, including but not limited to the anti-EphA2 antibody associated with a therapeutic agent, an antibody comprising a fragment or a region of the anti-EphA2 antibody, a humanized antibody (generally, but not necessarily, comprising one or more CDRs of the anti-EphA2 antibody), a chimeric antibody comprising variable regions derived from variable regions of the anti-EphA2 antibody and constant regions derived from constant regions of a human antibody, or a human antibody with one or more properties of the anti-EphA2 antibody, sufficient to reduce growth of cancerous cells. In some embodiments, the cancer is melanomas, breast, colon, lung, or prostate.

[0058] In another aspect, the invention is a method of preventing or delaying development of metastasis, treating metastatic cancer, or inhibiting proliferation of metastatic cancer cells in an individual with cancer by administering an effective amount of a composition comprising the anti-EphA2 antibody, or any of the antibodies (including polypeptides) or polynucleotides embodiments described herein, including but not limited to the anti-EphA2 antibody associated with a therapeutic agent, an antibody comprising a fragment or a region of the anti-EphA2 antibody, or a humanized antibody (generally, but not necessarily, comprising one or more CDRs of the anti-EphA2 antibody), a chimeric antibody comprising variable regions derived from variable regions of the anti-EphA2 antibody and constant regions derived from constant regions of a human antibody, or a human antibody with one or more properties of the anti-EphA2 antibody, sufficient to reduce growth of cancerous cells. In some embodiments, the cancer is melanomas, breast, colon, lung, or prostate.

[0059] In another aspect, the invention is a method of delivering a therapeutic agent (such as a toxin, or a radioactive molecule) to cancerous cells in

an individual by administering to the individual an effective amount of an EphA2 binding antibody or any EphA2 binding moiety (polypeptides, including but not limited to antibodies or antibody derivatives) described herein that are linked to a therapeutic agent (such as a toxin or a radioactive molecule). The EphA2 binding moiety includes, but not limited to the anti-EphA2 antibody, an antibody comprising a fragment or a region of the anti-EphA2 antibody, or a humanized antibody (generally, but not necessarily, comprising one or more CDRs of the anti-EphA2 antibody), a chimeric antibody comprising variable regions derived from variable regions of the anti-EphA2 antibody and constant regions derived from constant regions of a human antibody, or a human antibody with one or more properties of the anti-EphA2 antibody. In some embodiments, the cancerous cells are from melanomas, breast, colon, lung, or prostate cancer. In another embodiment, the therapeutic agent (such as a toxin or a radioactive molecule) is delivered into the cancerous cells (is internalized). Accordingly, the invention provides methods of inhibiting growth and/or proliferation of cancer cells such that the therapeutic agent is delivered into those cancer cells.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0060] FIGURE 1 shows results of A549 tumor xenografts subcutaneously treated with SPL1 and their slow re-growth after cessation of dosing.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0061] The invention disclosed herein provides antibodies and polypeptides which bind to an antigen, EphA2 and methods of making and using these antibodies and polypeptides to diagnose and treat various diseases human cancers associated with expression and/or overexpression of EphA2. EphA2 has been shown to be present and its expression is increased in a variety of human cancers. Anti-EphA2 antibodies such as those produced by any one of the host cells identified in the following paragraph have been generated and have been shown to specifically bind to EphA2.

[0062] In accordance with the Budapest Treaty, the hybridoma which produces mLUCA19 has been deposited in the American Type Culture

Collection (ATCC) 10801 University Blvd., Manassas VA 20110-2209 on March 20, 1993 with a Patent Deposit Designation of PTA-5070, the hybridoma which produces SPL1 has been deposited in the American Type Culture Collection (ATCC) on June 8, 2004 with a Patent Deposit Designation of PTA-6059, the hybridoma which produces LUCA40 has been deposited in the American Type Culture Collection (ATCC) on June 8, 2004 with a Patent Deposit Designation of PTA-6056, and the hybridoma which produces SG5 has been deposited in the American Type Culture Collection (ATCC) on February 2, 2006 with a Patent Deposit Designation of PTA-XXXX.

I. General Techniques

[0063] The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, such as, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies : a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J.D. Capra,

eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

II. Definitions

[0064] EphA2 refers to that polypeptide antigen with a molecular weight of approximately 130 kD, against which the antibodies of the present invention are directed. As described in more detail herein, this antigen has more than one different epitope. Some of the preferred antibody embodiments of this invention are directed against one of two or more specific epitopes of the EphA2 antigen. It is currently believed that EphA2 is over-expressed in certain cancer cells in comparison to their normal tissue counterparts

[0065] An "antibody" is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term encompasses not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also fragments thereof (such as Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), single chain (ScFv), mutants thereof, naturally occurring variants, fusion proteins comprising an antibody portion with an antigen recognition site of the required specificity, humanized antibodies, chimeric antibodies, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity.

[0066] The term "monoclonal antibody" encompasses not only intact monoclonal antibodies and full-length monoclonal antibodies, but also fragments thereof (such as Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), single chain (ScFv), mutants thereof, fusion proteins comprising an antibody portion, humanized monoclonal antibodies, chimeric monoclonal antibodies, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity and the ability to bind to an antigen. It is not intended to be limited as regards to the source of the antibody or the manner in which it is made (e.g., by hybridoma, phage selection, recombinant expression, transgenic animals, etc.).

[0067] "Humanized" antibodies refer to a molecule having an antigen-binding site that is substantially derived from an immunoglobulin from a non-

human species and the remaining immunoglobulin structure of the molecule based upon the structure and/or sequence of a human immunoglobulin. The antigen-binding site may comprise either complete variable domains fused onto constant domains or only the complementarity determining regions (CDRs) grafted onto appropriate framework regions in the variable domains. Antigen binding sites may be wild type or modified by one or more amino acid substitutions, e.g., modified to resemble human immunoglobulin more closely. Some forms of humanized antibodies preserve all CDR sequences (for example, a humanized mouse antibody which contains all six CDRs from the mouse antibodies). Other forms of humanized antibodies have one or more CDRs (one, two, three, four, five, six) which are altered with respect to the original antibody, which are also termed one or more CDRs "derived from" one or more CDRs from LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40.

[0068] "Chimeric antibodies" refers to those antibodies wherein one portion of each of the amino acid sequences of heavy and light chains is homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular class, while the remaining segment of the chains is homologous to corresponding sequences in another. Typically, in these chimeric antibodies, the variable region of both light and heavy chains mimics the variable regions of antibodies derived from one species of mammals, while the constant portions are homologous to the sequences in antibodies derived from another. One clear advantage to such chimeric forms is that, for example, the variable regions can conveniently be derived from presently known sources using readily available hybridomas or B cells from non human host organisms in combination with constant regions derived from, for example, human cell preparations. While the variable region has the advantage of ease of preparation, and the specificity is not affected by its source, the constant region being human, is less likely to elicit an immune response from a human subject when the antibodies are injected than would the constant region from a non-human source. However, the definition is not limited to this particular example.

[0069] An epitope that "specifically binds" or "preferentially binds" (used interchangeably herein) to an antibody or a polypeptide is a term well understood in the

art, and methods to determine such specific or preferential binding are also well known in the art. A molecule is said to exhibit "specific binding" or "preferential binding" if it reacts or associates more frequently, more rapidly, with greater duration and/or with greater affinity with a particular cell or substance than it does with alternative cells or substances. An antibody "specifically binds" or "preferentially binds" to a target if it binds with greater affinity, avidity, more readily, and/or with greater duration than it binds to other substances. For example, an antibody that specifically or preferentially binds to an EphA2 epitope is an antibody that binds this EphA2 epitope with greater affinity, avidity, more readily, and/or with greater duration than it binds to other EphA2 epitopes or non-EphA2 epitopes. It is also understood by reading this definition that, for example, an antibody (or moiety or epitope) that specifically or preferentially binds to a first target may or may not specifically or preferentially bind to a second target. As such, "specific binding" or "preferential binding" does not necessarily require (although it can include) exclusive binding. Generally, but not necessarily, reference to binding means preferential binding.

[0070] The term "immunologically active" in reference to an epitope being or "remaining immunologically active" refers to the ability of an antibody (e.g., anti-EphA2 antibody) to bind to the epitope under different conditions, for example, after the epitope has been subjected to reducing and denaturing conditions.

[0071] As used herein, the terms "LUCA19, SPL1, LUCA40, or SG5", "anti-EphA2 antibody" and "monoclonal anti-EphA2 antibody" are used interchangeably to refer to immunoglobulin produced by any of the host cells with a deposit number of ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, or PTA-6059, or host cell SG.3.15B4.1F9 (ATCC No. PTA-XXXX) or progeny thereof. Different biological functions are associated with LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, including, but not limited to, ability to bind to EphA2; ability to bind to EphA2 extracellular domain; ability to bind to EphA2 on cancer cells exposed on the surface of a living cell *in vitro* or *in vivo*; ability to deliver a chemotherapeutic agent to cancerous cells (such as ovarian, prostate, pancreatic, lung, colon, or breast cancer cells) expressing EphA2; ability to deliver a therapeutic agent or detectable marker into cancer cells expressing EphA2. As discussed herein,

polypeptides (including antibodies) of the invention may have any one or more of these characteristics.

[0072] An "anti-EphA2 equivalent antibody" or "anti-EphA2 equivalent polypeptide" refers to an antibody or a polypeptide having one or more biological functions associated with an anti-EphA2 antibody, such as, for example binding specificity.

[0073] As used herein, "agent" refers to a biological, pharmaceutical, or chemical compound. Non-limiting examples include simple or complex organic or inorganic molecule, a peptide, a protein, an oligonucleotide, an antibody, an antibody derivative, antibody fragment, a vitamin derivative, a carbohydrate, a toxin, or a chemotherapeutic compound. Various compounds can be synthesized, for example, small molecules and oligomers (*e.g.*, oligopeptides and oligonucleotides), and synthetic organic compounds based on various core structures. In addition, various natural sources can provide compounds for screening, such as plant or animal extracts, and the like. A skilled artisan can readily recognize that there is no limit as to the structural nature of the agents of the present invention.

[0074] Agents that are employed in the methods of this invention can be randomly selected or rationally selected or designed. As used herein, an agent is said to be randomly selected when the agent is chosen randomly without considering the specific sequences involved in the association of EphA2 with its native binding partners or known antibodies. An example of randomly selected agents is the use of a chemical library or a peptide combinatorial library.

[0075] As used herein, an agent is said to be rationally selected or designed when the agent is chosen on a nonrandom basis that takes into account the sequence of the target site and/or its conformation in connection with the agent's action. With respect to anti-EphA2 agents, it is currently believed that there are at least three epitopes on EphA2 against which antibodies can be raised and therefore at least three sites of action for agents that block EphA2 / anti-EphA2 interaction. This invention also encompasses agents that act at the sites of interaction between EphA2 and its native binding partner, although other ligands and their active EphA2 -interactive sites are also encompassed within the scope of this invention, whether currently known or later identified. Agents can

be rationally selected or rationally designed by utilizing the peptide sequences that make up the contact sites of the receptor/ligand and/or EphA2 /anti-EphA2 antibody complex. For example, a rationally selected peptide agent can be a peptide whose amino acid sequence is identical to an epitope appearing on EphA2 as it is exposed on the surface of a living cell in its native environment. Such an agent will reduce or block the association of the anti-EphA2 antibody with EphA2 , or the association of EphA2 with its native ligand, as desired, by binding to the anti- EphA2 antibody or to the native ligand.

[0076] As used herein, the term "labeled", with regard to the antibody, is intended to encompass direct labeling of the antibody by coupling (*i.e.*, physically linking) a detectable substance, such as a radioactive agent or a fluorophore (*e.g.* fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE)) to the antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with a detectable substance.

[0077] As used herein, the term "association", with regard to the antibody, includes covalent and non-covalent attachment or binding to an agent (*e.g.*, chemotherapeutic agent). The antibody can be associated with an agent (*e.g.*, chemotherapeutic agent) by direct binding or indirect binding via attachment to a common platform, such that the antibody directs the localization of the agent to the cancerous cell to which the antibody binds and wherein the antibody and agent do not substantially dissociate under physiological conditions such that the agent is not targeted to the same cancerous cell to which the antibody binds or such that the agent's potency is not decreased.

[0078] A "biological sample" encompasses a variety of sample types obtained from an individual and can be used in a diagnostic or monitoring assay. The definition encompasses blood and other liquid samples of biological origin, solid tissue samples such as a biopsy specimen or tissue cultures or cells derived therefrom, and the progeny thereof, for example, cells obtained from a tissue sample collected from an individual suspected of having cancer, in preferred embodiments from ovary, lung, prostate, pancreas, colon, and breast tissue. The definition also includes samples that have been manipulated in any way after their procurement, such as by treatment with reagents, solubilization, or enrichment for certain components, such as proteins or polynucleotides, or

embedding in a semi-solid or solid matrix for sectioning purposes. The term "biological sample" encompasses a clinical sample, and also includes cells in culture, cell supernatants, cell lysates, serum, plasma, biological fluid, and tissue samples.

[0079] The terms "polypeptide", "oligopeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to polymers of amino acids of any length. The polymer may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and it may be interrupted by non-amino acids. The terms also encompass an amino acid polymer that has been modified naturally or by intervention; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, acetylation, phosphorylation, or any other manipulation or modification, such as conjugation with a labeling component. Also included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids, etc.), as well as other modifications known in the art. It is understood that, because the polypeptides of this invention are based upon an antibody, the polypeptides can occur as single chains or associated chains.

[0080] A "variable region" of an antibody refers to the variable region of the antibody light chain or the variable region of the antibody heavy chain, either alone or in combination.

[0081] A "constant region" of an antibody refers to the constant region of the antibody light chain or the constant region of the antibody heavy chain, either alone or in combination.

[0082] As used herein, "substantially pure" refers to material that is at least 50% pure (*i.e.*, free from contaminants), more preferably at least 90 % pure, more preferably at least 95% pure, more preferably at least 98% pure, more preferably at least 99% pure.

[0083] A "host cell" includes an individual cell or cell culture that can be or has been a recipient for vector(s) for incorporation of polynucleotide inserts. Host cells include progeny of a single host cell, and the progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic DNA complement) to the original parent cell due to natural, accidental, or deliberate

mutation. A host cell includes cells transfected *in vivo* with a polynucleotide(s) of this invention.

[0084] As used herein, "delaying development of metastasis" means to defer, hinder, slow, retard, stabilize, and/or postpone development of metastasis. This delay can be of varying lengths of time, depending on the history of the cancer and/or individual being treated. As is evident to one skilled in the art, a sufficient or significant delay can, in effect, encompass prevention, in that the individual does not develop the metastasis.

[0085] An "effective amount" of a drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to effect beneficial or desired results including, without limitation, clinical results such as shrinking the size of the tumor (in the cancer context, for example, breast or prostate cancer), retardation of cancerous cell growth, delaying the development of metastasis, decreasing one or more symptoms resulting from the disease, increasing the quality of life of those suffering from the disease, decreasing the dose of other medications required to treat the disease, enhancing the effect of another medication such as via targeting and/or internalization, delaying the progression of the disease, and/or prolonging survival of individuals. An effective amount can be administered in one or more administrations. For purposes of this invention, an effective amount of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to reduce the proliferation of (or destroy) neoplastic cells and/or to reduce and/or delay the development, or growth, of metastases of neoplastic cells, either directly or indirectly.

[00]As is understood in the cancer clinical context, an effective amount of a drug, compound, or pharmaceutical composition may or may not be achieved in conjunction with another drug, compound, or pharmaceutical composition. Thus, an "effective amount" may be considered in the context of administering one or more therapeutic agents, and a single agent may be considered to be given in an effective amount if, in conjunction with one or more other agents, a desirable result may be or is achieved.

[0086] As used herein, "treatment" or "treating" is an approach for obtaining beneficial or desired results including preferably clinical results. For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are

not limited to, one or more of the following: reducing the proliferation of (or destroying) neoplastic cells, reducing metastasis of neoplastic cells found in cancers, shrinking the size of the tumor, decreasing symptoms resulting from the disease, increasing the quality of life of those suffering from the disease, decreasing the dose of other medications required to treat the disease, delaying the progression of the disease, and/or prolonging survival of patients.

[0087] As used herein, "delaying development of metastasis" means to defer, hinder, slow, retard, stabilize, and/or postpone development of metastasis. This delay can be of varying lengths of time, depending on the history of the cancer and/or individual being treated. As is evident to one skilled in the art, a sufficient or significant delay can, in effect, encompass prevention, in that the individual does not develop the metastasis.

[0088] A "biological sample" encompasses a variety of sample types obtained from an individual and can be used in a diagnostic or monitoring assay. The definition encompasses blood and other liquid samples of biological origin, solid tissue samples such as a biopsy specimen or tissue cultures or cells derived therefrom, and the progeny thereof. The definition also includes samples that have been manipulated in any way after their procurement, such as by treatment with reagents, solubilization, or enrichment for certain components, such as proteins or polynucleotides, or embedding in a semi-solid or solid matrix for sectioning purposes. The term "biological sample" encompasses a clinical sample, and also includes cells in culture, cell supernatants, cell lysates, serum, plasma, biological fluid, and tissue samples.

[0089] An "individual" is a vertebrate, preferably a mammal, more preferably a human. Mammals include, but are not limited to, farm animals, sport animals, pets (such as cats, dogs, horses), primates, mice and rats.

[0090] "Toxin" or "cytotoxin" refers to any substance, which effects an adverse response within a cell. For example, a toxin directed to a cancerous cell would have an adverse, sometimes deleterious effect, on the cancerous cell.

[0091] As used herein, "agent" refers to a biological, pharmaceutical, or chemical compound. Non-limiting examples include simple or complex organic or inorganic molecule, a peptide, a protein, an oligonucleotide, an antibody, an antibody derivative, or antibody fragment. Various compounds can be

synthesized, for example, small molecules and oligomers (*e.g.*, oligopeptides and oligonucleotides), and synthetic organic compounds based on various core structures. In addition, various natural sources can provide compounds for screening, such as plant or animal extracts, and the like.

[0092] As used herein, a "therapeutic agent" means any agent useful for therapy (here, generally in the cancer context) including anti-tumor drugs, toxins or cytotoxins, cytotoxin agents, and radioactive agents.

[0093] "Active immune response" refers to the development of, and on-going production of, antibodies *in vivo* directed against an antigen, in response to the administration of the antigen, or DNA vectors coding for that antigen, to the host mammal by intravenous, intramuscular, subcutaneous, or other mode of administration with or without an adjuvant. Active immune response can also include other aspects of the immune response, such as a cellular immune response.

Compositions and Methods of Making the Compositions

[0094] This invention encompasses compositions, including pharmaceutical compositions, comprising antibodies, polypeptides and proteins that bind to EphA2, and polynucleotides comprising sequences encoding antibodies, polypeptides and proteins that bind to EphA2. As used herein, compositions comprise one or more antibodies, polypeptides and/or proteins that bind to EphA2, and/or one or more polynucleotides comprising sequences encoding one or more antibodies, polypeptides and proteins that bind to EphA2. These compositions may further comprise suitable excipients, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art.

[0095] The present invention also encompasses various formulations of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 and equivalent antibodies or polypeptide fragments (*e.g.*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), chimeric antibodies, single chain (ScFv), mutants thereof, fusion proteins comprising an antibody portion, humanized antibodies, and any other modified configuration of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 that comprises an antigen (EphA2), recognition site of the required specificity. The invention also provides human antibodies displaying

one or more of the biological characteristics of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. The equivalent antibodies of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 (including humanized antibodies and human antibodies), polypeptide fragments of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, and polypeptides comprising any of these fragments are identified and characterized by one or more characteristics of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40.

[0096] In some embodiments, the antibodies, polypeptides and proteins of the invention that bind to EphA2 are antibodies, polypeptides and proteins that competitively inhibit preferential binding of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 to EphA2 or that preferentially bind to the same epitope on EphA2 as the anti-EphA2 antibody preferentially binds.

[0097] Accordingly, the invention provides any of the following (or compositions, including pharmaceutical compositions), comprising any of the following: (a) anti-EphA2 antibody produced by the host cell with a deposit number of ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, or PTA-6059, or host cell SG3.15B4.1F9 (PTA-XXXX) or its progeny; (b) a humanized form of anti-EphA2 antibody; (c) an antibody comprising one or more of the light chain and/or heavy chain variable regions of anti-EphA2 antibody; (d) a chimeric antibody comprising variable regions homologous or derived from variable regions of a heavy chain and a light chain of anti-EphA2 antibody, and constant regions homologous or derived from constant regions of a heavy chain and a light chain of a human antibody; (e) an antibody comprising one or more of the light chain and/or heavy chain CDRs (at least one, two, three, four, five, or six) of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40; (f) an antibody comprising a heavy and/or a light chain of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40; (g) a human antibody that is equivalent to LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. A humanized form of the antibody may or may not have CDRs identical to LUCA19, SPL1, LUCA40, or SG5 or antibody produced by the host cell with a deposit number of ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, or PTA-6059 or host cell SG3.15B4.1F9 (ATCC No. PTA-XXXX).

Determination of CDR regions is well within the skill of the art. In some embodiments, the invention provides an antibody which comprises at least one CDR that is substantially homologous to at least one CDR, at least two, at least three, at least four, at least 5 CDRs of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 (or, in

some embodiments substantially homologous to all 6 CDRs of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, or derived from LUCA19, SPL1, LUCA40, or SG5), or antibody produced by the host cell with a deposit number of ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, PTA-6059, or host cell SG3.15B4.1F9 (ATCC No. PTA-XXXX). Other embodiments include antibodies that have at least two, three, four, five, or six CDR(s) that are substantially homologous to at least two, three, four, five or six CDRs of LUCA19, SPL1 LUCA40, or SG5 or derived from LUCA19, SPL1, LUCA40, or SG5, or antibody produced by the host cell with a deposit number of ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, PTA-6059 or host cell SG3.15B.1F9. It is understood that, for purposes of this invention, binding specificity and/or overall activity (which may be in terms of reducing the growth and/or proliferation of cancerous cells, inducing apoptotic cell death in the cancer cell, delaying the development of metastasis, and/or treating palliatively) is generally retained, although the extent of activity may vary compared to LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 (may be greater or lesser). The invention also provides methods of making any of these antibodies. Methods of making antibodies are known in the art and are described herein.

[0098] The invention also provides polypeptides comprising an amino acid sequence of the antibodies of the invention, such as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. In some embodiments, the polypeptide comprises one or more of the light chain and/or heavy chain variable regions of the anti-EphA2 antibody. In some embodiments, the polypeptide comprises one or more of the light chain and/or heavy chain CDRs of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. In some embodiments, the polypeptide comprises three CDRs of the light chain and/or heavy chain of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. In some embodiments, the polypeptide comprises an amino acid sequence of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 that has any of the following: at least 5 contiguous amino acids of a sequence of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, at least 8 contiguous amino acids, at least about 10 contiguous amino acids, at least about 15 contiguous amino acids, at least about 20 contiguous amino acids, at least about 25 contiguous amino acids, at least about 30 contiguous amino acids, wherein at least 3 of the amino acids are from a variable region of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. In one embodiment, the variable region is from a light chain of LUCA19, SPL1, SG5

or LUCA40. In another embodiment, the variable region is from a heavy chain of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. In another embodiment, the 5 (or more) contiguous amino acids are from a complementarity-determining region (CDR) of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40.

[0099] Antibodies may be polyclonal (e.g., not homogeneous) or monoclonal. Methods of making monoclonal antibodies are known in the art. One method which may be employed is the method of Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975) or a modification thereof. In general, a mouse or rat is used for immunization but other animals may also be used. The immunogen can be, but is not limited to, primary cells, cultured cell lines, cancerous cells, nucleic acids, tissue, or peptides. Full length EphA2 or any fragments of EphA2 (e.g., extracellular domain), or EphA2 expressing cancer cells are used as immunogen. Cells used for immunogen, for example, EphA2 expressing cancer cells may be cultured for a period of time (at least 24 hours) prior to their use as an immunogen. Cells may be used as immunogens by themselves or in combination with a non-denaturing adjuvant, such as Ribi. In general, cells should be kept intact and preferably viable when used as immunogen. Methods of generating antibodies using intact cells as immunogen are described in WO 00/37503. Intact cells may allow antigens to be better detected than ruptured cells. In addition, monoclonal antibodies generated using intact cells as immunogen are most likely against an antigenic determinant on the cell surface or against extracellular domain of a transmembrane receptor. Use of denaturing or harsh adjuvants, e.g., Freud's adjuvant, may rupture the cells and therefore is discouraged. The immunogen may be administered multiple times at periodic intervals such as, bi-weekly, or weekly, or may be administered in such a way as to maintain viability in the animal (e.g., in a tissue recombinant).

[00100] To monitor the antibody response, a small biological sample (e.g., blood) may be obtained from the animal and tested for antibody titer against the immunogen. The spleen and/or several large lymph nodes can be removed and dissociated into single cells. If desired, the spleen cells may be screened (after removal of non-specifically adherent cells) by applying a cell suspension to a plate or to a well coated with the antigen. B-cells, expressing membrane-bound immunoglobulin specific for the antigen, will bind to the plate, and are not

rinsed away with the rest of the suspension. Resulting B-cells, or all dissociated spleen cells, can then be fused with myeloma cells (e.g., X63-Ag8.653 and those from the Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, CA). Polyethylene glycol (PEG) may be used to fuse spleen or lymphocytes with myeloma cells to form a hybridoma. The hybridoma is then cultured in a selective medium (e.g., hypoxanthine, aminopterin, thymidine medium, otherwise known as "HAT medium"). The resulting hybridomas are then plated by limiting dilution, and are assayed for the production of antibodies that bind specifically to the immunogen (e.g., surface of cancer cell lines, EphA2, etc.) using FACS, immunohistochemistry (IHC screening), and Western blot. The selected monoclonal antibody-secreting hybridomas are then cultured either *in vitro* (e.g., in tissue culture bottles or hollow fiber reactors), or *in vivo* (e.g., as ascites in mice). Methods of culturing hybridoma under conditions to generate the anti-EphA2 antibody, and purifying the antibody are known in the art.

[00101] Monoclonal antibody-secreting hybridomas described above can be selected for producing antibodies that bind preferentially to the epitope on EphA2 that the anti-EphA2 antibody preferentially binds. Methods of selecting such antibody are known in the art. For example, binding competition assays can be used to determine whether an antibody binds to the same epitope as does LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. An antibody's competition with LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 for binding to EphA2 indicates that the antibody binds preferentially to the epitope that LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 binds. Binding competition assays are well known in the art. Binding competition assays, which can be configured in a number of different formats, using either labeled antigen or labeled antibody. Usually, the antigen is immobilized on a 96-well plate, and the ability of unlabeled antibodies to block the binding of labeled antibodies is measured using radioactive or enzyme labels. Polypeptides that bind preferentially to the epitope on EphA2 that the anti-EphA2 antibody binds preferentially can also be tested and identified using similar methods.

[00102] As another alternative to the cell fusion technique, EBV immortalized B cells may be used to produce monoclonal antibodies of the subject invention. The hybridomas are expanded and subcloned, if desired, and supernatants are assayed for anti-immunogen activity by conventional assay

procedures (e.g., FACS, IHC, radioimmunoassay, enzyme immunoassay, fluorescence immunoassay, etc.).

[00103] In another alternative, the antibodies can be made recombinantly. Methods for making recombinant antibodies are well known in the art. Monoclonal antibody LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 and any other equivalent antibodies can be sequenced and produced recombinantly *in vitro*. In one embodiment, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 is sequenced and the polynucleotide sequence is then cloned into a vector for expression or propagation. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in a vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use. In another alternative, antibodies may be made recombinantly by phage display technology. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; and Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12:433-455.

[00104] In another alternative, the anti-EphA2 antibody or any other antibodies or protein of interest may be subjected to sequencing by Edman degradation, which is well known to those of skill in the art. The peptide information generated from mass spectrometry or Edman degradation can be used to design probes or primers that are used to clone the protein of interest.

[00105] An alternative method of cloning the protein of interest is by "panning" using EphA2 for cells expressing the antibody or protein of interest. The "panning" procedure is conducted by obtaining a cDNA library from tissues or cells that express the antibody or protein of interest, over-expressing the cDNAs in a second cell type, and screening the transfected cells of the second cell type for a specific binding to EphA2. Detailed descriptions of the methods used in cloning mammalian genes coding for cell surface proteins by "panning" can be found in the art. See, for example, Aruffo, A. and Seed, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8573-8577 (1987) and Stephan, J. et al., *Endocrinology* 140: 5841-5854 (1999).

[00106] cDNAs can be obtained by reverse transcribing the mRNAs from a particular cell type according to standard methods in the art. Specifically, mRNA can be isolated using various lytic enzymes or chemical solutions according to the procedures set forth in Sambrook, et al. *supra* or extracted by

commercially available nucleic-acid-binding resins following the accompanying instructions provided by manufacturers (*e.g.*, Qiagen, Invitrogen, Promega). The synthesized cDNAs are then introduced into an expression vector to produce the antibody or protein of interest in cells of a second type. It is implied that an expression vector must be replicable in the host cells either as episomes or as an integral part of the chromosomal DNA. Suitable expression vectors include but are not limited to plasmids, viral vectors, including adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, and cosmids.

[00107] The vectors containing the polynucleotides of interest can be introduced into the host cell by any of a number of appropriate means, including electroporation, transfection employing calcium chloride, rubidium chloride, calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances; microprojectile bombardment; lipofection; and infection (*e.g.*, where the vector is an infectious agent such as vaccinia virus). The choice of introducing vectors or polynucleotides will often depend on features of the host cell.

[00108] Any host cells capable of over-expressing heterologous DNAs can be used for the purpose of isolating the genes encoding the antibody, polypeptide or protein of interest. Non-limiting examples of mammalian host cells include but not limited to COS, HeLa, and CHO cells. Preferably, the host cells express the cDNAs at a level of about 5 fold higher, more preferably 10 fold higher, even more preferably 20 fold higher than that of the corresponding endogenous antibody or protein of interest, if present, in the host cells. Screening the host cells for a specific binding to EphA2 is effected by an immunoassay or FACS. A cell over-expressing the antibody or protein of interest can be identified.

[00109] The invention includes polypeptides comprising an amino acid sequence of the antibodies of this invention, such as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. The polypeptides of this invention can be made by procedures known in the art. The polypeptides can be produced by proteolytic or other degradation of the antibodies, by recombinant methods (*i.e.*, single or fusion polypeptides) as described above or by chemical synthesis. Polypeptides of the antibodies, especially shorter polypeptides up to about 50 amino acids, are conveniently made by chemical synthesis. Methods of chemical synthesis are known in the art

and are commercially available. For example, a LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 polypeptide could be produced by an automated polypeptide synthesizer employing the solid phase method.

[00110] The invention also encompasses single chain variable region fragments ("scFv") of antibodies of this invention, such as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. Single chain variable region fragments are made by linking light and/or heavy chain variable regions by using a short linking peptide. Bird et al. (1988) Science 242: 423-426. For example a linking peptide can bridge approximately 3.5 nm between the carboxy terminus of one variable region and the amino terminus of the other variable region. Linkers can in turn be modified for additional functions, such as attachment of drugs or attachment to solid supports. The single chain variants can be produced either recombinantly or synthetically. For synthetic production of scFv, an automated synthesizer can be used. For recombinant production of scFv, a suitable plasmid containing polynucleotide that encodes the scFv can be introduced into a suitable host cell, either eukaryotic, such as yeast, plant, insect or mammalian cells, or prokaryotic, such as E. coli. Polynucleotides encoding the scFv of interest can be made by routine manipulations such as ligation of polynucleotides. The resultant scFv can be isolated using standard protein purification techniques known in the art.

[00111] The invention includes modifications to antibodies, such as anti-EphA2 antibody, including functionally equivalent antibodies and polypeptides of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 that do not significantly affect their properties and variants which have enhanced or decreased activity. Modification of polypeptides is routine practice in the art and need not be described in detail herein. Examples of modified polypeptides include polypeptides with conservative substitutions of amino acid residues, one or more deletions or additions of amino acids which do not significantly deleteriously change the functional activity, or use of chemical analogs. Amino acid residues which can be conservatively substituted for one another include but are not limited to: glycine/alanine; valine/isoleucine/leucine; asparagine/glutamine; aspartic acid/glutamic acid; serine/threonine; lysine/arginine; and phenylalanine/tyrosine. These polypeptides also include glycosylated and nonglycosylated polypeptides, as well as polypeptides with other post-

translational modifications, such as, for example, glycosylation with different sugars, acetylation, and phosphorylation. Preferably, the amino acid substitutions would be conservative, i.e., the substituted amino acid would possess similar chemical properties as that of the original amino acid. Such conservative substitutions are known in the art, and examples have been provided above. Amino acid modifications can range from changing or modifying one or more amino acids to complete redesign of a region, such as the variable region. Changes in the variable region can alter binding affinity and/or specificity. Other methods of modification include using coupling techniques known in the art, including, but not limited to, enzymatic means, oxidative substitution and chelation. Modifications can be used, for example, for attachment of labels for immunoassay, such as the attachment of radioactive moieties for radioimmunoassay. Modified LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 polypeptides are made using established procedures in the art and can be screened using standard assays known in the art, some of which are described below and in the Examples.

[00112] The invention also encompasses fusion proteins comprising one or more fragments or regions from the antibodies of this invention, such as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. In one embodiment, a fusion polypeptide is provided that comprises at least 10 contiguous amino acids of variable light chain region and at least 10 amino acids of variable heavy chain region. In another embodiment, the fusion polypeptide contains a heterologous immunoglobulin constant region. In another embodiment, the fusion polypeptide contains a light chain variable region and a heavy chain variable region of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. For purposes of this invention, a LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 fusion protein contains one or more LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 polypeptides and another amino acid sequence to which it is not attached in the native molecule, for example, a heterologous sequence or a homologous sequence from another region. A LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 polypeptide can be created by methods known in the art, for example, synthetically or recombinantly.

[00113] In another embodiment, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 chimeras are provided in which the heavy and/or light chains are fusion proteins. In

some embodiments, the constant domain of the chains is from one particular species and/or class, and the variable domains are from a different species and/or class. For instance, a chimeric antibody (in some embodiments) is one in which the constant regions are derived from human origin, and the variable regions are homologous or derived from LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 (i.e., murine). Also embodied within the invention is an antibody with a humanized variable region, in which (in some embodiments) the CDR regions comprise LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 amino acid sequences, while the framework regions are derived from human sequences. Other forms of humanized antibodies are known in the art and described herein. Also embodied are functional fragments of chimeras. An example is a humanized Fab fragment, which contains a human hinge region, a human first constant region, a human kappa light or heavy chain constant region, and the variable region of light and/or heavy chain from LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. The humanized LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 Fab fragments can in turn be made to form Fab dimers. Typically, the LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 fusion proteins and LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 chimeras of this invention are made by preparing an expressing a polynucleotide encoding them using recombinant methods described herein, although they may also be prepared by other means known in the art, including, for example, chemical synthesis. See, for example, U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 6,331,415.

[00114] The invention also encompasses humanized antibodies. The polynucleotide sequence of an antibody, such as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or other equivalent antibodies may be used for genetic manipulation to generate a "humanized" antibody, or to improve the affinity, or other characteristics of the antibody. The general principle in humanizing an antibody involves retaining the basic sequence of the antigen-binding portion of the antibody, while swapping the non-human remainder of the antibody with human antibody sequences. There are four general steps to humanize a monoclonal antibody. These are: (1) determining the nucleotide and predicted amino acid sequence of the starting antibody light and heavy variable domains (2) designing the humanized antibody, i.e., deciding which antibody framework region to use during the humanizing process (3) the actual humanizing

methodologies/ techniques and (4) the transfection and expression of the humanized antibody. For example, the constant region may be engineered to more resemble human constant regions to avoid immune response if the antibody is used in clinical trials and treatments in humans. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,997,867 and 5,866,692.

[00115] A number of "humanized" antibody molecules comprising an antigen-binding site derived from a non-human immunoglobulin have been described, including chimeric antibodies having rodent V regions and their associated complementarity determining regions (CDRs) fused to human constant domains. See, for example, Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991); Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989); Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1987); and Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). Other references describe rodent CDRs grafted into a human supporting framework region (FR) prior to fusion with an appropriate human antibody constant domain. See, for example, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al. *Science* 239:1534-1536 (1988); and Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986). Another reference describes rodent CDRs supported by recombinantly veneered rodent framework regions. See, for example, European Patent Publication No. 519,596. These "humanized" molecules are designed to minimize unwanted immunological response toward rodent antihuman antibody molecules that limits the duration and effectiveness of therapeutic applications of those moieties in human recipients. Other methods of humanizing antibodies that may also be utilized are disclosed by Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.*, 19:2471-2476 (1991) and in U.S. Patent Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; 6,350,861; and PCT WO 01/27160.

[00116] In yet another alternative, fully human antibodies may be obtained by using commercially available mice that have been engineered to express specific human immunoglobulin proteins. Transgenic animals that are designed to produce a more desirable (e.g., fully human antibodies) or more robust immune response may also be used for generation of humanized or human antibodies. Examples of such technology are Xenomouse™ from Abgenix, Inc. (Fremont, CA) and HuMAb-Mouse® and TC Mouse™ from Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

[00117] This invention also provides compositions comprising LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 equivalent antibodies or polypeptides conjugated (for example, linked) to a therapeutic agent, such as a radioactive molecule, a toxin (e.g., calicheamicin), or a chemotherapeutic molecule, or to liposomes or other vesicles containing chemotherapeutic compounds. The compositions, when administered to an individual, can target these agents to a cancer cell expressing EphA2 recognized by the antibody or polypeptide(s) and thus can, for example, eliminate cancerous cells and/or suppress proliferation and/or growth of cancerous cells. For simplicity, reference will be made generally to LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or antibodies with the understanding that these methods apply to any of the EphA2 binding embodiments described herein. With these methods, conjugation generally refers to linking these components as described herein. The linking (which is generally fixing these components in proximate association at least for administration) can be achieved in any number of ways, as described below.

[00118] A radioactive molecule of this invention includes any radioisotope that is effective in destroying a cancerous cell. Examples include, but not limited to, cobalt-60 and X-rays. Additionally, naturally occurring radioactive elements such as uranium, radium, and thorium that typically represent mixtures of radioisotopes, are suitable examples of a radioactive molecule.

[00119] A toxin of the invention include, but not limited to, taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, Colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. The antibodies of the invention can be internalized within the carcinoma cells to which they bind and are therefore particularly useful for therapeutic applications, for example, delivering into the cells toxins that need to be internalized for their adverse activity. Examples of such toxins include, but not limited to, saporin, calicheamicin, auristatin, and maytansinoid.

[00120] The antibodies or polypeptides of the invention can be conjugated (linked) to a radioactive molecule, a toxin, or other therapeutic agents, or to

liposomes or other vesicles containing therapeutic agents covalently or non-covalently, directly or indirectly. The antibody may be linked to the radioactive molecule, the toxin, or the therapeutic molecule at any location along the antibody so long as the antibody is able to bind its target EphA2.

[00121] A toxin or a therapeutic agent may be coupled (e.g., covalently bonded) to a suitable monoclonal antibody either directly or indirectly (e.g., via a linker group, or, alternatively, via a linking molecule with appropriate attachment sites, such as a platform molecule as described in U.S. patent 5,552,391). The toxin and therapeutic agent of the present invention can be coupled directly to the particular targeting proteins using methods known in the art. For example, a direct reaction between an agent and an antibody is possible when each possesses a substituent capable of reacting with the other. For example, a nucleophilic group, such as an amino or sulfhydryl group, on one may be capable of reacting with a carbonyl-containing group, such as an anhydride or an acid halide, or with an alkyl group containing a good leaving group (e.g., a halide) on the other.

[00122] The antibodies or polypeptides can also be linked to a therapeutic agent via a microcarrier. Microcarrier refers to a biodegradable or a non-biodegradable particle which is insoluble in water and which has a size of less than about 150, 120 or 100 μm in size, more commonly less than about 50-60 μm , preferably less than about 10, 5, 2.5, 2 or 1.5 μm . Microcarriers include "nanocarriers", which are microcarriers have a size of less than about 1 μm , preferably less than about 500 nm. Such particles are known in the art. Solid phase microcarriers may be particles formed from biocompatible naturally occurring polymers, synthetic polymers or synthetic copolymers, which may include or exclude microcarriers formed from agarose or cross-linked agarose, as well as other biodegradable materials known in the art. Biodegradable solid phase microcarriers may be formed from polymers which are degradable (e.g., poly(lactic acid), poly(glycolic acid) and copolymers thereof) or erodible (e.g., poly(ortho esters such as 3,9-diethylidene-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane (DETOSU) or poly(anhydrides), such as poly(anhydrides) of sebacic acid) under mammalian physiological conditions. Microcarriers may also be liquid phase

(e.g., oil or lipid based), such liposomes, iscoms (immune-stimulating complexes, which are stable complexes of cholesterol, and phospholipid, adjuvant-active saponin) without antigen, or droplets or micelles found in oil-in-water or water-in-oil emulsions, provided the liquid phase microcarriers are biodegradable. Biodegradable liquid phase microcarriers typically incorporate a biodegradable oil, a number of which are known in the art, including squalene and vegetable oils. Microcarriers are typically spherical in shape, but microcarriers that deviate from spherical shape are also acceptable (e.g., ellipsoid, rod-shaped, etc.). Due to their insoluble nature (with respect to water), microcarriers are filterable from water and water-based (aqueous) solutions.

[00123] The antibody or polypeptide conjugates of the present invention may include a bifunctional linker that contains both a group capable of coupling to a toxic agent or therapeutic agent and a group capable of coupling to the antibody. A linker can function as a spacer to distance an antibody from an agent in order to avoid interference with binding capabilities. A linker can be cleavable or non-cleavable. A linker can also serve to increase the chemical reactivity of a substituent on an agent or an antibody, and thus increase the coupling efficiency. An increase in chemical reactivity may also facilitate the use of agents, or functional groups on agents, which otherwise would not be possible. The bifunctional linker can be coupled to the antibody by means that are known in the art. For example, a linker containing an active ester moiety, such as an N-hydroxysuccinimide ester, can be used for coupling to lysine residues in the antibody via an amide linkage. In another example, a linker containing a nucleophilic amine or hydrazine residue can be coupled to aldehyde groups produced by glycolytic oxidation of antibody carbohydrate residues. In addition to these direct methods of coupling, the linker can be indirectly coupled to the antibody by means of an intermediate carrier such as an aminodextran. In these embodiments the modified linkage is via either lysine, carbohydrate, or an intermediate carrier. In one embodiment, the linker is coupled site-selectively to free thiol residues in the protein. Moieties that are suitable for selective coupling to thiol groups on proteins are well known in the art. Examples include disulfide compounds, α -halocarbonyl and α -halocarboxyl compounds, and maleimides. When a nucleophilic amine function is present in the same molecule as an α -halo

carbonyl or carboxyl group the potential exists for cyclization to occur via intramolecular alkylation of the amine. Methods to prevent this problem are well known to one of ordinary skill in the art, for example by preparation of molecules in which the amine and α -halo functions are separated by inflexible groups, such as aryl groups or trans-alkenes, that make the undesired cyclization stereochemically disfavored. See, for example, U.S. Patent No. 6,441,163 for preparation of conjugates of maytansinoids and antibody via a disulfide moiety.

[00124] One of the cleavable linkers that can be used for the preparation of antibody-drug conjugates is an acid-labile linker based on cis-aconitic acid that takes advantage of the acidic environment of different intracellular compartments such as the endosomes encountered during receptor mediated endocytosis and the lysosomes. See, for example, Shen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1048-1054 (1981) for the preparation of conjugates of daunorubicin with macromolecular carriers; Yang et al., *J. Natl. Canc. Inst.* 80:1154-1159 (1988) for the preparation of conjugates of daunorubicin to an anti-melanoma antibody; Dillman et al., *Cancer Res.* 48:6097-6102 (1988) for using an acid-labile linker in a similar fashion to prepare conjugates of daunorubicin with an anti-T cell antibody; Trouet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:626-629 (1982) for linking daunorubicin to an antibody via a peptide spacer arm.

[00125] An antibody (or polypeptide) of this invention may be conjugated (linked) to a radioactive molecule by any method known to the art. For a discussion of methods for radiolabeling antibody see "Cancer Therapy with Monoclonal AntibodiesT", D. M. Goldenberg ed. (CRC Press, Boca Raton, 1995).

[00126] An antibody (or polypeptide) of this invention may be linked to a labeling agent (alternatively termed "label") such as a fluorescent molecule, a radioactive molecule or any others labels known in the art. Labels are known in the art that generally provide (either directly or indirectly) a signal.

[00127] The ability of the antibodies, polypeptides and proteins of this invention, such as ability to inhibit growth of cancerous cells expressing EphA2, ability to delay development of metastasis in an individual with cancer expressing EphA2, ability to deliver a therapeutic agent, such as a toxin, or a radioactive compound, to cancerous cells expressing EphA2, including ability to

deliver a therapeutic agent into cancerous cells expressing EphA2, may be tested using methods known in the art, some of which are described in the Examples.

[00128] The invention also provides compositions (including pharmaceutical compositions) comprising anti-EphA2 antibody or LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 equivalent antibodies (which, as this disclosure makes clear, include all of the antibodies described herein) or polypeptides and a therapeutic agent.

Methods for screening monoclonal antibodies

[00129] Several methods may be used to further screen monoclonal antibodies that bind to EphA2 on cancerous cells. One method that may be employed is immunohistochemistry (IHC). Standard immunohistochemical techniques are known to those of average skill in the art. See, for example, *Animal Cell Culture Methods* (J.P. Mather and D. Barnes, eds., Academic Press, Vol. 57, Ch. 18 and 19, pp. 314-350, 1998). Biological samples (e.g., tissues) may be obtained from biopsies, autopsies, or necropsies. To ascertain if EphA2 is present only on cancerous cells, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 may be used to detect the presence of EphA2 on tissues from individuals with cancer while other non-cancerous tissues from the individual suffering from cancer or tissues from individuals without cancer are used as a control. The tissue can be embedded in a solid or semi-solid substance that prevents damage during freezing (e.g., agarose gel or OCT) and then sectioned for staining. Cancers from different organs and at different grades can be used to screen monoclonal antibodies. Examples of tissues that may be used for screening purposes include but are not limited to ovary, breast, lung, prostate, colon, kidney, skin, thyroid, brain, heart, liver, stomach, nerve, blood vessels, bone, upper digestive tract, and pancreas. Examples of different cancer types that may be used for screening purposes include but are not limited to carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, adenosarcomas, lymphomas, and leukemias.

[00130] In yet another alternative, cancerous cells lines such as SK-Ov-3 (ATCC #HTB 77), LnCap (ATCC #CRL-1740), COLO 205 (ATCC #CCL 222), A549 (ATCC #CCL 185), PANC-1 (ATCC #CRL 1469), SK-BR-3 (ATCC #HTB 30), SK-MES-1 (ATCC #HTB 58), HT-29 (HTB-38), SW 480 (ATCC #CCL 228), AsPC-1

(ATCC #CRL 1682), Capan-1 (ATCC #HTB 79), CFPAC-1 (ATCC #CRL 1918), HPAF-II (ATCC #CRL-1997), HS-700T (ATCC #HTB 147), Du-145 (ATCC #HTB-81), CaLu-1 (ATCC #HTB-54), 786-O (ATCC #CRL-1932), CaKi-2 (ATCC #HTB-47), A498 (ATCC #HTB-44), BT474 (ATCC #HTB-20), and PC-3 (ATCC #CRL 1435) and normal cells from their respective tissues may be used to screen for monoclonal antibodies which are specific for cancerous tissue. Primary, or low passage, cell cultures derived from normal tissues from different organs, including but not limited to, ovary, breast, lung, prostate, colon, kidney, skin, thyroid, aortic smooth muscle, and endothelial cells can be used as negative controls. The cancerous or non-cancerous cells can be grown on glass slides or coverslips, or on plastic surfaces, or prepared in a CellArray™, as described in WO 01/43869, and screened for the binding of antibody using IHC as described above for tissues. Alternatively, cells may be removed from the growth surface using non-proteolytic means and spun into a pellet which is then embedded and treated as tissues for IHC analysis as described above. In another alternative, single cells may be screened by incubating with the primary antibody, a secondary "reporter" antibody linked to a fluorescent molecule and then analyzed using a fluorescent activated cell-sorting (FACS) machine.

[00131] Several different detection systems may be utilized to detect binding of antibodies to tissue section. Typically, immunohistochemistry involves the binding of a primary antibody to the tissue and then a secondary antibody reactive against the species from the primary antibody was generated and conjugated to a detectable marker (*e.g.*, horseradish peroxidase, HRP, or diaminobenzidine, DAB). One alternative method that may be used is polyclonal mirror image complementary antibodies or polyMICA. PolyMICA (polyclonal Mirror Image Complementary Antibodies) technique, described by D.C. Mangham and P.G. Isaacson (*Histopathology* (1999) 35(2):129-33), can be used to test binding of primary antibodies (*e.g.*, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40) to normal and cancerous tissue. Several kinds of polyMICA™ Detection kits are commercially available from The Binding Site Limited (P.O. Box 4073 Birmingham B29 6AT England). Product No. HK004.D is a polyMICA™ Detection kit which uses DAB chromagen. Product No. HK004.A is a

polyMICA™ Detection kit which uses AEC chromagen. Alternatively, the primary antibody may be directly labeled with the detectable marker.

[00132] The first step in IHC screening to select for an appropriate antibody is the binding of primary antibodies raised in mice (*e.g.*, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40) to one or more immunogens (*e.g.*, cells or tissue samples). In one embodiment, the tissue sample is sections of frozen tissue from different organs. The cells or tissue samples can be either cancerous or non-cancerous.

[00133] Frozen tissues can be prepared, sectioned, with or without fixation, and IHC performed by any of a number of methods known to one familiar with the art. See, for example, Stephan et al. *Dev. Biol.* 212: 264-277 (1999), and Stephan et al. *Endocrinology* 140: 5841-54 (1999).

[00134] Monoclonal antibodies that are cross-reactive with human cells and that bind to cancerous cells or tissues, but not to normal cells or tissues to the same degree, are selected. Monoclonal antibodies that bind to antigens expressed on one or more cancer types but not to normal cells are also selected. LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 is an example of an antibody that binds to the antigen EphA2 present on a number of different cancers, but has limited binding to normal tissues. Epitope mapping may be used to further characterize the antibody. Commercially available services (*e.g.*, Pepscan Systems, P.O. Box 2098, 8203 AB Lelystad, The Netherlands) may be used to determine the epitope(s) on the antigen EphA2 to which an antibody, such as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, binds.

Methods of diagnosing cancer using LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, equivalent antibodies or polypeptides that bind to EphA2

[00135] Monoclonal anti-EphA2 antibody and equivalent antibodies or polypeptides derivatives of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 which bind EphA2 made by the methods disclosed herein may be used to identify or detect the presence or absence of cancerous cells in a variety of tissues, including but not limited to, ovary, breast, lung, prostate, colon, kidney, skin, thyroid, brain, heart, liver, stomach, nerve, blood vessels, bone, upper digestive tract, and pancreas for purposes of diagnosis. For simplicity, reference will be made generally to LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or antibodies with the understanding that these

methods apply to any of the EphA2 binding embodiments described herein. Detection generally involves contacting cells with an antibody or a polypeptide described herein that binds to EphA2 and the formation of a complex between EphA2 and an antibody (e.g., LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, a humanized antibody of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, a human antibody or any other EphA2 binding moiety) that binds specifically to EphA2. The formation of such a complex can be *in vitro* or *in vivo*. Without being bound by theory, monoclonal anti-EphA2 antibody can bind to EphA2 through the extracellular domain of EphA2. As used herein, detection may include qualitative and/or quantitative detection and may include comparing the level measured to a normal cell for an increased level of expression of EphA2 in cancerous cells.

[00136] One method of using the antibodies for diagnosis is *in vivo* tumor imaging by linking the antibody to a labeling moiety (e.g., a fluorescent agent, a radioactive or radioopaque agent), administering the antibody to the patient and using an x-ray or other imaging machine to visualize the localization of the labeled antibody at the surface of cancer cells expressing the antigen. Labeling moieties are known in the art.

[00137] In other methods, the cancerous cells are removed and the tissue prepared for immunohistochemistry by methods well known in the art (e.g., embedding in a freezing compound, freezing and sectioning, with or without fixation; fixation and paraffin embedding with or without various methods of antigen retrieval and counterstaining). The monoclonal antibodies may also be used to identify neoplasms at different stages of development. The antibodies may also be used to determine which patients' tumors express the antigen on their surface at a pre-determined level and are thus candidates for immunotherapy using antibodies directed against said antigen.

[00138] Antibodies (or polypeptides) recognizing the antigen may also be used to create diagnostic immunoassays for detecting antigen released or secreted from living or dying cancer cells in bodily fluids, including but not limited to, blood, saliva, urine, pulmonary fluid, or ascites fluid. As discussed in further detail in the Examples, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 can bind to various forms cancer in different stages from tissues including but not limited to melanomas, breast, lung, prostate, and colon. Methods of using LUCA19, SPL1,

SG5 or LUCA40 for diagnostic purposes is useful both before and after any form of anti-cancer treatment, *e.g.*, chemotherapy or radiation therapy, to determine which tumors are most likely to respond to a given treatment, patient prognosis, tumor subtype or origin of metastatic disease, and progression of the disease or response to treatment.

Methods of using LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40, or equivalent antibodies or polypeptides for therapeutic purposes

[00139] Monoclonal anti-EphA2 antibody and equivalent antibodies (as well as other polypeptides embodiments of the invention) made by the methods disclosed herein may be used for therapeutic purposes in individuals with cancer, including but not limited to melanomas, breast, lung, colon, or prostate cancer. These therapeutic methods also apply to the linked embodiments described above. For simplicity, reference will be made generally to LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or antibodies with the understanding that these methods apply to any of the EphA2 binding embodiments described herein, including but not limited to humanized antibodies and human antibodies described herein including linked embodiments. Therapy with LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 can involve formation of complexes of such antibody and EphA2 both *in vitro* and/or *in vivo* as described above. In one embodiment, monoclonal anti-EphA2 antibody can bind to and reduce the growth and/or proliferation of cancerous cells. In another embodiment, monoclonal anti-EphA2 antibody can bind to and induce apoptotic cell death in the cancer cell. In another embodiment, monoclonal anti-EphA2 antibody can bind to cancerous cells and delay the development of metastasis. In another embodiment, monoclonal anti-EphA2 antibody can bind to cancerous cells and deliver a therapeutic agent (such as a toxin, or a radioactive compound) linked to LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 to cancerous cells. For some embodiments, therapeutic agent (such as a toxin) is introduced into a cell (*i.e.*, is internalized). Particularly suitable agents for these methods include agents that are active inside the cell. Examples of such agents include but not limited to saporin, calicheamicin, auristatin, and maytansinoid. Generally, in these embodiments an effective amount (an amount sufficient to deliver a therapeutic agent to and/or into target cancerous cells) is administered

to an individual. In yet another embodiment, an individual with cancer is given palliative treatment with LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. Palliative treatment of a cancer patient involves treating or lessening the adverse symptoms of the disease, or iatrogenic symptoms resulting from other treatments given for the disease without directly affecting the cancer progression. This includes treatments for easing of pain, nutritional support, sexual problems, psychological distress, depression, fatigue, psychiatric disorders, nausea, vomiting, etc.

[00140] This invention also provides methods of inhibiting growth and/or proliferation of cancer cells using LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 antibody or an antibody which preferentially binds to the same epitope as the epitope to which any of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 preferentially binds.

[00141] In yet another embodiment, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or any of the EphA2 embodiments described herein can bind to EphA2 expressing cancerous cells and induces an active immune response against the cancerous cells expressing EphA2. In some cases, the active immune response can cause the death of the cancerous cells (*e.g.*, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 binding to cancer cells inducing apoptotic or oncotic cell death), or inhibit the growth (*e.g.*, block cells cycle progression) of the cancerous cells. In other cases, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or any of the EphA2 antibodies described herein can bind to cancerous cells and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) can eliminate cancerous cells to which LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 binds.

Accordingly, the invention provides methods of stimulating an immune response comprising administering any of the compositions described herein.

[00142] The anti-EphA2 antibody may be administered with agents that enhance or direct an individual's own immune response, such as an agent that strengthens ADCC. In one embodiment, at least one fucose residue present in an anti-EphA2 antibody is removed from the oligosaccharides of that antibody, a modification to enhance ADCC. In similar embodiments, fucose residues present in an anti-EphA2 antibody are modified to alter their composition to the extent required to enhance ADCC compared to the original, unmodified antibody.

[00143] In some cases, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 binding can also activate both cellular and humoral immune responses and recruit more natural

killer cells or increased production of cytokines (*e.g.*, IL-2, IFN-g, IL-12, TNF-a, TNF-b, etc.) that further activate an individual's immune system to destroy cancerous cells. In yet another embodiment, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 can bind to cancerous cells, and macrophages or other phagocytic cell can opsonize the cancerous cells.

[00144] In some embodiments, the invention provides methods of conferring passive immunity comprising administering any of the compositions described herein.

[00145] The invention provides methods of delivering any of the compositions (including conjugates) described herein to an EphA2 expressing cell, such as an EphA2 expression cancer cells. These methods entail administering the compositions (including conjugates) described herein to an individual. In some embodiments, the methods provide for introducing, for example, a conjugate into a target cell. In yet another embodiment, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 can be conjugated to a therapeutic agent (such as a radioactive molecule, a toxin, *e.g.*, saporin, calicheamicin, auristatin, or maytansinoid, or other chemotherapeutic molecule) or to liposomes or other vesicles containing chemotherapeutic compounds and administered to an individual to target these compounds to the cancer cell containing the antigen recognized by the antibody and thus eliminate cancerous cells. In yet another embodiment, the antibody can be employed as adjuvant therapy at the time of the surgical removal of a cancer expressing the antigen in order to delay the development of metastasis. The antibody can also be administered before surgery (neoadjuvant therapy) in a patient with a tumor expressing the antigen in order to decrease the size of the tumor and thus enable or simplify surgery, spare tissue during surgery, and/or decrease the resulting disfigurement.

[00146] Various formulations of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 and equivalent antibodies or fragments (*e.g.*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), such as chimeric antibodies, single chain (ScFv), mutants thereof, fusion proteins comprising an antibody portion, humanized antibodies, and any other modified configuration of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 that comprises an antigen EphA2 recognition site of the required specificity, may be used for administration. In some embodiments, LUCA19, SPL1, SG5

or LUCA40 antibodies or various formulations of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 thereof may be administered neat. In other embodiments, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or various formulations of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 (including any composition embodiment described herein) thereof and a pharmaceutically acceptable excipient are administered, and may be in various formulations. Pharmaceutically acceptable excipients are known in the art, and are relatively inert substances that facilitate administration of a pharmacologically effective substance. For example, an excipient can give form or consistency, or act as a diluent. Suitable excipients include but are not limited to stabilizing agents, wetting and emulsifying agents, salts for varying osmolarity, encapsulating agents, buffers, and skin penetration enhancers. Excipients as well as formulations for parenteral and nonparenteral drug delivery are set forth in *Remington, The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. Mack Publishing (2000).

[00147] Generally, these agents are formulated for administration by injection (e.g., intraperitoneally, intravenously, subcutaneously, intramuscularly, etc.), although other forms of administration (e.g., oral, mucosal, etc) can be also used. Accordingly, LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 antibody and equivalents thereof are preferably combined with pharmaceutically acceptable vehicles such as saline, Ringer's solution, dextrose solution, and the like. The particular dosage regimen, i.e., dose, timing and repetition, will depend on the particular individual and that individual's medical history. Generally, any of the following doses may be used: a dose of at least about 50 mg/kg body weight; at least about 10 mg/kg body weight; at least about 3 mg/kg body weight; at least about 1 mg/kg body weight; at least about 750 µg/kg body weight; at least about 500 µg/kg body weight; at least about 250 µg/kg body weight; at least about 100 µg/kg body weight; at least about 50 µg/kg body weight; at least about 10 µg/kg body weight; at least about 1 µg/kg body weight, or more, is administered. Empirical considerations, such as the half-life, generally will contribute to determination of the dosage. Antibodies that are compatible with the human immune system, such as humanized antibodies or fully human antibodies, may be used to prolong half-life of the antibody and to prevent the antibody being attacked by the host's immune system.

[00148] In some individuals, more than one dose may be required. Frequency of administration may be determined and adjusted over the course of therapy, and is based on reducing the number of cancerous cells, maintaining the reduction of cancerous cells,

reducing the growth and/or proliferation of cancerous cells, or delaying the development of metastasis. The presence of cancerous cells can be identified by any number of methods known to one of skill in the art or discussed herein (*e.g.*, detection by immunohistochemistry or flow cytometry of biopsies or biological samples). In some cases, sustained continuous release formulations of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 antibodies may be appropriate. Various formulations and devices for achieving sustained release are known in the art.

[00149] In one embodiment, dosages for LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 antibodies may be determined empirically in individuals who have been given one or more administration(s). Individuals are given incremental dosages of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40. To assess efficacy of LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 or other equivalent antibody, markers of the specific cancer disease state can be monitored. These markers include: direct measurements of tumor size via palpation or visual observation; indirect measurement of tumor size by x-ray or other imaging techniques; an improvement as assessed by direct tumor biopsy and microscopic examination of the tumor sample; the measurement of an indirect tumor marker (*e.g.*, PSA for prostate cancer), a decrease in pain or paralysis; improved speech, vision, breathing or other disability associated with the tumor; increased appetite; or an increase in quality of life as measured by accepted tests or prolongation of survival. It will be apparent to one of skill in the art that the dosage will vary depending on the individual, the type of cancer, the stage of cancer, whether the cancer has begun to metastasize to other location in the individual, and the past and concurrent treatments being used.

[00150] Other formulations include suitable delivery forms known in the art including, but not limited to, carriers such as liposomes. See, for example, Mahato et al. (1997) *Pharm. Res.* 14:853-859. Liposomal preparations include, but are not limited to, cytofectins, multilamellar vesicles and unilamellar vesicles.

[00151] In some embodiments, more than one antibody may be present. The antibodies can be monoclonal or polyclonal. Such compositions may contain at least one, at least two, at least three, at least four, at least five different antibodies that are reactive against carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, or adenosarcomas. LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 antibody can be admixed with one or more antibodies reactive against carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, or adenosarcomas in organs including but not

limited to ovary, breast, lung, prostate, colon, kidney, skin, thyroid, bone, upper digestive tract, and pancreas. A mixture of antibodies, as they are often denoted in the art, may be particularly useful in treating a broader range of population of individuals.

[00152] Assessment of disease is performed using standard methods in the arts, such as imaging methods and monitoring appropriate marker(s).

Kits comprising antibodies and polypeptides of the invention that bind to EphA2

[00153] The invention also provides kits comprising antibodies or any of the compositions described herein that bind to EphA2 for use in diagnosis and/or therapy. Accordingly, the kits comprise an antibody that can bind to EphA2 preferentially and/or form a complex with EphA2 (useful, for example, for detecting breast, colon, lung, or prostate cancerous cells). In some embodiments, the kits comprise anti-EphA2 antibody or an antibody that preferentially binds to the same epitope as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 preferentially binds. In some embodiments, the kits comprise anti-EphA2 antibody or an antibody that preferentially binds to the same epitope as LUCA19, SPL1, SG5 or LUCA40 preferentially binds linked to a therapeutic agent or a labeling agent. These kits may further include instruction and/or reagents for linking the antibody or any antibody or polypeptide embodiments described herein to the therapeutic agent(s) or the labeling agent(s). In some aspects, the binding of an antibody (e.g., monoclonal, polyclonal, human, humanized, etc.) to EphA2 is used for diagnosing cancer in an individual, for example, kits for detecting presence or absence of cancerous cells, and kits for detecting presence or absence of breast, colon, lung, or prostate cancerous cells. In other aspects, the kits may be used, for example, to treat an individual with cancer or a family history of cancer. Kits for treating individual with cancer include but not limited to kits for inhibiting growth and/or proliferation of cancer cells, for delivering a therapeutic agent to cancerous cells, for delivering a therapeutic agent into cancerous cells. The kits of this invention are in suitable packaging, and may optionally provide additional components such as, buffers and instructions for determining binding to EphA2, such as capture reagents, developing reagents, labels, reacting surfaces, means for detection, control samples, and interpretive information. The

instructions may be for any measurement of antigen binding, including, but not limited to, those assays described herein. In other embodiments, the instructions may be for any of the methods described herein, including: instructions for inhibiting grow and/or proliferation of cancerous cells such as breast, lung, colon, or prostate, for delivering a therapeutic agent to cancerous cells, for delivering a therapeutic agent into cancerous cells. In some embodiments, reagents described above are supplied such that multiple measurements may be made, such as allowing for measurements in the same individual over time or multiple individuals. Any appropriate means for detecting binding of the antibodies may be employed (and provided in the kits) such as a labeled anti-human antibody, wherein the label may be an enzyme, fluorophore, chemiluminescent material radioisotope or coenzyme. Generally, the label used will be an enzyme.

[00154] The following examples are provided to illustrate, but not to limit, the invention.

Examples

Example 1. Preparation of cancer cell lines as an immunogen.

[00155] Whole cells isolated from tissue or from cell culture were used as an immunogen for producing monoclonal antibodies that are specific for surface antigens representative of a particular cell type. Such methods, suitable for the practice of this invention, are described in U.S. Patent # 6,541,225. Generally, to produce monoclonal antibodies directed to cell-surface antigens of a specific cell type, it is desirable to immunize non-transformed B-cells with viable and intact cells of that type, preferably with those cells whose surfaces that are free of serum. Cell lines that are suitable for the generation of monoclonal antibodies against the antigen EphA2, such as but not limited to LUCA19, LUCA 40, or SPL1, include: BT-474 (ATCC# HTB-20), MDA-MB-175VII (ATCC# HB-25), MDA-MB-361 (ATCC # HB-27), SKBR3 (ATCC# HTB-30), SKMES-1 (ATCC# HTB-58), ES-2 (ATCC# CRL-1978), SKOV3 (ATCC# HTB-77), HPAFII (ATCC# CRL-1997), Hs700T (ATCC# HTB-147), Colo205 (ATCC# CCL-222), HT-29 (ATCC# HTB-38), SW480 (ATCC# CCL-228), SW948 (ATCC# CCL-237), A498 (ATCC# HTB-44) and Caki-2 (ATCC# HTB-47).

[00156] The cells were grown in the appropriate nutrient media supplemented with growth factors, but free of serum. Immunization with cells that have been propagated in a serum-supplemented medium can have extreme disadvantages. Serum contains a complex mixture of small and large biomolecules with undefined activities. These biomolecules can adhere to the surfaces of cells and thereby leading to the generation of antibodies cross-reacting with molecules not representative of the specific cell type. Additionally, binding of serum biomolecules to the cell surface may lead to the masking of desired cell surface antigen targets. A number of serum-free media preparations are commercially known and publicly available, such as for example, F12/DME (1:1) nutrient media with the following supplements: insulin (10 µg/ml final concentration), epidermal growth factor (EGF) (5 ng/ml final concentration), selenious acid (2.5×10^{-8} M final concentration), and porcine pituitary extract (PPE) (5 µl/ml final concentration).

[00157] To harvest the cells, the cell monolayers were rinsed once with calcium- and magnesium-free Hanks saline solution, incubated in 10mM EDTA in Hanks saline solution at 37C for 15 minutes. The cells were detached from the culture surface by gentle pipetting. The cell suspension was pelleted by centrifugation at 1000xg for 5 minutes. The supernatant was removed and cells were resuspended in serum-free medium with non-denaturing adjuvant as appropriate.

Example 2. Generation of monoclonal antibodies

[00158] A non-denaturing adjuvant (Ribi, R730, Corixa, Hamilton MT) was rehydrated to 2 ml in phosphate buffered saline. 100 µl of this rehydrated adjuvant was then gently mixed with some of the cell pellet from Example 1 to be used for immunization. Approximately 10^6 cells per mouse were injected into Balb/c mice via footpad, approximately once or twice a week. The precise immunization schedule is as follows: Day zero, immunization plus Ribi. Day 3, immunization plus Ribi. Day 7, immunization plus Ribi. Day 24, immunization minus Ribi. Day 29, immunization minus Ribi. Day 32, immunization minus Ribi. Day 36, immunization minus Ribi. Day 44, immunization minus Ribi. Day 51, immunization minus Ribi. Day 69, bleed for titer test. Day 71. immunization

plus Ribi. Day 74, immunization plus Ribi. Day 81, immunization plus Ribi. Day 91, pre-fusion boost (no Ribi). Day 104, harvest nodes for fusion.

[00159] At Day 69, a drop of blood was drawn from the tail of each immunized animal to test the titer of antibodies against the cell line used to immunize using FACS analysis. When the titer reached at least 1:2000, the mice were sacrificed using CO₂ followed by cervical dislocation. Lymph nodes were harvested for hybridoma preparation.

[00160] Lymphocytes from mice were fused with the mouse myeloma line X63-Ag8.653 using 35% polyethylene glycol 4000. On day 10 following the fusion, the hybridoma supernatants were screened for the presence of the immunizing cells- specific monoclonal antibodies by fluorescence activated cell sorting (FACS). Conditioned medium from each hybridoma was incubated for 30 minutes with an aliquot of human fetal kidney cells. After incubation, the cell samples were washed, resuspended in 0.1 ml diluent and incubated with 1 µg/ml of FITC conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG for 30 min at 4°C. The cells were washed, resuspended in 0.2 ml FACS diluent and analyzed using a FACScan cell analyzer (Becton Dickinson; San Jose, CA). Hybridoma clones were selected for further expansion, cloning, and characterization based on their binding to the surface of the human fetal kidney cells by FACS. A hybridoma making a monoclonal antibody designated mu-SPL1 which binds an antigen designated Ag-SPL1 and an epitope on that antigen designated Ag-SPL1.1 was selected. A hybridoma making monoclonal antibody designated mu-LUCA19 which binds an antigen designated Ag-LUCA19 and an epitope on that antigen designated Ag-LUCA19.1 was selected. A hybridoma making monoclonal antibody designated mu-LUCA40 that binds an antigen designated Ag-LUCA40 and an epitope on that antigen designated Ag-LUCA40.1. A hybridoma making monoclonal antibody designated mu-SG5 that binds an antigen designated Ag-SG5 and an epitope on that antigen designated Ag-SG5.1. The hybridomas that produce the monoclonal antibodies, mu-SPL-1, mu-LUCA19, mu-LUCA40 and mu-SG5 were expanded in culture for purification of the monoclonal antibodies in a culture medium that is able to support monoclonal antibody growth and antibody purification.

Example 3. Purification of anti-EphA2 antibodies

[00161] Human cancer cells such as but not limited to SKMES-1, 786-O, and Colo205 cell lines were detached from tissue culture flasks in the presence of 10.0 mM EDTA, centrifuged at 1400 rpm for 5 minutes and resuspended in PBS containing 1% BSA and 2mM EDTA (FACS diluent). The cells were counted and adjusted to 10^7 cells/ml. About 0.1 ml of cells were incubated with 100 μ l FACS diluent for 30 minutes at 37°C. Monoclonal antibodies that bind to the human cancer cell lines were purified from tissue culture supernatant using protein-G affinity chromatography. If needed the tissue culture supernatant may be passed over a bovine IgG column before antibody purification in order to remove excess bovine IgG. The following materials were used for the antibody purification process: hybridoma tissue culture supernatant, Immunopure (G) IgG binding buffer (Pierce #21011 Rockford, IL), Immunopure IgG Elution Buffer (Pierce #21009), concentrated HCl (for adjusting pH), Corning 1 liter PES (polyether sulfone), 0.22 μ m filter (Corning #431098, Corning, NY), Amersham Pharmacia AKTA Explorer System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), Protein-G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences #17-0618-03), Stripping buffer consisting of 3M Potassium thiocyanate/50mM Tris pH 7.8, and PBS (phosphate buffered saline), 3M Tris pH 9.0.

[00162] To purify the mouse anti-human SPL1, mouse anti-human LUCA19 and mouse anti-human LUCA40 antibodies referred to herein as mu-SPL1, mu-LUCA19 and mu-LUCA40, respectively, the volume of the supernatant was measured and an equal volume of binding buffer was added to the supernatant. The mixture was allowed to equilibrate to room temperature. The supernatant was clarified by passage through a 0.22 μ m filter. The supernatant was loaded onto a protein-G Sepharose column using the AKTA Explorer system (Amersham Biosciences) and then washed with 5-10 column volumes of binding buffer. The monoclonal antibody was eluted with the elution buffer, and fractions were collected. The fractions were neutralized upon elution with the addition of 3M Tris, pH 9.0 to empty tubes (1/60 volume of the fractions). The peak fractions containing the monoclonal antibody were pooled. The pooled samples was injected into a pre-wetted slidealyzer cassette (10,000 MW cutoff;

Pierce #66810) and dialyzed in 1x PBS at 4°C (with 3 buffer changes of at least 4 hours of dialysis per change). The purified monoclonal antibody was sterile filtered (0.2µm Acrodisc) and stored at 2-8°C.

[00163] A sample of purified antibody is taken for determination of concentration by UV absorbance (A_{280}) and SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE is run under both non-reducing and reducing conditions for analysis of molecular weight, identification of the typical banding pattern of monoclonal antibodies and assessment of purity.

[00164] After purification of the mu-SPL1, mu-LUCA19 and mu-LUCA40 monoclonal antibody from the hybridoma supernatant, it was re-tested for binding to respective immunizing or target cells of interest. The cell samples were prepared as described above and incubated with the purified antibody at various concentrations. After incubation the cells were washed, resuspended in 0.1 ml diluent and incubated with 1µg of FITC conjugated F(ab)'2 fragment of goat anti-mouse IgG for 30 minutes at 4°C. The cells were washed, resuspended in 0.5 ml FACS diluent and analyzed using a FACScan cell sorter (Becton Dickinson, San Jose, CA). A shift to the right on the FACScan histogram indicated that the purified antibody still bound to the cells.

[00165] In other experiments, the binding of the mu-SPL1, mu-LUCA19 and mu-LUCA40 antibodies to SPL1, LUCA19 and LUCA40, respectively, was tested and confirmed using live cell ELISA. the following method was used, although other methods commonly known in the field are applicable. Cells (HT-29, SKOV3, SKMES-1, SW480, SKBR-3, and HPAFII) were grown in 10% fetal bovine serum (FBS) containing media to confluency on tissue culture treated 96-well plates (Falcon). Cells were washed with PBS and then incubated with 50µl of desired antibodies at a desired concentration in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing 1% BSA and 0.1% sodium azide for 1 hour at room temperature. The cells were then washed three times with 100µl per well of HBSS before incubation with horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (50µl per well diluted in HBSS) for 30 minutes at room temperature. The cells were finally washed three times with HBSS and the color change substrate (TMB substrate, KPL) was added to each well at 100µl per well. The color change reaction was stopped with the addition of 100µl per well of 1M phosphoric acid. The plates were then read at O.D. 450nm.

Example 4. Western blot analysis of SPL1, LUCA19 and LUCA40 expression in cancer cell line SW480

[00166] Renal cell carcinoma cell line SW480 (ATCC# CCL-228) were grown to confluency on 175 cm² culture dishes. The confluent monolayer was washed three times with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS+ containing no sodium bicarbonate or phenol red; buffered with 10mM HEPES, pH 7.4; Sigma Chemicals) and biotinylated with 200 µg of sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce Endogen) for 30 minutes at room temperature. The cells were then washed with HBSS+ containing 0.1M Tris, pH 7.4 (Sigma Chemicals) and incubated in HBSS+ containing 0.1M Tris, pH 7.4 for 15 minutes at room temperature. The cells were finally washed three times with HBSS+ and lysed by incubation for 5 minutes, on ice, in lysis buffer (HBSS+ with 2% Triton X-100, 2mM PMSF, 0.1% sodium azide, and 1 tablet per 5ml lysis buffer of EDTA free complete mini-protease cocktail (Roche Molecular Biochemicals)).

[00167] Cells were scraped in lysis buffer and lysates collected. Lysates were centrifuged at 14,000-x g for one hour at 4°C. The clarified lysate was then pre-cleared for 2 hours at 4°C with 5 µl of human IgG conjugated (1mg/ml) CNBr 4MB sepharose beads (Amersham Pharmacia). Human IgG beads were centrifuged and removed, and then the pre-cleared lysate was then incubated with monoclonal antibody mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 conjugated to CNBr 4MB Sepharose beads (conjugated at 1mg/ml) for 2 hours at 4°C. The mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 beads were centrifuged and removed after the 2-hour incubation. Both the human IgG and the mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 beads were individually washed three times with 1 ml of lysis buffer and then washed three times with 1ml HBSS+. The washed beads were eluted by the addition of 30 µl of SDS-PAGE sample buffer and boiling at 99°C for 5 minutes.

[00168] The samples were then resolved on a 4-20% Novex gradient gel (Invitrogen), and transferred onto 0.2µm nitrocellulose membrane (Invitrogen) and visualized by horse radish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin (Pierce

Endogen) or western blotted with 5 µg/blot of mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40.

[00169] For detection with HRP conjugated streptavidin, the nitrocellulose was first blocked for 1 hour with blocking buffer (5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline with 0.05% Tween-20 (TBST)). HRP conjugated streptavidin was diluted into TBST at 1 µg/ml and exposed to the nitrocellulose for 30 minutes at room temperature. The nitrocellulose was washed three times in TBST before visualization with ECL+ (Amersham).

[00170] For western blotting with mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40, the nitrocellulose was similarly blocked for 1 hour in blocking buffer. The nitrocellulose was then incubated in a heat sealed plastic pouch containing 1ml of 5 µg/ml mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 diluted in blocking buffer. The nitrocellulose was washed 3 times with TBST before incubation with 10ml of 1µg/ml HRP conjugated donkey anti-mouse IgG (heavy and light chain specific, cross adsorbed against bovine, chicken, goat, guinea pig, Syrian hamsters, horse, human, rabbit, sheep serum proteins; Jackson ImmunoResearch Cat. #709-035-149) for 1 hour at room temperature. The nitrocellulose was finally washed three times with TBST and visualized by ECL+ (Amersham).

Example 5. Immunohistochemistry methods

[00171] Frozen tissue samples from cancer patients were embedded in OCT compound and quick-frozen in isopentane with dry ice. Cryosections were cut with a Leica 3050 CM microtome at thickness of 8-10 µm and thaw-mounted on SuperFrost Plus slides (VWR #48311-703). The sections were fixed with 75% acetone/25% ethanol at 10°C and allowed to air-dry 2-4 hours at room temperature. The fixed sections were stored at -80°C until use.

[00172] For immunohistochemistry, the tissue sections were retrieved washed in Tris buffered 0.05% Tween (TB-T) and blocked in blocking buffer (TB-T, 5% normal goat serum and 100µg/ml avidin) for 30 minutes at room temperature. The slides were then incubated with the mu-LUCA19, mu-LUCA40, mu-SG5 or mu-SPL1 and control monoclonal antibodies diluted in blocking buffer (1 µg/ml)

for 60-90 minutes at room temperature. The sections were then washed three times with the blocking buffer. The bound monoclonal antibodies were detected with a goat anti-mouse IgG + IgM (H+L) F(ab')²-peroxidase conjugates and the peroxidase substrate diaminobenzidine (1 mg/ml, Sigma cat. No. D 5637) in 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.05 and 0.003% hydrogen peroxide (Sigma cat. No. H1009). The stained slides were counter-stained with hematoxylin and examined under Nikon microscope.

[00173] In some cases, paraffin embedded formaldehyde-fixed tissues may be used for immunohistochemistry after appropriate antigen retrieval methods were employed. One such antigen retrieval method is described in Mangham and Isaacson, *Histopathology* 35:129-33 (1999). Other methods of antigen retrieval and/or detection may be used by one skilled in the art. Results from similar experiments performed using frozen tissues or, where appropriate, fixed tissue with antigen retrieval and polyMICA detection were performed. The binding of anti-LUCA19, anti-LUCA40 and anti-SPL1 antibodies to a variety of normal and cancer tissues was assessed. In all cases, antibody binding in control fixed tissues was correlated with that of frozen tissues. The results from frozen tissues were only used if the two did not match in the controls.

[00174] For convenience, a summary of the combined results of several experiments using frozen surgical tissue from different sources is shown below in Tables 1-7. Tables 1-4 summarize the distribution of LUCA19, LUCA40, SPL1, and SG5 antigens on normal human tissues. Tables 5-7 summarize the distribution of LUCA19, LUCA40 and SPL1 antigens on various human tumor tissues.

Table 1. Distribution of LUCA19 antigen in normal human tissues	
Tissue Type	Results
Skin	Negative
Lung	Negative
Kidney	Negative
Pancreas	Negative except for 1+ staining on a few ducts
Liver	Negative
Colon	Negative
Duodenum	1+ staining in basal epithelium

64

Table 2. Distribution of LUCA40 antigen in normal human tissues	
Tissue Type	Results
Skin	Negative except +/- on a few small subcutaneous vessels
Lung	Negative
Kidney	Negative except for +/- on glomeruli
Pancreas	Negative
Liver	Negative except for +/- on parenchyma
Colon	Negative except +/- over mucosa and muscularis
Duodenum	Negative
Prostate	Negative
Ovary	Negative
Breast	Negative except +/- over glandular structures

Table 3. Distribution of SPL1 antigen in normal human tissues	
Tissue Type	Results
Skin	Negative
Lung	Negative
Kidney	Negative
Pancreas	Negative
Liver	Negative
Colon	1+ focal staining on mucosa (50%)
Duodenum	1+ mucosal staining
Prostate	Negative
Ovary	Negative
Breast	Negative

Table 4. Distribution of SG5 antigen in normal human tissues	
Tissue Type	Results
Skin	+/- staining on epidermis and sweat glands
Lung	Negative
Kidney	Negative
Pancreas	Negative
Liver	+/- staining (parenchymal hue)
Colon	Negative
Stomach	Negative
Prostate	Negative

Ovary	Negative
Breast	Negative

Table 5. Distribution of LUCA19 antigen in human tumor tissues

Tissue Type	Results
Prostate	Negative on 4/4 tumors screened
Colon	1-3+ staining on 5/5 tumors screened
Kidney	Negative on 5/5 tumors screened
Lung	1-2+ staining on 4/7 tumors screened and negative on 3/7 tumors screened
Ovary	Negative on 4/4 tumors screened
Pancreas	2-3+ on 5/5 tumors screened
Breast	Variable; 1-2+ on 1/3 tumors screened

Table 6. Distribution of LUCA40 antigen in human tumor tissues

Tissue Type	Results
Prostate	Variable; Negative to 1+ staining; 8 tumors screened
Colon	1-3+ staining on 8/8 tumors screened
Kidney	+/- stromal staining on 5/5 tumors screened
Lung	Variable; Negative to 1+ staining; 8 tumors screened
Ovary	+/- stromal staining on 5/5 tumors screened
Pancreas	1-2+ staining on 7/7 tumors screened
Breast	Negative on 3/4 tumors screened; +/- on 1/4 tumors screened

Table 7. Distribution of SPL1 antigen in human tumor tissues

Tissue Type	Results
Prostate	Negative on 6/6 tumors screened
Colon	1-3+ apical staining on 7/9 tumors; Negative on 2/9 tumors screened
Kidney	Negative on 5/5 tumors screened
Lung	Variable +/- to 1+ staining on 3/8 tumors screened; Negative on 5/8 tumors screened
Ovary	Negative on 5/5 tumors screened
Pancreas	1-2+ on 6/6 tumors screened
Breast	Negative on 4/4 tumors screened

Example 6. Immunocytochemistry results

[00175] Monoclonal antibodies mu-LUCA19, mu-LUCA40 and mu-SPL1 were used to test reactivity with various cell lines from different types of tissues. The results were scored as '+' for weak positive staining, '++' for moderate positive staining, '+++' for strong positive staining and '-' for negative staining.

[00176] Immunohistochemistry results were obtained using CellArray™ technology, as described in WO 01/43869. Cells from different established cell lines were removed from the growth surface without using proteases, packed and embedded in OCT compound. The cells were frozen and sectioned, then stained using a standard IHC protocol.

[00177] Results of the binding of the mu-LUCA19, mu-LUCA40 and mu-SPL1 antibodies to various established human normal and tumor cell lines are compiled for convenience in Tables 8-10. The experiments represented in Table 8 include Live-cell ELISA, Sarcoma Array and CellArray™ binding experiments with mu-LUCA19 using the methods described herein. The experiments represented in Table 9 include Live-cell ELISA, Sarcoma Array and Cell Array™ binding experiments with mu-LUCA40 using the methods described herein. The experiments represented in Table 10 include Live-cell ELISA, Sarcoma Array and Cell Array™ binding experiments with mu-SPL1 using the methods described herein.

Table 8. Mu-LUCA19 binding						
Cell line	ATCC#	Organ	Cell Type	Reactivity Cell Array	Reactivity Sarcoma Array	Reactivity Live Cell ELISA
MDA361	HB-27	Breast	Adenocarcinoma	-		
MDA175	HB-29	Breast	Ductal carcinoma	-		
MCF7	HTB-22	Breast	Adenocarcinoma	-		
SKBR3	HTB-30	Breast	Metastatic; pleural effusion adenocarcinoma	-		-
BT474	HTB-20	Breast	Ductal carcinoma	-		
HUVEC	Primary	Endothelial Cell	Normal human adult	++		

HMEC	CC-2251*	Breast	Normal mammary epithelial	-		
SKOV3	HTB-77	Ovary	Adenocarcinoma	++		+++
ES-2	CRL-1978	Ovary	Carcinoma	+		
SKMES1	HTB-58	Lung	Squamous carcinoma	-		+
CA130	RAVEN	Lung	Small cell carcinoma	+/-		
A549	CCL-185	Lung	Carcinoma	+		
9979	RAVEN	Lung	Lung cancer cell line	-		
SW948	CCL-237	Colon	Colorectal adenocarcinoma	-		
SW480	CCL-228	Colon	Colorectal adenocarcinoma	-		+++
HT-29	HTB-38	Colon	Colorectal adenocarcinoma	-		+
Colo205	CCL-222	Colon	Ascites colorectal adenocarcinoma	+/-		
Hs700T	HTB-147	Pancreas	Adenocarcinoma	-		
HPAFII	CRL-1997	Pancreas	Adenocarcinoma	++		-
AsPC-1	CRL-1682	Pancreas	Adenocarcinoma	+		
9926	RAVEN	Pancreas	Adenocarcinoma	++		
SVT2	CCL-163.1	Embryo (Mouse)	Fibroblast; SV40 transformed	-		
Cos7	CRL-1651	Kidney (African Green Monkey)	SV40 transformed	+/-		
RL65	CRL-10354	Lung (Rat)	Epithelial cell	-		
Calu3	HTB-55	Lung	Adenocarcinoma	+++		
Caki2	HTB-47	Kidney	Clear cell carcinoma	+		
A498	HTB-44	Kidney	Carcinoma	+/-		
786-O	CRL-1932	Kidney	Renal cell carcinoma	+/-		
293	CRL-1573	Kidney	Transformed with adenovirus5 DNA	-		

TDH	RAVEN	Prostate	Prostate cancer cell line	-		
PC3	CRL-1435	Prostate	Adenocarcinoma	-		
LNCaP	CRL-1740	Prostate	Carcinoma	-		
DU145	HTB-81	Prostate	Adenocarcinoma	+++		
22RV1	CRL-2505	Prostate	Carcinoma	-		
Hs746T	HTB-135	Stomach	Carcinoma	++		
N87	CRL-5822	Stomach	Metastatic; liver gastric carcinoma	++		
SW872	HTB-92	Connective Tissue	Liposarcoma		++	
SW684	HTB-91	Connective Tissue	Fibrosarcoma		++	
SK-UT-1	HTB-114	Uterus	Leiomyosarcoma		++	
SK-LMS-1	HTB-88	Vulva	Leiomyosarcoma		++	
SK-ES-1	HTB-86	Bone	Ewing's sarcoma		-	
RD-ES	HTB-166	Bone	Ewing's sarcoma		+/-	
RD	CCL-136	Muscle	Rhabdomyosarcoma		-	
MG-63	CRL-1427	Bone	Osteosarcoma		-	
HT-1080	CCL-121	Connective Tissue	Fibrosarcoma		++	
G-292	CRL-1423	Bone	Osteosarcoma		-	
A-204	HTB-82	Muscle	Rhabdomyosarcoma		+	

* CC-2251 BioWhittaker

Table 9. Mu-LUCA40 binding

Cell line	ATCC#	Organ	Cell Type	Reactivity Cell Array	Reactivity Sarcoma Array	Reactivity Live Cell ELISA
HMEC	CC-2251*	Breast	Normal mammary epithelial	-		

6a

HUVEC	Primary	Endothelial Cell	Normal human adult	++		
BT474	HTB-20	Breast	Ductal carcinoma	-		
MCF7	HTB-22	Breast	Adenocarcinoma	-		
MDA175	HB-29	Breast	Ductal carcinoma	-		
MDA361	HB-27	Breast	Adenocarcinoma	-		
SKBR3	HTB-30	Breast	Metastatic; pleural effusion adenocarcinoma	-		-
9979	RAVEN	Lung	Lung cancer cell line	+		
A549	CCL-185	Lung	Carcinoma	+		
CA130	RAVEN	Lung	Small cell carcinoma	+		
Calu3	HTB-55	Lung	Adenocarcinoma	+		
SKMES1	HTB-58	Lung	Squamous carcinoma	-		+
ES-2	CRL-1978	Ovary	Carcinoma	+++		
SKOV3	HTB-77	Ovary	Adenocarcinoma	+		+++
9926	RAVEN	Pancreas	Adenocarcinoma	++		
AsPC-1	CRL-1682	Pancreas	Adenocarcinoma	+		
HPAFII	CRL-1997	Pancreas	Adenocarcinoma	++		-
Hs700T	HTB-147	Pancreas	Adenocarcinoma	+		
Colo205	CCL-222	Colon	Ascites colorectal adenocarcinoma	+		
HT-29	HTB-38	Colon	Colorectal adenocarcinoma	-		+
SW480	CCL-228	Colon	Colorectal adenocarcinoma	++		+++
SW948	CCL-237	Colon	Colorectal adenocarcinoma	-		
293	CRL-1573	Kidney	Transformed with adenovirus5 DNA	+/-		
786-O	CRL-1932	Kidney	Renal cell carcinoma	+		

A498	HTB-44	Kidney	Carcinoma	+		
Caki2	HTB-47	Kidney	Clear cell carcinoma	+		
Cos7	CRL-1651	Kidney (African Green Monkey)	SV40 transformed	++		
RL65	CRL-10354	Lung (Rat)	Epithelial cell	-		
SVT2	CCL-163.1	Embryo (Mouse)	Fibroblast; SV40 transformed	-		
22RV1	CRL-2505	Prostate	Carcinoma	-		
DU145	HTB-81	Prostate	Adenocarcinoma	-		
LNCaP	CRL-1740	Prostate	Carcinoma	-		
PC3	CRL-1435	Prostate	Adenocarcinoma	-		
TDH	RAVEN	Prostate	Prostate cancer cell line	++		
Hs746T	HTB-135	Stomach	Carcinoma	+		
N87	CRL-5822	Stomach	Metastatic; liver gastric carcinoma	++		
SW872	HTB-92	Connective Tissue	Liposarcoma		++	
SW684	HTB-91	Connective Tissue	Fibrosarcoma		++	
SK-UT-1	HTB-114	Uterus	Leiomyosarcoma		+	
SK-LMS-1	HTB-88	Vulva	Leiomyosarcoma		++	
SK-ES-1	HTB-86	Bone	Ewing's sarcoma		-	
RD-ES	HTB-166	Bone	Ewing's sarcoma		+/-	
RD	CCL-136	Muscle	Rhabdomyosarcoma		-	
MG-63	CRL-1427	Bone	Osteosarcoma		-	
HT-1080	CCL-121	Connective Tissue	Fibrosarcoma		++	
G-292	CRL-1423	Bone	Osteosarcoma		-	
A204	HTB-82	Muscle	Rhabdomyosarcoma		+	

* CC-2251 BioWhitaker

Table 10. Mu-SPL1 binding

Cell line	ATCC#	Organ	Cell Type	Reactivity Cell Array	Reactivity Sarcoma Array	Reactivity Live Cell ELISA
HMEC	CC-2251*	Breast	Normal mammary epithelial	-		
HUVEC	Primary	Endothelial Cell	Normal human adult	++		
BT474	HTB-20	Breast	Ductal carcinoma	-		
MCF7	HTB-22	Breast	Adenocarcinoma	-		
MDA175	HB-29	Breast	Ductal carcinoma	-		
MDA361	HB-27	Breast	Adenocarcinoma	-		
SKBR3	HTB-30	Breast	Metastatic; pleural effusion adenocarcinoma	-		-
9979	RAVEN	Lung	Lung cancer cell line	+		
A549	CCL-185	Lung	Carcinoma	+		
CA130	RAVEN	Lung	Small cell carcinoma	+		
Calu3	HTB-55	Lung	Adenocarcinoma	+		
SKMES1	HTB-58	Lung	Squamous carcinoma	-		+
ES-2	CRL-1978	Ovary	Carcinoma	+++		
SKOV3	HTB-77	Ovary	Adenocarcinoma	++		+++
9926	RAVEN	Pancreas	Adenocarcinoma	++		
AsPC-1	CRL-1682	Pancreas	Adenocarcinoma	++		
HPAFII	CRL-1997	Pancreas	Adenocarcinoma	++ (75%)		-
Hs700T	HTB-147	Pancreas	Adenocarcinoma	+/-		
Colo205	CCL-222	Colon	Ascites colorectal adenocarcinoma	+/-		

HT-29	HTB-38	Colon	Colorectal adenocarcinoma	+/-		+
SW480	CCL-228	Colon	Colorectal adenocarcinoma	++		+++
SW948	CCL-237	Colon	Colorectal adenocarcinoma	+		
293	CRL-1573	Kidney	Transformed with adenovirus5 DNA	+/-		
786-O	CRL-1932	Kidney	Renal cell carcinoma	+		
A498	HTB-44	Kidney	Carcinoma	+		
Caki2	HTB-47	Kidney	Clear cell carcinoma	++		
Cos7	CRL-1651	Kidney (African Green Monkey)	SV40 transformed	++		
RL65	CRL-10354	Lung (Rat)	Epithelial cell	-		
SVT2	CCL-163.1	Embryo (Mouse)	Fibroblast; SV40 transformed	-		
22RV1	CRL-2505	Prostate	Carcinoma	-		
DU145	HTB-81	Prostate	Adenocarcinoma	+/-		
LNCaP	CRL-1740	Prostate	Carcinoma	-		
PC3	CRL-1435	Prostate	Adenocarcinoma	-		
TDH	RAVEN	Prostate	Prostate cancer cell line	++		
Hs746T	HTB-135	Stomach	Carcinoma	+		
N87	CRL-5822	Stomach	Metastatic; liver gastric carcinoma	++		
SW872	HTB-92	Connective Tissue	Liposarcoma		+	
SW684	HTB-91	Connective Tissue	Fibrosarcoma		++	
SK-UT-1	HTB-114	Uterus	Leiomyosarcoma		+	
SK-LMS-1	HTB-88	Vulva	Leiomyosarcoma		++	
SK-ES-1	HTB-86	Bone	Ewing's sarcoma		-	
RD-ES	HTB-166	Bone	Ewing's sarcoma		-	

RD	CCL-136	Muscle	Rhabdomyosarcoma		-	
MG-63	CRL-1427	Bone	Osteosarcoma		-	
HT-1080	CCL-121	Connective Tissue	Fibrosarcoma		++	
G-292	CRL-1423	Bone	Osteosarcoma		-	
A204	HTB-82	Muscle	Rhabdomyosarcoma		+	

* CC-2251 BioWhittaker

[00178] Results of the binding of the mu-LUCA19, mu-LUCA40 and mu-SPL1 antibodies to various established tumor cell lines from the National Cancer Institute (NCI) are compiled for convenience in Table 11 using the methods described herein.

Table 11. NCI Cell Line Array			LUCA19	LUCA40	SPL1
Cell Line	Tumor Origin	Histologic Type	Reactivity	Reactivity	Reactivity
CRF-CEM	Peripheral blood	Acute lymphoblastic leukemia	-	-	-
HL-60(TB)		Procyelocytic leukemia	-	-	-
K-562	Pleural effusion	Chronic myelogenous leukemia	-	-	-
MOLT-4	Peripheral blood	Acute lymphoblastic leukemia	-	-	-
RPMI-8226	Peripheral blood	Multiple myeloma	-	-	-
SR		Immunoblastic large cell lymphoma	-	-	-
A549	Lung	Carcinoma	+	+	+
EKVX	Lung	Adenocarcinoma	-	-	-
HOP-62	Lung	Adenocarcinoma	+++	+++	+++
HOP-92	Lung	Large cell, undifferentiated	+	+	++
NCI-H226	Lung	Squamous cell	+	++	++
NCI-H23	Lung	Adenocarcinoma	+/-	-	+
NCI-H322M	Lung	Bronchi alveolar carcinoma	-	-	-
NCI-H460	Lung	Non-small cell	-	-	-

74

NCI-H522	Lung	Adenocarcinoma	++	++	++
Colo205	Colon	Ascites colorectal adenocarcinoma	+/-	+/-	+ (50%)
HCC-2998	Colon	Carcinoma	++	++	+++
HCT-116	Colon	Carcinoma	++	++	++
HCT-15	Colon	Adenocarcinoma	+	+/-	+
HT29	Colon	Colorectal adenocarcinoma	-	-	+
KM12	Colon	Adenocarcinoma	+	++	++
SW-620	Colorectal adenocarcinoma	Metastatic; lymph node	++	++	+++
SF-268	CNS	Anaplastic astrocytoma	++	++	++
SF-295	CNS	Glioblastoma multiform	+	+	+
SF-539	CNS	Gliosarcoma	++	++	++
SNB-19	CNS	Glioblastoma	++	++	++
SNB-75	CNS	Astrocytoma	+/-	+/-	+/-
U251	CNS	Glioblastoma	+++	++	++
LOX IMVI	Lymph node metastasis	Malignant amelanotic melanoma	+	+	++
MALME-3M	Lung metastasis	Malignant melanoma	-	-	+
M14		Amelanotic melanoma	-	-	-
SK-MEL-2	Skin metastasis-thigh	Malignant melanoma	-	-	-
SK-MEL-28		Malignant melanoma	-	-	-
SK-MEL-5	Axillary node metastasis	Malignant melanoma	-	-	-
UACC--257		Malignant melanoma	+	+	+
UACC-62		Malignant melanoma	-	-	-
IGR-OV1	Ovary	Cystadenocarcinoma	-	-	-
OVCAR-3	Ovary	Adenocarcinoma	++	++ (75%)	++
OVCAR-4	Ovary	Adenocarcinoma	+	+	+
OVCAR-5	Ovary	Adenocarcinoma	+++	++	+++
OVCAR-8	Ovary	Adenocarcinoma	+++	+	++

25

SKOV3	Ovary	Adenocarcinoma	++	+	+
PC3	Prostate	Adenocarcinoma	-	-	-
DU145	Prostate	Adenocarcinoma	-	-	-
786-O	Kidney	Renal cell carcinoma	+/-	+	+
A498	Kidney	Carcinoma	+/-	+	+
ACHN	Kidney	Carcinoma	+++	++	++
CAKI-1	Kidney	Adenocarcinoma	++	++	++
SN12C	Kidney	Carcinoma	++	++	+++
TK-10	Kidney	Carcinoma	+	+	+
UO-31	Kidney	Carcinoma	++	++	++
MCF-7	Breast	Adenocarcinoma	-	-	-
NCI-ADR-RES	Breast	Metastatic; Pleural effusion adenocarcinoma	+	+	++
MDA-MB-231	Breast	Metastatic; Pleural effusion adenocarcinoma	++	++	+++
Hs 578T	Breast	Ductal carcinoma	+	+/-	+
MDA-MB-435	Breast	Metastatic; Pleural effusion adenocarcinoma	-	-	-
BT-549	Breast	Metastatic; Lymph node; Infiltrating ductal carcinoma	+++	+++	+++
T-47D	Breast	Metastatic; Pleural effusion; Ductal carcinoma	-	-	-

[00179] Monoclonal antibodies mu-LUCA19, mu-LUCA40 and mu-SPL1 were used to test reactivity with glioma-derived cell lines. Immunocytochemistry results were obtained using similar protocols as described above for the CellArray™ technology. The glioma-derived cell lines were removed from the growth surface without using proteases, packed and embedded in OCT compound. The cells were frozen and sectioned, then stained using a standard IHC protocol. Mu-LUCA19 was positive on 17 out of 25 glioma-derived cell lines screened. Staining intensity ranged from +/- to 3+ staining.

Mu-LUCA40 was positive on 18 out of 25 glioma-derived cell lines screened. Staining intensity ranged from +/- to 3+ staining. Mu-SPL-1 was positive on 14 out of 25 glioma-derived cell lines screened. Staining intensity ranged from +/- to 3+ staining.

Example 7. Isolation and Characterization of antigen Ag-SPL1, Ag-LUCA19, Ag-SG5 and Ag-LUCA40

[00180] To identify the antigen to which SPL1, LUCA19, SG5 and LUCA40 were reactive, an immunoprecipitation (Ippt) experiment was performed. For immunoprecipitation, thirty 175cm² flasks of SW480 cells were lysed with 30ml of lysis buffer. The lysis buffer consisted of Hanks balanced salt solution (HBSS+) fortified with 2% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (1 tablet per 5ml lysis buffer of complete mini EDTA free protease cocktail from Roche Molecular Biochemicals), 0.1% sodium azide, and 2mM PMSF. The cell lysate was clarified at 24,000xg for 30 minutes at 4°C before being passed over a column consisting of 1ml Protein G (Amersham Pharmacia). The pre-cleared SW480 lysate was then incubated with Protein G absorbed mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 (10µg mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 was pre-incubated for 30 minutes at room temp with 5µl Protein G) for 2 hours at 4°C. The beads (both the pre-clear Protein G beads and the Protein G absorbed mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 beads) were then washed three times with lysis buffer before elution with 30µl SDS sample buffer (3% SDS, 20% Glycerol, 10mM DTT, 2% Bromophenol blue, 0.1M Tris, pH8.0). 25µl of the eluate was then resolved by SDS-PAGE and visualized through Coomassie staining. 5µl of the eluate was resolved by SDS-PAGE and further transferred to nitrocellulose for western blotting.

[00181] The blot was then probed with mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 and developed using a Western Blotting Kit (Invitrogen Cat. No. WB7103) to confirm antigen recognition. By western blotting the mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 and mouse IgG eluate against mu-SPL1, mu-LUCA19 mu-SG5 or mu-LUCA40, a protein unique to the mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 eluate was observed. Stained protein bands from the NuPAGE gel were excised using

clean scalpel blades and are placed in clean Eppendorf tubes. Excised bands were stored at -20°C until used for protein identification by mass spectrometry.

Example 8. Characterization of the antigen to which mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 binds using Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

[00182] The antigens to which mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 and mu-LUCA40 bind were isolated as described in Example 7 and subjected to Tandem mass spectroscopy according to the method of Kane *et al.* J Bio Chem. 2002 June 21;277(25):22115-8, Epub May 06. Proteins are separated by SDS-PAGE, and the gel is stained with the colloidal Coomassie Blue reagent (Invitrogen). Proteins of interest are digested in gel with trypsin. The tryptic peptides are sequenced by microcapillary liquid chromatography MS/MS on an ion trap mass spectrometer (Thermo-Finnigan LCDQ DECA XP), as described in Wu *et al.*, Nature 405:477-482 (2000).

[00183] Alternatively, other commonly known methods of mass spectrometry, such as MALDI mass spectrometry, are also used in the practice of this invention. The results from the mass spectroscopy analysis showed that the antigen to which mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 and mu-LUCA40 was EphA2.

Example 9. Sandwich ELISA for epitope mapping of mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 and mu-LUCA40

[00184] The specific epitope on EphA2 to which mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 and mu-LUCA40 bind was assessed using a competitive sandwich ELISA. 50µl/well of 10µg/ml concentration of mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 or mu-LUCA40 were diluted in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution with out sodium bicarbonate and phenol red) and allowed to bind to 96-well Maxisorb micro-titer plates for 2 hours at room temperature. Coated plates are then blocked for 30 minutes with HBSS containing 1% BSA (W/V). HT-29 cells were lysed as described in example 7. The lysate is then applied to the blocked micro-titer wells at a volume of 150µl per well. The lysates are allowed to incubate for 1 hour at room temperature. After the incubation, the plate is then washed thoroughly with blocking buffer. Biotinylated mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 and mu-

LUCA40, at a concentration of 50 μ l/well, 1 μ g/ml, are added into the micro-titer wells and allowed to incubate for 1 hour at room temp. Biotinylated mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 and mu-LUCA40 were prepared by incubating 1 μ l of 200mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin diluted in DMSO for every 1mg of purified antibody for 2 hours at room temperature. The biotinylated antibodies are then quenched with a final concentration of 0.1M Tris, pH 7.4 for 30 minutes at room temperature. The biotinylated antibody is then separated from free biotin by concentrating through a 30kDa molecular weight cut-off filter. After the 1hour incubation of the biotinylated antibodies, the plates are washed thoroughly with HBSS. Horseradish peroxidase conjugated streptavidin (SA-HRP) is diluted into HBSS at a concentration of 1:10,000. The diluted SA-HRP is added into the washed micro-titer wells at 50 μ l/well and allowed to incubate for 30 minutes at room temp. After the incubation of SA-HRP, the plate is finally washed thoroughly with HBSS and developed with the addition of 100 μ l/well of 1-Step TMB substrate for a color change reaction. The development is stopped with the addition of 100 μ l/well of 1M phosphoric acid diluted in Milli-Q water. The developed plate is then analyzed with a ThermoMax micro-titer plate reader at 450nm.

[00185] From the results of the competitive sandwich ELISA, we can conclude that mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 and mu-LUCA40 represent three antibodies binding EphA2 through two distinctive epitopes, one represented by mu-LUCA40, and the second represented by mu-SPL1. mu-LUCA19 seems to share, but not directly overlap the epitope represented by mu-SPL1. The overlap does not extend into the epitope represented by the mu-LUCA40 epitope.

Example 10. Further characterization of mu-LUCA19 and mu-SG5

[00186] EphA2 stimulation in G55 cells, a glioma cell line that expresses endogenous EphA2, was studied using mu-LUCA19 and mu-SG5. The cells were treated with either mu-LUCA19 or mu-SG5 in increasing concentrations up to 30 μ g/ml and the phosphotyrosine content of immunoprecipitated EphA2 was measured by Western blot analysis with phosphotyrosine-specific antibodies (4G10, Upstate Cell Signaling Solutions, New York). No difference in phosphotyrosine content in EphA2

immunoprecipitated from G55 cells treated with either mu-LUCA19 or mu-SG5 was seen. Control Western blots for total EphA2 content was performed to ensure that the total EphA2 protein that was immunoprecipitated was the same for each treatment condition. Similar results were seen using A549 cells and mu-LUCA19 and mu-SG5 antibodies. These results indicate that treatment of cells expressing endogenous EphA2 with either mu-LUCA19 or mu-SG5 does not increase or decrease the phosphotyrosine content of EphA2.

Example 11. Effect of mu-SPL1, mu-LUCA19 and mu-LUCA40 on cancer cell lines

[00187] The ability of the antibodies to reduce cell number *in vitro* when grown as a monolayer can be assessed using cell monolayers grown in the presence or absence of varying amounts of test or control purified antibody and the change in cell number assessed using MTT. MTT is a dye that measures the activity of mitochondrial enzymes and correlates with relative viable cell number. Cells of interest were plated and grown in F12/DMEM (1:1) growth medium supplemented with 10% fetal bovine serum in 96 well plates. The cell lines were plated in triplicate wells of a 96-well dish at a density range of 1500-2500 cells/well. Immediately after plating, mu-SPL1, mu-LUCA19 or mu-LUCA40 was added. The cells were incubated at 37°C in a humidified incubator at 5% CO₂/air for 5 days. At the end of the assay, MTT was dissolved in PBS (5mg/ml) and added directly to wells at 1:10 dilution. Plates were placed back in incubator for 4 hours. After the incubation, medium was removed and 100 µl DMSO was added to solubilize the MTT precipitate. Plates were read at O.D. 540nm. In these experiments, mu-LUCA40 inhibited growth of 786-O, A549, Caki-2, ES-2, SKMES-1, and SKOV3 cell lines, and SPL1 and LUCA19 did not.

Example 12. Internalization of mu-LUCA19, mu-SG5 and mu-LUCA40 and toxin-conjugated anti-mouse IgG

[00188] Mab-ZAP (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) is an anti-mouse IgG conjugated to saporin, a toxin that inhibits protein synthesis. This toxin is impermeable to the cell membrane. If a monoclonal antibody is bound to a cell-surface antigen that is internalizable, the toxin-conjugate can bind to the bound monoclonal and, thereby, be internalized and eventually kill the cell.

Being dependent upon internalization for demonstration of toxic activity, the Mab-ZAP can serve to evaluate whether or not a given surface antigen will serve as a suitable target for any toxin that is dependent upon internalization to express cell toxic effects. As such, the Mab-ZAP serves as a model for such internalization-dependent toxins such as maytansinoids and calicheamicin.

[00189] For testing the internalization of mu-LUCA19 and mu-LUCA40 and saporin conjugated anti-mouse IgG by tumor cells and effect of killing the tumor cells after internalization of saporin, human glioma cells, G130 were removed from stock flasks with 10 mM EDTA and centrifuged. Cells were resuspended at 50,000/ ml in appropriate medium and 100 μ l plated per well in 96 well plates. Antibody mu-SPL1, mu-LUCA19 or mu-LUCA40 was added immediately to appropriate wells as a 10x concentrate, to make a final concentration of 10 μ g/ml. After 15 minutes at room temperature Mab-ZAP (Cat. # IT-04, Advanced Targeting Systems, San Diego CA) was added to appropriate wells as 10x concentrate, to make final concentrations from 0.001 nM to 10 nM. After 4 days growth, MTT was added (stock 5 mg/ml PBS, 1:10 dilution in well) for 4 hrs at 37°C. The medium was then removed from all wells and 100 μ l/well DMSO was added. The plates were gently swirled to solubilize the blue MTT precipitate and the plates were read at O.D. 540 nm.

[00190] There was a decrease in MTT staining in G130 cells in the presence of mu-LUCA19 and mu-LUCA40 as compared to staining in the absence of those antibodies. This indicates that the growth of G130 cells was inhibited in the presence of mu-LUCA19 and mu-LUCA40 and Mab-ZAP and these results are indicative of mu-LUCA19 and mu-LUCA40 and toxin-conjugated anti-mouse IgG were internalized in G130 cells. Similar results were seen using ES-2 cells, an ovarian carcinoma cell line, and mu-SG5 antibodies. There was a decrease in MTT staining in ES-2 cells in the presence of mu-SG5 as compared to staining in the absence of this antibody. This indicates that the growth of ES-2 cells was inhibited in the presence of mu-SG5 and Mab-ZAP. This result is indicative of mu-SG5 and toxin-conjugated anti-mouse IgG were internalized in ES-2 cells.

Example 13. Efficacy of Anti-EphA2 antibody SPL1 and LUCA40 with human cells in nude mice

[00191] Human tumor cells were grafted under the kidney capsule in nude (nu/nu) mice. Three tumor cell lines were used. The ES-2 and SKOV3-3 ovarian tumor-derived cell lines, and the Caki-2 kidney tumor-derived cell lines were obtained from the ATCC. In some studies both kidneys received xenografts. For the treated animals, grafts were made in the kidney capsule (500k cells in collagen gel).. Anti-EphA2 monoclonal antibody SPL1 or LUCA40 was injected intraperitoneally at a concentration of 50mg/kg and a volume of 0.01 mL/g body weight. Dosing was initiated on Day 2 following implantation, and doses of SPL1, LUCA40 or PBS were administered three times weekly as single rapid injections. Control mice were injected with PBS only. Three days after the final injection, the animals were euthanized and the kidneys with grafts were examined.

[00192] The amount of human DNA in the tumors was quantitated using real-time PCR on an Applied Biosystems (Foster City, CA) SDS7000 system, with primers and probe specific for the human ribosomal gene RPL19 according to published methods. Each tumor sample was analyzed in triplicate PCR reactions and average DNA concentrations were determined. Average DNA concentration and standard error of the mean was determined for each group of tumor samples. Statistical significance was determined using the Student's T-test (two-tailed, type 1). Tumor growth inhibition was calculated as the absolute value of $[(\text{average tumor volume of treated group} / \text{average tumor volume of PBS control group}) \times 100] - 100$.

[00193] In data not shown, SPL1 appeared on visual and manual examination to reduce the size of tumors, relative to controls, using cell lines Caki-2 and ES-2. Similar results were seen in LUCA40 treated mice implanted with Caki-2 tumors. DNA quantitation of the Caki-2 tumors from mice treated with LUCA40 antibodies confirmed that the LUCA40 treated mice had smaller tumors relative to controls. Table 12 shows other sub-renal capsule xenograft study designs with SPL1 antibodies and DNA quantitation results from these studies.

Table 12. SPL1 Sub-Renal Capsule Xenograft Model Study Design and Results

Cell Line Studied	MAB dose (mg/kg)	No. animals/group	% TGI*
ES-2	50	5	78.3 p= 0.006
ES-2	50	6	61 p= 0.026
SKOV3-3	50	6	70 p= 0.005

*TGI = tumor growth inhibition vs. PBS control group; p-values were determined by the Student's T-test, unpaired.

Example 14. Antitumor Efficacy of SPL1 in a Subcutaneous Model of Human Ovarian Tumors

[00194] This study was designed to test the dose-responsive anti-tumor data for SPL1 antibody in a subcutaneous model of ovarian cancer and lung cancer.

[00195] The ES-2 ovarian tumor-derived cell line was re-derived from a rapid-growing tumor identified in a pilot subcutaneous tumor model study. A549 lung tumor-derived cells were obtained from the ATCC. Cultured cells were trypsinized, washed in media, spun down and resuspended in media at 100 million cells per milliliter of media (5 million cells per 0.05 mL volume), then mixed in an equal volume of Matrigel® for a final injection volume of 0.1 mL. Female CRL nu/nu homozygous mice were used. Cells were inoculated by subcutaneous injection in the back of the neck of the mice. Dosing was initiated either on the day of implantation or when tumors were established and measurable. For Day 0 dosing, tumors were implanted in the morning and animals dosed in the afternoon of the same day. For established tumors, animals were randomized among groups as follows: tumor volumes were determined, animals were sorted by tumor volume, the mean was determined and the appropriate number of animals (12 to 15 per group depending on the model) was selected above and below the mean, removing from the study those with small or large tumors. The remaining animals were randomized by ear tag number into

57

treatment and control groups. The random distribution of the final groups was confirmed by T-test ($p > 0.1$ was considered randomized).

[00196] For each treatment dose group, SPL1 was diluted in PBS at an appropriate concentration dose (50 mg/kg for ES2 cells study and a concentration range of 10mg/kg, 30 mg/kg and 100 mg/kg for A549 cells study) and PBS control and administered at a volume of 0.01 mL/g body weight. Doses of SPL1 or PBS were administered twice weekly as single rapid injections into the intraperitoneal cavity. Control mice were injected with PBS only. Dosing was initiated in groups of 12-15 mice when tumors reached the appropriate size, depending on the study.

[00197] Tumors were allowed to grow for approximately 6 days prior to initial tumor measurement. Tumors were subsequently measured twice weekly by digital caliper in three dimensions, and tumor volume was calculated as one-half the product of the three measurements. Tumor volume over time was the primary endpoint for all studies. Clinical observations were made daily. Body weight was determined for each animal twice weekly.

[00198] Average tumor volumes and standard error of the mean were determined for each group at each measurement. Statistical significance was determined using the Student's T-test (two-tailed, type 1). Tumor growth inhibition was calculated as the absolute value of [(average tumor volume of treated group/ average tumor volume of PBS control group) x 100] - 100. Table 13 shows subcutaneous xenograft study designs and results.

Table 13. SPL1 SC Xenograft Model Study Design and Results

Cell Line Studied	MAb dose (mg/kg)	Dose Regimen	No. animals/group	% TGI*
ES-2	50	Start dosing Day 0	12	44.9% p= 0.045 Day 18
	PBS	Start dosing Day 0	12	NA
	50	Start dosing when tumors reach 100-150mm ³	12-15	47.6% p= 0.012 Day 21
	PBS	Start dosing when tumors reach 100-200mm ³	12-15	NA
A549	10	Start dosing when tumors reach 100mm ³	15	67.5% p= <0.001 Day 34
	30	Start dosing when tumors reach 100mm ³	15	82.2% p= <0.001 Day 34
	100	Start dosing when tumors reach 100mm ³	15	80.4% p= <0.001 Day 34
	PBS	Start dosing when tumors reach 100mm ³	15	NA

*TGI = tumor growth inhibition vs. PBS control group.

[00199] As shown in Figure 1, a subset of SPL1 treated A549 tumor xenografts was found to re-grow slowly after cessation of dosing, with tumor re-growth defined as an increase in volume of two-fold or more after cessation of dosing. 7 out of 16 mice in the 100 mg/kg treatment group had tumor regrowth, while 9 out of 16 mice in the 100 mg/kg treatment group remained tumor free after

95

cessation of dosing. Similarly, 3 out of 15 mice in the 30 mg/kg treatment group had tumor regrowth, while 12/15 mice in the 30 mg/kg remained tumor free after cessation of dosing. The graphed results in Figure 1 after the "stop dosing" point represent only the tumor size from mice that had tumor regrowth.

[00200] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application. All publications, patents and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent or patent application were specifically and individually indicated to be so incorporated by reference.

We claim:

1. A substantially purified immunoglobulin or an antigen-binding fragment thereof that is SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40.
2. A substantially purified immunoglobulin or an antigen-binding fragment thereof, that specifically binds to EphA2, and has at least one of the following characteristics of SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40:
 - a. the ability to bind to EphA2 on a cancer cell;
 - b. the ability to bind to a portion of EphA2 that is exposed on the surface of a living cancer cell *in vitro* or *in vivo*;
 - c. the ability to impede proliferation of tumor cells without increasing the phosphotyrosine content of EphA2;
 - d. the ability to deliver a therapeutic agent or detectable marker to a cancer cell expressing EphA2; and
 - e. the ability to deliver a therapeutic agent or detectable marker into a cancer cell expressing EphA2.
3. An isolated nucleic acid sequence coding for the immunoglobulin or antigen-binding fragment thereof of claim 1.
4. The nucleic acid of claim 3, wherein the nucleic acid is operably linked to a promoter.
5. The nucleic acid of claim 4, wherein the promoter and the nucleic acid are contained in an expression vector.
6. The nucleic acid of claim 3, wherein the immunoglobulin is a monoclonal antibody.
7. A cell line transfected, transformed, or infected with a vector containing a nucleic acid of claim 3.

8. A method for producing a substantially purified immunoglobulin, or an antigen binding fragment thereof, comprising the steps of:
 - a. Growing a cell line transformed with the nucleic acid of claim 3 under conditions in which the immunoglobulin or antigen binding fragment is expressed; and
 - b. Harvesting the expressed immunoglobulin or fragment.
9. The method of claim 8, wherein the cell line is a hybridoma.
10. The method of claim 9, wherein the hybridoma is ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, or PTA-6059, or the hybridoma SG3.15B4.1F9.
11. The method of claim 8, wherein the immunoglobulin is a monoclonal antibody.
12. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective dose of the purified immunoglobulin or antigen-binding fragment of claim 1, together with a pharmaceutically acceptable carrier.
13. A hybridoma deposited with the American Type Culture Collection having accession number PTA-5070, PTA-6056, or PTA-6059, or the hybridoma SG3.15B4.1F9 (PTA-XXXX).
14. An antibody that is produced by a hybridoma deposited with the American Type Culture Collection having accession number PTA-5070, PTA-6056, or PTA-6059, or the hybridoma SG3.15B4.1F9 (PTA-XXXX).
15. The immunoglobulin or antigen-binding fragment thereof of claim 1 that is humanized.
16. The immunoglobulin or antigen-binding fragment thereof of claim 1 that is chimerized.



17. The immunoglobulin or antigen-binding fragment thereof of claim 1 that is a human antibody.
18. The immunoglobulin or antigen-binding fragment thereof of claim 1 that is a derivative.
19. The pharmaceutical composition of claim 12 wherein said purified immunoglobulin or antigen-binding fragment is LUCA19, LUCA40, SG5 or SPL1.
20. The pharmaceutical composition of claim 12 wherein the purified immunoglobulin or antigen-binding fragment competes for binding to EphA2 with LUCA19, LUCA40, SG5 or SPL1.
21. The pharmaceutical composition of claim 12 wherein the purified immunoglobulin or antigen-binding fragment is humanized.
22. The pharmaceutical composition of claim 12 wherein the purified immunoglobulin or antigen-binding fragment is chimerized.
23. A method of treating cancer in a patient in need thereof, said method comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of an EphA2 antibody that specifically binds to EphA2, and has at least one of the following characteristics of SPL1, LUCA19, SG5 or LUCA40:
 - a. the ability to bind to EphA2 on a cancer cell;
 - b. the ability to bind to a portion of EphA2 that is exposed on the surface of a living cancer cell *in vitro* or *in vivo*;
 - c. the ability to impede proliferation of tumor cells without increasing the phosphotyrosine content of EphA2;
 - d. the ability to deliver a therapeutic agent or detectable marker to a cancer cell expressing EphA2; and
 - e. the ability to deliver a therapeutic agent or detectable marker into a cancer cell expressing EphA2.

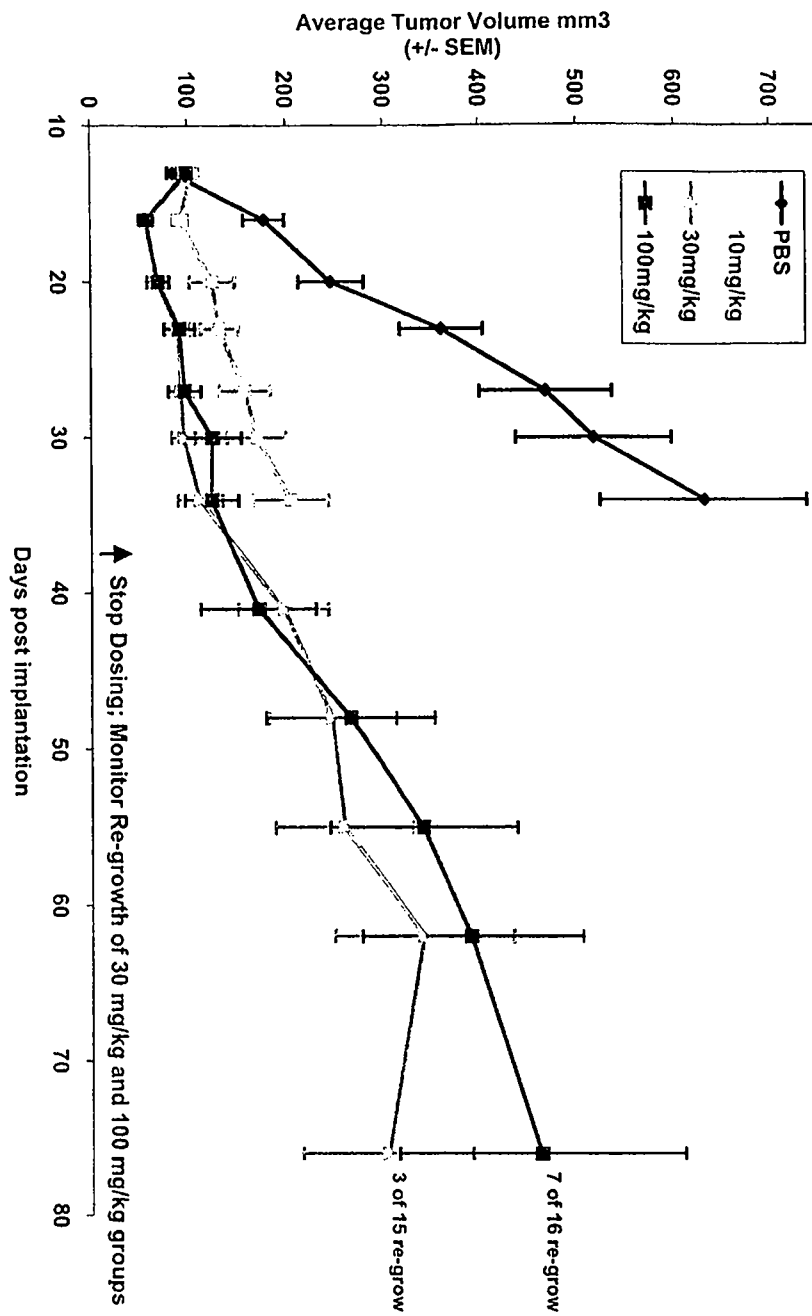


FIGURE 1

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 August 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/084226 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/00 (2006.01) **C07H 21/04** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **C12N 5/06** (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01) **C07H 21/02** (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/004057

(22) International Filing Date: 6 February 2006 (06.02.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/650,047 4 February 2005 (04.02.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC.** [US/US]; Britannia Oyster Point, 1140 Veterans Blvd., South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MATHER, Jennie, P.** [US/US]; 269 La Prenda Drive, Millbrae, California 94030 (US). **ROBERTS, Penelope, E.** [US/US]; 269 La Prenda Drive, Millbrae, California 94030 (US).

(74) Agents: **ZHOU, Jie** et al.; Morrison & Foerster LLP, 755 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304-1018 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:

30 November 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTIBODIES THAT BIND TO EPHA2 AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: Provided herein is disclosure about the development and characterization of an antibody that binds to antigen EphA2 which is present on a variety of human cancers from breast, lung, prostate, and colons. Methods of diagnosing and treating various cancers by using such antibodies directed against this antigen are also disclosed.

WO 2006/084226 A3

al

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/04057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: C07K 16/00(2006.01);A61K 39/395(2006.01);C12P 21/04(2006.01);C12N 5/16(2006.01);C07H 21/04(2006.01)
C12N 5/06(2006.01);C07H 21/02(2006.01)

USPC: 530/387.1;424/130.1;435/69.7,326;536/23.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 530/387.1; 424/130.1; 435/69.7,326; 536/23.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
STN DATABASE(medline, cancerlit, biosis, confsci, scisearch, embase, caplus, uspatfull, pctfull), WEST, PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARLES-KINCH et al Antibody Targeting of the EphA2 Tyrosine Kinase Inhibits Malignant Cell Behavior. Cancer Res. May 2002, Vol. 62, No. 10, pages 2840-2847.	1-23
A	LANDEN et al EphA2 as a Target for Ovarian Cancer Therapy. Expert Opin. Ther. Targets. December 2005, Vol. 9, No. 6, pages 1179-1187.	1-23
A	COFFMAN et al Differential EphA2 epitope display on normal versus malignant cells. Cancer Res. November 2003, Vol. 63, No. 22, pages 7907-7912.	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

24 July 2006 (24.07.2006)

Date of mailing of the international search report

17 AUG 2006

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT. Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized official

Christopher H. Yáen

Telephone No. 571-272-0600

92

ANTICUERPOS QUE LIGAN AL EPHA2 Y SUS MÉTODOS DE USOCAMPO TÉCNICO

[0001] Esta invención está en el campo de la biología y de la inmunoterapia. Más específicamente, se relaciona con el descubrimiento de una familia de anticuerpos que ligan al EPHA2. La invención suministra adicionalmente el diagnóstico y/o el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas y cánceres asociados con el EPHA2 utilizando la familia de anticuerpos anti- EPHA2

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Adicionalmente a sus cursos conocidos en diagnósticos, los anticuerpos han mostrado se útiles como agentes terapéuticos. Por ejemplo, la inmunoterapia, o el uso de anticuerpos para propósitos terapéuticos ha sido usado en años recientes para tratar el cáncer. La inmunoterapia pasiva involucra el uso de anticuerpos monoclonales en tratamientos de cáncer. Ve por ejemplo, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, sexta edición (2001) capítulo 20 páginas 495-508. Estos anticuerpos pueden tener una actividad biológica terapéutica inherente tanto mediante dirigir la inhibición

del crecimiento celular del tumor o la supervivencia y por su habilidad para reclutar la actividad natural de las células para matar del sistema inmune del cuerpo. Estos agentes pueden ser administrados solos o en conjunto con radiación o agentes quimioterapéuticos. Rituximab y Trastuzumab, aprobados para el tratamiento del linfoma no Hodgkin y el cáncer de pecho, respectivamente, son dos ejemplos de tales terapéuticos. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser usados para hacer conjugados de anticuerpo en donde el anticuerpo esta ligado a un agente tóxico y se dirige ese agente al tumor mediante ligar específicamente al tumor. Gemtuzumab ozogamicina es un ejemplo de un conjugado de anticuerpo aprobado usado para el tratamiento de la leucemia. Los anticuerpos monoclonales que se ligan a las células de cáncer y tienen usos potenciales para el diagnóstico y la terapia han sido descritos en publicaciones. Ver, por ejemplo, las siguientes solicitudes de patente que describen, *inter alia*, algunos pesos moleculares de proteínas objetivo: la Patente Estadounidense número 6, 054, 561 (c-erbB-2 (Her2) de 200 KD), y otros antígenos conocidos entre 40 a 200 KD en tamaño) y la patente Estadounidense número 5, 656, 444 (proteína oncofetal de 50 KD y de 55 KD). Ejemplos de anticuerpos en ensayos clínicos y/o aprobados para el tratamiento de tumores sólidos incluye: Trastuzumab

94

(antígeno: HER2/neu de 180 KD), Edrecolomab (antígeno: Ep-CAM de 40 a 50 KD), glóbulos de grasa de leche antihumana (HMFG1) (antígeno > 200 KD, HMW Mucin), Cetuximab (antígenos: de 150 KD y 170 KD, receptor de EGF), Alemtuzumab (antígeno: 21 a 28 KD, CD52), y Rituximab (antígeno: 35 KD CD20).

[0003] Los antígenos objetivos del trastuzumab (receptor de Hr-2), que es usado para tratar el cáncer de pecho, y el cetuximab (receptor de EGF), los cuales están en ensayos clínicos para el tratamiento de diversos cánceres están presentes en algún nivel detectable en gran número de tejidos de humano adulto normales incluyendo la piel, el colon, pulmones, ovarios, hígado, y páncreas. El margen de seguridad al usar estos terapéuticos está posiblemente suministrado por la diferencia en el nivel de expresión o en el acceso de o la actividad del anticuerpo de sus sitios.

[0004] Otro tipo de inmunoterapia es la inmunoterapia activa, o vacunación, con un antígeno presente sobre un cáncer específico o una construcción de ADN que dirige la expresión del antígeno, la que entonces evoca la respuesta inmune en el individuo, es decir, inducir al individuo a producir activamente anticuerpos contra su propio cáncer. La

inmunización activa no ha sido usada tan frecuentemente como la inmunoterapia pasiva o las inmunotoxinas.

[0005] Diversos modelos de progresión de enfermedad (incluyendo el cáncer) se ha sugerido. Las teorías varían desde la causación por una infección única / evento de transformación hasta la evolución de un tipo de tejido "similar a enfermedad" o "similar a cáncer" en ultimas a uno con capacidad patogénica o maligna completa. Alguna discusión con el cáncer, por ejemplo, un evento mutacional único es suficiente para causar la malignidad, mientras que otros arguyen que las alteraciones subsecuentes son también necesarias. Algunos otros han sugerido que incrementando la carga mutacional y el grado de tumor son necesarios tanto para la iniciación lo mismo que la progresión de la neoplasia mediante eventos de mutación- selección continuos a nivel celular. Algunos objetivos de cáncer se han encontrado solamente en tejidos de tumor, mientras que otros están presentes en tejidos normales y son reguladores y/o sobre expresores en tejidos de tumor. En tales situaciones, algunos investigadores han sugerido que la sobre expresión está ligada a la adquisición de la malignidad, mientras que otros sugieren que la sobre expresión es meramente un marcador de

46

una tendencia a lo largo de un trayecto hacia un estado de enfermedad incremental.

[0006] Un aspecto requerido para el diagnóstico ideal y/o el anticuerpo terapéutico es el descubrimiento y caracterización de un antígeno que está asociado con una variedad de cánceres. Existen pocos antígenos que son expresados sobre un número de tipos de cáncer (por ejemplo, el antígeno "pan-cáncer") que tiene expresión limitada sobre células no cancerosas. El aislamiento y purificación de tal antígeno sería útil para hacer anticuerpos (por ejemplo, diagnóstico y terapéuticos) que objetiven el antígeno. Un anticuerpo que liga al antígeno "pan-cáncer" Podría ser capaz de objetivar una variedad de cánceres encontrados en diferentes tejidos en contraste a un anticuerpo contra un antígeno asociado con solamente un tipo específico de cáncer. El antígeno sería útil también para el descubrimiento de drogas (por ejemplo moléculas pequeñas) y para la caracterización adicional de la regulación, crecimiento y diferenciación celular.

[0007] Lo que se necesita son objetivos novedosos sobre la superficie de células enfermas y/o de cáncer que puedan ser usados para tratar tales enfermedades y/o cánceres con anticuerpos y otros agentes que reconozcan específicamente

los objetivos de superficie celular. Existe una necesidad adicional, con base en los descubrimientos descritos aquí, para anticuerpos novedosos y otros agentes que reconozcan específicamente objetivos sobre la superficie de las células que puedan modular, sea mediante reducir o promover, las actividades promotoras de la enfermedad del EPHA2.

[0008] El EPHA2, previamente conocido como ECK, es una tiroxina quinasa receptor de transmembrana de 130 KD que es expresada sobre células epiteliales adultas. Ver Lindberg, et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 6316-6324. La EPHA2 es un miembro de la familia EPH de tiroxina quinasas receptoras, que son únicos en que ellos reconocen los ligandos, conocidos como efrinas, que son anclados a la membrana de células adyacentes. Ver Bartley, et al. (1994) *Nature* 368: 558-560. La secuencia del receptor humano del EPHA2 es conocida en la literatura. Esta involucra un dominio extra celular de 534 aminoácidos, un dominio transmembrana de 24 aminoácidos, y un dominio citoplásmico de 418 aminoácidos que contienen el dominio de la tirosina quinasa.

[0009] El EPHA2 está sobre expresado en un gran número de células de cáncer, por ejemplo, en el pecho, la próstata, el pulmón, y los carcinomas de colon, y en melanomas agresivos,

pero se ha reportado que no está sobre expresado en lesiones no cancerosas de estos mismos tejidos. Ver, por ejemplo, Rosenberg, et al. (1997) *Am. J. Physiol.* 273: G824-G832; Easty et al., (1995) *Int. J. Cancer* 60: 129-136; Walter-Daniels. Et al. (1999) *Prostate* 41: 275-280; Zantek et al. (1999) *Cell Growth & Differ.* 10: 629-638; Zantek et al. (2001) *Clin. Cancer Res.* 7: 3640-3648; Zelniski et al. (2001) *Cancer Res.* 61: 2301-2306; WO 01/121172; y WO 01/ 12840. Más aún, las células que han sido transformadas para sobre expresar el EPHA2 demuestran un crecimiento maligno y un enlazado al ligando, lo que causa que el EPHA2 sea internalizado y degradado, e invierta el efecto oncogénico de la sobre expresión del EPHA2. Ver Zelniski et al. (2001) *Cancer Res.* 61: 2301-2306; y Walker- Daniels, et al. (2002). *Mol. Cancer Res* 1: 79-87.

[0010] Usar el EPHA2 como un objetivo terapéutico ha sido propuesto por otros en la técnica. Un autor sugirió usar ligandos de EPHA2 tal como una fusión de la efrina A1 a la inmunoglobulina G humana. La exposición de células que expresan el EPHA2 a la proteína de fusión efrina A1- FC resultó en una subregulación de la expresión de EPHA2. Ver Duxbury, et al. (2004) *BBRC* 320 1096-1102.

[0011] Los anticuerpos para eck/ EPHA2 son conocidos, ver por ejemplo, Lindberg, et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 6316-6324. El uso de los anticuerpos anti- EPHA2 que usan objetivado con base en anticuerpo han sido descritos por otros, ver por ejemplo, Charles-Kinch et al. (2002) *Cancer Res.* 62:2840-2847, que describe usar el dominio extracelular del EPHA2 fusionado a la inmunoglobulina humana para generar anticuerpos monoclonales contra el EPHA2. El tratamiento de células cancerosas con estos anticuerpos monoclonales anti- EPHA2 resultó en cambios morfológicos y en la inhibición del crecimiento celular sobre agar suave.

[0012] Los anticuerpos para el EPHA2 han sido hechos y propuestos como útiles en el tratamiento de cáncer (ver por ejemplo. Patente Estadounidense 6, 997, 203; publicación de Patente Internacional números WO 01/12840 y WO 01/12172; la solicitud de Patente provisional Estadounidenses números 60/379, 322 y 60/ 379, 368; la Patente Estadounidense 5, 824, 303). La WO 2003 US 15044 describe métodos que comprende la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo que liga al EPHA2 y agoniza al EPHA2, incrementando así la fosforilación del EPHA2 y disminuyendo los niveles de EPHA2. En otras modalidades, esa solicitud describe la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo que

liga al EPHA2 e inhibe la formación de colonias de células cancerosas en agar suave, inhibe la formación de redes tubulares en membranas de base tridimensional o preparación de matriz extracelular, preferencialmente se liga a un epítipo del EPHA2 que está expuesto sobre las células de cáncer pero no sobre células que no tengan cáncer, y/o tiene un bajo crecimiento de célula tumoral de inhibición tipo Koff, por lo tanto y/o una metástasis. La Patente Estadounidense 6, 927, 203 describe anticuerpos que impiden la proliferación de células de tumor que utiliza un anticuerpo que incrementa el contenido de fosfotirosina del EPHA2.

[0013] La solicitud de Patente PCT WO 2003 91383 describe péptidos derivados del EPHA2 y su uso en la inmunoterapia anti tumor. Esta describe la vacunación por péptido o la inmunoterapia con base en un epítipo de EPHA2 que puede ser utilizado para inducir o imitar una respuesta a la célula linfocito T citotóxica a la células tumorales que sobre expresan el EPHA2.

[0014] Aunque los anticuerpos EPHA2 son conocidos, permanece una necesidad para anticuerpos particulares anti- EPHA2 que sean extremadamente efectivos en inhibir el crecimiento de

células de tumor, más allá del nivel de efectividad mostrado por los anticuerpos EPHA2 mostrados en el estado de la técnica.

[0015] Todas las referencias, publicaciones, y solicitudes de patente descritas se incorporan como referencia en su totalidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0016] La invención descrita aquí se relaciona con anticuerpos que se ligan a un antígeno, EPHA2, que es expresado sobre una variedad de cánceres humanos. De acuerdo a lo anterior, en un aspecto, la invención es una familia de anticuerpos, o un anticuerpo o un poli péptido (que puede o no ser un anticuerpo) que se liga preferencialmente al antígeno EPHA2. Los anticuerpos reclamados en la presente invención son sorprendentemente y muy efectivos para inhibir el crecimiento de células de tumos, más allá del nivel o de efectividad mostrado por los anticuerpos EPHA2 mostrados en el estado de la técnica. Algunos de estos anticuerpos se han llamado aquí como LUCA19, SPL1; 1UCA40, o SG5. En aspectos de esta invención, ciertos anticuerpos han sido descubiertos que pueden tener la habilidad de impedir la proliferación de

102

células de tumor mientras que no se incrementa el contenido de fosfotirosina del EPFA2.

[0017] En otro aspecto, la invención es un anticuerpo monoclonal anti- EPFA2 que es producido por cualquier uno de las siguientes líneas de células anfitrionas: PTA-5070 depositada en Marzo 20, 2003 en el American Type Culture Collection, PTA-6056 depositada en Junio 8, 2004 en el American Type Culture Collection, PTA-6059 depositada en Junio 8, 2004 en el American Type Culture Collection, y una línea celular anfitriona que produce SG5 (SG. 3. 15. B4. 1F9) que fue depositada en el American Type Culture Collection, en Febrero 2, de 2006.

[0018] En otro aspecto, la invención es un anticuerpo o un poli péptido (que puede o no ser un anticuerpo) que inhibe competitivamente el ligado específico del anticuerpo anti- EPFA2 al EPFA2. En otro aspecto, la invención es un anticuerpo o un poli péptido (que puede o no ser un anticuerpo) que se liga preferencialmente al mismo epítipo sobre el EPFA2 como se liga preferencialmente LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40.

[0019] En otro aspecto, la invención es un anticuerpo que comprende un fragmento o una región del anticuerpo anti-EPHA2. En una modalidad, el fragmento es una cadena ligera o liviana del anticuerpo anti-EPHA2. En otra modalidad, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo anti-EPHA2. Todavía en otra modalidad, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena liviana y/o de una cadena pesada del anticuerpo anti-EPHA2. Todavía en otra modalidad, el fragmento contiene uno o más regiones que determinan la complementariedad (CDR) de una cadena liviana y/o una cadena pesada del anticuerpo anti-EPHA2.

[0020] En otro aspecto, la invención suministra polipéptidos (que pueden o no ser anticuerpos) que comprenden cualquiera de los siguientes: a) uno o más CDR; b) tres CDR de la cadena liviana; c) tres CDR de la cadena pesada; d) tres CDR de la cadena liviana y tres CDR de la cadena pesada; e) la región variable de la cadena liviana; f) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-EPHA2.

[0021] En otro aspecto, la invención es un anticuerpo humanizado derivado de LUCA19, SPL1, SG5, o LUCA40. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado comprende uno o más CDR del anticuerpo anti-EPHA2. En otro aspecto, la

invención suministra un anticuerpo humanizado que se liga al mismo o epítomos que en el anticuerpos anti- EPHA2. Generalmente, un anticuerpo humanizado de la invención comprende uno o más (1, 2, 3, 4, 5, 6) CDR que son iguales y/o derivados de los CDR del anticuerpo anti- EPHA2, En otro aspecto, la invención suministra un anticuerpo humano que se liga al mismo o mismos epítomos sobre el EPHA2 que lo hace el anticuerpo anti- EPHA2.

[0022] En otro aspecto, la invención es un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables derivadas de las regiones variables de una cadena pesada y de una cadena liviana de el anticuerpo anti- EPHA2 y regiones constantes derivadas de las regiones constantes de una cadena pesada y de una cadena liviana de una anticuerpo humano.

[0023] Todavía en otro aspecto, la invención es una célula anfitriona (ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, PTA-6059, o SG. 3. 15. B4. 1F9 (ATCC No. PTA-XXXX)) o la progenie de ellos que producen anticuerpo monoclonal anti- EPHA2.

[0024] En otro aspecto, la invención es un polinucleótido aislado que codifica para el anticuerpo anti- EPHA2 que es producido mediante una célula anfitriona con un número de

105

depósito de ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, o PTA-6059, o una célula anfitriona SG. 3. 15. B4. 1F9 (ATCC No. PTA-XXXX)) o su progenie. En otro aspecto, la invención suministra polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) Lo mismo que cualquiera de otros poli péptidos descritos aquí.

[0025] En otro aspecto, la invención es un complejo de EPHA2 ligado mediante cualquiera del anticuerpo o poli péptido descritos aquí. En algunas modalidades el EPHA2 está presente en células de melanomas de cáncer de pecho, colon, de pulmón, o de próstata. En algunas modalidades, la invención es un complejo de EPHA2 ligado mediante el anticuerpo anti- EPHA2 o un anticuerpo que se liga preferencialmente al epítipo al cual el anticuerpo anti- EPHA2 se liga preferencialmente. En una modalidad, el anticuerpo anti- EPHA2 o cualquier anticuerpo que se liga preferencialmente al epítipo al cual se liga el anticuerpo anti- EPHA2 preferiblemente está ligado a un agente terapéutico (tal como una toxina).

[0026] En otro aspecto, la invención es un complejo de una célula de cáncer que expresa el EPHA2 ligado mediante cualquiera del anticuerpo o poli péptido descritos aquí. En algunas modalidades, la célula de cáncer es melanomas,

células de pecho, colon, pulmón, o próstata. En algunas modalidades, el anticuerpo es SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40 o cualquier anticuerpo que se ligue preferencialmente a un epítopo de cualquiera de estos anticuerpos anti- EPHA2 se liga preferencialmente. En algunas modalidades, SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40 o cualquier anticuerpo que se ligue preferencialmente a un epítopo de cualquiera de estos anticuerpos anti- EPHA2 se liga preferencialmente está vinculado a un agente terapéutico (tal como una toxina).

[0027] En otro aspecto, la invención es un complejo de un epítopo sobre el EPHA2 que el SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40 preferiblemente liga, el que a su vez se liga con cualquiera de los anticuerpos o poli péptidos descritos aquí. En algunas modalidades, el epítopo es sobre células de cáncer de melanomas, pecho, colon, pulmón o próstata. En algunas modalidades, el anticuerpo es SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40 o cualquier anticuerpo que se ligue preferencialmente a un epítopo al cual cualquiera de estos anticuerpos anti- EPHA2 se liga preferencialmente. En algunas modalidades, SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40 o cualquier anticuerpo que se ligue preferencialmente a un epítopo en el cual cualquiera de estos anticuerpos anti- EPHA2 se liga preferencialmente está ligado a un agente terapéutico (tal como una toxina).

[0028] En otro aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los poli péptidos (incluyendo cualquiera de los poli péptidos tal como el anticuerpo anti- EPHA2) o los poli nucleótidos descritos aquí, tal como las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti- EPHA2, el anticuerpo anti- EPHA2 ligado a un agente terapéutico, un anticuerpo que comprende un fragmento del anticuerpo anti. EPHA2, un anticuerpo humanizado del anticuerpo anti.- EPHA2, un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables derivadas de las regiones variables del anticuerpo anti- EPHA2 y regiones constantes derivadas de las regiones constantes de un anticuerpo humano, o un anticuerpo humano con uno o más propiedades del anticuerpo anti- EPHA2, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0029] Todavía en otro aspecto, la invención es un método para generar un anticuerpo monoclonal anti- EPHA2 que reacciona con células enfermas y/o cancerosas que comprende las etapas de: a) inmunizar un mamífero anfitrión con un inmunogén; b) obtener linfocitos del mamífero; c) fundir los linfocitos; con una línea de células de mieloma para producir un hibridoma; d) Cultivar el hibridoma de © para producir

129

anticuerpos monoclonales; y e) tamizar los anticuerpos para seleccionar solamente aquellos anticuerpos que se ligan a las células enfermas y/o cancerosas o a las líneas celulares enfermas y/o cancerosas pero que no se ligan a células no cancerosas o normales o líneas de células no cancerosas o normales, o se liga a células normales a un nivel inferior o a de una manera diferente.

[0030] En otro aspecto, la invención es un método para generar un anticuerpo de la familia anti- EPHA2 que comprende cultivar una célula anfitriona que codifica tal anticuerpo o progenie del mismo bajo condiciones que permitan la producción del anticuerpo, y purificar el anticuerpo anti- EPHA2.

[0031] En otro aspecto, la invención es un método para generar un anticuerpo de la familia anti- EPHA2 que comprende cultivar una célula anfitriona o progenie de ella bajo condiciones que permitan la producción del anticuerpo, y purificar el anticuerpo anti- EPHA2.

[0032] En otro aspecto, la invención suministra métodos para generar cualquiera de los anticuerpos (o poli péptido) descritos aquí mediante expresar uno o más polinucleótidos

109

que codifican el anticuerpo (que pueden ser expresados separadamente como una cadena liviana o pesada única, o ambas una cadena liviana y pesada expresadas de un vector) en una célula adecuada generalmente seguido por la recuperación y/o aislamiento del anticuerpo o poli péptidos de interés.

[0033] En otro aspecto, la invención es un anticuerpo anti-EPHA2 o un poli péptido (que puede ser o no un anticuerpo) que inhiba competitivamente el ligado preferencial de un anticuerpo anti- EPHA2 al EPHA2. En algunas modalidades, la invención es un anticuerpo o un poli péptido (que puede o no ser un anticuerpo) que se liga preferencialmente al mismo epítipo o a diferentes epítipos sobre el EPHA2 como lo hacen otros anticuerpos anti- EPHA2.

[0034] En todavía otro aspecto, la invención es una composición que comprende el EPHA2 ligado por un anticuerpo específico para un epítipo de EPHA2. En una modalidad, el anticuerpo es anti- EPHA2. En otras modalidades, dos o más anticuerpos anti- EPHA2 son administrados, con tales anticuerpos mapeando dos o más epítipos diferentes de EPHA2. En algunas modalidades, el anticuerpo anti- EPHA2 está ligado a un agente terapéutico o a una etiqueta detectable.

[0035] En otro aspecto, la invención es un anticuerpo que comprende un fragmento o una región de un anticuerpo anti-EPHA2. En una modalidad, el fragmento es una cadena liviana del anticuerpo. En otra modalidad el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo. Todavía en otra modalidad, el fragmento contiene uno o más regiones variables de una cadena liviana y/o de una cadena pesada del anticuerpo. Todavía en otra modalidad, el fragmento contiene una o más regiones que determinan la complementariedad (CDR) de una cadena liviana y/o una cadena pesada del anticuerpo.

[0036] En otro aspecto, la invención suministra polipéptidos (que pueden o no ser anticuerpos) que comprenden cualquiera de los siguientes: a) uno o más CDR (o fragmentos de ellos) de la cadena liviana o pesada; b) tres CDR de la cadena liviana; c) tres CDR de la cadena pesada; d) tres CDR de la cadena liviana y tres CDR de la cadena pesada; e) la región variable de la cadena liviana; f) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti- EPHA2.

[0037] En otro aspecto, la invención es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado comprende uno o más CDR de un anticuerpo Anti- EPHA2 no humano. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado se

111

liga al mismo o a diferentes epítomos como otros anticuerpos anti- EPHA2. Generalmente, un anticuerpo humanizado de la invención comprende uno o más (1, 2, 3, 4, 5, 6 o fragmentos de ellos) CDR que son iguales y/o derivados de los CDR del anticuerpo anti- EPHA2 no humano original. En algunas modalidades, el anticuerpo humano se liga al mismo o a diferentes epítomos como otros anticuerpos anti- EPHA2. En otro aspecto, la invención es un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables derivadas de las regiones variables de una cadena pesada y de una cadena liviana de un anticuerpo anti- EPHA2 no humano y regiones constantes derivadas de las regiones constantes de una cadena pesada y de una cadena liviana de un anticuerpo humano.

[0038] En otro aspecto, la invención es un polinucleótido aislado que codifica cualquiera uno de los anticuerpos SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40 que es producido mediante una célula anfitriona con un número de depósito de ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, o PTA-6059, respectivamente y la célula anfitriona SG. 3. 15. B4. 1F9 (ATCC No. PTA-XXXX) o su progenie. Esta invención involucra polipéptido de anticuerpo que tienen el actividades de ligado o biológicas inherentes de cualquiera de los anticuerpos anteriormente especificados. En otro aspecto la invención suministra polinucleótidos que codifican

cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) Lo mismo que cualquiera de otros poli péptidos descritos aquí.

[0039] En otro aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los poli péptidos (incluyendo cualquiera de los anticuerpos descritos aquí) o polinucleótidos descritos aquí, tal como composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti- EPHA2 ligado a un agente quimioterapéutico, un anticuerpo que comprende un fragmento de un anticuerpo anti- EPHA2, un anticuerpo humanizado de un anticuerpo anti- EPHA2 no humano, un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables derivadas de las regiones variables de un anticuerpo anti- EPHA2 no humano y secciones constantes derivadas de las regiones constantes de un anticuerpo humano, o un anticuerpo humano con una o más propiedades de un anticuerpo anti- EPHA2 no humano, o cualquiera del anticuerpo anti- EPHA2 descrito aquí ligado a un agente quimioterapéutico (tal como una parte radioactiva), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0040] En un aspecto, la invención es una composición que comprende un anticuerpo anti- EPHA2 ligado al EPHA2 presentes en una célula enferma o cancerosa. En las modalidades

113

preferidas, la célula de cáncer es seleccionada del grupo que consiste de células de cáncer de ovario, pulmón, próstata, pancreático, colon, y pecho. En algunas modalidades, la célula de cáncer es aislada. En algunas modalidades, la célula de cáncer es una muestra biológica. Generalmente, la muestra biológica es de un individuo, tal como un humano.

[0041] En otro aspecto, la invención es un método para diagnosticar la enfermedad en un individuo mediante detectar EPHA2 en células del individuo, particularmente enfermedades o desórdenes asociados con respuestas inflamatorias o auto inmunes en individuos. En otros aspectos de la invención, los métodos son suministrados para modular las respuestas inflamatorias y auto inmunes en individuos. Las enfermedades y condiciones resultantes de los desórdenes de inflamación y auto inmune que puedan ser sujetos a tratamiento utilizando las composiciones y métodos de la invención incluyen. Como vía de ilustración y no como limitación, esclerosis múltiple, meningitis, encefalitis, infarto, otros traumas cerebrales, enfermedad inflamatoria del intestino incluyendo colitis ulcerativa y enfermedad de Chron, miastenia gravis, lupus, artritis reumatoide, asma, diabetes establecida juvenil aguda. Sida, demencia, aterosclerosis, nefritis, retinitis,

114

dermatitis atópica, soriasis, isquemia miocárdial y daño pulmonar mediado por leucocitos agudos.

[0042] Todavía otras indicaciones para el uso terapéutico de los anticuerpos y otros agentes terapéuticos de la invención incluyen la administración a individuos en el riesgo de rechazo de órganos o injertos. Durante años recientes ha habido una considerable mejora en la eficiencia de las técnicas quirúrgicas para el trasplante de tejidos y órganos tales como piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Quizás los problemas principales más destacados es la carencia de agentes satisfactorios para inducir inmunotolerancia en el receptor con efecto al injerto u órgano trasplantado. Cuando las células alogénicas u órganos son trasplantados en un anfitrión (es decir el donante y el receptor son individuos diferentes de las mismas especies), el sistema inmune anfitrión similar en montaje de una respuesta inmune a antígenos extraños en el trasplante (anfitrión contra enfermedad de injerto) llevando a la destrucción del tejido trasplantado.

[0043] En otro aspecto, la invención es un método para diagnosticar si un individuo tiene cáncer, que comprende determinar si existe expresión de EPHA2 en células

115

seleccionadas del individuo, en donde la expresión de EPHA2 en dichas células es un indicativo de dicho cáncer. En algunas modalidades, la expresión del EPHA2 esta determinada utilizando un anticuerpo anti- EPHA2. En algunas modalidades, el método involucra detectar el nivel de expresión de EPHA2 de las células. El término "detección" como se utiliza aquí incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia o un control.

[0044] En todavía otro aspecto, la invención es un método de diagnóstico del cáncer en un individuo mediante detectar el EPHA2 liberado de células del individuo, en donde el cáncer es seleccionado del grupo que incluye pero no se limita a tumores de glándula adrenal, cánceres asociados con el SIDA, sarcoma de la parte suave alveolar, tumores astrocíticos, cáncer de vejiga (carcinoma de células escamosas y carcinoma de célula transicional), cáncer de hueso (adamantinoma, cistos de hueso aneurismal, osteocondroma, osteosarcoma), cánceres del cerebro y de la médula espinal, tumores metastáticos de cerebro, cáncer de pecho, tumores del cuerpo carótido, cáncer cervical, condrosarcoma, dordoma, carcinoma de célula renal cromófoba, carcinoma de célula clara, cáncer de colon, cáncer colorectal, histiocitomas fibrosos benignos cutáneos, tumores de células redondas pequeñas

desmoplásticas, ependimomas, tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extra esquelético, ossium imperfecta de fibrogenesis, displasia fibrosa del hueso, cánceres del ducto de la vejiga y de la bilis, enfermedad trofoblástica gestacional, tumores de las células germinales, cánceres de cabeza y cuello, tumores de células islet, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (nefroblastoma, carcinoma celular renal papilar), leucemias, tumores lipomatosos de lipoma/ benignos, liposarcoma / tumores lipomatosos malignos, cáncer de hígado (hepatoblastoma, carcinoma hepato celular), linfomas, cánceres de pulmón (carcinoma de célula pequeña), Adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula grande, etc.), meduloblastoma, melanoma, meningiomas, neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, cánceres de ovario, cánceres pancreáticos, carcinomas de tiroides papilaria, tumores paratiroides, cánceres pediátricos, tumores de la pantalla de nervios periférica, facromositoma, Tumores de pituitaria, cánceres de próstata, melanoma desvelada posterior, desórdenes hematológicos raros, cáncer metastático renal, tumor rabdoide, rabdomiosarcoma, sarcomas, cáncer de piel, sarcomas del tejido suave, cáncer de células escamosas, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, carcinoma tímico, timoma, cáncer

117

metastático de tiroides, y cánceres uterinos (carcinoma de la cerviz, carcinoma endometrial, y leiomioma).

[0045] En otro aspecto, la invención es un método para ayudar al diagnóstico del cáncer (tal como pero sin limitarse a cáncer de los ovarios, del pulmón, de la próstata, pancreático, del colon, o del pecho) en un individuo que comprende determinar la expresión del EPHA2 en una muestra biológica del individuo. En algunas modalidades, la expresión del EPHA2 está determinada utilizando un anticuerpo anti-EPHA2. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EPHA2 es un miembro de la familia específicamente nombrado aquí. En algunas modalidades, el método es detectar el nivel de la expresión de EPHA2 de las células.

[0046] Todavía en otro aspecto, la invención es un método para tratar el cáncer mediante administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo que se liga al EPHA2 suficiente para reducir el crecimiento de la célula cancerosa. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo anti-EPHA2. En ciertas modalidades, las células cancerosas son seleccionadas del grupo que incluye pero sin limitarse a tumores de glándula adrenal, cánceres asociados con el SIDA, sarcoma de la parte suave alveolar, tumores astrocíticos,

cáncer de vejiga (carcinoma de células escamosas y carcinoma de célula transicional), cáncer de hueso (adamantinoma, cistos de hueso aneurismal, osteocondroma, osteosarcoma), cánceres del cerebro y de la médula espinal, tumores metastáticos de cerebro, cáncer de pecho, tumores del cuerpo carótido, cáncer cervical, condrosarcoma, dordoma, carcinoma de célula renal cromófoba, carcinoma de célula clara, cáncer de colon, cáncer colorectal, histiocitomas fibrosos benignos cutáneos, tumores de células redondas pequeñas desmoplásticas, ependimomas, tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extra esquelético, ossium imperfecta de fibrogénesis, displasia fibrosa del hueso, cánceres del ducto de la vejiga y de la bilis, enfermedad trofoblástica gestacional, tumores de las células germen, cánceres de cabeza y cuello, tumores de células islet, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (nefroblastoma, carcinoma celular renal papilar), leucemias, tumores lipomatosos de lipoma/ benignos, liposarcoma / tumores lipomatosos malignos, cáncer de hígado (hepatoblastoma, carcinoma hepato celular), linfomas, cánceres de pulmón (carcinoma de célula pequeña), Adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula grande, etc.), meduloblastoma, melanoma, meningiomas, neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos,

cánceres de ovario, cánceres pancreáticos, carcinomas de tiroides papilaria, tumores paratiroides, cánceres pediátricos, tumores de la pantalla de nervios periférica, facromositoma, Tumores de pituitaria, cánceres de próstata, melanoma desvelada posterior, desórdenes hematológicos raros, cáncer metastático renal, tumor rabdoide, rabdomisarcoma, sarcomas, cáncer de piel, sarcomas del tejido suave, cáncer de células escamosas, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, carcinoma tímico, timoma, cáncer metastático de tiroides, y cánceres uterinos (carcinoma de la cerviz, carcinoma endometrial, y leiomioma). En ciertas modalidades preferidas, las células cancerosas son seleccionadas del grupo de tumores sólidos incluyendo pero sin limitarse a cáncer de pecho, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, sarcoma, cáncer metastático renal, cáncer metastático de tiroides, y carcinoma de células claras.

[0047] Todavía en otro aspecto, la invención es un método para retardar el desarrollo de la metástasis en un individuo que tiene cáncer que comprende administrar una cantidad efectiva de por lo menos uno de una familia de anticuerpos que se liga específicamente al EPHA2. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo anti- EPHA2. En otro aspecto, la

invención es un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células de cáncer in Vitro o en un individuo que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición que comprende un anticuerpo anti- EPHA2 asociado con (incluyendo ligado a) un agente quimioterapéutico al cultivo celular o a la muestra, o al individuo.

[0048] Todavía en otro aspecto, la invención es un método para suministrar un agente terapéutico a una célula cancerosa en un individuo mediante administrar al individuo una cantidad efectiva de por lo menos un miembro de una familia de anticuerpos, que ligan específicamente al EPHA2. En otras modalidades, un anticuerpo anti- EPHA2 es suministrado a un individuo en combinación con (incluyendo ligado a) otro agente terapéutico.

[0049] En algunas modalidades, el anticuerpo anti- EPHA2 es un anticuerpo humanizado derivado de un miembro de la familia de anticuerpos nombrada aquí (generalmente, pero no necesariamente, comprende uno o más CDR parciales o intactos del anticuerpo). En algunas modalidades, el anticuerpo anti- EPHA2 es un anticuerpo humano con una o más propiedades del miembro de la familia de anticuerpos nombrada. En algunas modalidades, el agente quimioterapéutico (tal como una toxina

o una molécula radioactiva) es suministrado dentro de las células cancerosas (es internalizado). En algunas modalidades, el agente es saporina.

[0050] En otro aspecto, la invención es un método de tratar cáncer en un individuo que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición que comprende un anticuerpo anti-EPHA2 asociado con (incluyendo ligado a) un agente quimioterapéutico al individuo).

[0051] La presente invención suministra adicionalmente métodos para modular, sea mediante mejorar o reducir, la asociación del EPHA2 con el socio de señalización citoplásmica. La asociación del EPHA2 con el socio de señalización citoplásmica puede ser impactado mediante poner en contacto una molécula de EPHA2 que presenta sobre una superficie de células, con una agente que modula el ligado del socio de señalización al EPHA2. Los agentes que bloquean o reducen la asociación de EPHA2 con sus socios de ligado y/o señalización puede ser utilizados para modular procesos biológicos y patológicos que se encuentran involucrados en las respuestas de inflamación o inmune mediadas por el EPHA2. Los procesos patológicos que involucran esta acción incluyen crecimiento celular asociado con tumores.



[0052] Los agentes pueden ser ensayados en cuanto a su habilidad para bloquear, reducir, mejorar o de otra manera modular la asociación del EPHA2 con su socio de ligado, tal como un anticuerpo anti- EPHA2. Específicamente, una agente puede ser ensayado en cuanto a la habilidad para modular iteración mediante incubar un péptido que comprende el sitio de interacción del EPHA2 (típicamente en su conformación nativa tal como existe sobre las células vivientes intactas) con un socio de ligado y un agente de ensayo, y determinar si el agente de ensayo reduce o mejora el ligado del socio ligado al péptido EPHA2. Agonistas, antagonistas, y otros moduladores son contemplados expresamente.

[0053] En ciertos aspectos, la invención es un método para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad en un individuo que comprende las etapas de (i) ensayar en cuanto a la presencia del EPHA2 en una muestra de sangre o de tejido obtenida de un individuo; (ii) detectar si dicha muestra tiene una cantidad incrementada de un marcador EPHA2 relativo a una muestra de sangre o tejido normal (no enferme y (iii) correlacionar una cantidad incrementada de dicho marcador a un diagnóstico positivo o correlacionar la ausencia de una cantidad incrementada de dicho marcador a un diagnóstico negativo para

la enfermedad. En ciertas modalidades, el marcador es detectado utilizando un anticuerpo anti- EPHA2. En ciertas modalidades, el método es efectuado mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste de producción de imágenes radio núcleos, citometría de flujo, e inmunohistoquímica.

[0054] En otro aspecto, la invención es un método para diagnosticar cáncer o cáncer metastático en un individuo mediante detectar EPHA2 en las células del individuo utilizando el anticuerpo anti- EPHA2 o cualquier parte de ligado del EPHA2 (poli péptidos, que incluyen, pero no se limitan a, diversos anticuerpos y derivados de anticuerpos) descritos aquí. En algunas modalidades, el cáncer es melanomas, de pecho, de colon, de pulmón y de próstata. En algunas modalidades, el método en detectar el nivel de EPHA2 de las células. La presencia del EPHA2 es detectada mediante detectar un complejo entre EPHA2 y una parte de ligado del EPHA2. El término "detección" como se utilizó aquí incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control.

[0055] En otro aspecto, la invención se un método para tratar el cáncer mediante administrar una cantidad efectiva de una composición que comprende el anticuerpo anti- EPHA2, o

124

cualquiera de los anticuerpos (incluyendo poli péptido) o polinucleótidos de las modalidades descritas aquí, incluyendo pero sin limitarse al anticuerpo anti- EPHA2 asociado con un agente terapéutico, un anticuerpo que comprende un fragmento o una región del anticuerpo anti- EPHA2, un anticuerpo humanizado (generalmente, pero no necesariamente, comprende uno o más CDR del anticuerpo anti- EPHA2), un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables derivadas de las regiones variables del anticuerpo anti- EPHA2 y regiones constantes derivadas de las regiones constantes de un anticuerpo humano, o un anticuerpo humano con una o más propiedades del anticuerpo anti- EPHA2, suficiente para reducir el crecimiento de células cancerosas. En algunas modalidades, el cáncer es melanomas, de pecho, de colon, de pulmón, o de próstata.

[0056] En ciertas modalidades, la invención es un método para tratar el cáncer en un paciente, dicho método comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo EPHA2 que liga específicamente al EPHA2, y tiene por lo menos uno, y preferiblemente dos o más, de las siguientes características de SP11, LUCA19, SG5, o LUCA40:

- a. la habilidad para ligar al EPHA2 en una célula de cáncer;
- b. la habilidad para ligar a una porción del EPHA2 que está expuesta sobre la superficie de una célula de cáncer viviente in Vitro o in Vivo;
- c. la habilidad para impedir la proliferación de células de tumor sin incrementar el contenido de fosfotirosina del EPHA2;
- d. la habilidad para suministrar un agente terapéutico o un marcador detectable a una célula de cáncer que expresa el EPHA2; y
- e. la habilidad para suministrar un agente terapéutico o marcador detectable dentro de una célula de cáncer que expresa el EPHA2.

[0057] En otro aspecto, la invención es un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células

cancerosas en un individuo mediante administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende el anticuerpo anti- EPHA2, o cualquiera de los anticuerpos (incluyendo poli péptidos) o modalidades de polinucleótidos descritas aquí, incluyendo pero sin limitarse a al anticuerpo anti- EPHA2 asociado con un agente terapéutico, un anticuerpo que comprende un fragmento o una región del anticuerpo anti- EPHA2, un anticuerpo humanizado (generalmente, pero no necesariamente, comprende uno o más CDR del anticuerpo anti- EPHA2), un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables derivadas de las regiones variables del anticuerpo anti- EPHA2 y regiones constantes derivadas de las regiones constantes de un anticuerpo humano, o un anticuerpo humano con una o más propiedades del anticuerpo EPHA2, suficiente para reducir el crecimiento de las células cancerosas. En algunas modalidades, el cáncer es melanomas de pecho, de colon, de pulmón, o de próstata.

[0058] En otro aspecto, la invención es un método para prevenir o retardar el desarrollo de la metástasis, tratar el cáncer metastático, o inhibir la proliferación de células de cáncer metastático en un individuo con cáncer mediante administrar una cantidad efectiva de una composición que comprende el anticuerpo anti- EPHA2, o cualquiera de los

anticuerpos (incluyendo poli péptidos) o modalidades de polinucleótidos descritos aquí, incluyendo pero sin limitarse a el anticuerpo anti- EPHA2 asociado con un agente terapéutico, un anticuerpo que comprende un fragmento o una región del anticuerpo anti- EPHA2 o un anticuerpo humanizado (generalmente, pero no necesariamente, comprende uno o más CDR del anticuerpo anti- EPHA2, un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables derivadas de las regiones variables del anticuerpo anti- EPHA2 y regiones constantes derivadas de las regiones constantes de un anticuerpo humano, o un anticuerpo humano con una o más propiedades del anticuerpo anti- EPHA2, suficiente para reducir el crecimiento de células cancerosas. En algunas modalidades, el cáncer es melanomas, de pecho, de colon, de pulmón, o de próstata.

[0059] En otro aspecto, la invención es un método para suministrar un agente terapéutico (tal como una toxina, o una molécula radiactiva) a células cancerosas en un individuo mediante administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo de ligado EPHA2 o cualquier parte de ligado del EPHA2 (poli péptidos, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos o derivados de anticuerpos) descritos aquí que son ligados a un agente terapéutico (tal como una toxina o

una molécula radiactiva). La parte de ligado del EPHA2 incluye, pero no se limita al anticuerpo anti- EPHA2, un anticuerpo que comprende un fragmento o una región del anticuerpo anti- EPHA2, o un anticuerpo humanizado (generalmente, pero no necesariamente, comprende una o más CDR del anticuerpo anti- EPHA2), un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables derivadas de las regiones variables del anticuerpo anti- EPHA2 y regiones constantes derivadas de las regiones constantes de un anticuerpo humano, o un anticuerpo humano con una o más propiedades del anticuerpo anti- EPHA2. En algunas modalidades, las células cancerosas son de melanomas, de pecho, de colon, de pulmón, o de próstata. En otra modalidad, el agente terapéutico (tal como una toxina o una molécula radiactiva) es suministrada dentro de las células cancerosas (es internalizado). De acuerdo a lo anterior, la invención suministra métodos para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células de cáncer tal que el agente terapéutico es suministrado dentro de aquellas células de cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0060] La Figura 1 muestra los resultados de injertos de tumor A549 tratados subcutáneamente con SPL1 y su recrecimiento lento después de la afirmación de la dosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0061] La invención descrita aquí suministra anticuerpos y poli péptidos que ligan a un antígeno, EPHA2 y métodos para hacer y usar estos anticuerpos y poli péptidos para el diagnóstico y el tratamiento de diversas enfermedades de cánceres humanos asociados con la expresión y/o la sobre expresión del EPHA2. El EPHA2 ha mostrado que está presente y su expresión es incrementada en una variedad de cánceres humanos. Los anticuerpos anti-EPHA2 tal como aquellos producidos por cualquiera una de las células anfitrionas identificadas en el siguiente párrafo han sido generados y han mostrado que se ligan específicamente al EPHA2.

[0062] De acuerdo con el tratado de Budapest, el hibridoma que produce mLUCA19 ha sido depositado en el American Type Culture Collection (ATCC) 10801 en la Universidad Bulevard, Manassas VA 20110-2209 en Marzo 20, de 1993 con una designación de depósito de patente del PTA- 5070, el

hibridoma que produce el SPL1 ha sido depositado en el American Type Culture Collection (ATCC) en Junio 8, 2004 con una designación de depósito de Patente del PTA-6059, el hibridoma que produce el LUCA40 ha sido depositado en el American Type Culture Collection (ATCC) en Junio 8, 2004 con una designación de depósito de Patente del PTA-6056, y el hibridoma que produce el SG5 ha sido depositado en el American Type Culture Collection (ATCC) en Febrero 2, 2006 con una designación de depósito de Patente del PTA- XXXX.

I. Técnicas generales

[0063] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del estado de la técnica. Tales técnicas son explicadas completamente en la literatura, tal como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (MJ. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academia Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Fresheney, ed., 1987); *Introduction to Cell and*

Tissue Culture (J.P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A.Doyle, J.B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and sons; Methods in enzymology (Academic Press, Inc); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C.C. Blackwell, eds); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Millar and M.P. Calos, eds., 1987); Current protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989; Monoclonal Antibodies: a practical approach (P.Shepard y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The antibodies (M.Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academia Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

II. Definiciones

[0064] El EPHA2 se refiere a ese antígeno de poli péptido con un peso molecular de aproximadamente 130 KD, contra el cual los anticuerpos de la presente invención están dirigidos. Como se describió en más detalle aquí, este antígeno tiene más de un epítipo diferente. Algunas de las modalidades de anticuerpo preferidas de esta invención están dirigidas contra uno de dos o más epítopos específicos del antígeno EPHA2. Se cree actualmente que el EPHA2 está sobre expresado en ciertas células de cáncer en combinación con sus contra partes de tejido normal.

[0065] Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de ligar específicamente a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, poli péptido, etc; mediante por lo menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utilizó aquí, el término involucra no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de ellos (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena única (ScFv), mutantes de ellos, variantes que ocurren naturalmente, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y cualquier

otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida.

[0066] El término "anticuerpo monoclonal" involucra no solamente los anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de ellos (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena única (ScFv), mutantes de ellos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida y la habilidad para ligarse a un antígeno. No sucede el propósito de limitarse con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en la cual esta hecho (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de Fago, expresión recombinante, ademanos transgénicos, etc.

[0067] Anticuerpos "humanizados" se refieren a una molécula que tiene un sitio de ligado de antígeno que es sustancialmente derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y el resto de la estructura de inmunoglobulina de la molécula con base en la estructura y/o

134

secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de ligado de antígeno puede comprender en dominios variables completos fundidos en dominios constantes o solamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones de estructura apropiadas en los dominio variables. Los sitios de ligado de antígeno pueden ser del tipo silvestre o modificados por uno o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, modificado para parecerse a la inmunoglobulina lo más cercanamente posible. Algunas formas de anticuerpos humanizados preservan todas las secuencias CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene todas las CDR de los anticuerpos del ratón). Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (1, 2, 3, 4, 5,6) que son alterados con respecto al anticuerpo original, lo que también se llamó uno o más CDR "derivados de" uno o más CDR de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40.

[0068] "Anticuerpos quiméricos" se refiere a aquellos anticuerpos en donde una porción de cada uno de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y livianas es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenezcan a una clase particular, mientras que el resto del segmento de las cadenas es homólogo para las secuencias correspondientes en

otro. Típicamente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable tanto de las cadenas pesada como liviana imitan las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otro. Una ventaja clara de tales formas quiméricas, es que, por ejemplo, las regiones variables pueden ser derivadas convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando hibridomas o células B fácilmente disponibles de organismos anfitriones no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Aunque la región variable tiene la ventaja de la facilidad de preparación, y la especificidad no es afectada por su fuente, la región constante siendo humana, es menos probable de producir una respuesta inmune de un sujeto humano cuando los anticuerpos son inyectados que si la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no está limitada a este ejemplo particular.

[0069] Un epítipo que "liga específicamente" o "liga preferencialmente" (usado de manera intercambiable aquí) a un anticuerpo o a un poli péptido es un término bien entendido en la técnica, y los métodos para determinar tal ligado específico o preferencial también son bien conocidos en la

técnica. Una molécula se dice que exhibe "ligado específico" o "ligado preferencial" si esta reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que lo que lo hace con células alternativas o sustancias alternas. Un anticuerpo "se liga específicamente" o "se liga preferencialmente" a un objetivo si este se liga con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que lo que se liga con otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que específicamente o preferencialmente se liga a un epítipo de EPHA2 es un anticuerpo que se liga a este epítipo EPHA2 con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que de lo que se liga con otro epítipo de EPHA2 o epítipos que no son EPHA2. También es entendido por la lectura de esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o parte o epítipo) que se liga específicamente o preferencialmente a un primer objetivo puede o no ligarse específicamente o preferencialmente a un segundo objetivo. Como tal, "el ligado específico" o "el ligado preferencial" no necesariamente requiere (aunque puede incluir un ligado exclusivo). Generalmente, pero no necesariamente se refiere a ligado de medios por ligado preferencial.

[0070] El término "activo inmunológicamente" en referencia a un epítopo que es o "permanece activo inmunológicamente" se refiere a la habilidad de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti- EPHA2 para ligar al epítopo bajo condiciones diferentes, por ejemplo, después de que el epítopo ha sido sometido a reducción y a condiciones de desnaturalización.

[0071] Como se utilizó aquí, los términos "LUCA19, SPL1, LUCA40, o SG5", "anticuerpo anti- EPHA2" y "anticuerpo anti- EPHA2 monoclonal "son utilizados de manera intercambiable para referirse a inmunoglobulina producida por cualquiera de las células anfitriones con un número de depósitos de ATCC número PTA-5070, PTA- 6056, o PTA- 6059, o la célula anfitriona SG, 3.15 B4, 1F9 (ATCC número PTA- XXXX) o su progenie. Diferentes funciones biológicas están asociadas con LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, incluyendo, pero sin limitarse a, la habilidad para ligar al EPHA2; la habilidad para ligar al dominio extra celular del EPHA2; la habilidad para ligar al EPHA2 en células de cáncer expuestas sobre la superficie de una célula viva in Vitro o in Vivo; la habilidad para suministrar un agente quimioterapéutico a células cancerosas 8tal como células de cáncer de ovario, próstata, pancreático, de pulmón, de colon, o de pecho) que expresan el EPHA2; la habilidad para suministrar un agente terapéutico o un

marcador detectable en células de cáncer que expresan EPHA2. Como se discutió aquí, los poli péptidos (incluyendo anticuerpos) de la invención pueden tener cualquier de una o más de estas características.

[0072] Un "anticuerpo equivalente anti- EPHA2" o "poli péptido equivalente a anti- EPHA2" se refiere a un anticuerpo o a un poli péptido que tiene una o más funciones biológicas asociadas con un anticuerpo anti- EPHA2, tal como, por ejemplo, especificidad en el ligado.

[0073] Como se utilizó aquí, "agentes" se refiere a un compuesto biológico, farmacéutico, o químico. Ejemplos no limitativos incluyen moléculas simples o complejas orgánicas o inorgánicas, un péptido, una proteína, un oligonucleótido, un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un derivado de vitamina, un carbohidrato, una toxina, o un compuesto químico terapéutico. Diversos compuestos pueden ser sintetizados, por ejemplo, moléculas pequeñas y oligómeros (por ejemplo, oligo péptidos y oligonucleótidos), y compuesto orgánicos sintéticos con base en diversas estructuras de núcleo. En adición, varias fuentes naturales pueden suministrar compuestos para tamizar, tal como extractos de plantas o animales, y similares, un

artesano versado puede fácilmente reconocer que no existe límite en cuanto a la naturaleza estructural de los agentes de la presente invención.

[0074] Los agentes que son empleados en los métodos de esta invención pueden ser seleccionados aleatoriamente o seleccionados racionalmente o diseñados. Como se utilizó aquí, un agente se dice que es seleccionado aleatoriamente cuando el agente es escogido aleatoriamente sin considerar las secuencias específicas involucradas en la asociación de EPHA2 con sus socios de ligado nativos o anticuerpos conocidos. Un ejemplo de agentes seleccionados aleatoriamente es el uso de una librería química o de una librería combinatorial de péptidos.

[0075] Como se utilizó aquí, un agente se dice que es seleccionado racionalmente o diseñado cuando el agente es escogido sobre una base no aleatoria que tiene en cuenta la secuencia del sitio objetivo y/o su conformación en conexión con la acción del agente. Con respecto a agentes anti- EPHA2, actualmente se cree que existe por lo menos tres epítomos en el EPHA2 contra los cuales los anticuerpos pueden ser conseguidos y por lo tanto en por lo menos tres sitios de acción para los agentes que bloquean la interacción EPHA2 /

anti- EPHA2. Esta invención también involucra agentes que actúan en los sitios de interacción entre el EPHA2 y su socio de ligado nativo, aunque otros ligandos y sus sitios interactivos de EPHA2 activos están también involucrados dentro del alcance de esta invención, sea que sean conocidos actualmente o que sean identificados posteriormente. Los agentes pueden ser seleccionados racionalmente o diseñados racionalmente mediante utilizar las secuencias de péptido que constriñe los sitios de contacto del complejo de receptor7 ligando y/o EPHA2/ anticuerpo anti- EPHA2. Por ejemplo, un agente de péptido seleccionado racionalmente puede ser un péptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a un epítipo que aparece en el EPHA2 tal como está expuesto en la superficie de una célula viva en su ambiente nativo. Tal agente reducirá o bloqueará la asociación del anticuerpo anti- EPHA2 con el EPHA2, o la asociación del EPHA2 con su ligando nativo, como se deseó mediante ligar al anticuerpo anti- EPHA2 o al ligando nativo.

[0076] Como se utilizó aquí, el término "marcado", con respecto al anticuerpo, tiene el propósito de involucrar el marcado directo del anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, ligado físico) a una sustancia detectable, tal como un agente radioactivo o un fluoróforo (por ejemplo,

isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE)) al anticuerpo, lo mismo que un marcado indirecto de la probeta o del anticuerpo mediante la reactividad con una sustancia detectable.

[0077] Como se utilizó aquí, el término "asociación", con respecto al anticuerpo, incluye una sujeción o ligado covalente y no covalente a un agente (por ejemplo un agente quimio terapéutico). El anticuerpo puede estar asociado con un agente (por ejemplo agente quimio terapéutico) mediante ligado directo o ligado indirecto vía la sujeción a una plataforma común, tal que el anticuerpo dirige la localización del agente a la célula cancerosa a la cual el anticuerpo se liga y en donde el anticuerpo y el agente no disocian sustancialmente bajo condiciones fisiológicas de modo que el agente no es objetivado en la misma célula cancerosa a la cual el anticuerpo se liga o tal que la potencia del agente no se disminuya.

[0078] Una "muestra biológica" involucra una variedad de tipos de muestra obtenidos de un individuo y pueden ser utilizados en un ensayo de diagnóstico o de monitoreo. La definición involucra sangre y otras muestras líquidas de Oríen biológico, muestras de tejido sólido tal como

especímenes de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de ellos, y la progenie de ellos, por ejemplo, células obtenidas de una muestra de tejido recolectada de un individuo que se sospecha que tiene cáncer, en modalidades preferidas de tejidos de ovarios, de pulmón, próstata, páncreas, colon, y pecho. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de cualquier manera después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de ciertos componentes, tal como proteínas o polinucleótidos, o en bebidas en una matriz semisólida o sólida para propósitos de seccionamiento. El término "muestra biológica" involucra una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobre nadantes de células, lisatos celulares, suero, plasma, tejido biológico, y muestras de tejidos.

[0079] Los términos "poli péptido", "oligo péptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de manera intercambiable aquí para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por ácidos no amino. Los términos también involucran un polímero de aminoácido que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, la

formación del enlace de disulfuro, glicosilación, lapidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcado. También se han incluido dentro de la definición, por ejemplo, los poli péptidos que contiene uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), lo mismo que otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los poli péptidos de esta invención se basan en un anticuerpo, los poli péptidos pueden ocurrir como cadenas únicas o cadenas asociadas.

[0080] Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena liviana del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sea sola o en combinación.

[0081] Una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena liviana del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, sea sola o en combinación.

[0082] Como se utilizó aquí "sustancialmente puro" se refiere a material que está por lo menos 50% puro (es decir,

libre de contaminantes), más preferiblemente por lo menos 90% puro, más preferiblemente por lo menos 95% puro, más preferiblemente por lo menos 98% puro, más preferiblemente por lo menos 99% puro.

[0083] Una "célula anfitriona" incluye una célula individual o cultivo celular que puede estar o ha estado en un recipiente para vectores con el objeto de la incorporación de los insertos de polinucleótido. Las células anfitriones incluyen la progenie de una célula anfitriona única, y la progenie puede que no necesariamente sea completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula pariente original debido a mutación, accidental o deliberada. Una célula anfitriona incluye células transfectadas in vivo con un polinucleótido o polinucleótidos de esta invención.

[0084] Como se utilizó aquí, "retardar el desarrollo de la metástasis" significa diferir, esconder, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la metástasis. Este retardo puede tener longitudes variables de tiempo, dependiendo de la historia del cáncer y/o el individuo a ser tratado. Como es evidente para una persona versada en la técnica, un retardo suficiente o significativo

puede, en efecto involucrar la prevención, en que el individuo no desarrolle la metástasis.

[0085] Una "cantidad efectiva" de una droga, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados benéficos o deseados incluyendo, sin limitación, resultados clínicos tales como encogimiento del tamaño del tumor (en el contexto del cáncer, por ejemplo, cáncer de pecho o de próstata), retardación del crecimiento celular canceroso, retardación del desarrollo de la metástasis, disminución de uno o más de los síntomas resultantes de la enfermedad, incremento en la calidad de vida de aquellos que sufren de la enfermedad, disminución de la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, mejoramiento del efecto de otra mediación tal como vía objetivado y/o internalización, retardado de la progresión de la enfermedad, y/o prolongación de la supervivencia de los individuos. Una cantidad efectiva puede ser administrada en una o más administraciones. Para propósitos de esta invención, una cantidad efectiva de la droga, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para reducir la proliferación de (o destruir) células neoplásicas y/o reducir y/o retardar el desarrollo, o

crecimiento, de metástasis de células neoplásicas, sea directa o indirectamente.

Como se entendió en el contexto clínico del cáncer, una cantidad efectiva de una droga, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse en conjunto con otra droga, compuesto, o composición farmacéutica. Así, una "cantidad efectiva" puede ser considerada en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y un agente único puede ser considerado que se da en una cantidad efectiva si, en conjunto con uno o más de otros agentes, un resultado deseable puede ser o es logrado.

[0086] Como se utilizó aquí, "tratamiento" o "tratar" es un modelo para obtener resultados benéficos o deseados incluyendo resultados clínicos preferiblemente. Para propósitos de esta invención, los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: reducir la proliferación de (o destruir) células neoplásicas, reducir la metástasis de células neoplásicas encontradas en los cánceres, encogimiento del tamaño del tumor, disminución de los síntomas resultantes de la enfermedad, incremento de la calidad de vida de aquellos que sufren de la enfermedad, disminución de la dosis

de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, retardación del progreso de la enfermedad y/o prolongación de la supervivencia de los pacientes.

[0087] Como se utilizó aquí, "retardar el desarrollo de la metástasis" significa diferir, esconder, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la metástasis. Este retardo puede ser de longitud variable en el tiempo, dependiendo de la historia del cáncer y/o del individuo a ser tratado. Como es evidente para aquellos versados en la técnica, un retardo suficiente o significativo puede, por ejemplo, puede, en efecto, involucrar la prevención, en que el individuo no desarrolle la metástasis.

[0088] Una "muestra biológica" involucra una variedad de tipos de muestras obtenidas de un individuo que pueden ser utilizadas en ensayos de diagnóstico o de monitoreo. La definición involucra sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como especímenes de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de ellos, y la progenie de ellos. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de cualquier manera después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento

en cuanto a ciertos componentes, tal como proteínas y polinucleótidos, o embebidos en una matriz semisólida o sólida para propósitos de seccionamiento. El término "muestra biológica" involucra una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobre nadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico, y Muestras de tejido.

[0089] Un "individuo" es un vertebrado (preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano). Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a animales de fincas, animales deportivos, mascotas (tales como gatos, perros, caballos), primates, ratas y ratones.

[0090] "Toxina" o "Citotoxina" se refiere a cualquier sustancia, que efectúa una respuesta adversa dentro de una célula. Por ejemplo, una toxina dirigida a una célula cancerosa podría tener un efecto adverso algunas veces de deterioro, sobre la célula cancerosa.

[0091] Como se utiliza aquí "agente" se refiere a un compuesto biológico, farmacéutico o químico. Ejemplos no limitativos incluyen moléculas simples o complejas orgánicas o inorgánicas, un péptido, una proteína, un oligonucleótido,

un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo. Diversos compuestos pueden ser sintetizados, por ejemplo, moléculas pequeñas y oligómeros (por ejemplo oligopéptidos y oligonucleótidos), y compuestos orgánicos sintéticos con base en diversas estructuras de núcleo. En adición, diversas fuentes naturales pueden suministrar compuestos para tamizado, tal como extractos de plantas o animales y similares.

[0092] Como se utilizó aquí, un "agente terapéutico" significa cualquier agente útil para terapia (aquí, generalmente en el contexto del cáncer) incluye drogas anti tumos, toxinas o citotoxinas, agentes de citotoxinas, y agentes radiactivos.

[0093] "Respuesta inmune activa" se refiere al desarrollo de, y al establecimiento de la producción de, anticuerpos in vivo dirigidos contra un antígeno, en respuesta a la administración del antígeno, o a vectores de ADN que codifican para ese antígeno, al mamífero anfitrión mediante administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o de otro modo con o sin un adyuvante. La respuesta inmune activa también puede incluir otros aspectos de la respuesta inmune, tal como respuesta inmune celular.

Composiciones y métodos para hacer las composiciones

[0094] Esta invención involucra composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos, poli péptidos y proteínas que ligan al EPHA2, y polinucleótidos que comprende secuencias que codifican anticuerpos, poli péptidos y proteínas que se ligan al EPHA2. Como se utilizó aquí, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos, poli péptidos y/o proteínas que ligan al EPHA2, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos, poli péptidos y proteínas que se ligan al EPHA2. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tal como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen amortiguadores, que son bien conocidos en la técnica.

[0095] La presente invención también involucra diversas formulaciones de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, y anticuerpos equivalentes o fragmentos de poli péptido (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos quiméricos, cadenas únicas (ScFv), mutantes de ellos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de LUCA19, SPL1, SG5

o LUCA40, que comprenden un antígeno (EPHA2), sitio de reconocimiento de la especificidad requerida. La invención también suministra anticuerpos humanos que muestran uno o más características biológicas del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. Los anticuerpos equivalentes de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, (incluyendo anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos), fragmentos de poli péptido de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, y poli péptidos que comprenden cualquiera de estos fragmentos son identificados y caracterizados mediante una o más características del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40.

[0096] En algunas modalidades, los anticuerpos, poli péptidos y proteínas de la invención que ligan al EPHA2 son anticuerpos, poli péptidos y proteínas que inhiben competitivamente el ligado preferencial del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, al EPHA2 o que ligan preferencialmente al mismo epítipo en el EPHA2 que el anticuerpo anti- EPHA2 preferencialmente liga.

[0097] De acuerdo a lo anterior, la invención suministra cualquiera de lo siguiente (o composiciones que incluyen composiciones farmacéuticas), que comprenden cualquiera de las siguientes: (a) anticuerpo anti- EPHA2 producido por la célula anfitriona con un número de depósito de ATCC No. PTA-

5070, PTA-6056 o PTA-6059 o la célula anfitriona SG. 3. 15. B4. 1F9 (PTA- XXXX) o su progenie; (b) una forma humanizada del anticuerpo anti- EPHA2; (c) un anticuerpo que comprende uno o más de la cadena liviana y/o la cadena pesada de las regiones variables del anticuerpo anti- EPHA2; (d) un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables homólogas o derivadas de las regiones variables de una cadena pesada y una cadena liviana del anticuerpo anti- EPHA2, y regiones constantes homólogas o derivadas de las regiones constantes de una cadena pesada y de una cadena liviana de un anticuerpo humanos; (e) un anticuerpo que comprende uno o más de la cadena liviana y/o la cadena pesada de los CDR (por lo menos 1, 2, 3, 4,5,6) de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40; (f) un anticuerpo que comprende una cadena pesada y/o liviana de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, (g) un anticuerpo humano que es equivalente a LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. Una forma humanizada del anticuerpo puede o no tener CDR idénticos a LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, o anticuerpo producido por la célula anfitriona con un número de depósito de ATCC No. PTA-5070, PTA-6056 o PTA-6059 o la célula anfitriona SG. 3. 15. B4. 1F9 (ATCC No. PTA- XXXX). La determinación de las regiones CDR está dentro del experticio de la técnica. En algunas modalidades, la invención suministra un anticuerpo que comprende por lo menos un CDR que es sustancialmente

homólogo a por lo menos un CDR, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco CDR de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 (o, en algunas modalidades sustancialmente homólogo a todos los seis CDR de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o derivado de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40), o anticuerpo producido por la célula anfitriona con un número de depósito de ATCC No. PTA-5070, PTA-6056 o PTA-6059 o la célula anfitriona SG. 3. 15. B4. 1F9 (ATCC No. PTA- XXXX). Otras modalidades incluyen anticuerpos que tienen por lo menos 2, 3, 4,5, o 6 CDR que son sustancialmente homólogos a por lo menos 2, 3, 4,5 o 6 CDR de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o derivados de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, o anticuerpos producidos por la célula anfitriona con un número de depósito de ATCC No. PTA-5070, PTA-6056 o PTA-6059 o la célula anfitriona SG. 3. 15. B4. 1F9. Se entiende que, para propósitos de esta invención, la especificidad de ligado y/o la actividad general (que puede darse en términos de reducción del crecimiento y/o proliferación de células cancerosas, inducción de muerte de células apoptóticas en la célula de cáncer, retardo en el desarrollo de la metástasis, y/o tratamiento paliativo) es generalmente retenido, aunque el grado de actividad puede variar comparado al LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 (puede ser mayor o menor). La invención también suministra métodos para hacer cualquiera de estos

anticuerpos. Los métodos para hacer anticuerpos son conocidos en la técnica y son descritos aquí.

[0098] La invención también suministra poli péptidos que comprenden una secuencia de aminoácido de los anticuerpos de la invención. tal como LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. En algunas modalidades, el poli péptido comprende uno o más de las regiones variables de cadena liviana y/o cadena pesada del anticuerpo anti-EPHA2. En algunas modalidades, el poli péptido comprende uno o más CDR de cadena liviana y/o cadena pesada de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. En algunas modalidades, el poli péptido comprende tres CDR de la cadena liviana y/o cadena pesada del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. En algunas modalidades, el poli péptido comprende una secuencia de aminoácido de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 que tiene cualquiera de las siguientes: por lo menos cinco aminoácidos contiguos de una secuencia de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, por lo menos ocho aminoácidos contiguos, por lo menos cerca de diez aminoácidos contiguos, por lo menos cerca de quince aminoácidos contiguos, por los menos cerca de veinte de aminoácidos contiguos, por lo menos cerca de 25 aminoácidos contiguos, por lo menos cerca de 30 aminoácidos contiguos, en donde por lo menos tres de los aminoácidos son de una región variable del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. En una modalidad, la

región variable es de una cadena liviana de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. En otra modalidad, la región variable es de una cadena pesada de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. En otra modalidad los cinco (o más) aminoácidos contiguos son de una región determinante de complementariedad (CDR) del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40.

[0099] Los anticuerpos pueden ser policlonales (por ejemplo, no homogéneos) o monoclonales. Los métodos para hacer anticuerpos monoclonales son conocidos en la técnica. Un método que puede ser empleado es el método de Kohler y Milstein, Nature 256: 495-497 (1975) o una modificación de este. En general, un ratón o rata es utilizado para la inmunización pero otros animales pueden también ser utilizados. El inmunogén puede ser, pero no se limita a, células primarias, líneas celulares cultivadas, células cancerosas, ácidos nucleicos, tejidos, o péptidos. El EPHA2 de longitud completad o cualquier fragmentos de EPHA2 (por ejemplo, dominio extra celular) o células de cáncer que expresan el EPHA2 son utilizadas como inmunogén. Las células utilizadas para inmunogén, por ejemplo, células de cáncer que expresan el EPHA2 pueden ser cultivadas durante un periodo de tiempo (por lo menos 24 horas) antes de su uso como un inmunogén. Las células pueden ser utilizadas como inmunogenes

por ellas mismas o en combinación con adyuvantes no desnaturalizantes tal como Ribí. En general, las células deben mantenerse intactas y preferiblemente viables cuando son utilizadas como inmunogén. Los métodos para generar anticuerpos que utilizan células intactas como inmunogén se describen en WO 00/37503. Las células intactas puede permitir que los antígenos sean detectados mejor que las células rotas. En adición, los anticuerpos monoclonales generados utilizan células intactas como inmunogén son más probablemente contra un determinante antigénico sobre la superficie celular o contra el dominio extra celular de un receptor de transmembrana. El uso de adyuvantes desnaturalizantes o de límite, por ejemplo, adyuvante de Froyd, puede romper las células y por lo tanto no se anima a usar. El inmunogén puede ser administrado en múltiples tiempos a intervalos periódicos tal como bisemanalmente, o semanalmente, o puede ser administrado de tal manera que se mantenga la viabilidad en el animal (por ejemplo en un tejido recombinante).

[0100] Para monitorear la respuesta del anticuerpo, una muestra biológica pequeña (por ejemplo, sangre) puede ser obtenida del animal y ensayada en cuanto al título de anticuerpo contra el inmunogén. El vaso y/o varios nodos

linfáticos grandes pueden ser removidos y disociados en células únicas. Si se desea, las células de vaso pueden ser tamizadas (después de la remoción de células adherentes no específicamente) mediante aplicar una suspensión celular a una placa o a un pozo recubierto con el antígeno. Las células B, que expresan la inmunoglobulina de ligado a membrana específica para el antígeno se ligarán a la placa, y no se enjuagarán con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células de vaso disociadas, pueden entonces ser fundidas con células de mieloma (por ejemplo X63- AG8. 653 y aquellas del instituto Salk, Cell Distribution Center, San Diego, CA). el polietilenglicol (PEG) puede ser usado para fundir vaso o linfocitos con células de mieloma para formar un hibridoma. El hibridoma es entonces cultivado en un medio selectivo (por ejemplo, hipoxantina, aminoterina, medio de timidina, u otros conocidos como "medio HAT"). Los hibridomas resultantes son entonces braqueados por dilución limiotante, y son ensayados en cuanto a la producción de anticuerpos que se ligan específicamente al inmunogén (por ejemplo, la superficie de líneas celulares de cáncer, EPHA2, etc.) utilizando FACS, inmunohistoquímica (tamizado IHC), y Western blot. Los hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal seleccionado son entonces cultivados sea in Vitro (por ejemplo en botellas

de cultivo de tejidos o reactores de fibra huecos), o in Vivo (por ejemplo como ascitas en ratones). Los métodos de cultivo de hibridoma bajo condiciones para generar el anticuerpo anti-EPHA2 y purificar el anticuerpo son conocidos en la técnica.

[0101] Los hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal descritos anteriormente pueden ser seleccionados para producir anticuerpos que se ligan preferencialmente al epítipo sobre EPHA2 que el anticuerpo anti-EPHA2 al cual el anticuerpo anti-EPHA2 preferencialmente se liga. Los métodos para seleccionar tales anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos de composición de ligado pueden ser usados para determinar si un anticuerpo se liga al mismo epítipo al cual lo hace LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. Una composición de anticuerpo con LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 ara ligar el EPHA2 indica que el anticuerpo se liga preferencialmente al epítipo al cual LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 se liga. Los ensayos de composición de ligado son bien conocidos en la técnica. Los ensayos de composición de ligado que pueden ser configurados en un número de formatos diferentes, utilizando sea antígeno marcado o anticuerpo marcado. Usualmente, el antígeno es inmovilizado en una placa de 96 pozos, y la habilidad de desmarcar anticuerpos para

bloquear el ligado de los anticuerpos marcados es medida utilizando etiquetas de enzima o radioactivas. Los polipéptidos que se ligan preferencialmente al epítipo el EPHA2 al cual el anticuerpo anti-EPHA2 se liga preferencialmente también pueden ser ensayados e identificados utilizando métodos similares.

[0102] Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, las células B inmortalizadas por EBV pueden ser utilizadas para producir anticuerpos monoclonales de la invención objeto. Los hibridomas son expandidos y subclonados, si se desea, y los sobre nadantes se ensayan en cuanto a actividad anti inmunogénica, mediante procedimientos de ensayo convencional (por ejemplo, FACS, y IHC, radio inmuno ensayo, inmuno ensayo de enzima, inmuno ensayo de fluorescencia, etc.).

[0103] En otra alternativa, los anticuerpos pueden ser hechos de manera recombinante. Los métodos para hacer anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica. El anticuerpo monoclonal LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 y cualquier otros anticuerpos equivalentes pueden ser secuenciados y producidos recombinantemente in Vitro. En una modalidad, el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 son secuenciados y

la secuencia del polinucleótido es entonces clonada en un vector para la expresión o la propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede ser mantenida en un vector en una célula anfitriona y la célula anfitriona puede entonces ser expandida y congelados para usos futuros. En otra alternativa, los anticuerpos pueden ser hechos recombinantemente mediante tecnología de visualización de fagos. Ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense números 5, 565, 332; 5, 580, 717; 5, 733, 743; 6, 265, 150; y Winter et al., Annu. Rev. Immunol. (1994)12: 433-455.

[0104] En otra alternativa, el anticuerpo anti- EHPA2 o cualquiera otros anticuerpos o proteínas de interés pueden ser sometidos a secuenciamiento mediante degradación Edman, la cual es bien conocida por aquellos versados en la técnica. La información del péptido generada de la espectrometría de masa o la degradación de Edman puede ser utilizada para diseñar probetas o iniciadores que son utilizados para clonar la proteína de interés.

[0105] Un método alterativo de clonar la proteína de interés es mediante "panning" utilizando el EPHA2 para células que expresan el anticuerpo o la proteína de interés. El procedimiento "panning" es conducido mediante obtener una

librería de cADN de tejidos o células que expresan el anticuerpo o proteína de interés, sobre expresar los cADN en un segundo tipo de célula, y tamizar las células transfectadas del segundo tipo de célula para un ligado específico al EPHA2. Descripciones detalladas de los métodos utilizados en la clonación de genes de mamíferos que codifican para las proteínas de la superficie celular mediante "panning" se pueden encontrar en la técnica. Ver, por ejemplo, Aruffo, A. y Seed, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8573-8577 (1987) y Stephan J. et al., *Endocrinology* 140: 5841-5854 (1999).

[0106] Los cADN pueden ser obtenidos mediante transcripción inversa de los mRNA a partir de un tipo de célula particular de acuerdo con métodos estándar en la técnica. Específicamente, el mRNA puede ser aislado utilizando diversas enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo con los procedimientos establecidos en Sambrook, et al. *Supra* o extraídos mediante resinas de ligado de ácido nucleico disponibles comercialmente siguiendo las instrucciones adjuntas provistas por los fabricantes (por ejemplo, Qiagen, Invitrogen, Promega). Los cADN sintetizados son entonces introducidos dentro de un vector de expresión para producir el anticuerpo o proteína de interés en las células de un

segundo tipo. Está implicado que un vector de expresión debe ser replicable en las células anfitrionas sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosomal. Los vectores de expresión adecuados incluyen pero no se limitan a plásmidos, vectores virales, incluyendo adeno virus, virus asociados con adeno, retrovirus y cósmidos.

[0107] Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden ser introducidos dentro de la célula anfitriona mediante cualquiera de un número de medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE- dextran, u otras sustancias; bombardeo de micro proyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso tal como un virus de vacuna). La escogencia de introducir vectores o polinucleótidos frecuentemente dependerá en los rasgos o características de la célula anfitriona.

[0108] Cualquier células anfitrionas capaces de sobre expresar ADN heterologos pueden ser utilizadas para el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo, poli péptido o proteína de interés. Ejemplos no limitativos de células anfitrionas de mamíferos incluyen pero no se

limitan a COS, HeLa, y células CHO. Preferiblemente, las células anfitrionas expresan los cADN en un nivel de alrededor de 5 veces mayor, más preferiblemente 10 veces más alto, aún más preferiblemente 20 veces mayor que aquel del anticuerpo endogenoso correspondientes o proteína de interés, si está presente, en las células anfitrionas. El tamizado de las células anfitriona para un ligado específico al EPHA2 se actuado mediante un inmuno ensayo o FACS. Una célula que sobre expresa el anticuerpo o proteína de interés puede se identificada.

[0109] La invención incluye poli péptidos que comprenden una secuencia de aminoácido de los anticuerpos de esta invención, tal como LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. Los poli péptidos de esta invención pueden ser hechos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los poli péptidos pueden ser producidos mediante degradación proteolítica u otra degradación de los anticuerpos, mediante métodos recombinantes (es decir poli péptidos únicos o de fusión) según se describió anteriormente o mediante síntesis química. Los poli péptidos de los anticuerpos, especialmente poli péptidos más cortos de hasta cerca de 50 aminoácidos, son convenientemente hechos mediante síntesis química. Los métodos de síntesis química son conocidos en la técnica y

están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un polipéptido LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 podría ser producido mediante un sintetizador de polipéptido automatizado empleando el método de fase sólida.

[0110] La invención también involucra fragmentos de la región variable de cadena única ("ScFv") de los anticuerpos de esta invención, tal como LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. Los fragmentos de región variable de cadena única son hechos mediante ligar las regiones variables de cadena liviana y/o pesada mediante utilizar un péptido de enlace corto. Bird et al (1998) Science 242: 423-426. Por ejemplo un péptido de enlace puede puentear aproximadamente 3, 5 nm entre los terminales carboxi de una región variable y el terminal amino de la otra región variable. Los enlazadores pueden a su vez ser modificados para funciones adicionales, tal como el sujetamiento de drogas o la sujeción a soportes sólidos. Las variantes de cadena única pueden ser producidas sean recombinantemente o sintéticamente. Para la producción sintética del ScFv, un sintetizador automatizado puede ser utilizado. Para la producción recombinante del ScFv, un plásmido adecuado que contiene al polinucleótido que codifica el

ScFv puede ser introducido dentro de una célula anfitriona, se eucariótica, tal como levadura, de plantas, de insectos, o células de mamíferos, o procariótica, tal como la E. Coli. Los polinucleótidos que codifican el ScFv de interés pueden ser hechos mediante manipulaciones de rutina tal como ligación de los polinucleótidos. El ScFv resultante puede ser aislado utilizando técnicas de purificación de proteína estándar conocidas en la técnica.

[0111] La invención incluye modificaciones a los anticuerpos, tal como el anticuerpo anti- EPHA2 que incluye anticuerpos funcionalmente equivalentes y poli péptidos de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 que no afectan de manera significativa sus propiedades y variantes que pueden tener actividad mejorada o disminuida. La modificación de poli péptidos es práctica de rutina en la técnica y no requiere ser descrita en detalle aquí. Ejemplos de poli péptidos modificados incluyen poli péptidos con sustituciones conservativas de residuos de aminoácido, una o más eliminaciones o adiciones de aminoácidos que no cambian de manera deteriorante significativamente la actividad funcional, o uso de los análogos químicos. Los residuos de aminoácidos que pueden ser sustituidos conservativamente por otro incluyen pero no se limitan a: glicina/ alanina,

valina/isoleucina/leucina, asparagina/glutamina; ácido aspártico/ ácido glutámico, serina/ treonina; lisina/ arginina; y fenilalanina/ triosina. Estos poli péptidos también incluyen poli péptidos glicosilados y no glicosilados, lo mismo que poli péptidos con otras modificaciones post trasduccionales, tal como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación fosforilación. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácido serían conservativas, es decir, el aminoácido sustituido posee propiedades químicas similares que aquellas del aminoácido original. Tales sustituciones conservativas son conocidas en la técnica, y ejemplos han sido suministrados anteriormente. Las modificaciones de aminoácido pueden variar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos para completar el rediseño de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad de ligado y/o la especificidad. Otros métodos de modificación incluye utilizar técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica que incluye, pero no se limitan a, medios enzimáticos, sustituciones oxidativas, y quelación. Las modificaciones pueden ser utilizadas, por ejemplo, para la sujeción de etiquetas para inmuno ensayos, tal como la sujeción de partes radioactivas para los radio inmuno ensayos. Los poli péptidos LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40

modificados están hechos utilizando procedimientos establecidos en la técnica que pueden ser tamizados utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica, algunos de los cuales se han descrito más adelante y en los ejemplos.

[0112] La invención también involucra proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos de esta invención, tal como LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. En una modalidad, un poli péptido de fusión se suministra el cual comprende por lo menos 10 aminoácidos contiguos de la región de la cadena liviana variable y por lo menos 10 aminoácidos de la región variable de la cadena pesada. En otra modalidad, el poli péptido de fusión contiene una región constante de inmunoglobulina heteróloga. En otra modalidad, el poli péptido de fusión contiene una región variable de cadena liviana y una región variable de la cadena pesada de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. Para propósitos de esta invención, una proteína de fusión de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 contiene uno o más poli péptidos de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 y otra secuencia de aminoácidos a la cual no está sujeta en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Un poli péptido de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 puede ser creado

mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, sintéticamente o de manera recombinante.

[0113] En otras modalidades las quimeras de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 se suministran en las cuales las cadenas pesada y/o liviana son proteínas de fusión. En algunas modalidades, el dominio constante de las cadenas es de una especie particular y/o clase particular, y el dominio variable es de una especie y/o clase diferente. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico (en algunas modalidades) es uno en el cual las regiones constantes son derivadas de origen humano y las regiones variables son homólogas o derivadas de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 (es decir, murina). También involucra dentro de la invención un anticuerpo con una región variable humanizada, en la cual (en algunas modalidades), las regiones CDR comprenden secuencias de aminoácidos de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, mientras que las regiones de estructura son derivadas de secuencias humanas. Otras formas de anticuerpos humanizados son conocidas en la técnica y descritas aquí. También se cubren fragmentos funcionales de quimeras. Un ejemplo de un fragmento Fab humanizado que contiene una región de bisagra humana, una primer región constante humana, una región ligera o liviana kappa humana o una región de cadena pesada kappa humana, y la región variable de la cadena

liviana y/o pesada del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. Los fragmentos Fab del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 pueden a su vez ser hechos para formar dímeros Fab. Típicamente, las proteínas de fusión de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 y las quimeras de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 de esta invención están hechas mediante preparar una expresión de un polinucleótido que las codifica utilizando métodos recombinantes descritos aquí, aunque ellos también pueden ser preparados por otros medios conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, síntesis química. Ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses números 5, 807, 715, 4, 816, 567; y 6, 331, 415.

[0114] La invención también involucra anticuerpos humanizados. La secuencia de polinucleótidos de un anticuerpo, tal como LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 u otros anticuerpos equivalentes pueden ser utilizados para la manipulación genética para generar un anticuerpo "humanizado", o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. El principio general en humanizar un anticuerpo involucra retener la secuencia básica de la porción de ligado al antígeno del anticuerpo, mientras se barre el reto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpo humano. Existen cuatro etapas generales para

humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar el nucleótido y secuencias de aminoácidos predichos de la partida de los dominios variable de liviano y pesado del anticuerpo (2) designar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir que región de estructura de anticuerpo se utiliza durante el proceso de humanización (3) metodologías reales de humanización / técnicas y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, la región constante puede ser trabajada por ingeniería para parecerse a las regiones constantes humanas para evitar respuestas inmune si el anticuerpo es utilizado en ensayos clínicos y tratamientos en humanos. Ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses números 5, 997, 867 y 5, 866, 692.

[0115] Un número de moléculas de anticuerpo "humanizado" comprende un sitio de ligado a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana que ha sido descrita, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones de roedores y sus regiones determinantes de complementariedad asociadas (CDR) fusionadas a los dominios constantes humanos. Ver, por ejemplo, Winter et al. *Nature* 349. 293-299 (1991); Lobuglio et al. *proa. Nat. Acad. Sci. USA*. 86: 4220-4224 (1989); Shaw et al. *J Immunol*. 138: 4534-4538 (1987); y Brown et al. *Cancer Res*. 47: 3577-3583 (1987). Otras referencias describen

los CDR de roedores injertados en regiones de estructura de soporte humanas (FR) antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Ver, por ejemplo, Riechmann et al. *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al. *Science* 239: 1534-1536 (1988); y Jones et al. *Nature* 321: 522-525 (1986). Otra referencia describe CDR de roedores soportados mediante regiones de estructura de roedores unidos recombinantemente. Ver, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea número 519, 596. Estas moléculas (humanizadas) son diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia las respuestas de anticuerpo anti humano de roedor que limita la duración y efectividad de las aplicaciones terapéuticas de aquellas partes en los receptores humanos. Otros métodos de humanizar anticuerpos que pueden ser utilizados se han descrito por Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 2471-2476 (1991) y en las Patentes Estadounidenses números 6, 180, 377; 6, 054, 297; 5, 997, 867; 5, 866, 692, 6, 210, 671; 6, 350, 861; y la PCT WO 01/27160.

[0116] En todavía otra alternativa, anticuerpos completamente humanos pueden ser obtenidos mediante utilizar ratones comercialmente disponibles que han sido trabajados por ingeniería genética para expresar proteínas de

inmunoglobulina humanas específicas. Los animales transgénicos que son diseñados para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo anticuerpos completamente humanos) o más robusta pueden también ser utilizados para la generación de los anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de tal tecnología son los XenomouseTM de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMab-Mouse[®] y TCMouseTM de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

[0117] Esta invención también suministra composiciones que comprenden anticuerpos o poli péptidos equivalentes a LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 conjugados (por ejemplo enlazados) a un agente terapéutico, tal como una molécula radiactiva, una toxina (por ejemplo, caliqueamicina), o una molécula quimio terapéutica, o liposomas u otras vesículas que contengan compuestos quimio terapéuticos. Las composiciones, cuando se administran a un individuo, pueden objetivar estos agentes a las células de cáncer que expresan el EPHA2 reconocidos por el anticuerpo o poli péptidos y por lo tanto, puede, por ejemplo, eliminar las células cancerosas y/o suprimir la proliferación y crecimiento de las células cancerosas. Para simplicidad, se hará referencia generalmente a anticuerpos de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 con el entendimiento de que estos métodos

aplican a cualquiera de las modalidades que ligan al EPHA2 descritas aquí. Con estos métodos, la conjugación en general se refiere a enlazar estos componentes como se describió aquí. El enlazado (que es generalmente fijar estos componentes en asociación próxima por lo menos para la administración) puede ser logrado de un número de maneras, como se describe más adelante.

[0118] Una molécula radioactiva de esta invención incluye cualquier radio isótopo que es efectivo para destruir una célula cancerosa. Ejemplos incluyen pero no se limitan a, cobalto-60 y rayos X. adicionalmente, los elementos radioactivos de ocurrencia natural tal como uranio, radio, torio y que representan típicamente mezclas de radio isótopos, son ejemplos adecuados de una molécula radioactiva.

[0119] Una toxina de la invención incluye, pero no se limita a, Taxol, citocalasin B, gramicidin D, bromuro de Etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicin, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracin diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaina, propanolol, y puromicina y análogos o homólogos de ellos. Los anticuerpo de esta

invención pueden ser internalizados dentro de las células de carcinoma a las cuales ellos se ligan y por lo tanto son particularmente útiles para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, suministrar dentro de las células toxinas que requieren ser internalizadas para su actividad adversa. Ejemplos de tales toxinas incluye, pero no se limitan a saporina, caliqueamicina, auristatina, y maitansinoide.

[0120] Los anticuerpos o poli péptidos de la invención pueden ser conjugados (enlazados) a una molécula radiactiva, una toxina, y otros agentes terapéuticos, o a liposomas u otras vesículas que contienen agentes terapéuticos covalentemente o no covalentemente, directamente o indirectamente. El anticuerpo puede ser ligado a la molécula radioactiva, la toxina, o la molécula terapéutica en cualquier localización a lo largo del anticuerpo siempre que el anticuerpo sea capaz de ligar su objetivo EPHA2.

[0121] Una toxina o un agente terapéutico puede estar acoplado (por ejemplo, pegado covalentemente) a un anticuerpo monoclonal adecuado sea directa o indirectamente (vía un grupo enlazador, o, alternativamente, por medio de una molécula de enlace con sitios de ligado apropiados tal como una molécula plataforma como se describió en la Patente

Estadounidense 5, 552, 391). La toxina y el agente terapéutico de la presente invención pueden ser acoplados directamente a las proteínas objetivo particulares utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, tal como un grupo amino o sulfidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo de partida (por ejemplo, un haluro) en el otro.

[0122] Los anticuerpos o poli péptidos también pueden ser ligados a un agente terapéutico mediante un micro portador. El micro portador se refiere a una partícula biodegradable o no biodegradable que es insoluble en agua y la cual tiene un tamaño menor a cerca de 150, 120 o 100 nm en tamaño, más comúnmente menos que cerca de 50 a 60 μm , preferiblemente menos de cerca de 10, 5, 2,5, 2 o 1,5 μm . Los micro portadores incluyen "nanoprotadores", que son micro portadores que tienen tamaños menores a cerca de 1 μm , preferiblemente menos de cerca de 500 nm. Tales partículas son conocidas en la técnica. Los micro portadores de fase sólida pueden ser partículas formadas de polímeros de

ocurrencia natural biocompatibles, polímeros sintéticos o copolímeros sintéticos, que pueden incluir o excluir micro portadores formados de agarosa o agarosa reticulada, lo mismo que otros materiales biodegradables conocidos en la técnica. Los micro portadores de fase sólida biodegradables pueden ser formados de polímeros que son degradables (por ejemplo poli(ácido láctico), poli (ácido glicólico) y copolímeros de ellos) o erodibles (por ejemplo poli (orto ésteres tales como 3, 9- dietilideno-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5] undecano (DETOSU) o poli (anhídrido) tales como poli (anhídrido) de ácido sebásico) bajo las condiciones fisiológicas del mamífero. Los micro portadores pueden también ser de fase líquida (por ejemplo, con base en aceite o lípidos) tal como liposomas, iscomas (complejos estimulantes inmunes, que son complejos estables de colesterol y fosfolípidos, saponina activa como adyuvante) sin antígeno o góticas o micelas encontradas en emulsiones aceite en agua o agua en aceite, siempre que los micro portadores de fase líquida sean biodegradables. Los micro portadores de fase líquida biodegradables típicamente incorporan un aceite biodegradable, un número de los cuales son conocidos en la técnica, incluyendo escualeno y aceites vegetales. Los micro portadores son típicamente esféricos en su forma, pero los micro portadores que se desvían de su forma esférica también

son aceptables (por ejemplo, helipsoides, en forma de varillas, etc.). Debido a su naturaleza insoluble (con respecto al agua), los micro portadores son filtrables desde el agua y soluciones con base en agua (acuoso).

[0123] Un conjugado de anticuerpo o de poli péptido de la presente invención puede incluir un enlazador bifuncional que contiene tanto un grupo capaz de acoplarse a un agente tóxico o agente terapéutico y un grupo capaz de acoplarse al anticuerpo. Un enlazador puede funcionar como un espaciador para distancia un anticuerpo de un agente para poder evitar interferencia con las capacidades de ligado. Un enlazador puede ser separable o no separable. Un enlazador puede servir para incrementar la reactividad química de un sustituyente sobre un agente o un anticuerpo, y por lo tanto incrementar la eficacia de acoplamiento. Un incremento en la reactividad química puede también facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales sobre los agentes, que de otra manera no sería posible. Los enlazadores bifuncionales pueden ser acoplados al anticuerpo por medios que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un enlazador que contiene una parte de éster activo, tal como un éster de N-hidroxisuccinimida, puede ser utilizado para acoplarse a residuos de lisina en el anticuerpo mediante un enlace de amida. En otro ejemplo, un

enlazador que contiene una amina nucleofílica o residuo de hidracina puede ser acoplado a los grupos aldehído producidos por oxidación glicolítica de los residuos de carbohidrato del anticuerpo. En adición a estos métodos directos de acoplamiento, el enlazador puede ser acoplado indirectamente al anticuerpo mediante un portador intermedio tal como un amino dextran. En estas modalidades el enlace modificado se hace vía lisina, carbohidrato, o un portador intermedio. En una modalidad, el enlazador está acoplado selectivamente a sitio a residuos libres de tiol en la proteína. Las partes que son adecuadas para el acoplamiento selectivo a grupos tiol sobre las proteínas son bien conocidos en la técnica. Ejemplos incluyen compuestos de disulfuro, alfa-halocarbonilo y compuestos de alfa-halocarboxilo, y maleimidas. Cuando una función de amina nucleofílica está presente en la misma molécula como una alfa-halocarbonilo o grupo carboxilo el potencial existe de ciclización vía alquilación intramolecular de la amina. Los métodos para impedir este problema son bien conocidos para una persona versada en la técnica, por ejemplo mediante la preparación de las moléculas en las cuales las funciones amina y alfa-halo son separadas mediante grupos inflexibles, tales como grupos arilo o trans-alquenos, que hacen que la ciclización indeseada sea estereo químicamente desfavorecida. Ver, por ejemplo, la Patente

Estadounidense número 6, 441, 163 para la preparación de conjugados de maitansinoides y anticuerpos vía una parte de disulfuro.

[0124] Uno de los enlazadores separables que pueden ser utilizados para la preparación de conjugados de anticuerpo-droga es un enlazador labil ácido con base en ácido cis-aconítico que tiene la ventaja del ambiente ácido de diferentes compartimentos intra celulares tal como las endosomas encontradas durante la endocitosis mediada por receptor y los lisosomas. Ver, por ejemplo, Shen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 1048-1054 (1981) para la preparación de conjugados de daunorubicina con portadores macro moleculares; Yang eta al., *J. Natl. Canc. Inst.* 80: 1154-1159 (1988) para la preparación de conjugados de daunorubicina a un anticuerpo anti- melanoma; Dillman et al., *Cancer Res.*, 48: 6097-6102 (1988) para usar un enlazador labil ácido de una manera similar a preparar conjugados de daunorubicina con un anticuerpo de anti- célula T; Trouet et al., *Proc, Natl, Acad. Sci.* 79: 626-629 (1982) para enlazar la dauorubicina a un anticuerpo mediante un brazo espaciador de péptido.

[0125] Un anticuerpo (o poli péptido) de esta invención puede ser conjugado (enlazado) a una molécula radioactiva mediante cualquier método conocido en la técnica. Para una discusión de los métodos para radio marcar anticuerpos ver "Cancer Therapy with Monoclonal AntibodiesT", D.M. Goldenberg ed. (CRC Press, Boca Raton, 1995).

[0126] Un anticuerpo (o poli péptido) de esta invención puede ser enlazado a un agente enmarcado o etiquetado (alternativamente llamado "etiqueta") tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualquier otras etiquetas conocidas en la técnica. Las etiquetas son conocidas en la técnica en que generalmente suministran (sea directa o indirectamente) una señal.

[0127] La habilidad de los anticuerpos, poli péptidos y proteínas de esta invención, tal como su habilidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas que expresan EPHA2, su habilidad para retardar el desarrollo de la metástasis en un individuo con cáncer que expresa el EPHA2, habilidad para suministrar un agente terapéutico, tal como una toxina, o un compuesto radiactivo, a células cancerosas que expresan EPHA2, incluyendo la habilidad para suministrar un agente terapéutico en células cancerosas que expresan

EPHA2, puede ser ensayado utilizando métodos conocidos en la técnica, algunos de los cuales son descritos en los ejemplos.

[0128] La invención también suministra composiciones (Incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden anticuerpos anti- EHPA2 o anticuerpos equivalentes a LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 8los cuales, como se hace claro en esta discusión, incluyen todos los anticuerpos descritos aquí) o poli péptidos y un agente terapéutico.

Métodos para tamizar anticuerpos monoclonales

[0129] Diversos métodos pueden ser utilizados para tamizar adicionalmente anticuerpos monoclonales que ligan a células cancerosas en EPHA2. Un método que puede ser empleado es la inmunohistoquímica (IHC). Las técnicas estándar de inmunohistoquímica son conocidas para aquellos conocedores de la técnica. Ver, por ejemplo, *Animal Cell Culture Methods* (J.P. Mather y D. Barners, eds., Academia Press, Vol. 57, Ch. 18 y 19, pp. 314-350, 1998). Las muestras biológicas (por ejemplo, tejidos) pueden obtenerse de biopsias, autopsias o necropsias. Para determinar si el EPHA2 está presente en células cancerosas, se puede utilizar el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 para detectar la presencia del EPHA2 en los tejidos de

individuos con cáncer mientras que otros tejidos no cancerosos del individuo que sufre de cáncer o tejidos de los individuos sin cáncer son usados como un control. El tejido puede estar embebido en un sólido o sustancias semi sólida que impida el daño durante el congelamiento (por ejemplo, gel de agarosa o OCT) y luego seccionada para el manchado. Los cánceres de diferentes órganos y en diferentes grados pueden utilizados para tamizar anticuerpos monoclonales. Ejemplos de tejidos que pueden ser utilizados para propósitos de tamizado incluyen pero no se limitan a ovario, pecho, pulmón, próstata, colon, riñón, piel, tiroides, cerebro, corazón, hígado, estómago, nervios, vasos sanguíneos, huesos, tracto digestivo superior, y páncreas. Ejemplos de diferentes tipos de cáncer que pueden utilizados para propósitos de tamizado incluyen pero no se limitan a carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, adeno sarcomas, linfomas, y leucemias.

[0130] Todavía otra alternativa, las líneas de células cancerosas tales como SK- Ov-3 (ATCC No HTB 77), LnCap (ATCC No CRL-1740), COLO 205 (ATCC No CCL 222), A549 (ATCC No CCL 185), PANC-1 (ATCC No CRL 1469), SK-BR-3 (ATCC No HTB 30), SK-MES-1 (ATCC No HTB 58), HT-29 (HTB-38), SW 480 (ATCC No CCL 228), AsPC-1 (ATCC No CRL 1682), Capan-1 (ATCC No HTB 79), CÁPAC-1 (ATCC No CRL 1918), HPAF-II (ATCC No CRL- 1997), HS,

700T (ATCC No HTB 147), Du-145 (ATCC No HTB-81), CaLu-1 (ATCC No HTB-54), 786-O (ATCC No CRL-1932), CaKi-2 (ATCC No HTB-47), A498 (ATCC No HTB-44), BT474 (ATCC No HTB-20), y PC-3 (ATCC No CRL1435) y las células normales de sus tejidos respectivos pueden ser utilizadas para tamizar para anticuerpos monoclonales para específicos para tejido canceroso. Principalmente, cultivos celulares primarios o de bajo pasaje de tejidos normales de diferentes órganos, incluyendo pero sin limitarse a ovario, pecho, pulmón, próstata, colon, riñón, piel, tiroides, músculo suave aórtico, y células endoteliales pueden utilizarse como controles negativos. Las células cancerosas o no cancerosas se hacen crecer en plaquetas de vidrio o cubiertas deslizantes, o sobre superficies plásticas, o preparadas en CellArray™, según se describió en la Wo 01/43869, y se tamizaron para el ligado del anticuerpo utilizando IHC como se describió anteriormente para los tejidos. Alternativamente, las células pueden ser removidas de la superficie de crecimiento utilizando medios no proteolíticos y giro en gránulos que luego son embebidos y tratados como tejidos para el análisis IHC como se describió anteriormente. En otra alternativa, las células únicas pueden ser tamizadas mediante incubarlas con el anticuerpo primario, un anticuerpo "reportero" secundario enlazado a una molécula fluorescente y

luego analizados utilizando una máquina de clasificación de células activadas fluorescentes (FACS).

[0131] Varios sistemas de detección diferentes pueden ser utilizados para detectar el ligado de los anticuerpos a la sección del tejido. Típicamente, la inmunohistoquímica involucra el ligado de un anticuerpo primario al tejido y luego un anticuerpo secundario reacciona contra las especies desde el anticuerpo primario generado y conjugado a un marcador detectable (por ejemplo, peroxidasa de rábano, HRP, o diaminobencedina, DAB). Un método alternativo que puede ser utilizado es la técnica de anticuerpos complementarios tipo espejo policlinales o poliMICA. La técnica de la poliMICA (anticuerpos complementarios de imagen de espejo policlinales), descrita por D.C. Mangham y P. G. Isaacson (*Histopathology* (1999)35(2): 129-33), puede ser utilizada para ensayar el ligado de anticuerpos primarios (por ejemplo LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40) a tejido normal y canceroso. Varias clases de kits de detección poliMICATM están disponibles comercialmente de The Binding Site Limited (P.O. Box 4073 Birmingham B29 6AT England). El producto número HK004.D es un kit de detección poliMICATM que utiliza el cromagen DAB. El producto número HK004. A es un kit de detección poliMICATM que utiliza el cromagen AEC.

Alternativamente, el anticuerpo primario puede estar directamente marcado con el marcador detectable.

[0132] La primera etapa en el tamizado IHC para seleccionar un anticuerpo apropiado es el ligado de los anticuerpos primarios hecho en ratones (por ejemplo LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40) a uno o más inmuno genes (por ejemplo muestras de células o tejidos). En una modalidad, la muestra de tejido es seccionada de tejido congelado a partir de diferentes órganos. Las células o muestras de tejido pueden ser cancerosas o no cancerosas.

[0133] Los tejidos congelados pueden ser preparados, seccionados, con o sin fijación y el IHC se lleva a cabo mediante un número de métodos conocidos a aquellos familiarizados con la técnica. Ver, por ejemplo, Stephan et al., *Dev. Biol.* 212:264-277 (1999), y Stephan et al., *Endocrinology* 140:5841-54 (1999).

[0134] Los anticuerpos monoclonales que reaccionan cruzadamente con células humanas y que se ligan a células cancerosas o tejidos cancerosos, pero que no lo hacen a células o tejidos normales al mismo grado, son seleccionados, los anticuerpos monoclonales que se ligan a antígenos

expresados sobre uno o más tipos de cáncer pero no sobre células normales también se seleccionan. El LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 es un ejemplo de un anticuerpo que se liga al antígeno EPHA2 presente en un número de cánceres diferentes, pero tiene un ligado limitado a tejidos normales. El mapeado del epítipo puede ser utilizado para caracterizar adicionalmente al anticuerpo. Servicios disponibles comercialmente (por ejemplo, Pepscan Systems, P.O. Box 2098, 8203 AB Lelystad, The Netherlands) se puede utilizar para determinar el epítipo sobre el antígeno EPHA2, al cual un anticuerpo, tal como el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, se liga.

Métodos de diagnóstico del cáncer utilizando LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, anticuerpos equivalentes o poli péptidos equivalentes que se ligan al EPHA2.

[0135] El anticuerpo anti- EPHA2 monoclonal y sus anticuerpos equivalentes o derivados de poli péptidos de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 que se ligan al EPHA2 hechos por los métodos descritos aquí pueden utilizarse para identificar o detectar la presencia o ausencia de células cancerosas en una variedad de tejidos, incluyendo pero sin limitarse a ovarios, pecho, pulmón, próstata, colon, riñón, piel, tiroides, cerebro, corazón, hígado, estómago, nervios, vasos

sanguíneos, huesos, tracto digestivo superior, y páncreas para propósitos de diagnóstico. Para simplicidad, se hará referencia generalmente a LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o anticuerpos con el entendimiento de que estos métodos aplican a cualquiera de las modalidades que ligan al EPHA2 descritas aquí. La detección generalmente involucra poner en contacto células con un anticuerpo o un poli péptido descrito aquí el cual se liga al EPHA2 y la formación de un complejo entre el EPHA2 y un anticuerpo (por ejemplo LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, un anticuerpo humanizado de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, un anticuerpo humano o cualquier otra parte que liga al EPHA2) que se liga específicamente al EPHA2. La formación de tal complejo puede hacerse in Vitro o in vivo. Sin estar sujeto a ninguna teoría, el anticuerpo anti- EPHA2 puede ligarse al EPHA2 mediante el dominio extracelular del EPHA2. Como se utiliza aquí, la detección puede incluir detección cualitativa y/o cuantitativa y puede incluir comparar el nivel medido a una célula normal para un nivel incrementado de expresión de EPHA2 en células cancerosas.

[0136] Un método de usar los anticuerpos para el diagnóstico es la formación de imágenes de tumor in vivo mediante enlazar el anticuerpo a una parte de etiquetado (por ejemplo, un agente fluorescente, un agente radioactivo o radio fago),

;

administrar el anticuerpo al paciente y utilizar rayos X u otra máquina de formación de imágenes para visualizar la localización del anticuerpo marcado en la superficie de células cancerosas que expresan l antígeno. Las partes marcadas son conocidas en la técnica.

[0137] En otros métodos, las células cancerosas son removidas y el tejido es preparado para inmunohistoquímica mediante métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, embeber en un compuesto congelado, congelar y seccionar, con o sin fijación; la fijación y embeber en parafina con o sin diversos métodos de recuperación de antígeno y contra manchado). Los anticuerpos monoclonales también puede utilizarse para identificar neoplasmas en diferentes etapas de desarrollo. Los anticuerpos también pueden ser utilizados para determinar que tumores del paciente expresan el antígeno sobre su superficie a un nivel predeterminado y por lo tanto son candidatos para inmuno terapia utilizando anticuerpos directamente contra dicho antígeno.

[0138] Los anticuerpos (o poli péptidos) que reconocen el antígeno se pueden también utilizar para crear inmuno ensayos de diagnóstico para detectar el antígeno liberado o secretado de células de cáncer vivas o que están muriendo en fluidos

corporales, incluyendo pero sin limitarse a, sangre, saliva, orina, fluido pulmonar o fluido de ascitas. Como se discutió en detalle adicional, en los ejemplos, el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 puede ligarse a varias formas de cáncer en diferentes etapas desde los tejidos incluyendo pero sin limitarse a melanomas, pecho, pulmón, próstata, y colon. Los métodos para utilizar LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 para propósitos de diagnóstico es útil tanto y después de cualquier forma de tratamiento anti cáncer, por ejemplo, quimioterapia o terapia de radiación, para determinar que tumores más probablemente responden a un tratamiento dado, para prognosis de paciente, subtipo de tumor u origen de enfermedad metastático, y progresión de la enfermedad o respuesta al tratamiento.

Métodos de utilizar LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, o anticuerpos equivalentes o poli péptidos equivalentes para propósitos terapéuticos.

[0139] El anticuerpo anti- EPHA2 monoclonal y anticuerpos equivalentes (lo mismo que otras modalidades de poli péptido de la invención) hechos por los métodos descritos aquí pueden utilizarse para propósitos terapéuticos en individuos con cáncer, incluyendo pero sin limitarse a melanomas, cáncer de pecho, pulmón, próstata, y colon. Estos métodos terapéuticos

también aplican a modalidades enligadas descritas anteriormente. Para simplicidad, se hace referencia en general a LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o anticuerpos con el entendimiento de que estos métodos aplican a cualquiera de las modalidades que ligan al EPFA2 descritas aquí, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos descritos aquí incluyendo modalidades enlazadas. La terapia con LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 puede involucrar la formación de complejos de tal anticuerpo y EPFA2 tanto in Vitro y/o in vivo como se describió anteriormente. En una modalidad, el anticuerpo anti- EPFA2 monoclonal puede ligarse a y reducir el crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas. En otra modalidad, el anticuerpo anti- EPFA2 monoclonal puede ligarse a inducir la muerte apoptótica de células en las células de cáncer. En otra modalidad, el anticuerpo anti- EPFA2 monoclonal puede ligarse a células cancerosas y retardar el desarrollo de la metástasis. En otra modalidad, el anticuerpo anti- EPFA2 monoclonal puede ligarse a células cancerosas y suministrar un agente terapéutico (tal como una toxina, o un compuesto radiactivo) ligado a LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 a células cancerosas. Para algunas modalidades, el agente terapéutico (tal como una toxina) es introducido dentro de una célula (es decir, es internalizado). Agentes adecuados particularmente para estos

métodos incluyen agentes que son activos al interior de la célula. Ejemplos de tales agentes incluyen pero sin limitarse a saponina, caliqueamicina, auristatina, y maitancinoide. Generalmente, en estas modalidades una cantidad efectiva (una cantidad suficiente para suministrar un agente terapéutico a y/o en células cancerosas objetivo) es administrada a un individuo. Todavía en otra modalidad, un individuo con cáncer se le da un tratamiento paliativo con LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. El tratamiento paliativo de un paciente con cáncer involucra tratar o disminuir los síntomas adversos de la enfermedad o síntomas iatrogénicos resultantes de otros tratamientos dados para la enfermedad sin afectar directamente la progresión del cáncer. Esto incluye tratamientos para aliviar el dolor, soporte nutricional, problemas sexuales, esfuerzo psicológico, depresión fatiga, desórdenes siquiátricos, náuseas, vómitos etc.

[0140] Esta invención también suministra métodos para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células de cáncer utilizando el anticuerpo de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o un anticuerpo que se ligue preferencialmente al mismo epítipo que el epítipo al cual cualquiera del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 se liga preferencialmente.

[0141] Todavía en otra modalidad, el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o cualquiera de las modalidades EPHA2 descritas aquí pueden ligarse al EPHA2 que expresa las células cancerosas e induce una respuesta inmune activa contra las células cancerosas que expresan el EPHA2. En algunos casos, la respuesta inmune activa puede causar la muerte de las células cancerosas (por ejemplo el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 se liga a células de cáncer que inducen la muerte apoptótica u oncótica de las célula), o inhibe el crecimiento (por ejemplo, bloquea la progresión del ciclo de las célula) de las células cancerosas. En otros casos, el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o cualquiera de los anticuerpos EPHA2 descritos aquí puede ligarse a células cancerosas y la fitotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) puede eliminar las células cancerosas a las cuales el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 se ligan. De acuerdo a lo anterior, la invención suministra métodos para estimular una respuesta inmune que comprende administrar cualquiera de las composiciones descritas aquí.

[0142] El anticuerpo anti-EPHA2 puede ser administrado con agentes que promuevan o dirijan una respuesta inmune propia del individuo, tal como un agente que fortalezca el ADCC. En una modalidad, por lo menos un residuo fucoso presente en un anticuerpo anti.-EPHA2 se remueve de los oligosacáridos de

ese anticuerpo, una modificación para promover el ADCC. En modalidades similares, los residuos fucosos presentes en un anticuerpo anti-EPHA2 son modificados para alterar su composición al grado requerido para mejorar o promover el ADCC comparado con el anticuerpo original sin modificación.

[0143] En algunos casos, el ligado de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 pueden también activar tanto respuestas inmune celulares y humorales y reclutar más células asesinas naturales o incrementar la producción de citosinas (por ejemplo, IL-2, IFN-g, IL-12, TNF-a, TNF-b, etc.) que activan adicionalmente un sistema inmune del individuo para destruir las células cancerosas. En todavía otra modalidad, el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 pueden ligarse a células cancerosas, y macrófagos u otras células fagocíticas pueden obzonizar las células cancerosas.

[0144] En algunas modalidades, la invención suministra métodos para conferir inmunidad pasiva que comprende administrar cualquiera de las composiciones descritas aquí.

[0145] La invención suministra métodos para suministrar cualquiera de las composiciones (incluyendo conjugados) descritos aquí a una célula que expresa el EPHA2 tal como las

células de cáncer con expresión del EPHA2. Estos métodos conllevan a administrar las composiciones (incluyendo conjugados) descritos aquí a un individuo. En algunas modalidades, los métodos suministran la introducción, por ejemplo, de un conjugado en una célula objetivo. En todavía otra modalidad, el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 pueden estar conjugados a un agente terapéutico tal como una molécula radioactiva, una toxina, por ejemplo, saporina, caliqueamicina, auristatina o maitancinoide, u otras moléculas quimio terapéuticas, o a liposomas u otras vesículas que contienen compuestos quimio terapéuticos y ser administrados a un individuo para objetivar estos compuestos a la célula de cáncer que contiene el antígeno reconocido por el anticuerpo y así eliminar las células cancerosas. En todavía otra modalidad, el anticuerpo puede ser empleado como terapia de adyuvante en el momento de la remoción quirúrgica de un cáncer que expresa el antígeno para poder retardar el desarrollo de la metástasis. El anticuerpo también puede ser administrado antes de la cirugía (terapia neoadyuvante) en un paciente con un tumor que exprese el antígeno para poder disminuir el tamaño del tumor y así permitir una cirugía más simple, esparcir el tejido durante la cirugía, y/o disminuir la desfiguración resultante.

[0146] Varias formulaciones de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 y anticuerpos equivalentes o fragmentos equivalentes (por ejemplo Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, FC, etc.), tal como anticuerpos quiméricos, cadenas única (ScFv), mutantes de ellos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno EPHA2 de especificidad requerida, pueden se pueden utilizar para la administración. En algunas modalidades, los anticuerpos de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o varias formulaciones de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 del mismo pueden ser administradas de manera nítida. En otras modalidades, el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 o varias formulaciones de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 (incluyendo cualquier modalidad de composición descrita aquí) de los mismos y un excipiente farmacéuticamente aceptable son administrados, y pueden venir en diversas formulaciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente efectiva. Por ejemplo, un excipiente puede dar la forma o consistencia, o actuar como diluyente. Excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a agentes estabilizadores, agentes humectantes o emulsificantes, sales para variar la

osmolaridad, agentes encapsulantes, amortiguadores, y mejoradores o promotores de la penetración en la piel. Los excipientes también como formulaciones para suministro de drogas parenteral y no parenteral se establecen en *Remington, The Science and Practice of Pharmacy*, 20th edición. Mack Publishing (200).

[01470] Generalmente estos agentes son formulados para la administración mediante inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.), aunque otras formas de administración (por ejemplo oral, mucosal, etc.) también se pueden utilizar. De acuerdo a lo anterior el anticuerpo de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 y sus equivalentes son combinados preferiblemente con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como salina, solución de ringer, solución de dextrosa, y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, la temporización, y la repetición dependerá del individuo particular y de la historia médica del individuo. Generalmente, cualquiera de las siguientes dosis se pueden utilizar: una dosis de por lo menos cerca de 50 mg/kg de peso de cuerpo; por lo menos cerca de 10 mg/kg del peso de cuerpo; y por lo menos cerca de 3 mg/kg del peso del cuerpo; en por lo menos cerca de 1 mg/kg del peso de cuerpo; por lo menos

cerca de 750 $\mu\text{g/kg}$ del peso del cuerpo; por lo menos cerca de 500 $\mu\text{g/kg}$ del peso del cuerpo; por lo menos cerca de 250 $\mu\text{g/kg}$ del peso del cuerpo; por lo menos cerca de 100 $\mu\text{g/kg}$ del peso del cuerpo; por lo menos cerca de 50 $\mu\text{g/kg}$ del peso del cuerpo; por lo menos cerca de 10 $\mu\text{g/kg}$ del peso del cuerpo; por lo menos cerca de 1 $\mu\text{g/kg}$ del peso del cuerpo; o más, es administrado. Consideraciones empíricas, tales como la vida promedio, generalmente contribuirá a la determinación de la dosificación. Los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano tal como anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, se pueden utilizar para prologar la vida promedio del anticuerpo y para impedir que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del anfitrión.

[0148] En algunos individuos, más de una dosis puede ser requerida. La frecuencia de administración puede ser determinada y ajustada durante el curso de la terapia, y esta basada en la reducción del número de células cancerosas, mantener la reducción de las células cancerosas, reducir el crecimiento y/o la proliferación de las células cancerosas, o recargar el desarrollo de la metástasis. La presencia de células cancerosas pueden ser identificadas por cualquier

número de métodos conocidos para aquellos versados en la técnica o discutidos aquí (por ejemplo, detección por inmune histoquímica o citometría de flujo de biopsias o de muestras biológicas). En algunos casos φ , las formulaciones de liberación continua sostenida de anticuerpos LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 pueden ser apropiadas. Varias formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida se conocen en la técnica.

[0149] En una modalidad, las dosificaciones para los anticuerpos de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 se pueden determinar empíricamente en individuos a quienes se les ha dado una o más administraciones. Los individuos de les dan dosificaciones incrementales de LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40. Para determinar la eficacia del LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 u otro anticuerpo equivalente, los marcadores del estado de enfermedad del cáncer específico puede ser monitoreado. Estos marcadores incluyen: medidas directas del tamaño de tumor mediante palpación u observación visual; medidas indirectas del tamaño del tumor mediante rayos X u otras técnicas de formación de imágenes; una mejora como se determinó por la biopsia directa del tumor y examen microscópico de la muestra de tumor; la mediad de un marcador indirecto (por ejemplo PSA para cáncer de próstata), una disminución en el dolor o

parálisis; mejora del habla, visión, respiración, u otras discapacidades asociadas con el tumor, apetito incrementado; o un incremento en la calidad de vida según se mide mediante ensayos aceptados o por la prolongación de la supervivencia. Será aparente o evidente para aquellos versados en la técnica que la dosis variará dependiendo del individuo, el tipo de cáncer, el estado del cáncer, si el cáncer ha iniciado a metastasizar u otra localización a otras localizaciones del individuo, y el pasado y tratamiento concurrente está siendo utilizado.

[0150] Otras formulaciones incluyen formas de suministro adecuadas conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a vehículos tales como liposomas. Ver, por ejemplo, Mahato et al. (1997) *Pharm. Res.* 14: 853-859. Las preparaciones liposomales incluyen, pero no se limitan a, citofectinas, vesículas multi laminares y vesículas unilaminares.

[0151] En algunas modalidades, más de un anticuerpo puede estar presente. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Tales composiciones pueden contener por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, diferentes anticuerpos que son reactivos contra

carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas o adenosarcomas. El anticuerpo LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 se puede mezclar con uno o más anticuerpos reactivos contra carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas o adenosarcomas en órganos incluyendo pero sin limitarse a ovario, pecho, pulmón, próstata, colon, riñón, piel, tiroides, cerebro, huesos, tracto digestivo superior, y páncreas. Una mezcla de anticuerpos, como usualmente se les llama en la técnica, puede ser particularmente útil para tratar un rango más amplio de población de individuos.

[0152] La determinación de la enfermedad se lleva a cabo utilizando los métodos estándar en la técnica, tales como métodos de formación de imágenes y monitoreo de marcadores apropiados.

Kits que comprenden anticuerpos y poli péptidos de la invención que ligan al EPHA2-

[0153] La invención también suministra kits que comprenden los anticuerpos o cualquiera de las composiciones descritas aquí que ligan al EPHA2 para uso en diagnóstico y/o terapia. De acuerdo a lo anterior, los kits, comprenden un anticuerpo que se puede ligar al EPHA2 preferencialmente y/o formar un

complejo con el EPHA2 (útil, por ejemplo, para detectar células cancerosas de pecho, colon, pulmón, o próstata). En algunas modalidades, los kits comprenden un anticuerpo anti-EPHA2 o un anticuerpo que se liga preferencialmente al mismo epítipo al cual lo hace el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 preferencialmente. En algunas modalidades, los kits comprenden un anticuerpo anti-EPHA2 o un anticuerpo que se liga preferencialmente al mismo epítipo al cual lo hace preferencialmente el LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40 ligado a un agente terapéutico o a un agente de etiquetado o marcado. Estos kits pueden incluir adicionalmente instrucciones y/o reactivos para ligar el anticuerpo o cualquier anticuerpo o modalidades de poli péptido descritas aquí al agente o agentes terapéuticos o al agente o agentes de etiquetado. En algunos aspectos, el ligado de un anticuerpo (por ejemplo, monoclonal, policlonal, humano, humanizado, etc.) al EPHA2 es utilizado para diagnosticar cáncer en un individuo, por ejemplo, kits para detectar la presencia o ausencia de células cancerosas, y kits para detectar la presencia o ausencia de células cancerosas del pecho, colon, pulmón, o próstata. En otros aspectos, los kits se pueden utilizar, por ejemplo para tratar un individuo con cáncer o una historia de familia de cáncer. Los kits para tratar individuos con cáncer incluyen pero no se limitan a kits para inhibir el

crecimiento y/o la proliferación de células de cáncer, para suministra un agente terapéutico a células cancerosas, para suministrar un agente terapéutico dentro de las células cancerosas. Los kits de esta invención vienen en empaque adecuados, y pueden opcionalmente suministrar componentes adicionales tales como amortiguadores e instrucciones para determinar el ligado al EPHA2, tal como reactivos de captura, reactivos de desarrollo, etiquetas, superficies de reacción, medios para detección, muestras de control, e información interpretativa. Las instrucciones pueden ser para cualquier medida de ligado de antígeno, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos ensayos descritos aquí. En otras modalidades, las instrucciones pueden ser para cualquiera de los métodos descritos aquí, incluyendo: instrucciones para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas tales como pecho, colon, pulmón, o próstata para suministrar un agente terapéutico a células cancerosas, para suministrar un agente terapéutico dentro de células cancerosas. En algunas modalidades, los reactivos descritos anteriormente son suministrados de modo que las medidas múltiples se pueden hacer, tales como permitir mediciones en el mismo individuo durante el tiempo o en múltiples individuos. Cualquier medio apropiado para detectar el ligado de los anticuerpos puede ser empleado (y suministrados en los kits) tal como

anticuerpo anti- humano marcado, en donde la etiqueta puede ser una enzima, un fluoróforo, material quimio luminiscente, radio isótopo o de coenzima. Generalmente, la etiqueta utilizada será una enzima.

[0154] Los siguientes ejemplos se suministran para ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. preparación de líneas de células de cáncer como un inmunogén.

[0155] Células completas aisladas de tejido o de cultivos celulares fueron utilizadas como un inmunogén para producir anticuerpos monoclonales que son específicos para antígenos de superficie representativos de un tipo de célula particular. Tales métodos, adecuados para la práctica de esta invención, se describen en la Patente Estadounidense número 6, 541, 225. Generalmente, para producir anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos de superficie celular de un tipo de célula específico, es deseable inmunizar células B no transformadas con células viables e intactas de ese tipo, preferiblemente con aquellas células cuyas superficies están

libres de suero. Las líneas de células que son adecuadas para la generación de anticuerpos monoclonales contra el antígeno EPHA2, tal como pero sin limitarse a LUCA19, SPL1, SG5 o LUCA40, incluyen: BT474 (ATCC No HTB-20), MDA-MB-175VII (ATCC No HB 25), MDA-MB-361 (ATCC No HB 27), SKBR3 (ATCC No HTB-30), SKMES-1 (ATCC No HTB-58), ES-2 (ATCC No CRL-1978 58), SKOV3 (ATCC No HTB-77), HPAFII (ATCC No CRL- 1997), HS700T (ATCC No HTB 147), COLO205 (ATCC No CCL 222), HT-29 (HTB-38), SW480 (ATCC No CCL 228), SW948 (ATCC No CCL 237), A498 (ATCC No HTB-44), y CaKi-2 (ATCC No HTB-47).

[0156] Las células se hicieron crecer en un medio nutriente apropiado suplementado con factores de crecimiento, pero libre de suero. La inmunización con las células que habían sido prepagadas en un medio suplementado con suero puede tener desventajas extremas. El suero contiene una mezcla compleja de biomoléculas pequeñas y grandes con actividades indefinidas. Estas biomoléculas se pueden adherir a las superficies de las células y por lo tanto dirigirse a la generación de anticuerpos de reacción cruzadas con las moléculas no representativas del tipo de células típico. Adicionalmente, el ligado de las biomoléculas del suero a la superficie celular puede llevar a enmascarar los objetivos de antígeno de superficie celular deseados. Un número de

preparaciones de medio libre de suero se conoce comercialmente y esta disponible públicamente, tal como por ejemplo F12/DME (1:1) un medio de nutriente con los siguientes suplementos: insulina (10 µg/ml concentración final), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (5 µg/ml concentración final), ácido de selenio ($2,5 \times 10^{-8}$ m de concentración final), y extracto pituitario de porcino (PPE) (5 µg/ml concentración final).

[0157] Para cosechar las células, las monocapas celulares fueron enjuagadas una vez con solución salina Hanks libre de calcio y de magnesio, y se incubó en 10 mM de EDTA en solución salina hanks a 37 °C durante 15 minutos. Las células fueron luego liberadas de la superficie del cultivo mediante pipeteado gentil. la suspensión celular fue granulada mediante centrifugación a 1000 por g durante 5 minutos. El sobrenadante fue removido y la células fueron resuspendidas en un medio libre de suero con un adyuvante no desnaturalizante según es apropiado.

Ejemplo 2. Generación de anticuerpos monoclonales

[0158] Un adyuvante no desnaturalizante (Ribi, R730, Corixa, Hamilton MT) se rehidrató a 2 ml en salina amortiguada con

fosfato. 100 μ l de este adyuvante rehidratado fue entonces mezclados suavemente con algunos de los gránulos celulares del ejemplo 1 para usarse en la inmunización. Aproximadamente 10^6 células por ratón fueron inyectadas en las plantas de los pies Balb/ratón, aproximadamente 1 o 2 veces a la semana. El programa de inmunización preciso es como sigue: día 0, inmunización más Ribi. Día 3, inmunización más Ribi. Día 7, inmunización más Ribi. Día 24, inmunización menos Ribi. Día 29, inmunización menos Ribi. Día 32, inmunización menos Ribi. Día 36, inmunización menos Ribi. Día 44, inmunización menos Ribi. Día 51, inmunización menos Ribi. Día 69, toma de sangre para muestra para ensayo de título. Día 74, inmunización más Ribi. Día 81, inmunización más Ribi. Día 91, empuje prefusión (sin Ribi). Día 104, cosechar nodos por fusión.

[0159] En el día 69, una gota de sangre se retiró de la cola de cada animal inmunizado para ensayar el título de los anticuerpos contra la línea celular utilizada para inmunizar utilizando análisis FACS. Cuando el título alcanzó por lo menos 1:2000, los ratones se sacrificaron utilizando CO₂ seguido por dislocación cervical. Los nodos linfáticos se cosecharon para la preparación del hibridoma.

[0160] Los linfocitos de los ratones se fusionaron con la línea de mieloma de ratón X63-AG8. 653 utilizando 35% de polietilenglicol 4000. Sobre el día 10 luego de la fusión, los sobre nadantes del hibridoma se tamizaron en cuanto a la presencia de anticuerpos monoclonales específicos a la inmunización de las células mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). El medio acondicionado de cada hibridoma se incubó durante 30 minutos con una alícuota de células de riñón fetal humano. Después de la incubación, las muestras de células se lavaron, resuspendidas en 0,1 de diluyente, e incubadas con un $\mu\text{g/ml}$ FITC conjugado con fragmento F(ab')_2 de IgG anti ratón de cabra durante 30 minutos a 4°C . Las células se lavaron, resuspendidas en 0,2 ml de FACS como diluyente y se analizaron utilizando el analizador de células FACScan (Becton Dickinson; San Jose, CA). Los clones de hibridoma se seleccionaron para una expansión adicional, clonación y caracterización con base en su ligado a la superficie de las células de riñón fetal humanos mediante FACS. Un hibridoma que hace un anticuerpo monoclonal designado mu-SPL1 que se liga a un antígeno designado Ag-SPL1 y un epítipo de ese antígeno designado Ag-SPL1 se seleccionó. Un hibridoma que hace un anticuerpo monoclonal designado LUCA-19, que se liga a un antígeno designado Ag-LUCA19 y un epítipo sobre ese antígeno designado

Ag-LUCA19.1 se seleccionó. Un hibridoma que hace el anticuerpo monoclonal designado mu-LUCA40 que liga un antígeno designado Ag-LUCA40 y un epítipo sobre ese antígeno designado Ag-LUCA40.1. Un hibridoma que hace un anticuerpo monoclonal designado mu-SG5, que se liga a un antígeno designado Ag-SG5 y un epítipo sobre ese antígeno designado Ag-SG5.1. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales, mu-SPL-1, mu-LUCA19, mu-LUCA40 y mu-SG5 se expandieron en cultivos para la purificación de los anticuerpos monoclonales en un medio de cultivo que es capaz de soportar el crecimiento del anticuerpo monoclonal y la purificación del anticuerpo.

Ejemplo 3. Purificación de anticuerpos anti- EPHA2

[0161] Las células de cáncer humano tales como pero sin limitarse a SUMES-1, 786-O, y Colo205 se liberaron de los frascos de cultivo de tejido en la presencia de 10,0 mM de EDTA, se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS que contenía 1% de BSA y 2 mM de EDTA (diluyente FACS). Las células se contaron y ajustaron a 10^7 células / ml. Cerca de 0.1 ml de las células se incubaron con 10 μ l de diluyente FACS durante 30 minutos a 37°C. Los anticuerpos monoclonales que ligan a las líneas de células de

cáncer humano se purificaron de sobre nadantes del cultivo de tejido utilizando la cromatografía por afinidad de proteína G. Si se requirió el sobre nadante del cultivo de tejido se puede pasar sobre una columna de IgG bovino antes de la purificación del anticuerpo para remover el exceso de IgG bovino. Los siguientes materiales se utilizaron para el proceso de purificación del anticuerpo: sobre nadante de cultivo de tejido de hibridoma, amortiguador que liga el IgG (G) inmuno puro (Pierce No 21011 Rockford, IL), amortiguador de elusión de IgG inmuno puro Pierce No 21009), HCL concentrado (para ajustar el ph), un litro de PES Corning (polisulfona de poliéter), 0,22 μm de filtro (Corning No 431098, Corning, NY), sistema explorador AKTA de Amersham farmacia (Amersham Biosciencies, Piscataway, NJ), sefarosa 4 de proteína- G de flujo rápido (Amersham Biosciencies No 17-0618-03), amortiguador de corte que consiste en tiocianato de potasio al 3 m (50 mm de tris ph 7,8), y PBS (salina amortiguada con fosfato), tris al 3 m con ph 9,0.

[0162] Para purificar el SPL1 antihumano de ratón, el LUCA19 antihumano de ratón y el LUCA40 antihumano de ratón preferidos aquí como mu-SPL1, mu-LUCA19 y mu-LUCA40, respectivamente, el volumen del sobre nadante se midió y un volumen igual de amortiguador de ligado se agregó al sobre

nadante. La mezcla se le permitió equilibrarse a temperatura ambiente. El sobre nadante se clarificó mediante pasarlo a través de un filtro de 0,22 μm . El sobre nadante se cargó sobre una columna de proteína-G sefarosa utilizando el sistema explorador AKTA (Amersham Biosciences), y luego se lavó con 5 a 10 volúmenes de columna de amortiguador de ligado. El anticuerpo monoclonal se eluyó con el amortiguador de elusión y las fracciones se recolectaron. Las fracciones se neutralizaron luego de la elusión con la adición de tris al 3 M, pH 9,0 en tubos vacíos (1/60 volumen de las fracciones). Las fracciones pico que contenían el anticuerpo monoclonal se agruparon. Las muestras agrupadas se inyectaron en un cassette analizador de deslizamiento prehumedo (10000 MW de corte; Pierce No 66810) y se dializó en 1 por PBS a 4°C (con tres cambios de amortiguador de cada uno 4 horas de diálisis por cambio). El anticuerpo monoclonal purificado fue filtrado estéril (0.2 μm Acrodisc) y almacenado entre 2 a 8 °C.

[0163] Una muestra de anticuerpo purificado se toma para la determinación de la concentración mediante absorbancia UV (A_{280}) y electrofóresis de gel de SDS- poliacrilamida (SDS-PAGE). El SDS-PAGE se corre bajo tanto condiciones no reductoras como condiciones reductoras para el análisis del peso molecular, la identificación del patrón del ligado

típico de anticuerpos monoclonales y la determinación de la pureza.

[0164] Después de la purificación del mu- SPL1, mu-LUCA19 y mu-LUCA40 del sobre nadante de hibridoma, este se reensayó en cuanto al ligado para la inmunización respectiva o las células objetivas de interés. Las muestras de células se prepararon como se describió anteriormente y se incubaron con el anticuerpo purificado en varias concentraciones. Después de la incubación las células se lavaron, resuspendidas en 0,1 ml de diluyente e incubadas 1 µg de fragmento F(ab)'2 conjugado con FITC de IgG anti- ratón de cabra durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron, resuspendidas en 0,5 ml de diluyente FACS y analizadas utilizando el clasificador de células FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Un cambio a la derecha en el histograma del FACScan indicó que el anticuerpo purificado todavía se ligaba a las células.

[0165] En otros experimentos, el ligado mu-SPL1, mu-LUCA19 y mu-LUCA40 a SPL1, LUCA19 y LUCA40, respectivamente, se ensayo y se confirmó utilizando el HELISA en células vivas. El siguiente método se utilizó aunque otros métodos comúnmente conocidos en el campo son aplicables. Células (HT-29, SKOV3, SUMES-1, SW480, SKBR-3 y HPAFII) se hicieron crecer en 10 %

de suero bovino fetal (FBS) que contenía el medio para la confluencia sobre el cultivo de tejido tratado en placas de 96 pozos (Falcon). Las células se lavaron con PBS y se incubaron con 50 μ l de anticuerpos deseados a una concentración deseada en solución de sal balanceada de Hank (HBSS) que contiene 1% de BSA y 0,1% de azida de sodio durante una hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron entonces tres veces con 100 μ l por pozo de HBSS antes de la incubación con peroxidasa de rábano (HRP) anticuerpo secundario (50 μ l por pozo diluido en HBSS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron finalmente tres veces con HBSS y el sustrato de cambio de color (sustrato TMB, KPL) se agregó a cada pozo a 100 μ l por pozo. La reacción de cambio de color se detuvo con la adición de 100 μ l por pozo de ácido fosfórico al 1 M. Las placas se leyeron entonces en O.D. 450 nm.

Ejemplo 4. Análisis Western blot de la expresión de SPL1, LUCA19 y LUCA40 en línea celular de cáncer SW480

[0166] La línea de células de carcinoma de célula renal SW480 (ATCC No CCL-228) se hizo crecer para confluenciar sobre 175 cm² de platos de cultivo. La mono capa confluyente se lavó tres veces con solución de sal balanceada de Hank

(HBSS más bicarbonato que no contenía sodio o fenol rojo; amortiguado con 10 mM de HEPES, pH 7,4; Sigma Chemicals) y biotinilado con 200 µg de sulfo- NHS-LC-biotin (Pierce Endogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células entonces se lavaron con HBSS+ tris al 0,1 M, pH 7,4 (Sigma Chemicals) e incubadas en HBSS+ un contenido de tris al 0,1 M, pH 7,4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron finalmente tres veces con HBSS+ y lisadas para su incubación durante cinco minutos, sobre hielo, en amortiguador de lysis (HBSS+ con 2% de Triton X-100, 2 mM de PMSF, 0,1% de azida de sodio, y una tableta por 5 ml de amortiguador de lysis de EDTA libre en un cóctel miniproteasa completo (Roche Molecular Biochemicals)).

[0167] Las células se rasparon en el amortiguador de lysis y los lisatos recolectados. Los lisatos se centrifugaron a 14000 por g durante una hora a 4°C. El lisato clarificado fue entonces preclarificado durante dos horas a 4°C con 5 µl de perlas de sefarosa 4MB CNBr conjugadas con IgG humano (1 mg/ml) (Amersham Farmacia). Las perlas de IgG humano fueron centrifugadas y removidas, y luego el lisato preclarificado se incubó con anticuerpo monoclonal mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 conjugado con perlas de sefarosa 4MD CNBr (conjugado a un mg/ml) durante dos horas a 4°C. Las perlas de

mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 se centrifugaron y removieron después de dos horas de incubación. Tanto el IgG humano y las perlas de mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 se lavaron lavadas individualmente tres veces con 1 ml de amortiguador de lysis y entonces lavadas tres veces con 1 ml de HBSS+. Las perlas lavadas se eluyeron mediante la adición de 30 µl de un amortiguador de muestra SDS-PAGE y se hicieron hervir a 99°C durante 5 minutos.

[0168] Las muestras se resolvieron entonces sobre un gel de gradiente novel de 4 a 20% (Invitrogen), y se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Invitrogen) y se visualizó mediante estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Pierce Endogen) o manchadas western con 5 µg/mancha de mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40.

[0169] Para la detección con la estreptavidina conjugada con HRP, la nitrocelulosa se bloqueó primero durante una hora con amortiguador de bloque (5% de leche seca sin grasa en salina amortiguada con tris con 0,05% de tween -20 (TBST)). La estreptavidina conjugada con HRP se diluyó en TBST a 1 µg/ml y se expuso a la microcelulosa durante 30 minutos a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se lavó tres veces con TBST antes de la visualización con ECL+ (Amersham).

[0170] Para el manchado Western con mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40, la nitrocelulosa se bloqueó similarmente durante 1 hora en amortiguador de bloqueo. La nitrocelulosa se incubó entonces en una bolsa plástica sellada al calor que contenía 1 ml de 5 µg/ml de mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 diluidos en amortiguador de bloqueo. La nitrocelulosa se lavó tres veces con TBST antes de la incubación con 10 ml de IgG anti-ratón de burro conjugado con HRT 1 µg/ml (cadena pesada y liviana específica, absorbido de malla cruzada contra proteínas de suero bovino, pollo, cabra, marranito de guinea, Hanster cirio, caballo, humano, conejo, oveja; Jackson ImmunoResearch Cat. No 709-035-149) durante una hora a temperatura ambiente. la nitrocelulosa fue finalmente lavada tres veces con TBST y se visualizó mediante SL+ (Amersham).

Ejemplo 5. Métodos inmunohistoquímicas

[0171] Muestras de tejido congelado de pacientes con cáncer fueron embebidos en un compuesto OCT con congelamiento rápido en isopentano con hielo seco. Las criosecciones se cortaron con una micro toma leica 3050 CM en un espesor de 8 a 10 µm y montadas en deshielo sobre tajadas SuperFrost Plus (VWR No

48311-703). Las secciones se fijaron con 75% de acetona / 25 % de etanol a 10 °C y se les permitió secarse al aire 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Las secciones fijas se almacenaron a -80°C hasta el uso.

[0172] Para la inmunohistoquímica, las secciones de tejido se recuperaron lavadas en tris amortiguado con 0,05% de tween (TB-T) y bloqueadas en amortiguador de bloqueo (TB-T, 5% de suero de cabra normal y 100 µg/ml de avidina) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las tajadas fueron entonces incubadas con los anticuerpos monoclonales mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 y de control diluidos en amortiguador de bloqueo (1 µg/ml). Durante 60 a 90 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron entonces tres veces con el amortiguador de bloqueo. Los anticuerpos monoclonales ligados fueron detectados con conjugados de IgG anti- ratón de cabra más IgM (H+L) F (ab')²- peroxidasa y la diaminobencidina en el sustrato de perodixidasa (1 mg/ml, Sigma Cat. No. de 5637) en 0,1 m de amortiguador de acetato de sodio a ph 5,05 y 0, 003% de peróxido de hidrógeno (Sigma Cat. No. H1009). Las tajadas manchadas fueron contramarchadas con hematoxilina y examinadas bajo el microscopio Nikon.

[0173] En algunos casos, la parafina embebida en tejidos fijados por formaldehído se puede utilizar para la inmunohistoquímica después de que los métodos de recuperación de antígeno apropiados fueron empleados. Uno de tales métodos de recuperación de describe en Mangham e Isaacson, *Histopathology* 35:129-33 1999). Otros métodos de recuperación de antígeno y/o detección se pueden utilizar por aquellos versados en la técnica. Los resultados de experimentos similares llevados a cabo utilizando tejidos congelados o, cuando es apropiado, tejidos fijos con la recuperación de antígeno y la detección de polyMICA se llevaron a cabo. El ligado de los anticuerpos anti-LUCA19, anti- SPL1, y anti-LUCA40 a una variedad de tejidos normales y de cáncer se determinó. En todos los casos, el anticuerpo se ligó en tejidos fijos de control fue correlacionado con aquella de los tejidos congelados. Los resultados de los tejidos congelados se usaron solamente si dos no casaban en los controles.

[0174] Para la conveniencia, un resumen de los resultados combinados de diversos experimentos que utilizan tejido quirúrgico congelado de diferentes fuentes se muestra abajo en las tablas 1 a 7. Las tablas 1 a 4 resumen la distribución de los antígenos LUCA19, SPL1, SG5 y LUCA40 sobre tejidos

humanos normales. Las tablas 5 a 7 resumen la distribución de los antígenos LUCA19, SPL1, y LUCA40 sobre varios tejidos de tumor humano.

Tabla 1. distribución del antígeno LUCA19 en Tejidos humanos normales	
Tipo de tejido	Resultados
Piel	Negativo
Pulmón	Negativo
Riñón	Negativo
Páncreas	Negativo excepto por 1+ de manchas en unos pocos ductos
Hígado	Negativo
Colón	Negativo
Duodeno	1+ manchado en el epitelio basal

Tabla 2. distribución del antígeno LUCA40 en Tejidos humanos normales	
Tipo de tejido	Resultados
Piel	Negativo excepto +/- sobre pocos vasos subcutáneos pequeños
Pulmón	Negativo
Riñón	Negativo excepto +/- en glomeruli
Páncreas	Negativo
Hígado	Negativo excepto para +/- en parenquina
Colón	Negativo excepto +/- sobre mucosa y muscularis
Duodeno	Negativo
Próstata	Negativo
Ovario	Negativo
Pecho	Negativo excepto +/- sobre estructuras gladulares

Tabla 3. distribución del antígeno SPL1 en Tejidos humanos normales	
Tipo de tejido	Resultados
Piel	Negativo
Pulmón	Negativo
Riñón	Negativo
Páncreas	Negativo
Hígado	Negativo
Colón	1+ manchado focal sobre mucosa (50%)
Duodeno	1+ manchado mucosal
Próstata	Negativo
Ovario	Negativo
Pecho	Negativo

Tabla 4. distribución del antígeno SG5 en Tejidos humanos normales	
Tipo de tejido	Resultados
Piel	+/- estañado en epidermis y glándulas de sudor
Pulmón	Negativo
Riñón	Negativo
Páncreas	Negativo
Hígado	+/- manchado (sitio parenquimal)
Colón	Negativo
estómago	Negativo
Próstata	Negativo
Ovario	Negativo
Pecho	Negativo

Tabla 5. distribución del antígeno LUCA19 en Tejidos de tumor humano	
Tipo de tejido	Resultados
Próstata	Negativo sobre 4/4 tumores tamizados
Colón	1-3+ manchado 5/5 tumores tamizados

Riñón	Negativo sobre 5/5 tumores tamizados
Pulmón	1-2+ manchado sobre 4/7 tumores tamizados y negativos sobre 3/7 tumores tamizados
Ovarios	Negativo sobre 4/4 tumores tamizados
Páncreas	2-3+ sobre 5/5 tumores tamizados
Pecho	Variable; 1-2+ sobre 1/3 tumores tamizados

Tabla 6. distribución del antígeno LUCA40 en Tejidos de tumor humano	
Tipo de tejido	Resultados
Próstata	Variable; negativo a 1+ manchado; 8 tumores tamizados
Colón	1-3+ manchados sobre 8/8 tumores tamizados
Riñón	+/- manchado estromal sobre 5/5 tumores tamizados
Pulmón	Variable; negativo a 1+ manchado; 8 tumores tamizados
Ovarios	+/- manchado estromal sobre 5/5 tumores tamizados
Páncreas	1-2+ manchado sobre 7/7 tumores tamizados
Pecho	Negativo sobre ¼ tumores tamizados; +/- sobre ¼ tumores tamizados

Tabla 7. distribución del antígeno SPL1 en Tejidos de tumor humano	
Tipo de tejido	Resultados
Próstata	Negativo sobre 6/6 tumores tamizados
Colón	1-3+ manchados apical sobre 7/9 tumores; negativo sobre 2/9 tumores tamizados
Riñón	Negativo sobre 5/5 tumores tamizado
Pulmón	Variable +/- a 1+ manchado sobre 3/8 tumores tamizados; negativo sobre 5/8 tumores tamizados
Ovarios	Negativo sobre 5/5 tumores tamizados
Páncreas	1-2+ sobre 6/6 tumores tamizados
Pecho	Negativo sobre 4/4 tumores tamizados

Ejemplo 6. Resultados de la inmunocitoquímica

[0175] Los anticuerpos monoclonales mu-SPL1, mu-LUCA19, y mu-LUCA40 se utilizaron para el ensayo de reactividad con varias líneas de células de diferentes tipos de tejidos. Los resultados se registraron como "+" para un manchado positivo y "++" para un manchado positivo moderado, "+++" para un manchado fuerte positivo y "-" para manchado negativo.

[0176] Los resultados de la inmunohistoquímica se obtuvieron utilizando la tecnología CellArray™, como se describió en la WO 01/43869. Las células de diferentes líneas celulares establecidas se removieron de la superficie de crecimiento sin utilizar proteasas, se empacaron y embebieron en el compuesto OCT. Las células se congelaron y seccionadas, y se mancharon utilizando un protocolo IHC estándar.

[0177] Los resultados del ligado de los anticuerpos de mu-SPL1, mu-LUCA19, y mu-LUCA40 a diversas líneas de células de tumor y normales humanas establecidas son compiladas para conveniencia en las tablas 8-10. Los experimentos representados en la tabla 8 incluyen el HELISA de célula viva, el arreglo de sarcoma y el CellArray™ como experimentos

de ligado con el mu-LUCA19 utilizando los métodos descritos aquí. Los experimentos representados en la tabla 9 incluyen los experimentos de ligado por HELISA de célula viva, el arreglo de sarcoma y el CellArray™ con mu-LUCA40 utilizando los métodos descritos aquí. Los experimentos representados en la tabla 10 incluyen los experimentos de ligado por HELISA de célula viva, el arreglo sarcoma y el CellArray™ con el mu-SPL1 utilizado los métodos descritos aquí.

Tabla 8. ligado del Mu-LUCA19						
Línea celular	ATCC#	Órgano	Tipo de célula	Reactividad del arreglo celular	Reactividad del arreglo Sarcoma	Reactividad por HELISA de célula viva
MDA361	HB-27	Pecho	Adenocarcinoma	-		
MDA175	HB-29	Pecho	Carcinoma ductal	-		
MCF7	HTB-22	Pecho	Adenocarcinoma	-		
SKBR3	HTB-30	Pecho	Metastático; efusión adenocarcinoma de efusión pelural	-		-
BT474	HTB-20	Pecho	Carcinoma ductal	-		
HUVEC	Primario	Célula endotelial	Adulto humano normal	++		
HMEC	CC-2251 *	Pecho	Normal de mamífero epitelial	-		

SKOV3	HTB-77	Ovario	Adenocarcinoma	++		+++
ES-2	CRL-1978	Ovario	Carcinoma	+		
SKMES1	HTB-58	Pulmón	Carcinoma escamoso	-		+
CA130	RA VEN	Pulmón	Carcinoma de célula pequeña	+/-		
A549	CCL-185	Pulmón	Carcinoma	+		
9979	RA VEN	Pulmón	Línea de célula de cáncer de pulmón	-		
SW948	CCL-237	Colon	Adenocarcinoma colorectal	-		
SW480	CCL-228	Colon	Adenocarcinoma colorectal	-		+++
HT-29	HTB-38	Colon	Adenocarcinoma colorectal	-		+
Colo205	CCL-222	Colon	Adenocarcinoma colorectal de ascitas	+/-		
Hs700T	HTB-147	Páncreas	Adenocarcinoma	-		
HP AFII	CRL-1997	Páncreas	Adenocarcinoma	++		-
AsPC-1	CRL-1682	Páncreas	Adenocarcinoma	+		
9926	RA VEN	Páncreas	Adenocarcinoma	++		
SVT2	CCL- 163.1	Embrión (Ratón)	Fibroblasto; SV 40 transformado	-		
Cos7	CRL-1651	Riñón (mono verde africano)	SV 40 Transformado	+/-		
RL65	CRL-	Pulmón	Célula	-		

	I0354	(Rata)	epitelial			
Calu3	HTB-55	Pulmón	Adenocarcinoma	+++		
Caki2	HTB-47	Riñón	Carcinoma de célula clara	+		
A498	HTB-44	Riñón	Carcinoma	+/-		
786-0	CRL-1932	Riñón	Carcinoma de célula renal	+/-		
293	CRL-1573	Riñón	Transformado con ADN del adenovirus5	-		
TDH	RAVEN	Próstata	Líneas de células de cáncer de próstata	-		
PC3	CRL-1435	Próstata	Adenocarcinoma	-		
LNCaP	CRL-1740	Próstata	Carcinoma	-		
DU145	HTB-81	Próstata	Adenocarcinoma	+++		
22RV1	CRL-2505	Próstata	Carcinoma	-		
Hs746T	HTB-135	Estómago	Carcinoma	++		
N87	CRL-5822	Estómago	Metastático; carcinoma gástrico del hígado	++		
SW872	HTB-92	Tejido conectivo	Liposarcoma		++	
SW684	HTB-91	Tejido conectivo	Fibrosarcoma		++	
SK-UT-1	HTB-114	Útero	Leiomiomasarcoma		++	
SK-LMS- 1	HTB-88	Vulva	Leiomiomasarcoma		++	
SK-ES-1	HTB-86	Hueso	sarcoma de		-	

			Ewing			
RD-ES	HTB-166	Hueso	sarcoma de Ewing		+/-	
RD	CCL-136	Músculo	Rabdomiosarcoma		-	
MG-63	CRL-1427	Hueso	Osteosarcoma		-	
HT-I080	CCL-121	Tejido conectivo	Fibrosarcoma		++	
G-292	CRL-1423	Hueso	Osteosarcoma		-	
A-204	HTB-82	Músculo	Rabdomiosarcoma		+	

* CC-2251 BioWhittaker

Tabla 9. Ligado del Mu-LUCA40

Línea celular	ATCC#	Órgano	Tipo de célula	Reactividad del arreglodel celular	Reactividad del arreglo Sarcoma	Reactividad por HELISA de célula viva
HMEC	CC-2251*	Pecho	Normal de mamífero epitelial	-		
HUVEC	Primary	Célula endotelial	Adulto humano normal adult	++		
BT474	HTB-20	Pecho	Carcinoma ductal	-		
MCF7	HTB-22	Pecho	Adenocarcinoma	-		
MDA175	HB-29	Pecho	Carcinoma ductal	-		
MDA361	HB-27	Pecho	Adenocarcinoma	-		
SKBR3	HTB-30	Pecho	Metastático; adenocarcinoma de efusión pleural	-		-
9979	RAVEN	Pulmón	Línea de célula de cáncer de Pulmón	+		
A549	CCL-185	Pulmón	Carcinoma	+		
CA130	RAVEN	Pulmón	Carcinoma de célula pequeña	+		

Calu3	HTB-55	Pulmón	Adenocarcinoma	+		
SKMES1	HTB-58	Pulmón	Carcinoma escamoso	-		+
ES-2	CRL- 1978	Ovario	Carcinoma	+++		
SKOV3	HTB-77	Ovario	Adenocarcinoma	+		+++
9926	RA VEN	Páncreas	Adenocarcinoma	++		
AsPC-1	CRL- 1682	Páncreas	Adenocarcinoma	+		
HP AFTI	CRL- 1997	Páncreas	Adenocarcinoma	++		-
Hs700T	HTB-147	Páncreas	Adenocarcinoma	+		
Colo205	CCL-222	Colon	Adenocarcinoma colorectal De ascitas	+		
HT-29	HTB-38	Colon	Adenocarcinoma colorectal	-		+
SW480	CCL-228	Colon	Adenocarcinoma colorectal	++		+++
SW948	CCL-237	Colon	Adenocarcinoma colorectal	-		
293	CRL- 1573	Riñón	ADN Transformado con adenovirus5	+/-		
786-0	CRL- 1932	Riñón	Carcinoma de célula renal	+		
A498	HTB-44	Riñón	Carcinoma	+		
Caki2	HTB-47	Riñón	Carcinoma de célula clara	+		
Cos7	CRL- 1651	Riñón mono verde africano	SV Transformado 40	++		
RL65	CRL- I0354	Pulmón (Rata)	Célula epitelial	-		
SVT2	CCL- 163.1	Embrión (Ratón)	Fibroblasto; SV 40 Transformado	-		
22RV1	CRL- 2505	Próstata	Carcinoma	-		
DU145	HTB-81	Próstata	Adenocarcinoma	-		
LNCaP	CRL- 1740	Próstata	Carcinoma	-		

PC3	CRL-1435	Próstata	Adenocarcinoma	-		
TDH	RAVEN	Próstata	Línea de célula de cáncer de Próstata	++		
Hs746T	HTB-135	Estómago	Carcinoma	+		
N87	CRL-5822	Estómago	Metastático; carcinoma gástrico del hígado	++		
SW872	HTB-92	Tejido conectivo	Liposarcoma			++
SW684	HTB-91	Tejido conectivo	Fibrosarcoma			++
SK-UT-1	HTB-114	Útero	Leiomiomasarcoma			+
SK-LMS-1	HTB-88	Vulva	Leiomiomasarcoma			++
SK-ES-1	HTB-86	Hueso	sarcoma de Ewing			-
RD-ES	HTB-166	Hueso	sarcoma de Ewing			+/-
RD	CCL-136	Músculo	Rabdomiosarcoma			-
MG-63	CRL-1427	Hueso	Osteosarcoma			-
HT-1080	CCL-121	Tejido conectivo	Fibrosarcoma			++
G-292	CRL-1423	Hueso	Osteosarcoma			-
A204	HTB-82	Músculo	Rabdomiosarcoma			+

* CC-2251 BioWhitaker

Tabla 10. Ligado del Mu-SPL1 binding

Línea celular	ATCC#	Órgano	Tipo de célula	Reactividad del arreglodel celular	Reactividad del arreglo Sarcoma	Reactividad por HELISA de célula viva
HMEC	CC-2251*	Pecho	Normal de mamífero epitelial	-		
HUVEC	Primario	Célula endotelial	Adulto humano normal	++		
BT474	HTB-20	Pecho	Carcinoma	-		

			ductal			
MCF7	HTB-22	Pecho	Adenocarcinoma	-		
MDA175	HB-29	Pecho	Carcinoma ductal	-		
MDA361	HB-27	Pecho	Adenocarcinoma	-		
SKBR3	HTB-30	Pecho	Metastático; adenocarcinoma de efusión pleural	-		-
9979	RA VEN	Pulmón	Línea de células de cáncer de Pulmón	+		
A549	CCL-185	Pulmón	Carcinoma	+		
CA130	RAVEN	Pulmón	Carcinoma de célula pequeña	+		
Calu3	HTB-55	Pulmón	Adenocarcinoma	+		
SKMES1	HTB-58	Pulmón	Carcinoma escamoso	-		+
ES-2	CRL-1978	Ovario	Carcinoma	+++		
SKOV3	HTB-77	Ovario	Adenocarcinoma	++		+++
9926	RA VEN	Páncreas	Adenocarcinoma	++		
AsPC-1	CRL-1682	Páncreas	Adenocarcinoma	++		
HP AFII	CRL-1997	Páncreas	Adenocarcinoma	++ (75%)		-
Hs700T	HTB-147	Páncreas	Adenocarcinoma	+/-		
Colo205	CCL-222	Colon	Adenocarcinoma colorectal ascitas	+/. . .		
HT-29	HTB-38	Colon	Adenocarcinoma colorectal	+/-		+
SW480	CCL.228	Colon	Adenocarcinoma colorectal	++		+++
SW948	CCL-237	Colon	Adenocarcinoma colorectal	+		
293	CRL-1573	Riñón	ADN Transformado con adenovirus5	+/-		
786-0	CRL-1932	Riñón	Carcinoma de célula renal	+		
A498	HTB-44	Riñón	Carcinoma	+		

Caki2	HTB-47	Riñón	Carcinoma de célula clara	++		
Cos7	CRL-1651	Riñón (mono verde africano)	SV Transformado 40	++		
RL65	CRL-I0354	Pulmón (Rata)	Célula epitelial	-		
SVT2	CCL-163.1	Embrión (Ratón)	Fibroblasto; SV40 transformado	-		
22RV1	CRL-2505	Próstata	Carcinoma	-		
DU145	HTB-81	Próstata	Adenocarcinoma	+/-		
LNCaP	CRL-1740	Próstata	Carcinoma	-		
PC3	CRL-1435	Próstata	Adenocarcinoma	-		
TDH	RA VEN	Próstata	Línea de célula de cáncer de Próstata	++		
Hs746T	HTB-135	Estómago	Carcinoma	+		
N87	CRL-5822	Estómago	Metastático; carcinoma gástrico de hígado	++		
SW872	HTB-92	Tejido conectivo	Liposarcoma		+	
SW684	HTB-91	Tejido conectivo	Fibrosarcoma		++	
SK-UT-1	HTB-114	Útero	Leiomiomasarcoma		+	
SK.LMS-1	HTB.88	Vulva	Leiomiomasarcoma		++	
SK-ES-1	HTB-86	Hueso	sarcoma de Ewing		-	
RD-ES	HTB-166	Hueso	sarcoma de Ewing		-	
RD	CCL-136	Músculo	Rabdomiosarcoma		-	
MG-63	CRL-1427	Hueso	Osteosarcoma		-	
HT-1080	CCL-121	Tejido conectivo	Fibrosarcoma		++	
G-292	CRL-1423	Hueso	Osteosarcoma		-	
A204	HTB-82	Músculo	Rabdomiosarcoma		+	

*CC-2251 BioWhitaker

[0178] Los resultados del ligado de los anticuerpos de mu-LUCA19, mu-LUCA40 y mu-SPL1 a diversas líneas de células de tumor establecidos del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) con compilados para conveniencia en la tabla 11 utilizando los métodos descritos aquí.

Tabla 11. Arreglo de línea celular NCI			LUCA19	LUCA40	8PL1
Línea celular	Origen de tumor	Tipo histológico	Reactividad	Reactividad	Reactividad
CRF-CEM	Sangre periférica	Leucemia linfoblástica aguda	-	-	-
HL-60 (TB)		Leucemia proliocítica	-	-	-
K -562	Efusión pleural	Leucemia mielogenosa crónica	-	-	-
MOLT-4	Sangre periférica	Leucemia linfoblástica aguda	-	-	-
RPMI-8226	Sangre periférica	Mieloma múltiple	-	-	-
SR		Lifoma de célula grande inmunoblástica	-	-	-
A549	Pulmón	Carcinoma	+	+	+
EKVX	Pulmón	Adenocarcinoma	-	-	-
HOP-62	Pulmón	Adenocarcinoma	+++	+++	+++
HOP-92	Pulmón	Célula grande no diferenciada	+	+	++
NO-H226	Pulmón	Célula escamosa	+	++	++
NCI-H23	Pulmón	Adenocarcinoma	+/-	-	+
NCI-	Pulmón	carcinoma alveolar			

H322M		Bronquial	-	-	-
NO-H460	Pulmón	Célula no pequeña	-	-	-
NCI-HS22	Pulmón	Adenocarcinoma	++	++	++
Colo205	Colon	Adenocarcinoma colorectal ascitas	+/-	+/-	+ (50%)
HCC-2998	Colon	Carcinoma	++	++	+++
HCT-116	Colon	Carcinoma	++	++	++
HCT-15	Colon	Adenocarcinoma	+	+/-	+
HT29	Colon	Adenocarcinoma colorectal	-	-	+
KM12	Colon	Adenocarcinoma	+	++	++
SW-620	Adenocarcinoma colorectal	Metastático; Nodo linfático	++	++	+++
SF-268	CNS	astrocitoma Anaplasico	++	++	++
SF-295	CNS	Multiforme Glioblastoma	+	+	+
SF-539	CNS	Gliosarcoma	++	++	++
SNB-19	CNS	Glioblastoma	++	++	++
SNB-75	CNS	Astrocitoma	+/-	+/-	+/-
U251	CNS	Glioblastoma	+++	++	++
LOX IMVI	Metástasis del nodo linfático	Melanoma amelanotico maligno	+	+	++
MALME-3M	Pulmón metástasis	Melanoma maligno	-	-	+
M14		Melanoma Amelanotico	-	-	-
SK-MEL-2	Metástasis de la piel - muslo	Melanoma maligno	-	-	-
SK-MEL-28		Melanoma maligno	-	-	-
SK-MEL-5	Metástasis del nodo axilar	Melanoma maligno	-	-	-

UACC-257		Melanoma maligno	+	+	+
UACC-62		Melanoma maligno	-	-	-
IGR-OV1	Ovario	Cistoadenocarcinoma	-	-	-
OVCAR-3	Ovario	Adenocarcinoma	++	++ (75%)	++
OVCAR-4	Ovario	Adenocarcinoma	+	+	+
OVCAR-5	Ovario	Adenocarcinoma	+++	++	+++
OVCAR-8	Ovario	Adenocarcinoma	+++	+	++
SKOV3	Ovario	Adenocarcinoma	++	+	+
PC3	Próstata	Adenocarcinoma	-	-	-
DU145	Próstata	Adenocarcinoma	-	-	-
786-0	Riñón	Carcinoma de célula renal	+/-	+	+
A498	Riñón	Carcinoma	+/-	+	+
ACHN	Riñón	Carcinoma	+++	++	++
CAKI-1	Riñón	Adenocarcinoma	++	++	++
SN12C	Riñón	Carcinoma	++	++	+++
TK-10	Riñón	Carcinoma	+	+	+
UO-31	Riñón	Carcinoma	++	++	++
MCF-7	Pecho	Adenocarcinoma	-	-	-
NO-ADR-RES	Pecho	Metastático; Adenocarcinoma de efusión pleural	+	+	++
MDA-MB-231	Pecho	Metastático; Adenocarcinoma de efusión pleural	++	++	+++
Hs 578T	Pecho	Carcinoma ductal	+	+/-	+
MDA-MB-435	Pecho	Metastático; Adenocarcinoma de efusión pleural	-	-	-
BT -549	Pecho	Metastático; Nodo linfático Carcinoma ductal de infiltración	+++	+++	+++

T-47D	Pecho	Metastático; efusión pleural; carcinoma ductal	-	-	-
-------	-------	--	---	---	---

[00179] Los anticuerpos monoclonales mu-LUCA19, mu-LUCA40 y mu-SPL1 fueron usados para ensayar la reactividad con líneas de células derivadas de glioma. Los resultados de la inmunocitoquímica fueron obtenidos utilizando protocolos similares a los descritos anteriormente para la tecnología CellArray™ Technology. Las líneas de células derivadas de gliomas fueron removidas de la superficie de crecimiento sin usar proteasas, se empacaron y se embebieron en el compuesto OCT. Las células fueron congeladas y seccionadas, y luego se manchó usando un protocolo IHC estándar. El Mu-LUCA19 positivo sobre 17 de 25 líneas de células derivadas de glioma tapizadas. La intensidad del manchado vario entre +/- a 3+ en manchado. El Mu-LUCA40 fue positivo sobre 18 de 25 líneas de células derivadas de glioma tapizadas. La intensidad del manchado varió entre +/- a 3+ en manchado. El Mu-SPL-1 fue positivo fue sobre 14 de 25 líneas de células derivadas de glioma tamizadas. La intensidad del manchado varió entre +/- a 3+ en manchado.

Ejemplo 7. Aislamiento y caracterización del antígeno Ag-SPL1, Ag-LUCA19, Ag-SG5 y Ag-LUCA40

[00180] Para identificar el antígeno con el cual el SPL1, LUCA19, SG5 y LUCA40 fueron reactivos, un experimento de inmunoprecipitación (Ippt) fue llevado a cabo. Para la inmunoprecipitación, 30 frascos de 175cm² células SW480 fueron lisados con 30ml de amortiguador de lisis. El amortiguador de lisis consistió de una solución de sal balanceada de Hank (HBSS+) fortificada con 2% de Tritón X-100, cóctel de inhibidor de proteasa (1 tableta por 5ml de amortiguador de lisis de cóctel de proteasa libre de mini de EDTA completo de Roche Molecular Biochemicals), 0,1% de azida de sodio, y 2Mm PMSF. El lisato celular fue clasificado a 24000xg durante 30 minutos a 4°C antes de ser pasado por una columna que consiste de 1 ml de proteínas G (Amersham Pharmacia). El lisato de SW480 pre-clarificado fue entonces incubado con mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 absorbidos con proteínas G (10µg de mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 fueron reencubados durante 30 minutos a temperatura ambiente con 5µl de proteínas G) durante 2 horas a 4°C. Las perlas (tanto de las perlas de proteínas G pre-claras y las perlas de mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 absorbidos con proteínas G) fueron entonces lavadas 3 veces con amortiguador de lisis antes de la elusión con 30µl de amortiguador de muestra SDS (3% de SDS, 20 glicerol, 10mM de DTT, 2% de bromo fenol azul, 0,1M tris, pH8.0). 25µl del eluato fueron entonces resueltos

por SDS-PAGE y visualizados mediante el manchado Coomassie. 5µl del eluato fue resultado por SDS-PAGE y transferido adicionalmente a nitrocelulosa para el manchado western.

[00181] La mancha fue entonces probada con mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 y se desarrolló usando un kit de Western Blotting (Invitrogen Cat. No. WB7103) para confirmar el reconocimiento del antígeno. Mediante el manchado Western el mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 y el eluato de IgG de ratón contra el mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40, una proteína única al eluato de mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 fue observado. Las bandas de la proteína manchada del gel NuPAGE fue cortada usando cuchillas de escalpelo limpias y se colocaron en tubos Eppendor limpios. Las bandas cortadas fueron almacenadas a -20°C hasta que se usaron para la identificación de la proteína mediante espectrometría de masa.

Ejemplo 8. Caracterización del antígeno al cual el mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 se liga usando espectrometría de masa en derivación (MS/MS)

[00182] Los antígenos a los cuales mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 y mu-LUCA40 se ligan fueron aislados como se escribió en el

ejemplo 7 sometidos a espectroscopia de masa paralelo o en tandem de acuerdo con el método de Kane et al. J Bio Chem. 2002 Junio 21; 277(25):22115-8, Epub Mayo 06. Las proteínas son separadas mediante SDS-PAGE, y el gel es manchado con el reactivo azul colloidal Coomassie (Invitrogen). Las proteínas de interés son digeridas en el gel con tripsina. Los péptidos tripticos son secuenciados mediante cromatografía líquida micro capilar MS/MS sobre un espectrómetro de masa de trampa iónica (Termo-Finnigan LCDQ DECA XP), según se describió en Wu et al., Nature 405:477-482(2000).

[00183] Alternativamente, otros métodos comúnmente conocidos de espectrometría de masa, tales como la espectrometría de masa MALDI, también son usados en la práctica de esta invención. Los resultados del análisis de espectroscopia de masa mostró que antígeno al cual mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 y mu-LUCA40 era EphA2.

Ejemplo 9. Sándwich ELISA para mapiado del epítipo del mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 y mu-LUCA40

[00184] El epítipo específico sobre el EphA2 al cual el mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 y mu-LUCA40 se liga fue determinado usando un Sándwich ELISA competitivo. 50µl/ poso de 10µg/ ml

concentración mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 o mu-LUCA40 fueron diluidos en HBSS (solución de sal balanceada de Hank's sin bicarbonato de sodio y fenol rojo) y se le permitió ligarse a placas micro título Maxisorb de 96 pozos durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas recubiertas son entonces bloqueadas durante 30 minutos con HBSS que contiene 1% BSA (P/V). Las células HT-29 fueron lisadas como se describió en el ejemplo 7. El lisato es entonces aplicado a los pozos del micro título bloqueados en un volumen de 150µl por pozo. Se le permite a los lisatos incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, la placa es entonces lavada muy bien con amortiguador de bloqueo. El mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 y mu-LUCA40 biotinilados, a una concentración de 50µl/ pozo, 1µl/ ml, son agregados a los pozos micro títulos y se le permite encubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. El mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 y mu-LUCA40 biotinilados fueron preparados mediante encubar 1µg de 200mg/ml de sulfo-NHS-LC-Botín diluido en DMSO por cada 1mg de anticuerpo purificado durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos biotinilados son entonces calmados con una concentración final de 0,1M Tris, pH 7.4 durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo biotinilado es entonces separado de la biotina libre mediante concentrar por un filtro de corte de peso molecular de 30kDa. Después de 1

hora de incubación de los anticuerpos biotinilados, las placas son lavadas muy bien con HBSS. Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (SA-HRP) es diluida en HBSS a una concentración de 1:10000. El SA-HRP diluido es agregado en los pozos micro títulos lavados a razón de 50µl/pozo y se le permitió incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación de SA-HRP, la placa es finalmente lavada muy bien con HBSS y desarrollada con la adición de 100µl/pozo de sustrato TMB de una etapa para una reacción de cambio de color. El desarrollo es detenido con la adición de 100µl/pozo de ácido fosfórico al 1M diluido en agua Milli-Q. La placa desarrollada es entonces analizada con el lector de placa de micro titulo ThermoMax a 450 NM.

[00185] De los resultados del Sándwich ELISA competitivo, podemos concluir que el mu-SPL1, mu-LUCA19, mu-SG5 y mu-LUCA40 representan 3 anticuerpos que se ligan al EphA2 mediante dos epítomos distintivos, 1 representado por el mu-LUCA40, y el segundo por mu-SPL1. El mu-LUCA19 parece compartir, pero no sobreponerse directamente al epítomo representado por el mu-SPL1. El sobre posicionamiento no se extiende dentro del epítomo representado por el epítomo mu-LUCA40.

Ejemplo 10. Caracterización adicional del mu-LUCA19 y mu-SG5

[00186] La estimulación del EphA2 en células G55, una línea de células de glioma que expresa EphA2 endogenoso, fue estudiada usando mu-LUCA19 y mu-SG5. Las células fueron tratadas con mu-LUCA19 o mu-SG5 en concentraciones incrementales hasta 30µl/ml y el contenido de fosfotirosina del inmuno del EphA2 inmunoprecipitado fue medido mediante análisis Western blot con anticuerpos específicos a fosfotirosina (4G10, Upstate Cell Signaling Solutions, New York). Ninguna diferencia en el contenido de fosfotirosina en el EphA2 inmunoprecipitado de las células G55 tratadas sea con mu-LUCA19 o mu-SG5 se dio. Los controles del western blots para el contenido de EphA2 total se llevaron a cabo para asegurar que la proteína EphA2 total que fue inmunoprecipitada era la misma para cada condición del tratamiento. Resultados similares fueron vistos usando células A549 y mu-LUCA19 y anticuerpos mu-SG5. Estos resultados indican que el tratamiento de las células que expresan el EphA2 endogenoso con mu-LUCA19 o mu-SG5 no incrementa o disminuye el contenido de fosfotirosina del EphA2.

Ejemplo 11. Efecto del mu-SPL1, mu-LUCA19 Y mu-LUCA40 sobre líneas de células de cáncer

[00187] La habilidad de los anticuerpos para reducir el numero celular infiltrado cuando se hacen crecer como una monocapa puede ser determinada usando monocapas de células crecidas en la presencia o ausencia de cantidades variables de anticuerpo purificado de ensayo o de control y el cambio en el numero celular determinado usando MTT. El MTT es una tintura que mide la actividad de las enzimas mitocondriales y correlaciona con el número celular viable relativo. Las células de interés fueron plaqueadas y crecidas en F12/DMEM (1:1) como medio de crecimiento suplementado con 10% de suero bovino fetal en placas de 96 pozos. Las líneas celulares fueron plaqueadas en pozos triplicados del plato de 96 pozos en un rango de densidad entre 1500 a 2500 células/pozo. Inmediatamente después del plaqueado, el n mu-SPL1, mu-LUCA19, o mu-LUCA40 fueron agregados. Las células fueron encubadas a 37°C en un incubador unificado a 5% de CO²/aire durante 5 días. Al final del ensayo, el MTT fue disuelto en PBS (5mg/ml) y se agrego directamente a los pozos en una dilución de 1:10. Las placas fueron colocadas de nuevo en el incubador durante 4 horas. Después de la incubación el medio fue removido y se agrego 100µl de DMSO para solubilizar el

precipitado MTT. Las placas fueron leídas en O.D. 540nm. En estos experimentos, el mu-LUCA40 inhibió el crecimiento de 786-O, A547, Caki-2, ES-2, SKMES-1, y SKOV3, y SPL1 y LUCA19 no lo hicieron.

Ejemplo 12. Internalización del mu-LUCA19, mu-SG5 y mu-LUCA40 y el IgG anti-ratón conjugado con toxina

[00188] El Mab-ZAP (Advance Targeting Systems, San Diego, CA) es IgG de anti-ratón conjugado a la saporina, una toxina que inhibe la síntesis de la proteína. Esta toxina es impermeable a la membrana celular. Si un anticuerpo monoclonal es ligado al antígeno de superficie celular que es internalizable, el conjugado de toxina puede ligarse al enlace monoclonal y, por lo tanto, ser internalizado y eventualmente matar la célula. Siendo dependiente de la internalización para la demostración de la actividad toxica, el Mab-ZAP puede servir para evaluar si o no un antígeno de superficie dado servirá como objetivo adecuado para cualquier toxina que sea dependiente de internalización para expresar los efectos tóxicos celulares. Como tal Mab-ZAP sirve como un modelo para tales toxinas dependientes de internalización tal como la maitansinoides y la caliqueamicina.

[00189] Para ensayar la internalización del mu-LUCA19 y mu-LUCA40 y el IgG anti-ratón conjugado con saporina por las células de tumor y efectuar la matanza de las células de tumor después de la internalización de la saporina, células de glioma humano, G130 fueron removidas de frascos de material con 10Mm de EDTA y se centrifugaron. Las células fueron resuspendidas a razón de 50000/ ml en medio apropiado y 100µl plaqueadas por pozo en placas de 96 pozos. El anticuerpo mu-SPL1, mu-LUCA19 o mu-LUCA40 fue agregado inmediatamente a los pozos apropiados en 10x de concentrado, para hacer una concentración de 10µg/ml. Después de 15 minutos a temperatura ambiente el Mab-ZAP (Cat. # IT-40, Advance Targeting Systems, San Diego CA) se agrego a los pozos apropiados como 10x concentrado, para hacer una concentraron final entre 0,001nm en 10 NM. Después de 4 días de crecimiento, el MTT fue agregado (material de 5mg/ml de PBS, 1:10 en dilución en pozo) durante 4 horas a 37°C. El medio fue entonces removido de todos los pozos y se agrega 100µl/ pozo de DMSO. Las placas fueron balanceadas suavemente para solubilizar el precipitado de MTT azul y las placas fueron leídas en O.D. 540 NM.

[00190] Hubo una disminución en el manchado MTT en las células G130 en la presencia de mu-LUCA19 y mu-LUCA40 en

comparación con el manchado en la ausencia de aquellos anticuerpos. Esto indica que el crecimiento de las células G130 fue inhibido en la potencia mu-LUCA19 y mu-LUCA40 y el Mab-ZAP y estos resultados son indicativos de que el mu-LUCA19 y el mu-LUCA40 y el IgG anti-ratón conjugado con la toxina fueron internalizados en las células G130. Los resultados similares fueron vistos usando células ES-2, una línea de células de carcinoma de ovario, y anticuerpos mu-SG5. Hubo una disminución en el manchado MTT en las células ES-2 en la presencia de mu-SG5 comparado con el manchado en la ausencia de este anticuerpo. Esto indica que el crecimiento de las células ES-2 fue inhibido en la presencia de mu-SG5 y Mab-ZAP. Este resultado es indicativo de que el mu-SG5 y el IgG anti-ratón conjugado con la toxina fueron internalizados en las células ES-2.

Ejemplo 13. Eficacia del anticuerpo anti-EphA2, SPL1 y LUCA40 con células humanas en ratones desnudos

[00191] células de tumor humano fueron injertadas debajo de la cápsula de riñón en ratones desnudos (nu/nu). 3 líneas de células de tumor fueron usadas. Las líneas de células derivadas de tumor de ovario ES-2 y SKOV3-3, y las líneas de células derivadas de tumor de riñón Caki-2 fueron obtenidas

del ATCC. En algunos estudios ambos riñones recibieron xenoinjerto. Para los animales tratados como a los injertos fueron hechos en la cápsula de riñón (50k células en gel de colágeno). El anticuerpo monoclonal anti-EphA2, SPL1 o LUCA40 fueron inyectados intraperitonealmente a una concentración de 50mg/kg y un volumen de 0,01 mL/g por peso del cuerpo. La dosificación fue iniciada en el día 2 luego de la implantación, y las dosis de SPL1, LUCA40 o PBS fueron administradas 3 veces semanalmente como inyecciones únicas rápidas. Los ratones de control fueron inyectados con PBS solamente. Tres días después de la inyección final, los animales fueron eutanizados y los riñones con los injertos fueron examinados.

[00192] La cantidad de ADN humano en los tumores fue cuantificada usando PCR en tiempo real sobre un sistema Applied Biosystems (Foster City, CA) SDS7000, con iniciadores y probetas específicas para el gen ribosomal humano RPL19 de acuerdo con los métodos publicados. Cada muestra de tumor fue analizada en reacciones PCR triplicadas y las concentraciones de ADN promedio fueron determinadas. La concentración de ADN promedio y el error estándar de la media fueron determinados para cada grupo de muestras de tumor. La significancia estadística fue determinada usando el ensayo t de Student (2

colas, tipo 1). La inhibición del crecimiento del tumor fue calculada como el valor absoluto de [(volumen de tumor promedio del grupo tratado/volumen de tumor promedio del grupo de control con PBC)x100]-100.

[00193] En datos no mostrados el, SPL1 apareció sobre la visual y le examen manual redujo el tamaño de los tumores, con relación a los tumores, usando líneas celulares Caki-2 y ES-2. Resultados similares fueron vistos en los ratones tratados con LUCA40 e implantados con tumores Caki-2. Las cuantificaciones de ADN para los tumores Caki-2 de los ratones tratados con anticuerpos LUCA40 confirmaron que los ratones tratados con LUCA40 tenían tumores más pequeños en relación a los controles. La tabla 12 muestra otros diseños de estudio de xenoinjerto de cápsula subrenal con anticuerpos SPL1 y resultados de cuantificaron de ADN de estos estudios.

Tabla 12. Diseño de estudio de modelos de xenoinjertos de cápsula subrenal con SPL1 y resultados

Línea celular estudiada	Dosis (mg/kg)	Mab	Números de animales/grupo	% TGI*
ES-2	50		5	78.3 p=0.006
ES-2	50		6	61 p= 0.026
SKOV3-3	50		6	70 p= 0.005

*TGI = Inhibición de crecimiento de tumor vs. Grupo de control con PBS; valores p- fueron determinados por el ensayo T de Student, no emparejado.

Ejemplo 14. Eficacia del anti-tumor del SPL1 en un modelo subcutáneo de tumores ovarios humanos

[00194] este estudio fue diseñado para ensayar los datos anti-tumor con respuesta a dosis para el anticuerpo SPL1 en un modelo subcutáneo de cáncer de ovario y cáncer de pulmón.

[00195] la líneas de células derivadas de tumor de ovario ES-2 fue re derivada de un tumor de crecimiento rápido identificado como un estudio de modelo de tumor subcutáneo piloto. Las células derivadas del tumor de pulmón A549 fueron obtenidas de ATCC. Las células cultivadas fueron triptinizadas, lavadas en el medio, hechas girar y resuspendidas en el medio a 100 millones de células por mm de medio. (5 millones de células x 0.05 ml. de volumen), entonces se mezclaron en un volumen igual de Matrigel® para un volumen de inyección final de 0.1 mL. Ratones homocigotos nu/nu CRL hembras fueron usados. Las células fueron inoculadas mediante inyección subcutánea en la parte trasera del cuello del ratón. Las dosis fueron iniciadas sea sobre el

día de implantación o cuando los tumores fueron establecidos inmedibles. La dosificación del día 0, los tumores fueron implantados en la mañana y los animales fueron dosificados por la tarde el mismo día. Para tumores establecidos, los animales fueron aleatorizados entre grupos como sigue: volúmenes de tumor fueron determinados, animales fueron clasificados por volumen de tumor, la media fue determinada y el número apropiado de animales (12 a 15 por grupo dependiendo del de modelo) fueron seleccionados por encima y por debajo de la media, removiendo del estudio aquellos con tumores muy pequeños o muy grandes. El resto de animales fueron aleatorizados por número de tarjetas en las orejas dentro del tratamiento y los grupos de control. La distribución aleatoria de los grupos finales fue confirmada por el ensayo T ($p > 0.1$ fue considerado aleatorizado).

[00196] Para cada grupo de dosis de tratamiento, el SPL1 fue diluido en PBS a una dosis de concentración apropiada (50 mg/kg para el estudio de las células ES-2 y un rango de concentración de 10 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg para el estudio de células a A549) y el control PBS se administro a un volumen de 0.01 Ml/g por peso de cuerpo. Las dosis de SPL1 o PBS fueron administradas dos veces por semana como inyecciones únicas rápidas en la cavidad intraperitoneal. Los

ratones de control fueron inyectados con PBS solamente. La fue iniciada en grupos de 12 a 15 ratones cuando los tumores alcanzaron el tamaño apropiado, dependiendo del estudio.

[00197] Se le permitió a los tumores crecer durante aproximadamente 6 días antes de la medida de tumor inicial. Los tumores fueron lo suficientemente medidos dos veces por semana mediante tal y digital en 3 dimensiones, y el volumen del tumor fue calculado como la mitad del producto de las 3 medidas. El volumen del tumor durante el tiempo fue el punto final principal para todos los estudios. Las observaciones clínicas fueron hechas diariamente. El peso del cuerpo fue determinado para cada animal dos veces en la semana.

[00198] Los volúmenes de tumor promedio y el error estándar de la media fueron determinados para cada grupo en cada medida. Las significancia estadística fue determinada usando el ensayo T de Student (2 colas, tipo 1). La inhibición de crecimiento de tumor fue calculada como el valor absoluto de $[(\text{volumen de tumor promedio del grupo tratado} / \text{volumen de tumor promedio del grupo de control con PBS}) \times 100] - 100$. La tabla 13 muestra los diseños de semi injertos subcutáneos y los resultados.

Tabla 13: Diseño del estudio del modelo de semi injerto SPL1 SC y los resultados

Línea celular estudiada	Dosis de Mab(mg/kg)	Régimen de Dosis	No. de animales/Grupo	% TGI
ES-2	50	Dosis de inicio día 0	12	44.9% p= 0.045 Día 18
	PBS	Dosis de inicio día 0	12	NA
	50	Dosis de inicio cuando los tumores alcanzan entre 100-150 mm ³	12-15	47.6% p= 0.012 Día 21
	PBS	Dosis de inicio cuando los tumores alcanzan entre 100-200 m ³	12-15	NA
A549	10	Dosis de inicio cuando los tumores alcanzan entre 100 mm ³	15	67.5% p= <0.001 Día 34
	30	Dosis de inicio cuando los tumores alcanzan entre 100 mm ³	15	82.2% p= <0.001 Día 34
	100	Dosis de inicio cuando los tumores alcanzan entre 100	15	80.4% p= <0.001 Día 34

		mm ³		
	PBS	Dosis de inicio cuando los tumores alcanzan entre 100 mm ³	15	NA

*TGI = Inhibición del crecimiento del tumor contra grupo de control de PBC

[00199] Como muestra la figura 1, un subConjunto de SPL1 tratado con xenoinjerto A549 se encontró que recrece lentamente después de la cesación de la dosis, con el recrecimiento del tumor definido como un incremento en el volumen de 2 veces o más después de la cesación de la dosis. 7 de 16 ratones en el grupo de tratamiento de 100 mg/kg tenían recrecimiento del tumor, mientras que 9 de 16 ratones en el grupo de tratamiento de 100 mg/kg permanecieron libres de tumor después de la cesación de la dosis. Similarmente, 3 de 15 ratones en el grupo de 30 mg/kg tuvieron recrecimiento de tumor, mientras que 12/15 ratones en el grupo de 30 mg/kg permanecieron libres de tumor luego de la cesación de la dosificación. Los resultados graficados en la figura 1 después del "para la dosis" representa solamente el tamaño

del tumor de los ratones que tenían un recrecimiento de tumor.

[00200] Se entiende que los ejemplos y modalidades descritos aquí tienen propósitos ilustrativos solamente y que diversas modificaciones o cambios a la luz de lo anterior puede ser sugeridos por personas basada en la técnica y que deben estar incluidos dentro del espíritu y visión de esta solicitud. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes patentes solicitadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad para todos los propósitos al mismo grado que si cada publicaron individual, patente o solicitud patente fuera especifica e individualmente indicada que se incorpora como referencia.

REIVINDICACIONES

Nosotros reivindicamos:

1. Una inmunoglobulina o un fragmento que liga a
antígeno sustancialmente purificada de la misma que
es SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40-

2. Una inmunoglobina sustancialmente purificada o un
fragmento que liga al antígeno de la misma, que liga

específicamente al EphA2, y que tiene por lo menos una de las características del SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40:

- a. La habilidad para ligar al EphA2 sobre una célula de cáncer;
- b. La habilidad para ligar a una porción del EphA2 que esta expuesto sobre la superficie de una célula de cáncer viva *in Vitro* o *in vivo*;
- c. La habilidad para impedir la proliferación de células de tumor sin incrementar el contenido de fosfotirosina del EphA2;
- d. La habilidad para suministrar un agente terapéutico o marcador detectable a una célula de cáncer que expresa el EphA2; y
- e. La habilidad para suministrar un agente terapéutico o marcador detectable dentro de una célula de cáncer que expresa el EphA2.

3. Una secuencia de Ácido nucleico aislada que codifica para la inmunoglobulina o el fragmento que liga el antígeno de la misma de la reivindicación 1.
4. El ácido nucleico de la reivindicación 3, en donde el ácido nucleico esta ligado operativamente a un promotor.
5. El ácido nucleico de la reivindicación 4, en donde el promotor y el ácido nucleico son obtenidos es un vector de expresión.
6. El ácido nucleico en la reivindicación 3, en donde la inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal.
7. Una línea de células transfectada, transformada, o infectada con un vector que contiene un ácido nucleico de la reivindicación 3.
8. Un método para producir una inmunoglobulina sustancialmente purificada, o un fragmento que liga al antígeno de la misma, que comprende las etapas de:

- a. Hacer crecer una línea de células transformada con el ácido nucleico de la reivindicación 3 bajo condiciones en las cuales la inmunoglobulina o el fragmento que liga al antígeno son expresados; y
 - b. Cosechar la inmunoglobulina o el fragmento expresados.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la línea de células es un hibridoma.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el hibridoma es ATCC No. PTA-5070, PTA-6056, o PTA-6059, o el hibridoma SG3.15B4.1F9.
11. El método de la reivindicación 8, en donde la inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal.
12. Una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de la inmunoglobulina purificada o del fragmento que liga al antígeno de la reivindicación 1, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Un hibridoma depositado con el American Type Cultura Collection que tiene el numero de acceso PTA-5070, PTA-6056, o PTA-6059, o el hibridoma SG3.15B4.1F9 (PTA-XXXX).

14. Con un anticuerpo que es producido por un hibridoma depositado con el American Type Cultura Collection que tiene el numero de acceso PTA-5070, PTA-6056, o PTA-6059, o el hibridoma SG3.15B4.1F9 (PTA-XXXX).

15. La inmunoglobulina o el fragmento que liga antígeno de la misma de la reivindicación 1 que es humanizada.

16. La inmunoglobulina o el fragmento que liga antígeno de la misma de la reivindicación 1 que es quimerizada.

17. La inmunoglobulina o el fragmento que liga antígeno de la misma de la reivindicación 1 es un anticuerpo humano.

18. La inmunoglobulina o el fragmento que liga antígeno de la misma de la reivindicación 1 que es un derivado.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en donde dicha inmunoglobulina purificada o fragmento que liga el antígeno es LUCA19, LUCA40, SG5 o SPL1.
20. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en donde la inmunoglobulina purificada o fragmento que liga el antígeno compete para ligarse al EphA2 con LUCA19, LUCA40, SG5 o SPL1.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en donde la inmunoglobulina purificada o fragmento que liga el antígeno es humanizado.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en donde la inmunoglobulina purificada o fragmento que liga el antígeno es quimerizado.
23. Un método para tratar el cáncer en un paciente que lo requiere, dicho método comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un

anticuerpo EphA2 que se liga específicamente al EphA2 y tiene por lo menos una de las siguientes características de SPL1, LUCA19, SG5 o LUCA40:

- a. La habilidad para ligarse al EphA2 sobre una célula de cáncer;
- b. La habilidad para ligar a una porción del EphA2 que esta expuesto sobre la superficie de una célula de cáncer viva *in Vitro* o *in vivo*;
- c. La habilidad para impedir la proliferación de células tumorales sin incrementar el contenido de fosfotirosina del EphA2;
- d. La habilidad para suministrar un agente terapéutico o marcador detectable a una célula de cáncer que expresa el EphA2; y
- e. La habilidad para suministrar un agente terapéutico o marcador detectable dentro de una célula cancerosa que expresa el EphA2.

ANTICUERPOS QUE LIGAN AL EPHA2 Y LOS MÉTODOS DE USO DE ELLOS**Resumen:**

Se ha provisto aquí la divulgación a cerca del desarrollo y caracterización de un anticuerpo que liga al antígeno EPHA2 el cual está presente en un variedad de cánceres humanos del pecho, pulmón, próstata, y colon. También se describen aquí los métodos de diagnóstico y tratamiento de los diversos cánceres mediante el uso de tales anticuerpos dirigidos contra este antígeno.

1/1

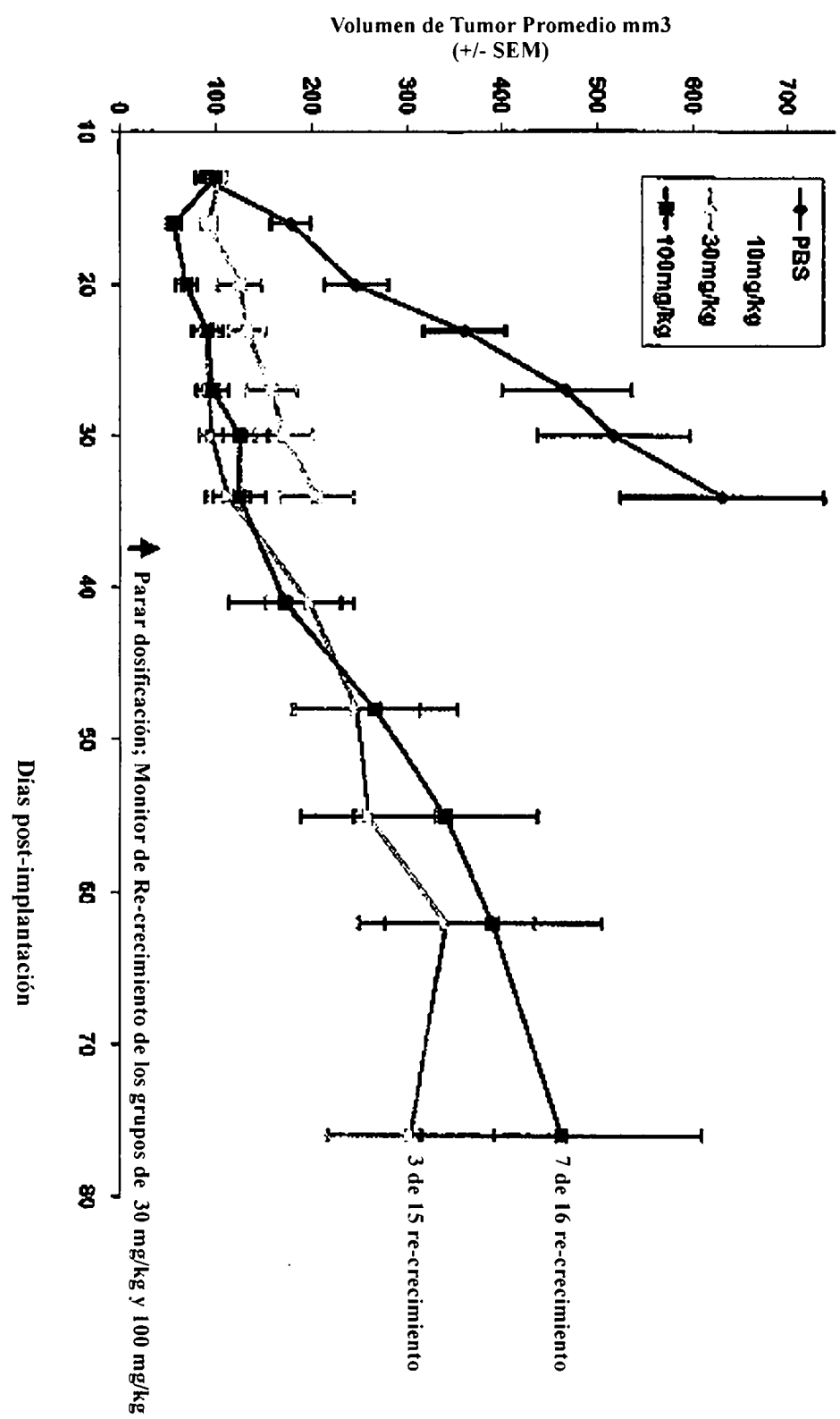


FIGURA 1

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

To:

ZHOU, Jie
Morrison & Foerster LLP
755 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304-1018
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 26 May 2006 (26.05.2006)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 415072002840	
International application No. PCT/US2006/004057	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
	International filing date (day/month/year) 06 February 2006 (06.02.2006)
	Priority date (day/month/year) 04 February 2005 (04.02.2005)
Applicant RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC. et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a **priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a **priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
04 February 2005 (04.02.2005)	60/650,047	US	10 April 2006 (10.04.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Gijsbertus Beijer

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Telephone No. +41 22 338 95 61



No. 07-078090- -00000-0000

Fecha: 2007-07-31 16:08:16 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 261

cio
CIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Edgar Navarro
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia