



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-3460

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

ANTICUERPO ANTAGONISTA PARA EL TRATAMIENTO

DEL CANCER

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SANOFI-AVENTIS

DOMICILIO

PARIS, FRANCIA

74. APODERADO

EMILIOFERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003460- -00000-0000

Fecha: 2009-01-16 16:33:18 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378- FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

18 Feb. 2009

SOLICITUD DE:

1

- ☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SANOFI-AVENTIS**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia.

Dirección: 174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

Domicilio: Paris,
Francia

IDENTIFICACIÓN

C.C.
C.E.

☐
☐

NIT
Otro
Cual

☐
☐

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.
C.E.

☒
☐

NIT
Otro
Cual

☐
☐

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Véronique BLANC**
c/o Sanofi Aventis,
174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

2. **Claudia FROMOND**
c/o Sanofi Aventis,
174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia
3. **Fabienne PARKER**
c/o Sanofi Aventis,
174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

4. **Jiawen HAN**
355 Crafts St,
02460 Newton,
Massachusetts 02460,
Estados Unidos de América
5. **Daniel TAVARES**
27 Sylvester Road,
01760 Natick,
Massachusetts 01760,
Estados Unidos de América

6. **Chonghui ZHANG**
122 Summer Road,
Brookline,
Massachusetts 02445,
Estados Unidos de América
7. **Min LI**
15 Landham Road,
Sudbury,
Massachusetts 01776,
Estados Unidos de América

8. **Xiao-Mai ZHOU**
12 Richards Road,
Watertown,
Massachusetts 02472,
Estados Unidos de América
9. **Michel STREULI**
115 Lancaster Terrace,
Brookline,
Massachusetts 02446,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/003074
Publicación Internacional No. WO 2008/010101 A3

Fecha: 13 de julio de 2007
Fecha: 24 de enero de 2008

6

Título (54)

ANTICUERPO ANTAGONISTA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

7

Clasificación Internacional (51)

C07K 016/028

8

Prioridad

SI☒ NO☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

18 de julio de 2006

(31) Número de Solicitud

06291160.7

9

Comprobante de pago No.:

09-3,065
09-3,129
09-2,943
09- 554
08-99,412
09- 526

Fecha:

14 de enero de 2009
14 de enero de 2009
14 de enero de 2009
6 de enero de 2009
23 de diciembre de 2008
6 de enero de 2009

10

Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.

☒ Comprobante de pago de la tasa por concepto de 59 reivindicaciones adicionales a la décimo quinta por \$1.475.000.oo.

☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒ Poderes, si fuere el caso.

☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐ Declaraciones.

☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐ Traducción 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.

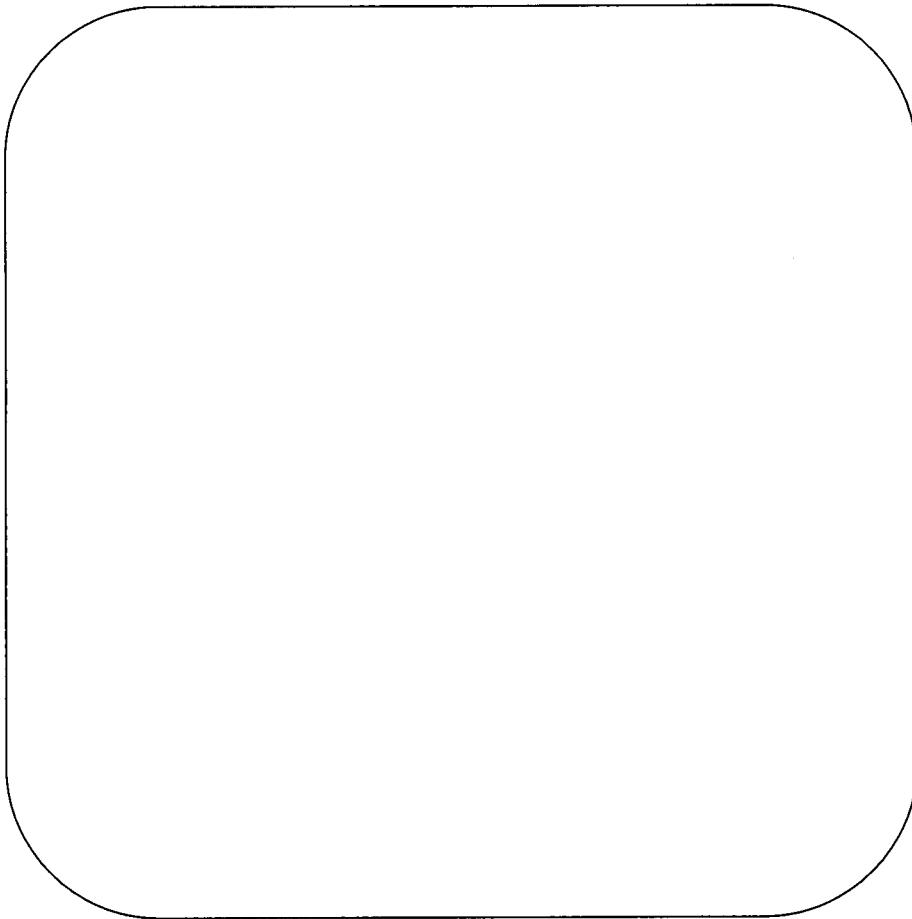
☐ Arte final 12x12

☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

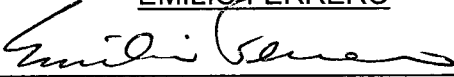
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

166/JGG

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/010101 A3

Descripción:

Páginas 87 en el idioma original

Páginas 89 en español

Reivindicaciones: Número (s) 74

Figuras: Número (s) 16

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

SANOPI-AVENTIS

domiciliado (s) en/of **174, avenue de France**

F-75013 Paris, Francia, hereby ratify the patent

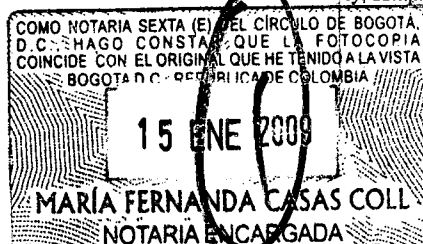
application No. 05,057,645 filed by EMILIO FERRERO on June 14, 2005 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit



promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this _____
en/in _____
por/by _____
Firma _____ Signature _____

Sanofi-Aventis Dr. Markus Jacobi

Vu pour certification
matérielle de la signature
de M. Markus Jacobi
apposée ci-dessous.

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française
Le présent acte public
2. - a été signé par Dr. Koenig
3. - agissant en qualité de Notaire
4. - est revêtu du sceau de la Cour

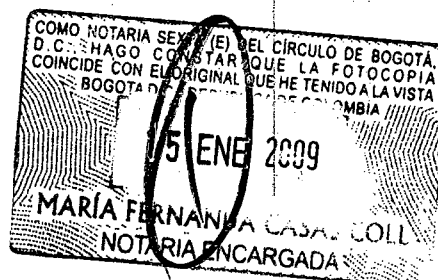
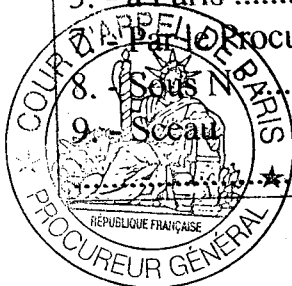
ATTESTE

5. - à Paris le **21 JUIN 2005**

Par le Procureur Général près la Cour d'Appel

8. - Sous N° 81902/2005

9. - Sceau Le signature



CERTIFICAT NOTARIE (SOCIETE)

K. L. ASSOCIÉS
Notaires
20, rue de la Paix
75002 PARIS
Tél. 01 55 04 70 00 - Fax 01 40 20 42 43

Le Notaire soussigné certifie : que la signature qui précède de :
Markus JACOBI

Est authentique et que le signataire occupe actuellement le poste de Directeur Operations
Brevets Europe
De la société sanofi-aventis,
et que ladite société fonctionne et est régie par le droit français
que la société est sise 174 avenue de France, 75013 PARIS, France
et que le signataire est habilité à octroyer le présent pouvoir.

Tous les faits susmentionnés sont connus du Notaire qui a examiné les documents
correspondants et les certifie.

Etabli et signé à Paris

Le 20/06/05

Le Notaire
(signature – cachet)



APOSTILLE (Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. Pays :	
2. Le présent acte public	
3. a été signé par	
4. agissant en qualité de	
5. est revêtu du sceau/cachet de/du	
Attesté	
6. à	le
7. par	
8. N°	
9. Sceau/cachet :	10. Signature :

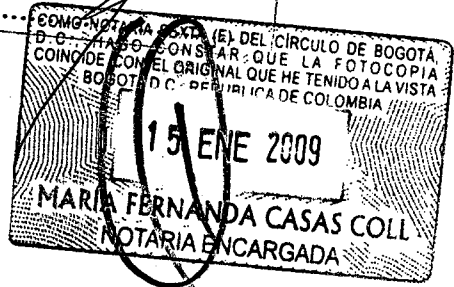
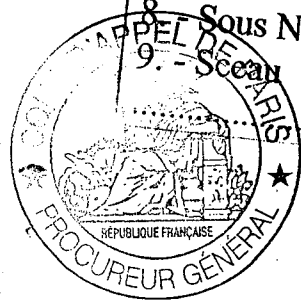


APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- 1. - République Française
- Le présent acte public
- 2. - a été signé par *M^e Korne*
- 3. - agissant en qualité de *Notaire*
- 4. - est revêtu du sceau de *Ac. F.T.U.D.E.*
- 5. - à Paris
- 7. - Par le Procureur G^{al} près la Cour d'Appel
- 8. - Sous N° *91.903*
- 9. - Sceau

ATTESTE **21 JUIN 2005**

Le *[Signature]* signature



Traducción Oficial No. 20050708 de un documento escrito en Francés y en INGLÉS, el cual, para su identificación se sella con el sello de María Eugenia Sanint Traductora Oficial según Resolución 1448 del Ministerio de Justicia.

LEGALIZACIONES

Escritas en FRANCES, al pie de un PODER escrito en ESPAÑOL, otorgado por SANOFI- AVENTIS, a favor de EMILIO/FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA PAEZ Y GERMAN CAVELIER (por el cual se ratifica la solicitud de patente NO. 05.057.645 presentada por EMILIO FERRERO el 14 de junio de 2005.)

(Firma Ilegible)
Dr. Markus Jacobi
Sanofi-Aventis

Visto para la certificación material de la firma del Sr. Markus Jacobi, puesta anteriormente.

(Firma Ilegible)
.L. ASSOCIES
Notarios
20, rue de la Paix
75002 PARIS

Sello del Notario

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

El Notario suscrito certifica que la firma puesta anteriormente de:

Marcus Jacobi

es auténtica, y que el signatario ocupa actualmente el cargo de Director de Operaciones Patentes Europa, de la sociedad Sanofi-Aventis, y que la dicha sociedad funciona y está regida por el derecho francés; que la sociedad tiene su sede en el 174, avenue de France, 75013, PARIS, Francia, y que el signatario está habilitado para otorgar el presente poder.

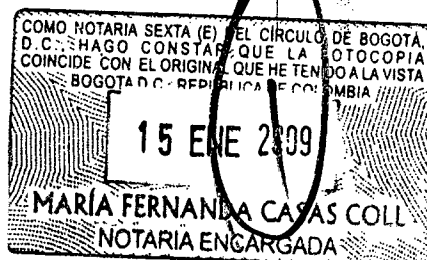
Todos los hechos mencionados anteriormente son de conocimiento del Notario, quien examinó los documentos correspondientes y los certifica.

Dado y firmado en París, hoy, 20 de junio de 2005.

El Notario
(Firma – sello)

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 1448 DEL 30 DE SEPT DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 1448 DEL 30 DE SEPT DEL MINISTERIO DE JUSTICIA



(Ilegible)
Alain Koenig
NOTARIO
20, rue de la Paix, París

APOSTILLA
(Convenio de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: República Francesa
El presente Documento Público
2. Fue firmado por el Abogado Koenig
3. Quien actúa en calidad de NOTARIO
4. Lleva el sello de SU DESPACHO

Certifica

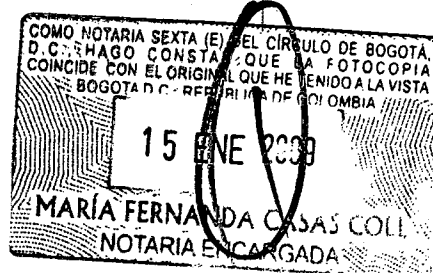
5. En París
6. El 21 de junio de 2005
7. Por el Procurador General ante el Tribunal de Primera Instancia
8. Bajo el Número 81903
9. Sello/Estampilla:
Sello del Tribunal de Primera Instancia de París.
- 10- Firma: (Ilegible)

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA.

Traductora : Maria Eugenia Sanint
Bogotá, 8 de julio de 2005

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 671 SIS
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 118 DEL
5 DE SEPTIEMBRE DE 2000
del Ministerio de Justicia



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 JUL 12 P 1:28

Jefe de LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

449243

449243
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

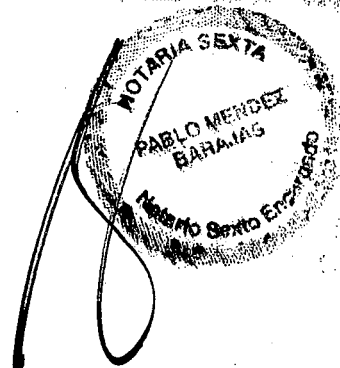
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

Maria Eugenia Samin

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA 12 JUL 2005



COMO NOTARIA SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

BOGOTA D.C.

15 ENE 2009

MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 January 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/010101 A3

(51) International Patent Classification:

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

(21) International Application Number:

PCT/IB2007/003074

(22) International Filing Date: 13 July 2007 (13.07.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

06291160.7 18 July 2006 (18.07.2006) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **SANOFI-AVENTIS** [DE/DE]; 174, avenue de France, F-75013 Paris (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BLANC, Véronique** [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **FROMOND, Claudia** [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **PARKER, Fabienne** [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **HAN, Jiawen** [US/US]; 355 Crafts St., Newton, MA 02460 (US). **TAVARES, Daniel** [US/US]; 27 Sylvester Road, Natick, MA 01760 (US). **ZHANG, Chonghui** [CN/US]; 122 Summer Road, Brookline, MA 02445 (US). **LI, Min** [CN/US]; 15 Landham Road, Sudbury, MA 01776 (US). **ZHOU, Xiao-Mai** [US/US]; 12 Richards Road, Watertown, MA 02472 (US). **STREULI, Michel** [CH/US]; 115 Lancaster Terrace, Brookline, MA 02446 (US).

(74) Agent: **BOUVET, Philippe**; Sanofi-Aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, MT, 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
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- the filing date of the international application is within two months from the date of expiration of the priority period

(88) Date of publication of the international search report:
17 July 2008

(54) Title: **ANTAGONIST ANTIBODY AGAINST EPHA2 FOR THE TREATMENT OF CANCER**

(57) Abstract: Antibodies, humanized antibodies, resurfaced antibodies, antibody fragments, derivatized antibodies, and conjugates of same with cytotoxic agents, which specifically bind to, and inhibit A class of Eph receptors, antagonize the effects of growth factors on the growth and survival of tumor cells, and which have minimal agonistic activity or are preferentially devoid of agonist activity. Said antibodies and fragments thereof may be used in the treatment of tumors that express elevated levels of A class of Eph receptors, such as breast cancer, colon cancer, lung cancer, ovarian carcinoma, synovial sarcoma and pancreatic cancer, and said derivatized antibodies may be used in the diagnosis and imaging of tumors that express elevated levels of A class of Eph receptors. Also provided are cytotoxic conjugates comprising a cell binding agent and a cytotoxic agent, therapeutic compositions comprising the conjugate, methods for using the conjugates in the inhibition of cell growth and the treatment of disease, and a kit comprising the cytotoxic conjugate are disclosed are all embodiments of the invention. In particular, the cell binding agent is a monoclonal antibody, and epitope-binding fragments thereof, that recognizes and binds the A class of Eph receptors.

WO 2008/010101 A3

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 January 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/010101 A2

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2007/003074
- (22) International Filing Date: 13 July 2007 (13.07.2007)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
06291160.7 18 July 2006 (18.07.2006) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): **SANOFI-AVENTIS** [DE/DE]; 174, avenue de France, F-75013 Paris (DE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **BLANC, Véronique** [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **FROMOND, Claudia** [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **PARKER, Fabienne** [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **HAN, Jiawen** [US/US]; 355 Crafts St., Newton, MA 02460 (US). **TAVARES, Daniel** [US/US]; 27 Sylvester Road, Natick, MA 01760 (US). **ZHANG, Chonghui** [CN/US]; 122 Summer Road, Brookline, MA 02445 (US). **LI, Min** [CN/US]; 15 Landham Road, Sudbury, MA 01776 (US). **ZHOU, Xiao-Mai** [US/US]; 12 Richards Road, Watertown, MA 02472 (US). **STREULI, Michel** [CH/US]; 115 Lancaster Terrace, Brookline, MA 02446 (US).
- (74) Agent: **BOUVET, Philippe**; Sanofi-Aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, SI, 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, MT, 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
 - with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description
 - with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
 - the filing date of the international application is within two months from the date of expiration of the priority period

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: ANTAGONIST ANTIBODY FOR THE TREATMENT OF CANCER

(57) **Abstract:** Antibodies, humanized antibodies, resurfaced antibodies, antibody fragments, derivatized antibodies, and conjugates of same with cytotoxic agents, which specifically bind to, and inhibit A class of Eph receptors, antagonize the effects of growth factors on the growth and survival of tumor cells, and which have minimal agonistic activity or are preferentially devoid of agonist activity. Said antibodies and fragments thereof may be used in the treatment of tumors that express elevated levels of A class of Eph receptors, such as breast cancer, colon cancer, lung cancer, ovarian carcinoma, synovial sarcoma and pancreatic cancer, and said derivatized antibodies may be used in the diagnosis and imaging of tumors that express elevated levels of A class of Eph receptors. Also provided are cytotoxic conjugates comprising a cell binding agent and a cytotoxic agent, therapeutic compositions comprising the conjugate, methods for using the conjugates in the inhibition of cell growth and the treatment of disease, and a kit comprising the cytotoxic conjugate are disclosed are all embodiments of the invention. In particular, the cell binding agent is a monoclonal antibody, and epitope-binding fragments thereof, that recognizes and binds the A class of Eph receptors.

WO 2008/010101 A2

ANTAGONIST ANTIBODY FOR THE TREATMENT OF CANCER

FIELD OF THE INVENTION

The present invention provides novel murine anti-Eph monoclonal antibodies or
5 fragments thereof, and humanized or resurfaced versions thereof. More specifically,
the invention relates to novel monoclonal antibodies or fragments thereof, and
humanized or resurfaced versions thereof, which interact with the EphA receptor family
and act as antagonists. More particularly, the invention relates to anti-EphA2 receptor
antibodies that inhibit the cellular functions of the EphA2 receptor. Still more
10 particularly, the invention relates to anti-EphA2 receptor antibodies that antagonize
growth and survival of tumor cells and which are devoid of agonist activity.

The present invention is further directed to cytotoxic conjugates comprising a cell
binding agent and a cytotoxic agent, therapeutic compositions comprising the
conjugate, methods for using the conjugates in the inhibition of cell growth and the
15 treatment of disease, and a kit comprising the cytotoxic conjugate. In particular, the cell
binding agent is a monoclonal antibody, or epitope-binding fragment thereof, and a
humanized or resurfaced version thereof that recognizes and binds the EphA family of
receptors.

BACKGROUND OF THE INVENTION

20 Receptor tyrosine kinases play a diverse role in cell growth and differentiation during
normal physiologic responses and in oncogenic transformation and tumor progression.
Eph receptors are a unique family of receptor tyrosine kinases (RTK), the largest in the
genome, consisting of at least 16 receptors that interact with nine membrane-bound
ephrin ligands (Pasquale, E. B. *et al.*, 2005, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, **6**: 462-
25 475). They can be further divided into two groups, class A and B, based on the
sequence homology and binding affinity (Pasquale, E. B. *et al.*, 2005, *Nature Reviews
Mol. Cell Biol.*, **6**: 462-475). Class A Eph receptors interact with multiple ligands of the
ephrin-A family, a group of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-linked membrane
proteins, while class B Eph receptors bind to ephrin-B ligands, a family of
30 transmembrane proteins. Binding of Eph receptors to their ligands induces receptor
clustering, activation of kinase activity, and subsequent trans-phosphorylation of the
cytoplasmic domains on tyrosine residues, creating docking sites for a number of

14

signaling proteins (Kullander, K. and Klein, R., 2002, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, **3**: 475-486; Noren, N. K. and Pasquale, E. B., 2004, *Cell signal.*, **16**: 655-666).

Cancer is a disease characterized by uncontrolled proliferation, resulting from aberrant signal transduction. The most dangerous forms of cancer are malignant cells which
5 have the ability of these to spread, either by direct growth into adjacent tissue through invasion, or by implantation into distant sites by metastasis. Metastatic cells have acquired the ability to break away from the primary tumor, translocate to distant sites through the bloodstream or lymphatic system, and colonize distant and foreign microenvironments.

- 10 It is now clear that the Eph molecules also have a role in disease states such as cancer. In particular, overexpression of the EphA2 receptor has been reported in cancers of the ovary, breast, prostate, lung, colon, oesophagus, renal cell, cervix, and melanoma. EphA2 was suggested to be a positive regulator of cell growth and survival in malignant cells (Landen, C. N. *et al.*, 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **9** (6): 1179-
15 1187). A role for EphA2 in metastasis has also been described, since EphA2 overexpression alone is sufficient to transform mammary epithelial cells into a malignant phenotype (Zelinski *et al.*, 2001, *Cancer Res.*, **61**: 2301-2306), and increases spontaneous metastasis to distant sites (Landen, C. N. *et al.*, 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **9** (6): 1179-1187). Furthermore, increasing evidence suggests that
20 EphA2 is involved in tumor angiogenesis (Ogawa *et al.*, 2000, *Oncogene*, **19**: 6043-6052; Cheng *et al.* 2002, *Mol. Cancer Res.*, **1**: 2-11; Cheng *et al.*, 2003, *Neoplasia*, **5** (5): 445-456; Dobrzanski *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, **64**: 910-919).

- Phosphorylation of EphA2 has been shown to be linked to its abundance. Tyrosine phosphorylated EphA2 is rapidly internalised and fated for degradation, whereas
25 unphosphorylated EphA2 demonstrates reduced turnover and therefore accumulates at the cell surface. It is currently thought that this kind of model might contribute to the high frequency of EphA2 overexpression in cancer (Landen, C. N. *et al.*, 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **9** (6): 1179-1187). However, reality may be more complex, since recent data seem to indicate a role for EphA2 kinase-dependent and -independent
30 functions in tumor progression (Fang W. B., 2005, *Oncogene*, **24**: 7859-7868).

Agonistic antibodies have been developed which promote EphA2 tyrosine phosphorylation and internalisation, ultimately resulting in inhibition of tumor cell growth (Dodge-Zantek *et al.*, 1999, *Cell Growth & Differ.*, **10**: 629-638; WO 01/12172, WO

03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642). These antibodies are directed against the extracellular domain of EphA2. Since these agonist antibodies do not inhibit but rather stimulate EphA2 receptor phosphorylation and downstream signals, these antibodies might not be effective for tumors which take advantage of the EphA2 kinase activity. On the other hand, the use of antagonistic agents, including antibodies, has been proposed (WO 2004/092343), but no actual antagonistic antibody was disclosed therein. Moreover, such antibodies were proposed to stimulate, rather than inhibit, cell proliferation. Application WO 2006/084226 discloses antibodies which neither increase nor decrease EphA2 kinase activity but are capable of impeding tumor cell proliferation. However, there is no indication therein that these antibodies prevent ephrinA1 binding to the receptor and inhibit ephrinA1-induced EphA2 phosphorylation. Rather, they may affect tumor cell proliferation through a totally different mechanism, e.g. by preventing receptor clustering following ephrinA1 binding. The skilled person would thus not have concluded that these antibodies are antagonists, but, rather, that their mechanism of action is unclear.

Therefore, there is a need for new, antagonistic anti-EphA2 antibodies, which bind to the extracellular domains of EphA2 receptor, inhibit its activation by the ligand ephrin A1 and inhibit EphA2 kinase-dependend tumor cell growth. Such antagonistic antibodies should be useful for the treatment of cancer.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, it is an object of the invention to provide agents that specifically bind to class A Eph receptor family members, such as EphA2, and inhibit the cellular activity of the receptor by antagonizing the receptor. Thus, the present invention includes antibodies or fragments thereof that recognize the EphA2 receptor, preferably human, and function as antagonists of said receptor.

The EphA2 receptor has a role in the development and the growth of tumors, and has also been involved in metastasis. In some embodiments, the antibodies of the invention are capable of inhibiting the growth of a cancer cell. In some other embodiments, the antibodies of the invention are capable of preventing the migration of metastatic cancer cells. In preferred embodiments, the cancer cell is a cell of a cancer selected from the group consisting of a breast cancer, colon cancer, endometrial cancer, ovarian carcinoma, osteosarcoma, cervical cancer, prostate cancer, lung cancer, synovial

16

carcinoma pancreatic cancer, a sarcoma, a glioma, head and neck cancer, gastric cancer, liver cancer, and other carcinomas. In another embodiment, the antibodies of the invention are capable of inhibiting angiogenesis.

Whereas the anti-EphA2 antibodies disclosed in the prior art were mostly agonists (e.g. WO 03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642), this invention encompasses antibodies recognizing said receptor which have minimal agonistic activity, or, preferentially, which are devoid of any agonist activity towards the receptor. In a preferred embodiment, the antibodies of the invention do not stimulate EphA2 tyrosine phosphorylation.

10 The antibodies of the invention are capable of inhibiting the binding of a ligand, preferably ephrin A1, to the EphA2 receptor. In some embodiments, they are capable of inhibiting EphA2 tyrosine phosphorylation. In another embodiment, EphA2 tyrosine phosphorylation is inhibited by the antibodies of the invention even in the presence of ephrinA1. In some embodiments, antibodies of the invention can block EphA2-mediated signaling; in particular, they are capable of inhibiting EphA2-dependent phosphorylation of Akt.

This invention also provides antibodies which bind the EphA2 receptor with a K_D of 0.3×10^{-9} M or smaller.

Antibodies of the invention can be polyclonal or monoclonal. Epitope-binding fragments such as Fab, Fab', F(ab')₂, or Fv fragments are included within the scope of this invention. Preferred are monoclonal anti-EphA2 antibodies. In a more preferred embodiment, there are provided murine antibodies selected from 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; and EphA2-N2, which are fully characterized herein with respect to the amino acid sequences of both their light and heavy chain variable regions, the cDNA sequences of the genes for the light and heavy chain variable regions, the identification of their CDRs (complementarity-determining regions), the identification of their surface amino acids, and means for their expression in recombinant form. The hybridoma producing murine anti-EphA2 monoclonal antibodies 37.3D7, 37.1F5, and 53.2H11, and EphA2-N1 and EphA2-N2 have been deposited under the Budapest Treaty on June 16, 2006 and on May 3rd, 2007, respectively, at the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA, under the accession numbers PTA-7660, PTA-7661, PTA-7662, PTA-8407, and PTA-8408, respectively.

17

The present invention includes the murine anti-EphA2 monoclonal antibody selected from 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2, and resurfaced or humanized versions of the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibodies wherein surface-exposed residues of the variable region frameworks of the antibodies, or their epitope-binding fragments, are replaced in both light and heavy chains to more closely resemble known human antibody surfaces. The humanized antibodies and epitope-binding fragments thereof of the present invention have improved properties in that they are less immunogenic (or completely non-immunogenic) than murine versions in human subjects to which they are administered.

10 Thus, the different versions of humanized 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; and EphA2-N2 antibodies and epitope-binding fragments thereof of the present invention specifically recognize EphA2 receptor while not being immunogenic to a human.

The humanized versions of the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibodies of the present invention are fully characterized herein with respect to their respective amino acid sequences of both light and heavy chain variable regions, the DNA sequences of the genes for the light and heavy chain variable regions, the identification of the complementarity determining regions (CDRs), the identification of their variable region framework surface amino acid residues, and disclosure of a means for their expression in recombinant form.

20 This invention also contemplates the use of conjugates between cytotoxic conjugates comprising (1) a cell binding agent that recognizes and binds the EphA receptor, such as, EphA2 receptor, and (2) a cytotoxic agent. In the cytotoxic conjugates, the cell binding agent has a high affinity for the EphA receptor (e.g., EphA2 receptor) and the cytotoxic agent has a high degree of cytotoxicity for cells expressing the EphA receptor, such that the cytotoxic conjugates of the present invention form effective killing agents.

In a preferred embodiment, the cell binding agent is an anti-EphA2 antibody (e.g., 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, or EphA2-N2) or an epitope-binding fragment thereof, more preferably a humanized anti-EphA2 antibody (e.g., 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, or EphA2-N2) or an epitope-binding fragment thereof, wherein a cytotoxic agent is covalently attached, directly or via a cleavable or non-cleavable linker, to the antibody or epitope-binding fragment thereof. In more preferred embodiments, the cell binding agent is the humanized 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; and EphA2-N2 antibodies or an epitope-binding fragment thereof, and the

cytotoxic agent is a taxol, a maytansinoid, a tomaymycin derivative, a leptomycin derivative, CC-1065 or a CC-1065 analog.

In preferred embodiments of the invention, the cell binding agent is the humanized anti-EphA2 antibody 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, or EphA2-N2 and the cytotoxic agent is a maytansine compound, such as DM1 or DM4.

The present invention also encompasses the use of fragments of anti-EphA2 antibodies which retain the ability to bind the EphA2 receptor. In another aspect of the invention, the use of functional equivalents of anti-EphA2 antibodies is contemplated.

The present invention also includes a method for inhibiting the growth of a cell expressing the EphA2 receptor. In preferred embodiments, the method for inhibiting the growth of the cell expressing the EphA2 receptor takes place *in vivo* and results in the death of the cell, although *in vitro* and *ex vivo* applications are also included.

The present invention also provides a therapeutic composition comprising an anti-EphA2 antibody or an anti-EphA2 antibody-cytotoxic agent conjugate, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipients. In some embodiments, the therapeutic composition comprises a second therapeutic agent. This second therapeutic agent can be chosen from the group comprising the antagonists of fibroblast-growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), tissue factor (TF), protein C, protein S, platelet-derived growth factor (PDGF), or HER2 receptor.

The present invention further includes a method of treating a subject having cancer using the therapeutic composition. In some embodiments, the cancer is a metastatic cancer. In particular, the cancer cell is a cell of a cancer selected from the group consisting of breast cancer, colon cancer, endometrial cancer, ovarian carcinoma, osteosarcoma, cervical cancer, prostate cancer, lung cancer, synovial carcinoma, pancreatic cancer, a sarcoma, a glioma, head and neck cancer, gastric cancer, liver cancer, and other carcinomas. In preferred embodiments, the cytotoxic conjugate comprises an anti-EphA2 antibody and a cytotoxic agent. In more preferred embodiments, the cytotoxic conjugate comprises a humanized 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibody-DM1 conjugate, humanized 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibody-DM4, a humanized 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibody-taxane conjugate, or a humanized 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibody-tomaymycin

derivative conjugate, and the conjugate is administered along with a pharmaceutically acceptable carrier or excipients.

In another aspect of the invention, anti-EphA2 antibodies are used to detect the EphA2 protein in a biological sample. In a preferred embodiment, said antibodies are used to
5 determine EphA2 levels in a tumor tissue.

The present invention also includes a kit comprising an anti-EphA2 antibody or an anti-EphA2 antibody-cytotoxic agent conjugate and instructions for use. In preferred embodiments, the anti-EphA2 antibodies are the humanized 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibodies, the cytotoxic agent is a maytansine compound,
10 such as DM1 or DM4, a taxane, a leptomycin derivative, or a tomaymycin derivative, and the instructions are for using the conjugates in the treatment of a subject having cancer. The kit may also include components necessary for the preparation of a pharmaceutically acceptable formulation, such as a diluent if the conjugate is in a lyophilized state or concentrated form, and for the administration of the formulation.

15 Unless otherwise stated, all references and patents cited herein are incorporated by reference.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Fig. 1 shows the analysis of the specific binding of anti-EphA2 antibodies to cells overexpressing human EphA2 (300-19/hu-EphA2 cells) by FACS analysis. Fig. 1A
20 shows the data for the 37.3D7 antibody, Fig. 1B for the 37.1F5 antibody, and Fig. 1C for the 53.2H11 antibody, respectively.

Fig. 2 shows the specific binding of purified 37.3D7 antibody to BxPC3 human pancreatic cancer cells, MDA-MB-231 human breast cancer cells, and HT-29 human colon cancer cells. Histograms of FACS analysis are shown.

25 Fig. 3 shows binding curves for the antibodies 37.3D7 (Fig. 3A), 37.1F5 (Fig. 3B), and 53.2H11 (Fig. 3C) established with human EphA2 overexpressing murine 300-19 cells (300-19/hu-EphA2).

Fig. 4 shows the specific binding of purified 37.3D7 and 53.2H11 antibodies to cells overexpressing EphA2. Histograms of FACS analysis are shown. Fig. 4A shows the
30 data for cells overexpressing murine EphA2 (300-19/mu-EphA2) and Fig. 4B shows the

data for cells overexpressing rat EphA2 (300-19/rat-EphA2).

Fig. 5A shows the specific binding of purified 37.3D7, 37.1F5, and 53.2H11 antibodies to VERO monkey kidney epithelial cells. Histograms of FACS analysis are shown.

Fig. 5B shows the binding curves for the antibodies 37.3D7, 37.1F5, and 53.2H11
5 established with VERO monkey kidney epithelial cells.

Fig. 6 shows the inhibition of the binding of biotinylated ephrinA1 to mammary MDA-MB-231 human breast cancer cells by 37.3D7, 37.1F5, and 53.2H11 antibodies.

Fig. 7A shows the inhibition of ephrinA1-stimulated EphA2-phosphorylation in mammary MDA-MB-231 cells by 37.3D7 and 37.1F5 antibodies.

10 Fig. 7B shows the inhibition of ephrinA1-stimulated EphA2-phosphorylation in mammary MDA-MB-231 cells by 37.3D7 and 53.2H11 antibodies.

Fig. 7C shows the inhibition of ephrinA1-stimulated Akt phosphorylation in pancreatic CFPAC-1 cells by 37.3D7 and 37.1F5 antibodies.

15 Figs. 8A and B show the stimulation of EphA2-phosphorylation by ephrinA1 and the absence of stimulation of EphA2-phosphorylation by the antibodies 37.3D7, 37.1F5, and 53.2H11 in mammary MDA-MB-231 cells.

Figs. 9A-9D show the inhibition of serum-stimulated growth and survival of colon HT-29 cells (9A), colon LoVo cells (9B), pancreatic CFPAC-1 cells (9C) and melanoma UACC-257 cells (9D) by 37.3D7 and 53.2H11 antibodies.

20 Fig. 10A shows the dose-dependent inhibition of serum-stimulated growth of pancreatic BxPC3 cells by 37.3D7 antibody.

Fig. 10B shows the dose-dependent inhibition of serum-stimulated growth of colon LoVo cells by the 53.2H11 antibody.

25 Fig. 10C shows the dose-dependent inhibition of EGF-stimulated growth of colon LoVo cells by 53.2H11 antibody.

Fig. 11A shows the binding curve of 37.3D7 antibody to HUVEC cells.

Fig. 11B shows the binding curve of 37.1F5 antibody to HUVEC cells.

Fig. 12 shows the inhibition of VEGF-stimulated HUVEC cell growth and survival by 37.3D7 antibody.

Fig. 13 shows the inhibition of VEGF-induced Akt phosphorylation by 37.3D7 antibody in HUVEC cells.

- 5 Fig. 14 shows the effect of the treatment with 37.3D7 antibody on the growth of HT-29 colon cancer xenograft in mice. The effect is compared with that of an anti-EGFR antibody and a non-binding control IgG1 antibody.

Fig. 15A shows the inhibition of the growth of PC3 prostate tumor cells by hu37.3D7-SPDB-DM4.

- 10 Fig. 15B shows the inhibition of the growth of PC3 prostate tumor cells by hu53.2H11-SPDB-DM4.

Fig. 16A shows the effect of the treatment with hu37.3D7-SPDB-DM4 on the growth of MDA-MB-231 breast tumor xenograft in mice.

- 15 Fig. 16B shows the effect of the treatment with hu53.2H11-SPDB-DM4 on the growth of MDA-MB-231 breast tumor xenograft in mice.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- New agents capable to specifically bind EphA receptors and antagonize said receptors are herein provided. In particular, the present inventors have discovered novel antibodies that specifically bind to EphA receptors on the cell surface. While previously
- 20 known antibodies which specifically bind the EphA receptor also activate it even in the absence of its ligands, the antibodies or fragments of the present invention are preferentially devoid of any agonist activity. On the other hand, they have the unique ability to inhibit the cellular functions of the receptor even in the presence of its ligands, a characteristic which is totally absent from the previously known EphA2-binding
- 25 antibodies. Furthermore, the antagonistic antibodies and antibody fragments of the present invention inhibit the growth and/or the migration of human tumor cells, and/or angiogenesis, three properties totally unanticipated in view of the prior art (Landen, C. N. *et al.*, 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, 9 (6): 1179-1187; WO 01/12172; WO 2004/014292; WO 2004/092343).

- 30 As used herein, the term "Eph receptor" refers to a tyrosine kinase belonging to the

Eph receptors family (reviewed in Pasquale, E. B. *et al.*, 2005, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, 6, 462-475). "Class A Eph receptor family" or "EphA receptors" as used herein preferentially interact with glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked ligands (of the Ephrin-A subclass, which presently comprises five ligands). Specific EphA
5 receptors include: EphA1 (also called Eph and Esk); EphA2 (also called Eck, mEck, Myk2, Sek2); EphA3 (also termed Hek, Mek4, Tyro4 and Cek4); EphA4 (also known as Hek8, Sek1, Tyrol, and Cek8); EphA5 (also called Hek7, Bsk, Ehk1, Rek7 and Cek7); EphA6 (also called mEhk2 and Ehk2); EphA7 (otherwise named Hek11, Mdk1, Ebk, Ehk3); and EphA8 (also termed Eek and mEek) and naturally occurring variants
10 thereof. The preferred Eph receptor herein is the "EphA2 receptor", comprising, for example, an amino sequence as in Genbank accession Nos NM_004431 (human EphA2), NM_010139 (murine EphA2), or NXM_345596 (rat EphA2). The term "Eph ligand" as used herein refers to a protein that binds to, and optionnally activates (e.g. stimulates the autophosphorylation of), an Eph receptor. A preferred Eph ligand herein
15 is "ephrinA1", which binds to the EphA2 receptor and comprises, for example, an amino sequence as in Genbank accession NM_004428 (human ephrinA1).

The term "antagonist" as used herein refers to a molecule which is capable of inhibiting one or more of the biological activities of a target molecule, such as an EphA receptor. Antagonists may act by interfering with the binding of a receptor to a ligand and vice
20 versa, by decreasing EphA2 phosphorylation, and/or by incapacitating or killing cells which have been activated by a ligand. The antagonist may completely block receptor-ligand interactions or may substantially reduce such interactions. All such points of intervention by an antagonist shall be considered equivalent for purposes of this invention. Thus, included within the scope of the invention are antagonists (e.g.
25 neutralizing antibodies) that bind to EphA receptor, Eph ligand or a complex of an Eph receptor and Eph ligand; amino acid sequence variants or derivatives of an EphA receptor or EphA ligand which antagonize the interaction between an EphA receptor and EphA ligand; soluble EphA receptor or soluble EphA ligand, optionally fused to a heterologous molecule such as an immunoglobulin region (e.g. an immunoadhesin); a
30 complex comprising an EphA receptor in association with EphA ligand; synthetic or native sequence peptides which bind to EphA receptor or EphA ligand.

The term "agonist" as used herein refers to any compound, including a protein, a polypeptide, a peptide, an antibody, an antibody fragment, a conjugate, a large molecule, a small molecule, capable of activating one or more of the biological

23

activities of the target molecule. EphA agonists act by stimulating phosphorylation of the protein, thereby triggering degradation of said protein.

Thus in a preferred embodiment the present invention provides, among other features, anti-EphA monoclonal antibodies, anti-EphA humanized antibodies, and fragments of the anti-EphA antibodies. Each of the antibodies and antibody fragments of the present invention is designed to specifically recognize and bind the EphA2 receptor, and acts as an EphA2 receptor antagonist. Moreover, the antagonistic antibodies and antibody fragments of the invention have the unique properties of being able to inhibit the growth of human tumor cells, and/or the migration of metastatic cancer cells, and/or angiogenesis.

A preferred EphA receptor bound by the antagonistic antibodies and antibody fragments of the invention is the EphA2 receptor. Human EphA2 is a preferred EphA2 receptor.

The EphA2 receptor belongs to a family of receptor whose cytoplasmic tail phosphorylation is increased after ligand binding to interact with a variety of adapter and signalling proteins, leading to the activation of different downstream cellular signalling pathways (Kullander, K. and Klein, R., 2002, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, **3**: 475-486; Noren, N. K. and Pasquale, E. B., 2004, *Cell signal.*, **16**: 655-666). As used herein, the term "EphA2-mediated signaling" refers to all the cellular events which occur in response to ligand binding by EphA2. Whereas antibodies disclosed in the prior art agonize the EphA2 receptor, and, in particular, increase the tyrosine phosphorylation of the EphA2 protein, the antibodies and antibody fragments of the invention are preferentially devoid of any such agonistic properties. In particular, they are unable to stimulate EphA2 phosphorylation by themselves.

On the other hand, this invention provides the first actual antagonistic anti-EphA2 antibodies. In one embodiment, the antibodies and antibody fragments of the invention can inhibit the binding of a ligand to an EphA receptor. In a preferred embodiment, the binding of ephrinA1 to EphA2 is prevented by the antibodies and fragments thereof provided by this invention. Remarkably, in another embodiment, the antibodies and antibody fragments of the invention are capable of inhibiting tyrosine phosphorylation of the EphA2 receptor, even in the presence of ephrinA1. Moreover, said antibodies and fragments thereof are capable of inhibiting EphA2-mediated signaling. In particular, Akt ephrinA1-dependent phosphorylation can be prevented by the antibodies and antibody

fragments of the invention.

Antibodies

The term "antibody" is used herein in the broadest sense and specifically covers monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies) of any isotype such as IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE, polyclonal antibodies, multispecific antibodies, chimeric antibodies, and antibody fragments. An antibody reactive with a specific antigen can be generated by recombinant methods such as selection of libraries of recombinant antibodies in phage or similar vectors, or by immunizing an animal with the antigen or an antigen-encoding nucleic acid.

10 A typical antibody is comprised of two identical heavy chains and two identical light chains that are joined by disulfide bonds. Each heavy and light chain contains a constant region and a variable region. Each variable region contains three segments called "complementarity-determining regions" ("CDRs") or "hypervariable regions", which are primarily responsible for binding an epitope of an antigen. They are usually referred to as CDR1, CDR2, and CDR3, numbered sequentially from the N-terminus. 15 The more highly conserved portions of the variable regions are called the "framework regions".

As used herein, "V_H" or "VH" refers to the variable region of an immunoglobulin heavy chain of an antibody, including the heavy chain of an Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab', or F(ab')₂ fragment. Reference to "V_L" or "VL" refers to the variable region of the immunoglobulin light chain of an antibody, including the light chain of an Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab', or F(ab')₂ fragment. 20

A "polyclonal antibody" is an antibody which was produced among or in the presence of one or more other, non-identical antibodies. In general, polyclonal antibodies are produced from a B-lymphocyte in the presence of several other B-lymphocytes producing non-identical antibodies. Usually, polyclonal antibodies are obtained directly from an immunized animal. 25

A "monoclonal antibody", as used herein, is an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e. the antibodies forming this population are essentially identical except for possible naturally occurring mutations which might be present in minor amounts. These antibodies are directed against a single epitope and are therefore highly specific. 30

An "epitope" is the site on the antigen to which an antibody binds. It can be formed by contiguous residues or by non-contiguous residues brought into close proximity by the folding of an antigenic protein. Epitopes formed by contiguous amino acids are typically retained on exposure to denaturing solvents, whereas epitopes formed by non-contiguous amino acids are typically lost under said exposure.

As used herein, the term " K_D " refers to the dissociation constant of a particular antibody/antigen interaction.

The present invention proceeds from murine anti-EphA2 antibodies, herein 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; and EphA2-N2 which are fully characterized with respect to the amino acid sequences of both light and heavy chains, the identification of the CDRs, the identification of surface amino acids, and means for their expression in recombinant form. The primary amino acid and DNA sequences of antibodies 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; and EphA2-N2 light and heavy chains, and of humanized versions, are disclosed herein.

Antibodies 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 are produced by hybridomas respectively designated 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2, and deposited under the Budapest Treaty on June 16, 2006 and May 3rd, 2007, respectively, at the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA, under the accession numbers PTA-7660, PTA-7661 PTA-7662, PTA-8407 and PTA-8408, respectively.

The scope of the present invention is not limited to antibodies and fragments comprising these sequences. Instead, all antibodies and fragments that specifically bind to EphA2 receptor and antagonize the biological activity of the receptor, but which are devoid of agonist activity, fall within the scope of the present invention. Thus, antibodies and antibody fragments may differ from antibody 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; and EphA2-N2 or the humanized derivatives in the amino acid sequences of their scaffold, CDRs, light chain and heavy chain, and still fall within the scope of the present invention.

In one embodiment, this invention provides antibodies or epitope-binding fragment thereof comprising one or more CDRs having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, and 72.

In a preferred embodiment, the antibodies of the invention comprise at least one heavy chain and at least one light chain, and said heavy chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 61, 62, 63, 67, 68, and 69, and said light chain
5 comprises three sequential CDRs having amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 64, 65, 66, 70, 71, and 72.

In a more preferred embodiment, the antibodies of the invention comprise three CDRS having amino acid sequences selected from the group of SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5,
10 and 6. In a further more preferred embodiment, there is provided a 37.3D7 antibody, which comprises at least one heavy chain and at least one light chain, and said heavy chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 1, 2, and 3, and said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 4, 5, and 6.

15 In another more preferred embodiment, the antibodies of the invention comprise three CDRS having amino acid sequences selected from the group of SEQ ID NOS: 7, 8, 9, 10, 11, and 12. In further more preferred embodiment, there is provided a 37.1F5 antibody, which comprises at least one heavy chain and at least one light chain, and said heavy chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences
20 consisting of SEQ ID NOS: 7, 8, and 9, and said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 10, 11, and 12.

In another more preferred embodiment, the antibodies of the invention comprise three CDRS having amino acid sequences selected from the group of SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17, and 18. In a further more preferred embodiment, there is provided a
25 53.2H11, which comprises at least one heavy chain and at least one light chain, and said heavy chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 13, 14, and 15, and said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 16, 17, and 18.

30 In another more preferred embodiment, the antibodies of the invention comprise three CDRS having amino acid sequences selected from the group of SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, and 66. In a further more preferred embodiment, there is provided a EphA2-N1 antibody, which comprises at least one heavy chain and at least one light chain,

2A

and said heavy chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 61, 62, and 63, and said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 64, 65, and 66.

- 5 In another more preferred embodiment, the antibodies of the invention comprise three CDRs having amino acid sequences selected from the group of SEQ ID NOS: 67, 68, 69, 70, 71, and 72. In a further more preferred embodiment, there is provided a EphA2-N2 antibody, which comprises at least one heavy chain and at least one light chain, and said heavy chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences
10 consisting of SEQ ID NOS: 67, 68, and 69, and said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 70, 71, and 72.

- In another embodiment, the antibodies of the invention comprises a V_H having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 20, 22, 24,
15 74 and 76. In a preferred embodiment, there is provided a 37.3D7 antibody comprising a V_H having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 20. In another preferred embodiment, there is provided a 37.1F5 antibody comprising a V_H having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 22. In another preferred embodiment, there is provided a 53.2H11 antibody comprising a V_H having an amino acid sequence
20 consisting of SEQ ID NO 24. In another preferred embodiment, there is provided a EphA2-N1 antibody comprising a V_H having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 74. In another preferred embodiment, there is provided a EphA2-N2 antibody comprising a V_H having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 76.

- In another preferred embodiment, the antibodies of the invention comprise a V_L having
25 an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 26, 28, 30, 78 and 80. In a preferred embodiment, there is provided a 37.3D7 antibody comprising a V_L having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 26. In another preferred embodiment, there is provided a 37.1F5 antibody comprising a V_L having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 28. In another preferred
30 embodiment, there is provided a 53.2H11 antibody comprising a V_L having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 30. In another preferred embodiment, there is provided a EphA2-N1 antibody comprising a V_L having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 78. In another preferred embodiment, there is provided a EphA2-N2 antibody comprising a V_L having an amino acid sequence consisting of SEQ

28

ID NO 80.

Humanized or Resurfaced 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; and EphA2-N2 Antibodies

As used herein, the term "humanized antibody" refers to a chimeric antibody which
5 contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. A "chimeric
antibody", as used herein, is an antibody in which the constant region, or a portion
thereof, is altered, replaced, or exchanged, so that the variable region is linked to a
constant region of a different species, or belonging to another antibody class or
subclass. "Chimeric antibody" also refers to to an antibody in which the variable region,
10 or a portion thereof, is altered, replaced, or exchanged, so that the constant region is
linked to a variable region of a different species, or belonging to another antibody class
or subclass.

The goal of humanization is a reduction in the immunogenicity of a xenogenic antibody,
such as a murine antibody, for introduction into a human, while maintaining the full
15 antigen binding affinity and specificity of the antibody. Humanized antibodies, or
antibodies adapted for non-rejection by other mammals, may be produced using
several technologies such as resurfacing and CDR grafting. As used herein, the
resurfacing technology uses a combination of molecular modeling, statistical analysis
and mutagenesis to alter the non-CDR surfaces of antibody variable regions to
20 resemble the surfaces of known antibodies of the target host.

Strategies and methods for the resurfacing of antibodies, and other methods for
reducing immunogenicity of antibodies within a different host, are disclosed in US
Patent 5,639,641, which is hereby incorporated in its entirety by reference. Briefly, in a
preferred method, (1) position alignments of a pool of antibody heavy and light chain
25 variable regions is generated to give a set of heavy and light chain variable region
framework surface exposed positions wherein the alignment positions for all variable
regions are at least about 98% identical; (2) a set of heavy and light chain variable
region framework surface exposed amino acid residues is defined for a rodent antibody
(or fragment thereof); (3) a set of heavy and light chain variable region framework
30 surface exposed amino acid residues that is most closely identical to the set of rodent
surface exposed amino acid residues is identified; (4) the set of heavy and light chain
variable region framework surface exposed amino acid residues defined in step (2) is
substituted with the set of heavy and light chain variable region framework surface

exposed amino acid residues identified in step (3), except for those amino acid residues that are within 5 Å of any atom of any residue of the complementarity-determining regions of the rodent antibody; and (5) the humanized rodent antibody having binding specificity is produced.

- 5 Antibodies can be humanized using a variety of other techniques including CDR-grafting (EP 0 239 400; WO 91/09967; U.S. Pat. Nos. 5,530,101; and 5,585,089), veneering or resurfacing (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, *Molecular Immunology* **28**(4/5): 489-498; Studnicka G. M. *et al.*, 1994, *Protein Engineering* **7**(6): 805-814; Roguska M.A. *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**:969-973), and
- 10 chain shuffling (U.S. Pat. No. 5,565,332). Human antibodies can be made by a variety of methods known in the art including phage display methods. See also U.S. Pat. Nos. 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806, and 5,814,318; and international patent application publication numbers WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, and WO 91/10741 (said references incorporated by
- 15 reference in their entireties).

The present invention provides humanized antibodies or fragments thereof, which recognizes EphA2 receptor and acts as antagonists. In another embodiment, the humanized antibodies or epitope-binding fragments thereof have the additional ability to inhibit growth of a cancer cell expressing the EphA2 receptor. In a further

20 embodiment, the humanized antibody or epitope-binding thereof have the additional ability to inhibit the migration of a metastatic cancer cell expressing the EphA2 receptor.

A preferred embodiment of such a humanized antibody is a humanized 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody, or an epitope-binding fragment

25 thereof.

In more preferred embodiments, there are provided resurfaced or humanized versions of the 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 and EphA2-N2 antibodies wherein surface-exposed residues of the antibody or its fragments are replaced in both light and heavy chains to more closely resemble known human antibody surfaces. The humanized

30 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 and EphA2-N2 antibodies or epitope-binding fragments thereof of the present invention have improved properties. For example, humanized 37.3D7, 37.1F5; and 53.2H11 antibodies or epitope-binding fragments thereof specifically recognize EphA2 receptor. More preferably, the humanized 37.3D7,

37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibodies or epitope-binding fragments thereof have the additional ability to inhibit growth of a cell expressing the EphA2 receptor.

The humanized versions of the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibodies are also fully characterized herein with respect to their respective amino acid sequences of both light and heavy chain variable regions, the DNA sequences of the genes for the light and heavy chain variable regions, the identification of the CDRs, the identification of their surface amino acids, and disclosure of a means for their expression in recombinant form. However, the scope of the present invention is not limited to antibodies and fragments comprising these sequences. Instead, all antibodies and fragments that specifically bind to EphA2 receptor are included in the present invention. Preferably, the antibodies and fragments that specifically bind to EphA2 receptor antagonize the biological activity of the receptor. More preferably, such antibodies further are substantially devoid of agonist activity. Thus, antibodies and epitope-binding antibody fragments of the present invention may differ from the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody or the humanized derivatives thereof, in the amino acid sequences of their scaffold, CDRs, and/or light chain and heavy chain, and still fall within the scope of the present invention.

The CDRs of the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibodies are identified by modeling and their molecular structures have been predicted. Again, while the CDRs are important for epitope recognition, they are not essential to the antibodies and fragments of the invention. Accordingly, antibodies and fragments are provided that have improved properties produced by, for example, affinity maturation of an antibody of the present invention.

The mouse light chain IgVk and Jk germline genes and heavy chain IgVh and Jh germline genes from which 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 were likely derived have been identified, as disclosed in the experimental Examples section. Such germline gene sequences are useful to identify somatic mutations in the antibodies, including in the CDRs.

The sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibodies, and the sequences of their CDRs were not previously known and are set forth in this application. Such information can be used to produce humanized versions of the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-

31

N1, and EphA2-N2 antibodies. These humanized anti-EphA antibodies or their derivatives may also be used as the cell binding agent of the present invention.

Thus, in one embodiment, this invention provides humanized antibodies or epitope-binding fragment thereof comprising one or more CDRs having an amino acid

5 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, and 72. In a preferred embodiment, the humanized antibodies of the invention comprise at least one heavy chain and at least one light chain, and said heavy chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences selected from the group consisting of

10 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 61, 62, 63, 67, 68, and 69, and said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 64, 65, 66, 70, 71, and 72. In a further preferred embodiment, the humanized antibodies of the invention comprise at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy

15 chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1, 2, and 3, and wherein said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 4, 5, and 6. In another further preferred embodiment, the humanized antibodies of the invention comprise at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy

20 chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 7, 8, and 9, and wherein said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 10, 11, and 12. In another further preferred embodiment, the humanized antibodies of the invention comprise at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy

25 chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 13, 14, and 15, and wherein said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 16, 17, and 18. In another more preferred embodiment, the humanized antibodies of the invention comprise at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy

30 chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 61, 62, and 63, and wherein said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 64, 65, and 66. In another more preferred embodiment, the humanized antibodies of the invention comprise at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy

35 chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of

SEQ ID NOS: 67, 68, and 69, and wherein said light chain comprises three sequential CDRs having amino acid sequences consisting of SEQ ID NOS: 70, 71, and 72.

In one embodiment, this invention provides humanized antibodies or fragments thereof which comprise a V_H having an amino acid sequence chosen from the group consisting of SEQ ID NOS: 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, and 45. In a preferred embodiment, a humanized 37.1D7 antibody is provided which comprises a V_H having an amino acid sequence chosen from the group consisting of SEQ ID NOS: 32, 34, and 36. In another preferred embodiment, a humanized 37.1F5 antibody is provided which comprises a V_H having an amino acid sequence chosen from the group consisting of SEQ ID NOS: 37 and 38. In another preferred embodiment, a humanized 53.2H11 antibody is provided which comprises a V_H having an amino acid sequence chosen from the group consisting of SEQ ID NOS: 40, 42, 43, and 45.

In another embodiment, this invention provides humanized antibodies or fragments thereof which comprise a V_L having an amino acid sequence chosen from the group consisting of SEQ ID NOS: 47, 48, 49, 50, and 52. In a preferred embodiment, a humanized 37.1D7 antibody is provided which comprises a V_L having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 47. In another preferred embodiment, a humanized 37.1F5 antibody is provided which comprises a V_L having an amino acid sequence chosen from the group consisting of SEQ ID NOS: 48, 49, and 50. In another preferred embodiment, a humanized 53.2H11 antibody is provided which comprises a V_L having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO 52.

The humanized 37.3D7 antibodies and epitope-binding fragments thereof of the present invention can also include substitution in light and/or heavy chain amino acid residues at one or more positions defined by the grey residues in Table 1A and 1B which represent the murine surface framework residues that have been changed from the original murine residue to the corresponding framework surface residue in the human antibody, 28E4. The starred (*) residues in Table 1B correspond to the murine back mutations in the humanized 37.3D7 heavy chain variants (SEQ ID NO: 34 and SEQ ID NO:36). The residues for back mutations are proximal to CDR's and were chosen as described in U.S. patent No. 5,639,641 or in analogy to the selection of residues that had in previous humanization efforts resulted in a decrease in antigen binding affinity (Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.*;9(10): 895-904; U.S. patent application publications 2003/0235582 and 2005/0118183).

33

Likewise, the humanized 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; and EphA2-N2 antibodies and epitope-binding fragments thereof of the present invention can also include substitution in light and/or heavy chain amino acid residues.

Polynucleotides, vectors, and host cells

- 5 Nucleic acids encoding anti-EphA2 antibodies of the invention are provided. In one embodiment, the nucleic acid molecule encodes a heavy and/or a light chain of an anti-EphA2 immunoglobulin. In a preferred embodiment, a single nucleic acid encodes a heavy chain of an anti-EphA2 immunoglobulin and another nucleic acid molecule encodes the light chain of an anti-EphA2 immunoglobulin.
- 10 In another aspect of this invention, there are provided polynucleotides encoding polypeptides having an amino acid sequence selected from the group of SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 76, 78 and 80. In a preferred embodiment, the polynucleotide of the invention is
- 15 selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 39, 41, 44, 46, 51, 73, 75, 77, and 79. The invention is not limited to said polynucleotides per se but also includes all polynucleotides displaying at least 80 % identity with said polynucleotides.

- The invention provides vectors comprising the polynucleotides of the invention. In one
- 20 embodiment, the vector contains a polynucleotide encoding a heavy chain of an anti-EphA2 immunoglobulin. In another embodiment, said polynucleotide encodes the light chain of an anti-EphA2 immunoglobulin. The invention also provides vectors comprising polynucleotide molecules encoding fusion proteins, modified antibodies, antibody fragments, and probes thereof.

- 25 In order to express the heavy and/or light chain of the anti-EphA2 antibodies of the invention, the polynucleotides encoding said heavy and/or light chains are inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational sequences. Expression vectors include plasmids, YACs, cosmids, retrovirus, EBV-derived episomes, and all the other vectors that the skilled man will
- 30 know to be convenient for ensuring the expression of said heavy and/or light chains. The skilled man will realize that the polynucleotides encoding the heavy and the light chains can be cloned into different vectors or in the same vector. In a preferred

24

embodiment, said polynucleotides are cloned in the same vector.

Polynucleotides of the invention and vectors comprising these molecules can be used for the transformation of a suitable mammalian host cell, or any other type of host cell known to the skilled person. Transformation can be by any known method for

- 5 introducing polynucleotides into a cell host. Such methods are well known of the man skilled in the art and include dextran-mediated transformation, calcium phosphate precipitation, polybrene-mediated transfection, protoplast fusion, electroporation, encapsulation of the polynucleotide into liposomes, biolistic injection and direct microinjection of DNA into nuclei.

10 **Antibody Fragments**

- The antibodies of the present invention include both the full length antibodies discussed above, as well as epitope-binding fragments. As used herein, "antibody fragments" include any portion of an antibody that retains the ability to bind to the epitope recognized by the full length antibody, generally termed "epitope-binding
- 15 fragments." Examples of antibody fragments include, but are not limited to, Fab, Fab' and F(ab')₂, Fd, single-chain Fvs (scFv), single-chain antibodies, disulfide-linked Fvs (dsFv) and fragments comprising either a V_L or V_H region. Epitope-binding fragments, including single-chain antibodies, may comprise the variable region(s) alone or in combination with the entirety or a portion of the following: hinge region, C_H1, C_H2, and
- 20 C_H3 domains.

- Such fragments may contain one or both Fab fragments or the F(ab')₂ fragment. Preferably, the antibody fragments contain all six CDRs of the whole antibody, although fragments containing fewer than all of such regions, such as three, four or five CDRs, are also functional. Further, the fragments may be or may combine members of any
- 25 one of the following immunoglobulin classes: IgG, IgM, IgA, IgD, or IgE, and the subclasses thereof.

Fab and F(ab')₂ fragments may be produced by proteolytic cleavage, using enzymes such as papain (Fab fragments) or pepsin (F(ab')₂ fragments).

- The "single-chain FVs" ("scFvs") fragments are epitope-binding fragments that contain
- 30 at least one fragment of an antibody heavy chain variable region (V_H) linked to at least one fragment of an antibody light chain variable region (V_L). The linker may be a short, flexible peptide selected to ensure that the proper three-dimensional folding of the (V_L)

35

and (V_H) regions occurs once they are linked so as to maintain the target molecule binding-specificity of the whole antibody from which the single-chain antibody fragment is derived. The carboxyl terminus of the (V_L) or (V_H) sequence may be covalently linked by a linker to the amino acid terminus of a complementary (V_L) or (V_H) sequence.

- 5 Single-chain antibody fragments of the present invention contain amino acid sequences having at least one of the variable or complementarity determining regions (CDRs) of the whole antibodies described in this specification, but are lacking some or all of the constant domains of those antibodies. These constant domains are not necessary for antigen binding, but constitute a major portion of the structure of whole
- 10 antibodies. Single-chain antibody fragments may therefore overcome some of the problems associated with the use of antibodies containing a part or all of a constant domain. For example, single-chain antibody fragments tend to be free of undesired interactions between biological molecules and the heavy-chain constant region, or other unwanted biological activity. Additionally, single-chain antibody fragments are
- 15 considerably smaller than whole antibodies and may therefore have greater capillary permeability than whole antibodies, allowing single-chain antibody fragments to localize and bind to target antigen-binding sites more efficiently. Also, antibody fragments can be produced on a relatively large scale in prokaryotic cells, thus facilitating their production. Furthermore, the relatively small size of single-chain antibody fragments
- 20 makes them less likely to provoke an immune response in a recipient than whole antibodies.

- Single-chain antibody fragments may be generated by molecular cloning, antibody phage display library or similar techniques well known to the skilled artisan. These proteins may be produced, for example, in eukaryotic cells or prokaryotic cells,
- 25 including bacteria. The epitope-binding fragments of the present invention can also be generated using various phage display methods known in the art. In phage display methods, functional antibody domains are displayed on the surface of phage particles which carry the polynucleotide sequences encoding them. In particular, such phage can be utilized to display epitope-binding domains expressed from a repertoire or
- 30 combinatorial antibody library (e.g., human or murine). Phage expressing an epitope-binding domain that binds the antigen of interest can be selected or identified with antigen, e.g., using labeled antigen bound or captured to a solid surface or bead. Phage used in these methods are typically filamentous phage including fd and M13 binding domains expressed from phage with Fab, Fv or disulfide-stabilized Fv antibody

30

domains recombinantly fused to either the phage gene III or gene VIII protein.

Examples of phage display methods that can be used to make the epitope-binding fragments of the present invention include those disclosed in Brinkman *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods*, **182**: 41-50; Ames *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods*, **184**: 177-186; Kettleborough *et al.*, 1994, *Eur. J. Immunol.*, **24**:952-958; Persic *et al.*, 1997, *Gene* **187**: 9-18; Burton *et al.*, 1994, *Advances in Immunology*, **57**: 191-280; PCT application No. PCT/GB91/01134; PCT publications WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; and U.S. Pat. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 and 5,969,108; each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

After phage selection, the regions of the phage encoding the fragments can be isolated and used to generate the epitope-binding fragments through expression in a chosen host, including mammalian cells, insect cells, plant cells, yeast, and bacteria, using recombinant DNA technology, e.g., as described in detail below. For example, techniques to recombinantly produce Fab, Fab' and F(ab')₂ fragments can also be employed using methods known in the art such as those disclosed in PCT publication WO 92/22324; Mullinax *et al.*, 1992, *BioTechniques*, **12**(6): 864-869; Sawai *et al.*, 1995, *AJRI*, **34**: 26-34; and Better *et al.*, 1988, *Science*, **240**: 1041-1043; said references incorporated by reference in their entireties. Examples of techniques which can be used to produce single-chain Fvs and antibodies include those described in U.S. Pat. Nos. 4,946,778 and 5,258,498; Huston *et al.*, 1991, *Methods in Enzymology* **203**: 46-88; Shu *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 7995-7999; Skerra *et al.*, 1988, *Science*, **240**: 1038-1040.

Functional Equivalents

Also included within the scope of the invention are functional equivalents of the anti-EphA antibody and the humanized anti-EphA2 receptor antibody. The term "functional equivalents" includes antibodies with homologous sequences, chimeric antibodies, artificial antibodies and modified antibodies, for example, wherein each functional equivalent is defined by its ability to bind to EphA2 receptor. The skilled artisan will understand that there is an overlap in the group of molecules termed "antibody fragments" and the group termed "functional equivalents." Methods of producing functional equivalents are known to the person skilled in the art and are disclosed, for

3A

example, in PCT Application WO 93/21319, European Patent No. EP 0239400; PCT Application WO 89/09622; European Patent No. EP 0338745; and European Patent Application EP 0332424, which are incorporated in their respective entireties by reference.

- 5 Antibodies with homologous sequences are those antibodies with amino acid sequences that have sequence homology with amino acid sequence of an anti-EphA antibody and a humanized anti-EphA antibody of the present invention. Preferably homology is with the amino acid sequence of the variable regions of the anti-EphA antibody and humanized anti-EphA antibody of the present invention. "Sequence
- 10 homology" as applied to an amino acid sequence herein is defined as a sequence with at least about 90%, 91%, 92%, 93%, or 94% sequence homology, and more preferably at least about 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence homology to another amino acid sequence, as determined, for example, by the FASTA search method in accordance with Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 2444-
- 15 2448.

- A chimeric antibody is one in which different portions of an antibody are derived from different animal species. For example, an antibody having a variable region derived from a murine monoclonal antibody paired with a human immunoglobulin constant region. Methods for producing chimeric antibodies are known in the art. See, e.g.,
- 20 Morrison, 1985, *Science*, **229**: 1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques*, **4**: 214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods*, **125**: 191-202; U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 4,816,397, which are incorporated herein by reference in their entireties.

- Humanized forms of chimeric antibodies are made by substituting the complementarity determining regions of, for example, a mouse antibody, into a human framework
- 25 domain, e.g., see PCT Pub. No. W092/22653. Humanized chimeric antibodies preferably have constant regions and variable regions other than the complementarity determining regions (CDRs) derived substantially or exclusively from the corresponding human antibody regions and CDRs derived substantially or exclusively from a mammal other than a human.

- 30 Artificial antibodies include scFv fragments, diabodies, triabodies, tetrabodies and mru (see reviews by Winter, G. and Milstein, C., 1991, *Nature*, **349**: 293-299; Hudson, P.J., 1999, *Current Opinion in Immunology*, **11**: 548-557), each of which has antigen-binding ability. In the single chain Fv fragment (scFv), the V_H and V_L domains of an antibody



are linked by a flexible peptide. Typically, this linker peptide is about 15 amino acid residues long. If the linker is much smaller, for example 5 amino acids, diabodies are formed, which are bivalent scFv dimers. If the linker is reduced to less than three amino acid residues, trimeric and tetrameric structures are formed that are called triabodies and tetrabodies. The smallest binding unit of an antibody is a CDR, typically the CDR2 of the heavy chain which has sufficient specific recognition and binding that it can be used separately. Such a fragment is called a molecular recognition unit or mru. Several such mrus can be linked together with short linker peptides, therefore forming an artificial binding protein with higher avidity than a single mru.

10 The functional equivalents of the present application also include modified antibodies, e.g., antibodies modified by the covalent attachment of any type of molecule to the antibody. For example, modified antibodies include antibodies that have been modified, e.g., by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a
15 cellular ligand or other protein, etc. The covalent attachment does not prevent the antibody from generating an anti-idiotypic response. These modifications may be carried out by known techniques, including, but not limited to, specific chemical cleavage, acetylation, formylation, metabolic synthesis of tunicamycin, etc. Additionally, the modified antibodies may contain one or more non-classical amino acids.

20 Functional equivalents may be produced by interchanging different CDRs on different chains within different frameworks. Thus, for example, different classes of antibody are possible for a given set of CDRs by substitution of different heavy chains, whereby, for example, IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE antibody types and isotypes may be produced. Similarly, artificial antibodies within the scope of the invention may be produced by
25 embedding a given set of CDRs within an entirely synthetic framework.

Functional equivalents may be readily produced by mutation, deletion and/or insertion within the variable and/or constant region sequences that flank a particular set of CDRs, using a wide variety of methods known in the art.

The antibody fragments and functional equivalents of the present invention encompass
30 those molecules with a detectable degree of binding to EphA, when compared to the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody. A detectable degree of binding includes all values in the range of at least 10-100%, preferably at least 50%, 60% or 70%, more preferably at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 99% the binding

39

ability of the murine 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody to EphA.

Improved Antibodies

The CDRs are of primary importance for epitope recognition and antibody binding.

- 5 However, changes may be made to the residues that comprise the CDRs without interfering with the ability of the antibody to recognize and bind its cognate epitope. For example, changes that do not affect epitope recognition, yet increase the binding affinity of the antibody for the epitope may be made.

- 10 Thus, also included in the scope of the present invention are improved versions of both the murine and humanized antibodies, which also specifically recognize and bind EphA, preferably with increased affinity.

- Several studies have surveyed the effects of introducing one or more amino acid changes at various positions in the sequence of an antibody, based on the knowledge of the primary antibody sequence, on its properties such as binding and level of expression (Yang, W. P. *et al.*, 1995, *J. Mol. Biol.*, **254**: 392-403; Rader, C. *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 8910-8915; Vaughan, T. J. *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 535-539).

- 20 In these studies, equivalents of the primary antibody have been generated by changing the sequences of the heavy and light chain genes in the CDR1, CDR2, CDR3, or framework regions, using methods such as oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis, cassette mutagenesis, error-prone PCR, DNA shuffling, or mutator-strains of *E. coli* (Vaughan, T. J. *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 535-539; Aday, N. B. *et al.*, 1996, Chapter 16, pp. 277-291, in "*Phage Display of Peptides and Proteins*", Eds. Kay, B. K. *et al.*, Academic Press). These methods of changing the sequence of the primary antibody have resulted in improved affinities of the secondary antibodies (Gram, H. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 3576-3580; Boder, E. T. *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**: 10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, *Immunotechnology*, **2**: 169-179; Thompson, J. *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.*, **256**: 77-88; Short, M. K. *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.*, **277**: 16365-16370; 30 Furukawa, K. *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.*, **276**: 27622-27628).

By a similar directed strategy of changing one or more amino acid residues of the antibody, the antibody sequences described in this invention can be used to develop

anti-EphA antibodies with improved functions, including improved affinity for EphA.

Preferred amino acid substitutions are those which: (1) reduce susceptibility to proteolysis, (2) reduce susceptibility to oxidation, (3) alter binding affinity for forming protein complexes, and (4) confer or modify other physico-chemical or functional properties of such analogs. Analogs can include various muteins of a sequence other than the naturally-occurring peptide sequence. For example, single or multiple amino acid substitutions (preferably conservative amino acid substitutions) may be made in the naturally-occurring sequence (preferably in the portion of the polypeptide outside the domain (s) forming intermolecular contacts. A conservative amino acid substitution should not substantially change the structural characteristics of the parent sequence (e. g., a replacement amino acid should not tend to break a helix that occurs in the parent sequence, or disrupt other types of secondary structure that characterizes the parent sequence). Examples of art-recognized polypeptide secondary and tertiary structures are described in *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)) ; and Thornton *et al.*, 1991, *Nature*, **354**: 105, which are each incorporated herein by reference.

Improved antibodies also include those antibodies having improved characteristics that are prepared by the standard techniques of animal immunization, hybridoma formation and selection for antibodies with specific characteristics.

The present invention also includes cytotoxic conjugates. These cytotoxic conjugates comprise two primary components, a cell-binding agent and a cytotoxic agent.

As used herein, the term "cell binding agent" refers to an agent that specifically recognizes and binds the EphA receptors on the cell surface. In one embodiment, the cell binding agent specifically recognizes the EphA receptor such that it allows the conjugates to act in a targeted fashion with little side-effects resulting from non-specific binding.

In another embodiment, the cell binding agent of the present invention also specifically recognizes the EphA receptor so that the conjugates will be in contact with the target cell for a sufficient period of time to allow the cytotoxic drug portion of the conjugate to act on the cell, and/or to allow the conjugates sufficient time in which to be internalized

41

by the cell.

In a preferred embodiment, the cytotoxic conjugates comprise an anti-EphA antibody as the cell binding agent, more preferably the murine 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 anti-EphA monoclonal antibody. In a more preferred

- 5 embodiment, the cytotoxic conjugate comprises a humanized 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody or an epitope-binding fragment thereof. The 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody is able to specifically recognize an EphA receptor, such as EphA2, and directs the cytotoxic agent to an abnormal cell or a tissue, such as cancer cells, in a targeted fashion.

- 10 The second component of the cytotoxic conjugates of the present invention is a cytotoxic agent. The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that reduces or blocks the function, or growth, of cells and/or causes destruction of cells.

- In preferred embodiments, the cytotoxic agent is a taxoid, a maytansinoid such as DM1 or DM4, a small drug, a tomaymycin derivative, a leptomycin derivative, a prodrug, CC-
15 1065 or a CC-1065 analog. In preferred embodiments, the cell binding agents of the present invention are covalently attached, directly or via a cleavable or non-cleavable linker, to the cytotoxic agent.

The cell binding agents, cytotoxic agents, and linkers are discussed in more detail below.

20 **Cell Binding Agents**

- The effectiveness of the compounds of the present invention as therapeutic agents depends on the careful selection of an appropriate cell binding agent. Cell binding agents may be of any kind presently known, or that become known, and includes peptides and non-peptides. The cell binding agent may be any compound that can bind
25 a cell, either in a specific or non-specific manner. Generally, these can be antibodies (especially monoclonal antibodies), lymphokines, hormones, growth factors, vitamins, nutrient-transport molecules (such as transferrin), or any other cell binding molecule or substance.

More specific examples of cell binding agents that can be used include:

- 30 • polyclonal antibodies;

- monoclonal antibodies;
- fragments of antibodies such as Fab, Fab', and F(ab')₂, Fv (Parham, 1983, *J. Immunol.*, **131**:2895-2902; Spring *et al.*, 1974, *J. Immunol.*, **113**: 470-478; Nisonoff *et al.*, 1960, *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**: 230-244).

5 Preferably, a humanized anti-EphA antibody is used as the cell binding agent of the present invention. More preferably the humanized anti-EphA antibody is selected from humanized or resurfaced 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 and EphA2-N2 antibodies.

Cytotoxic Agents

10 In another embodiment, the humanized antibody or an epitope-binding fragment thereof can be conjugated to a drug, such as a maytansinoid or a tomaymycin derivative, to form a prodrug having specific cytotoxicity towards antigen-expressing cells by targeting the drug to the EphA2 receptor. Cytotoxic conjugates comprising such antibodies and a small, highly toxic drug (e.g., maytansinoids, taxanes,
15 tomaymycin derivatives, a leptomycin derivative, CC-1065, and CC-1065 analogs) can be used as a therapeutic for treatment of tumors, such as breast and ovarian tumors.

The cytotoxic agent used in the cytotoxic conjugate of the present invention may be any compound that results in the death of a cell, or induces cell death, or in some manner decreases cell viability. Preferred cytotoxic agents include, for example,
20 maytansinoids and maytansinoid analogs, a prodrug, tomaymycin derivatives, taxoids, a leptomycin derivative, CC-1065 and CC-1065 analogs, defined below. These cytotoxic agents are conjugated to the antibodies, antibodies fragments, functional equivalents, improved antibodies and their analogs as disclosed herein.

The cytotoxic conjugates may be prepared by *in vitro* methods. In order to link a drug
25 or prodrug to the antibody, a linking group is used. Suitable linking groups are well known in the art and include disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups and esterase labile groups. Preferred linking groups are disulfide groups and thioether groups. For example, conjugates can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond
30 between the antibody and the drug or prodrug.

Maytansinoids

Among the cytotoxic agents that may be used in the present invention to form a cytotoxic conjugate, are maytansinoids and maytansinoid analogs. Examples of suitable maytansinoids include maytansinol and maytansinol analogs. Maytansinoids are drugs that inhibit microtubule formation and that are highly toxic to mammalian

5 cells.

Examples of suitable maytansinol analogues include those having a modified aromatic ring and those having modifications at other positions. Such suitable maytansinoids are disclosed in U.S. Patent Nos. 4,424,219; 4,256,746; 4,294,757; 4,307,016; 4,313,946; 4,315,929; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,450,254; 4,322,348;

10 4,371,533; 6,333,410; 5,475,092; 5,585,499; and 5,846,545.

Specific examples of suitable analogues of maytansinol having a modified aromatic ring include:

(1) C-19-dechloro (U.S. Pat. No. 4,256,746) (prepared by LAH reduction of ansamycin P2);

15 (2) C-20-hydroxy (or C-20-demethyl) +/-C-19-dechloro (U.S. Pat. Nos. 4,361,650 and 4,307,016) (prepared by demethylation using *Streptomyces* or *Actinomyces* or dechlorination using LAH); and

(3) C-20-demethoxy, C-20-acyloxy (-OCOR), +/-dechloro (U.S. Pat. No. 4,294,757) (prepared by acylation using acyl chlorides).

20 Specific examples of suitable analogues of maytansinol having modifications of other positions include:

(1) C-9-SH (U.S. Pat. No. 4,424,219) (prepared by the reaction of maytansinol with H₂S or P₂S₅);

(2) C-14-alkoxymethyl (demethoxy/CH₂OR) (U.S. Pat. No. 4,331,598);

25 (3) C-14-hydroxymethyl or acyloxymethyl (CH₂OH or CH₂OAc) (U.S. Pat. No. 4,450,254) (prepared from *Nocardia*);

(4) C-15-hydroxy/acyloxy (U.S. Pat. No. 4,364,866) (prepared by the conversion of maytansinol by *Streptomyces*);

(5) C-15-methoxy (U.S. Pat. Nos. 4,313,946 and 4,315,929) (isolated from *Trewia*

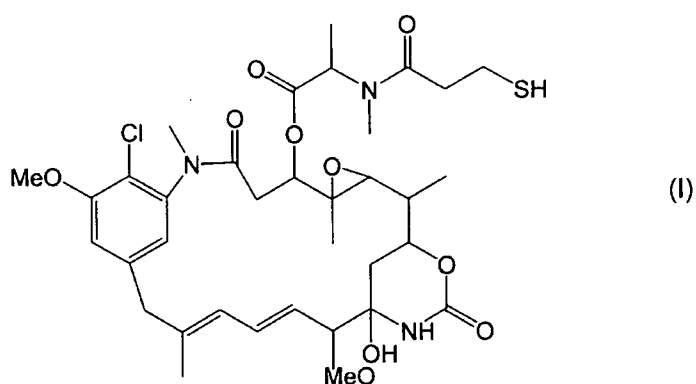
724

nudiflora);

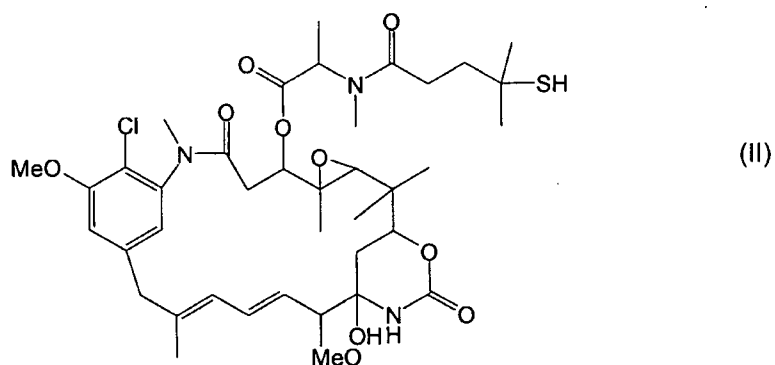
(6) C-18-*N*-demethyl (U.S. Pat. Nos. 4,362,663 and 4,322,348) (prepared by the demethylation of maytansinol by *Streptomyces*); and

(7) 4,5-deoxy (U.S. Pat. No 4,371,533) (prepared by the titanium trichloride/LAH reduction of maytansinol).

In a preferred embodiment, the cytotoxic conjugates of the present invention utilize the thiol-containing maytansinoid (DM1), formally termed *N*^{2'}-deacetyl-*N*^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine, as the cytotoxic agent. DM1 is represented by the following structural formula (I):



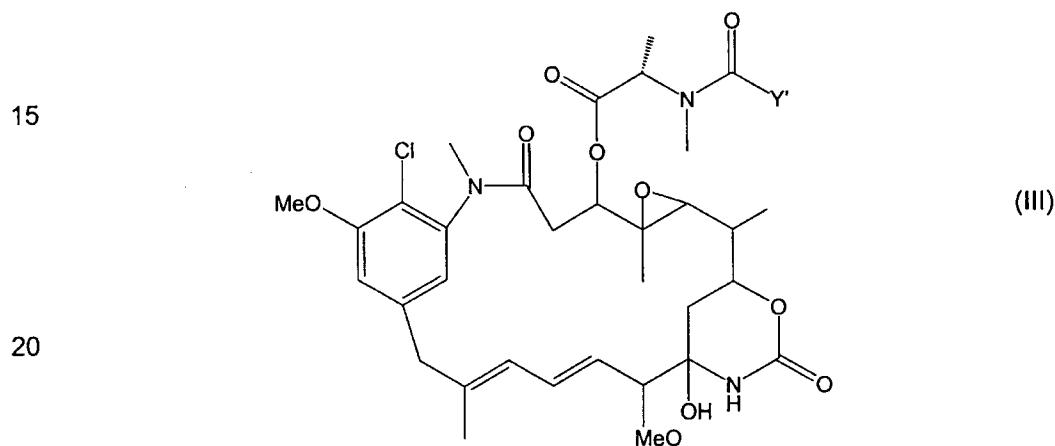
In another preferred embodiment, the cytotoxic conjugates of the present invention utilize the thiol-containing maytansinoid *N*^{2'}-deacetyl-*N*^{2'}-(4-methyl-4-mercapto-1-oxopentyl)-maytansine as the cytotoxic agent. DM4 is represented by the following structural formula (II):



In further embodiments of the invention, other maytansines, including thiol and

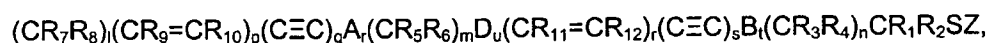
disulfide-containing maytansinoids bearing a mono or di-alkyl substitution on the carbon atom bearing the sulfur atom, may be used. These include a maytansinoid having, at C-3, C-14 hydroxymethyl, C-15 hydroxy, or C-20 desmethyl, an acylated amino acid side chain with an acyl group bearing a hindered sulfhydryl group, wherein the carbon atom of the acyl group bearing the thiol functionality has one or two substituents, said substituents being CH₃, C₂H₅, linear or branched alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and further wherein one of the substituents can be H, and wherein the acyl group has a linear chain length of at least three carbon atoms between the carbonyl functionality and the sulfur atom.

Such additional maytansines include compounds represented by formula (III):



wherein:

Y' represents



wherein:

R₁ and R₂ are each independently CH₃, C₂H₅, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and in addition R₂ can be H;

A, B, D are cycloalkyl or cycloalkenyl having 3 -10 carbon atoms, simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

$R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11},$ and R_{12} are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

$l, m, n, o, p, q, r, s,$ and t are each independently 0 or an integer of from 1 to 5, provided that at least two of l, m, n, o, p, q, r, s and t are not zero at any one time; and

Z is H, SR or -COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical.

Preferred embodiments of formula (III) include compounds of formula (III) wherein:

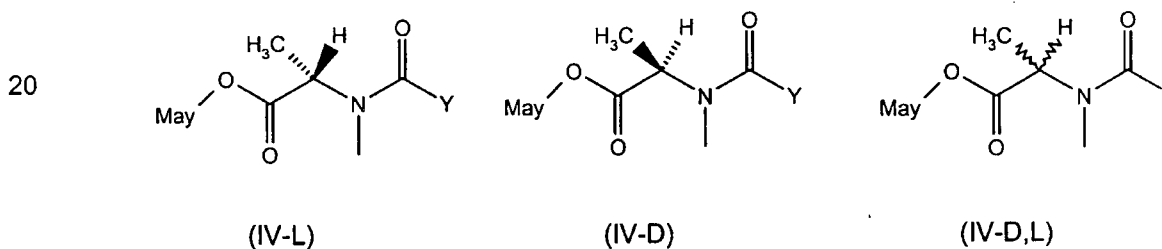
R_1 is methyl, R_2 is H and Z is H.

R_1 and R_2 are methyl and Z is H.

R_1 is methyl, R_2 is H, and Z is $-SCH_3$.

R_1 and R_2 are methyl, and Z is $-SCH_3$.

Such additional maytansines also include compounds represented by formula (IV-L), (IV-D), or (IV-D,L):



wherein:

Y represents $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

wherein:

97

R₁ and R₂ are each independently CH₃, C₂H₅, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and in addition R₂ can be H;

5 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R₈ are each independently H, CH₃, C₂H₅, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

10 l, m and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be 0;

Z is H, SR or -COR wherein R is linear or branched alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical; and

15 May represents a maytansinoid which bears the side chain at C-3, C-14 hydroxymethyl, C-15 hydroxy or C-20 desmethyl.

Preferred embodiments of formulas (IV-L), (IV-D) and (IV-D,L) include compounds of formulas (IV-L), (IV-D) and (IV-D,L) wherein:

R₁ is methyl, R₂ is H, R₅, R₆, R₇, and R₈ are each H, l and m are each 1, n is 0, and Z is H.

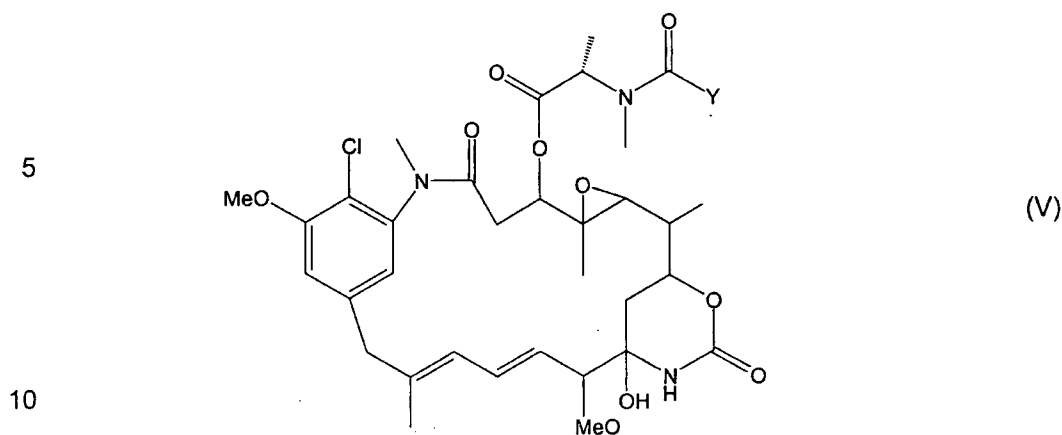
20 R₁ and R₂ are methyl, R₅, R₆, R₇, R₈ are each H, l and m are 1, n is 0, and Z is H.

R₁ is methyl, R₂ is H, R₅, R₆, R₇, and R₈ are each H, l and m are each 1, n is 0, and Z is -SCH₃.

25 R₁ and R₂ are methyl, R₅, R₆, R₇, R₈ are each H, l and m are 1, n is 0, and Z is -SCH₃.

Preferably the cytotoxic agent is represented by formula (IV-L).

Such additional maytansines also include compounds represented by formula (V):



wherein:

Y represents $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

15 wherein:

R_1 and R_2 are each independently CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and in addition R_2 can be H;

20 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 and R_8 are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

25 l , m and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be 0; and

Z is H, SR or -COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical.

Preferred embodiments of formula (V) include compounds of formula (V) wherein:

30 R_1 is methyl, R_2 is H, R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each H; l and m are each 1; n is

0; and Z is H.

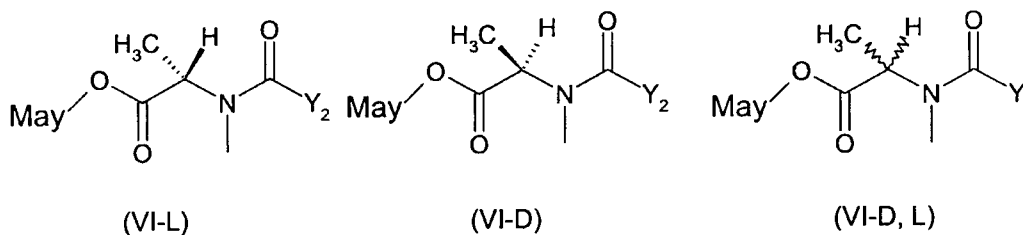
R_1 and R_2 are methyl; R_5 , R_6 , R_7 , R_8 are each H, l and m are 1; n is 0; and Z is H.

R_1 is methyl, R_2 is H, R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each H, l and m are each 1, n is 0,
5 and Z is $-\text{SCH}_3$.

R_1 and R_2 are methyl, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 are each H, l and m are 1, n is 0, and Z is $-\text{SCH}_3$.

Such additional maytansines further include compounds represented by formula (VI-L), (VI-D), or (VI-D,L):

10



15

wherein:

Y_2 represents $(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$,

wherein:

R_1 and R_2 are each independently CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from
20 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and in addition R_2 can be H;

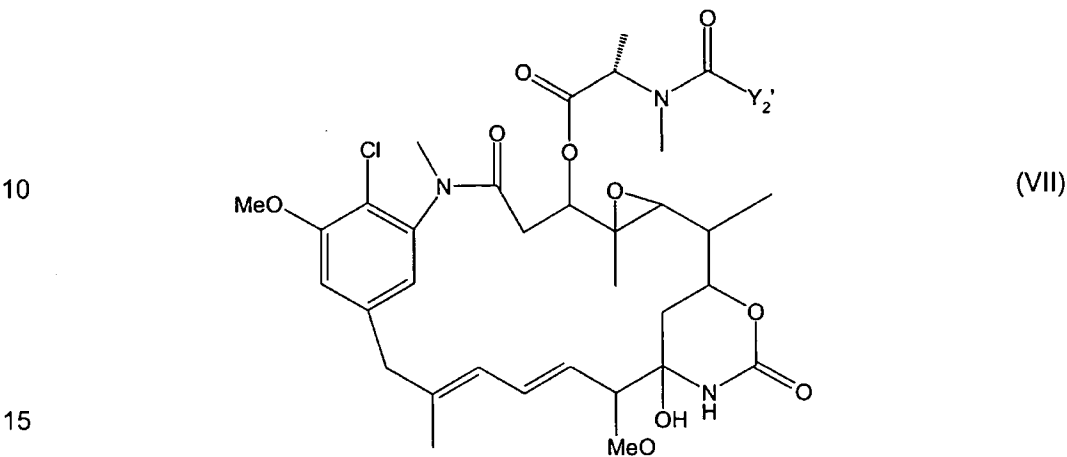
R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 and R_8 are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear cyclic
25 alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

l, m and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be 0;

Z₂ is SR or COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical; and

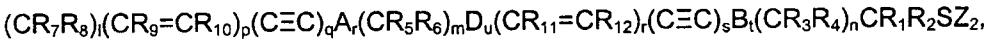
May is a maytansinoid.

5 Such additional maytansines also include compounds represented by formula (VII):



wherein:

Y₂' represents



20 wherein:

R₁ and R₂ are each independently CH₃, C₂H₅, linear branched or alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and in addition R₂ can be H;

25 A, B, and D each independently is cycloalkyl or cycloalkenyl having 3 to 10 carbon atoms, simple or substituted aryl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, and R₁₂ are each independently H, CH₃, C₂H₅, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl

or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

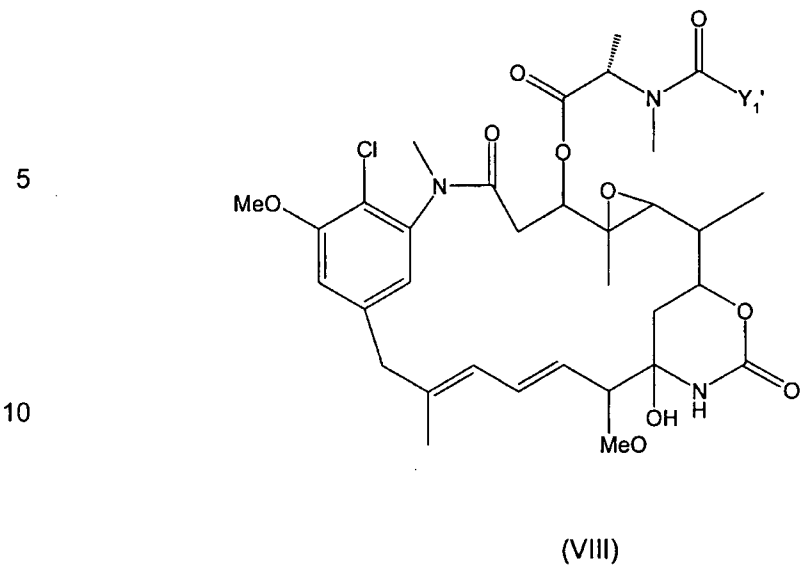
l, m, n, o, p, q, r, s, and t are each independently 0 or an integer of from 1 to 5, provided that at least two of l, m, n, o, p, q, r, s and t are not zero at any one time; and

- 5 Z₂ is SR or -COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 - 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical.

Preferred embodiments of formula (VII) include compounds of formula (VII) wherein: R₁ is methyl, R₂ is H.

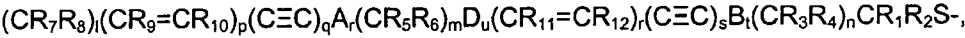
- 10 The above-mentioned maytansinoids can be conjugated to anti-EphA antibody 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 or a homologue or fragment thereof, wherein the antibody is linked to the maytansinoid using the thiol or disulfide functionality that is present on the acyl group of an acylated amino acid side chain found at C-3, C-14 hydroxymethyl, C-15 hydroxy or C-20 desmethyl of the
- 15 maytansinoid, and wherein the acyl group of the acylated amino acid side chain has its thiol or disulfide functionality located at a carbon atom that has one or two substituents, said substituents being CH₃, C₂H₅, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and in addition
- 20 one of the substituents can be H, and wherein the acyl group has a linear chain length of at least three carbon atoms between the carbonyl functionality and the sulfur atom.

A preferred conjugate of the present invention is the one that comprises the anti-EphA antibody 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 or a homologue or fragment thereof, conjugated to a maytansinoid of formula (VIII):



15 wherein:

Y_1' represents



wherein:

20 A, B, and D, each independently is cycloalkyl or cycloalkenyl having 3 -10 carbon atoms, simple or substituted aryl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

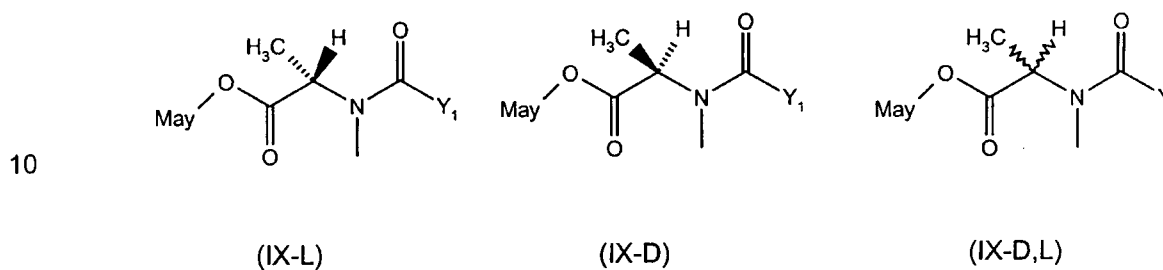
25 $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11},$ and R_{12} are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical; and

$l, m, n, o, p, q, r, s,$ and t are each independently 0 or an integer of from 1 to 5, provided that at least two of l, m, n, o, p, q, r, s and t are non-zero at any one time.

Preferably, R_1 is methyl, R_2 is H, or R_1 and R_2 are methyl.

An even more preferred conjugate of the present invention is the one that comprises the anti-EphA antibody 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 or a homologue or fragment thereof, conjugated to a maytansinoid of formula (IX-L), (IX-D),

5 or (IX-D,L):



wherein:

15 Y_1 represents $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

wherein:

R_1 and R_2 are each independently CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical,

20 and in addition R_2 can be H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 and R_8 are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical;

25 l , m and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be 0; and

May represents a maytansinol which bears the side chain at C-3, C-14 hydroxymethyl, C-15 hydroxy or C-20 desmethyl.

Preferred embodiments of formulas (IX-L), (IX-D) and (IX-D,L) include compounds of formulas (IX-L), (IX-D) and (IX-D,L) wherein:

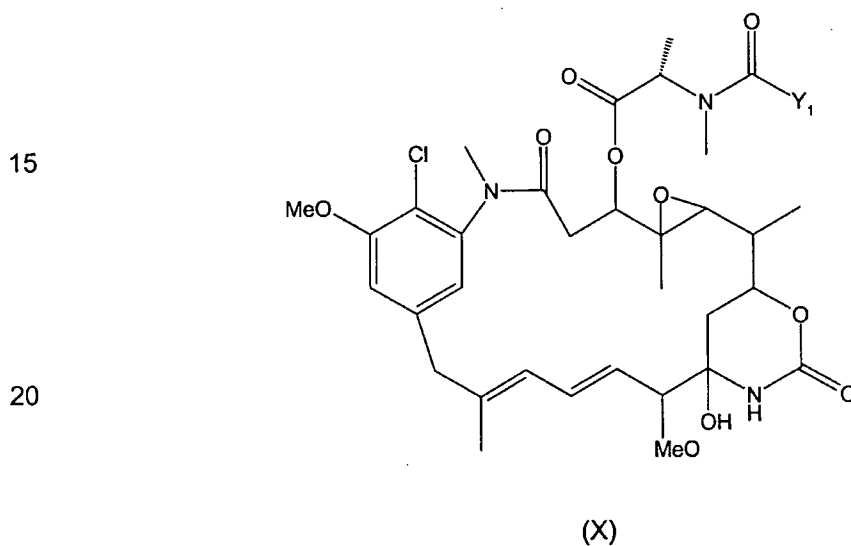
5 R_1 is methyl, R_2 is H, or R_1 and R_2 are methyl,

R_1 is methyl, R_2 is H, R_5 , R_6 , R_7 and R_8 are each H; l and m are each 1; n is 0,

R_1 and R_2 are methyl; R_5 , R_6 , R_7 and R_8 are each H; l and m are 1; n is 0.

Preferably the cytotoxic agent is represented by formula (IX-L).

10 A further preferred conjugate of the present invention is the one that comprises the anti-EphA antibody 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 or a homologue or fragment thereof, conjugated to a maytansinoid of formula (X):



25 wherein the substituents are as defined for formula (IX) above.

Especially preferred are any of the above-described compounds, wherein R_1 is H, R_2 is methyl, R_5 , R_6 , R_7 and R_8 are each H, l and m are each 1, and n is 0.

Further especially preferred are any of the above-described compounds, wherein R_1 and R_2 are methyl, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 are each H, I and m are 1, and n is 0

Further, the *L*-aminoacyl stereoisomer is preferred.

- Each of the maytansinoids taught in pending U.S. patent application number 10/849,136, filed May 20, 2004, may also be used in the cytotoxic conjugate of the present invention. The entire disclosure of U.S. patent application number 10/849,136 is incorporated herein by reference.

Disulfide-containing linking groups

- In order to link the maytansinoid to a cell binding agent, such as the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody, the maytansinoid comprises a linking moiety. The linking moiety contains a chemical bond that allows for the release of fully active maytansinoids at a particular site. Suitable chemical bonds are well known in the art and include disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds and esterase labile bonds. Preferred are disulfide bonds.

- The linking moiety also comprises a reactive chemical group. In a preferred embodiment, the reactive chemical group can be covalently bound to the maytansinoid via a disulfide bond linking moiety.

Particularly preferred reactive chemical groups are *N*-succinimidyl esters and *N*-sulfosuccinimidyl esters.

- Particularly preferred maytansinoids comprising a linking moiety that contains a reactive chemical group are C-3 esters of maytansinol and its analogs where the linking moiety contains a disulfide bond and the chemical reactive group comprises a *N*-succinimidyl or *N*-sulfosuccinimidyl ester.

- Many positions on maytansinoids can serve as the position to chemically link the linking moiety. For example, the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hydroxymethyl, the C-15 position modified with hydroxy and the C-20 position having a hydroxy group are all expected to be useful. However the C-3 position is preferred and the C-3 position of maytansinol is especially preferred.

- While the synthesis of esters of maytansinol having a linking moiety is described in terms of disulfide bond-containing linking moieties, one of skill in the art will understand

that linking moieties with other chemical bonds (as described above) can also be used with the present invention, as can other maytansinoids. Specific examples of other chemical bonds include acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds and esterase labile bonds. The disclosure of U.S. Patent No. 5,208,020, incorporated
5 herein, teaches the production of maytansinoids bearing such bonds.

The synthesis of maytansinoids and maytansinoid derivatives having a disulfide moiety that bears a reactive group is described in U.S. Patent Nos. 6, 441,163 and 6,333,410, and U.S. Application No. 10/161,651, each of which is herein incorporated by reference.

10 The reactive group-containing maytansinoids, such as DM1, are reacted with an antibody, such as the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody, to produce cytotoxic conjugates. These conjugates may be purified by HPLC or by gel-filtration.

Several excellent schemes for producing such antibody-maytansinoid conjugates are
15 provided in U.S. Patent No. 6,333,410, and U.S. Application Nos. 09/867,598, 10/161,651 and 10/024,290, each of which is incorporated herein in its entirety.

In general, a solution of an antibody in aqueous buffer may be incubated with a molar excess of maytansinoids having a disulfide moiety that bears a reactive group. The reaction mixture can be quenched by addition of excess amine (such as ethanolamine,
20 taurine, etc.). The maytansinoid-antibody conjugate may then be purified by gel-filtration.

The number of maytansinoid molecules bound per antibody molecule can be determined by measuring spectrophotometrically the ratio of the absorbance at 252 nm and 280 nm. An average of 1-10 maytansinoid molecules/antibody molecule is
25 preferred.

Conjugates of antibodies with maytansinoid drugs can be evaluated for their ability to suppress proliferation of various unwanted cell lines *in vitro*. For example, cell lines such as the human epidermoid carcinoma line A-431, the human small cell lung cancer cell line SW2, the human breast tumor line SKBR3 and the Burkitt's lymphoma
30 cell line Namalwa can easily be used for the assessment of cytotoxicity of these compounds. Cells to be evaluated can be exposed to the compounds for 24 hours and

the surviving fractions of cells measured in direct assays by known methods. IC₅₀ values can then be calculated from the results of the assays.

PEG-containing linking groups

Maytansinoids may also be linked to cell binding agents using PEG linking groups, as set forth in U.S. Application No. 10/024,290. These PEG linking groups are soluble both in water and in non-aqueous solvents, and can be used to join one or more cytotoxic agents to a cell binding agent. Exemplary PEG linking groups include hetero-bifunctional PEG linkers that bind to cytotoxic agents and cell binding agents at opposite ends of the linkers through a functional sulfhydryl or disulfide group at one end, and an active ester at the other end.

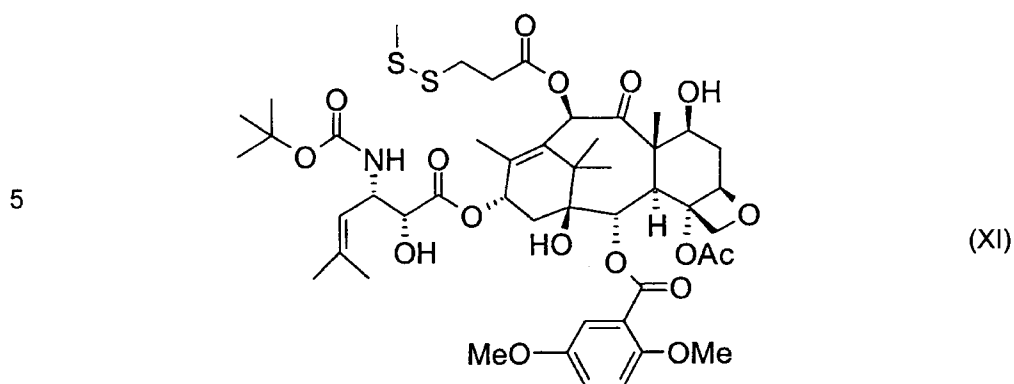
As a general example of the synthesis of a cytotoxic conjugate using a PEG linking group, reference is again made to U.S. Application No. 10/024,290 for specific details. Synthesis begins with the reaction of one or more cytotoxic agents bearing a reactive PEG moiety with a cell-binding agent, resulting in displacement of the terminal active ester of each reactive PEG moiety by an amino acid residue of the cell binding agent, such as the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody, to yield a cytotoxic conjugate comprising one or more cytotoxic agents covalently bonded to a cell binding agent through a PEG linking group.

Taxanes

The cytotoxic agent used in the cytotoxic conjugates according to the present invention may also be a taxane or derivative thereof.

Taxanes are a family of compounds that includes paclitaxel (taxol), a cytotoxic natural product, and docetaxel (Taxotere), a semi-synthetic derivative, two compounds that are widely used in the treatment of cancer. Taxanes are mitotic-spindle poisons that inhibit the depolymerization of tubulin, resulting in cell death. While docetaxel and paclitaxel are useful agents in the treatment of cancer, their antitumor activity is limited because of their non-specific toxicity towards normal cells. Further, compounds like paclitaxel and docetaxel themselves are not sufficiently potent to be used in conjugates of cell binding agents.

A preferred taxane for use in the preparation of cytotoxic conjugates is the taxane of formula (XI):



10

Methods for synthesizing taxanes that may be used in the cytotoxic conjugates of the present invention, along with methods for conjugating the taxanes to a cell binding agent, such as the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody, are described in detail in U.S. Patent Nos. 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738 and 15 6,436,931, and in U.S. Application Nos. 10/024,290, 10/144,042, 10/207,814, 10/210,112 and 10/369,563.

Tomaymycin derivatives

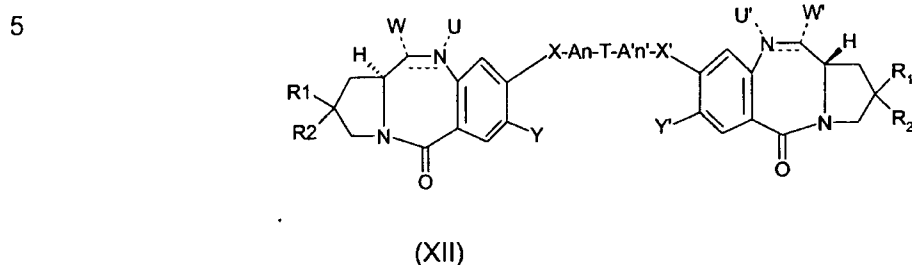
The cytotoxic according to the present invention may also a tomaymycin derivative. Tomaymycin derivatives are pyrrolo[1,4]benzodiazepines (PBDs), a known class of 20 compounds exerting their biological properties by covalently binding to the N2 of guanine in the minor groove of DNA. PBDs include a number of minor groove binders such as anthramycin, neothramycin and DC-81.

Novel tomaymycin derivatives that retain high cytotoxicity and that can be effectively linked to cell binding agents are described in the International Application No. 25 PCT/IB2007/000142, whose content is herein incorporated by reference. The cell binding agent-tomaymycin derivative complexes permit the full measure of the cytotoxic action of the tomaymycin derivatives to be applied in a targeted fashion against unwanted cells only, therefore avoiding side effects due to damage to non-targeted healthy cells.

30 The cytotoxic agent according to the present invention comprises one or more tomaymycin derivatives, linked to a cell binding agent, such as the 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 or EphA2-N2 antibody, via a linking group. The linking group is part of a chemical moiety that is covalently bound to a tomaymycin derivative through

conventional methods. In a preferred embodiment, the chemical moiety can be covalently bound to the tomaymycin derivative via a disulfide bond.

The tomaymycin derivatives useful in the present invention have the formula (XII) shown below:



wherein

10 ---- represents an optional single bond;

----- represents either a single bond or a double bond ;

provided that when ----- represents a single bond, U and U', the same or different, independently represent H, and W and W', the same or different, are independently selected from the group consisting of OH, an ether such as -OR, an ester (e.g. an acetate), such as -OCOR, a carbonate such as -OCOOR, a carbamate such as -OCONRR', a cyclic carbamate, such that N10 and C11 are a part of the cycle, a urea such as -NRCONRR', a thiocarbamate such as -OCSNHR, a cyclic thiocarbamate such that N10 and C11 are a part of the cycle, -SH, a sulfide such as -SR, a sulphoxide such as -SOR, a sulfone such as -SOOR, a sulphonate such as -SO₃ -, a sulfonamide such as -NRSOOR, an amine such as -NRR', optionally cyclic amine such that N10 and C11 are a part of the cycle, a hydroxylamine derivative such as -NROR', an amide such as -NRCOR, an azido such as -N₃, a cyano, a halo, a trialkyl or triarylphosphonium, an aminoacid-derived group; Preferably W and W' are the same or different and are OH, Ome, Oet, NHCONH₂, SMe;

15

20

25 and when ----- represents a double bond, U and U' are absent and W and W' represent H;

• R1, R2, R1', R2' are the same or different and independently chosen from Halide or Alkyl optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Aryl, Het, S(O)_qR,

or R1 and R2 and R1' and R2' form together a double bond containing group =B and =B' respectively.

Preferably, R1 and R2 and R1' and R2' form together a double bond containing group =B and =B' respectively.

- 5 ▪ B and B' are the same or different and independently chosen from Alkenyl being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Aryl, Het, S(O)_qR or B and B' represent an oxygen atom.

Preferably, B=B'.

More preferably, B=B'= =CH₂ or =CH-CH₃,

- 10 ▪ X, X' are the same or different and independently chosen from one or more -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

Preferably, X=X'.

More preferably, X=X'=O.

- 15 ▪ A, A' are the same or different and independently chosen from Alkyl or Alkenyl optionally containing an oxygen, a nitrogen or a sulfur atom, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, Aryl, Het, Alkyl, Alkenyl.

Preferably, A=A'.

More preferably, A=A'=linear unsubstituted alkyl.

- Y, Y' are the same or different and independently chosen from H, OR;

- 20 Preferably, Y=Y'.

More preferably, Y=Y'=OAlkyl, more preferably OMethyl.

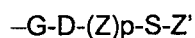
- 25 ▪ T is -NR-, -O-, -S(O)_q-, or a 4 to 10-membered aryl, cycloalkyl, heterocyclic or heteroaryl, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, and/or linker(s), or a branched Alkyl, optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR and/or linker(s), or a linear Alkyl substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR and/or linker(s).

Preferably, T is a 4 to 10-membered aryl or heteroaryl, more preferably phenyl or pyridyl, optionally substituted by one or more linker(s).

- Said linker comprises a linking group. Suitable linking groups are well known in the art and include thiol, sulfide, disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups and esterase labile groups. Preferred are disulfide groups and thioether groups.

- When the linking group is a thiol-, sulfide (or so-called thioether -S-) or disulfide (-S-S-) -containing group, the side chain carrying the thiol, the sulfide or disulfide group can be linear or branched, aromatic or heterocyclic. One of ordinary skill in the art can readily identify suitable side chains.

Preferably, said linker is of formula:



where

G is a single or double bond, -O-, -S- or -NR-;

- D is a single bond or -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

- where E and F are the same or different and are independently chosen from linear or branched -(OCH₂CH₂)_iAlkyl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl(OCH₂CH₂)_i-Alkyl-, -(OCH₂CH₂)_i-, -(OCH₂CH₂)_iCycloalkyl(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iHeterocyclic(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iAryl(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iHeteroaryl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_iAlkyl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_i-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_iCycloalkyl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl(OCH₂CH₂)_iHeterocyclic(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_iAryl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl(OCH₂CH₂)_iHeteroaryl(OCH₂CH₂)_j-, -Cycloalkyl-Alkyl-, -Alkyl-Cycloalkyl-, -Heterocyclic-Alkyl-, -Alkyl-Heterocyclic-, -Alkyl-Aryl-, -Aryl-Alkyl-, -Alkyl-Heteroaryl-, -Heteroaryl-Alkyl-;

where i and j, identical or different are integers and independently chosen from 0, 1 to 2000;

Z is linear or branched -Alkyl-;

p is 0 or 1;

Z' represents H, a thiol protecting group such as COR, R20 or SR20, wherein R20 represents H, methyl, Alkyl, optionally substituted Cycloalkyl, aryl, heteroaryl or heterocyclic, provided that when Z' is H, said compound is in equilibrium with the corresponding compound formed by intramolecular cyclisation resulting from addition of the thiol group -SH on the imine bond -NH= of one of the PBD moieties.

▪ n, n', equal or different are 0 or 1.

▪ q is 0, 1 or 2.

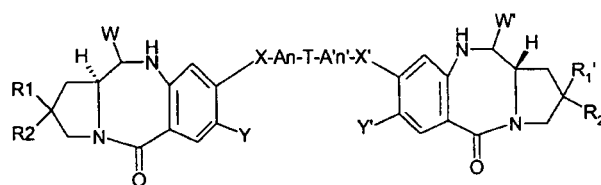
▪ R, R' are equal or different and independently chosen from H, Alkyl, Aryl, each being optionally substituted by Hal, CN, NRR', CF3, R, OR, S(O)qR, Aryl, Het;

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

The compounds of the general formula (XII) having geometrical and stereoisomers are also a part of the invention.

The N-10, C-11 double bond of tomaymycin derivatives of formula (XII) is known to be readily convertible in a reversible manner to corresponding imine adducts in the presence of water, an alcohol, a thiol, a primary or secondary amine, urea and other nucleophiles. This process is reversible and can easily regenerate the corresponding tomaymycin derivatives in the presence of a dehydrating agent, in a non-protic organic solvent, in vacuum or at high temperatures (Z. Tozuka, 1983, *J. Antibiotics*, **36**: 276).

Thus, reversible derivatives of tomaymycin derivatives of general formula (XIII) can also be used in the present invention:



(XIII)

where A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' are defined as in formula (XII) and W, W' are the same or different and are selected from the group consisting of OH, an

ether such as -OR, an ester (e.g. an acetate), such as -OCOR, -COOR, a carbonate such as -OCOOR, a carbamate such as -OCONRR', a cyclic carbamate, such that N10 and C11 are a part of the cycle, a urea such as -NRCONRR', a thiocarbamate such as -OCSNHR, a cyclic thiocarbamate such that N10 and C11 are a part of the cycle, -SH, a sulfide such as -SR, a sulfoxide such as -SOR, a sulfone such as -SOOR, a sulphonate such as -SO₃-, a sulfonamide such as -NRSOOR, an amine such as -NRR', optionally cyclic amine such that N10 and C11 are a part of the cycle, a hydroxylamine derivative such as -NROR', an amide such as -NRCOR, -NRCONRR', an azido such as -N₃, a cyano, a halo, a trialkyl or triarylphosphonium, an aminoacid-derived group. Preferably, W and W' are the same or different and are OH, Ome, Oet, NHCONH₂, SMe.

Compounds of formula (XIII) may thus be considered as solvates, including water when the solvent is water; these solvates can be particularly useful.

In a preferred embodiment, the tomaymycin derivatives of the invention are selected from the group consisting in:

- 8,8'-[1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[5-methoxy-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[1,5-pentanediybis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[1,4-butanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[3-methyl-1,5-pentanediybis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[2,6-pyridinediybis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropoxy)-2,6-pyridinediybis-(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

- 8,8'-[5-(3-aminopropoxy)-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 5 • 8,8'-[5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[5-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)propoxy]-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 10 • 8,8'-[5-acetylthiomethyl-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- bis-{2-[(S)-2-methylene-7-methoxy-5-oxo-1,3,,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester
- 15 • 8,8'-[3-(2-acetylthioethyl)-1,5-pentanediybis(oxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 20 • 8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-
- 25 5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

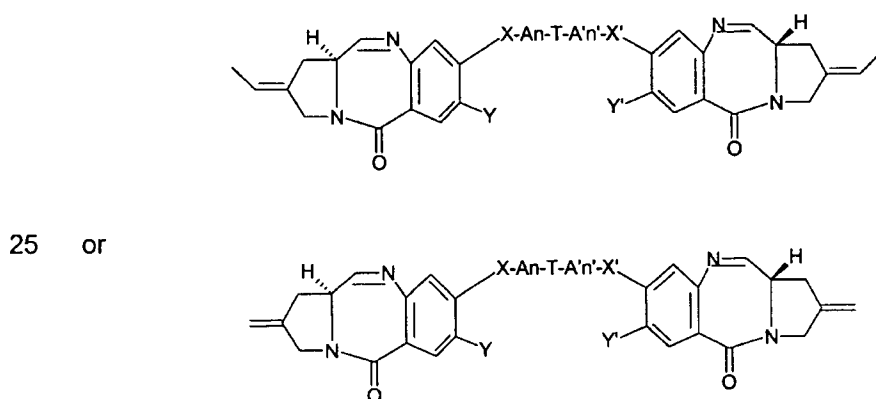
- 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-methyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 5 • 8,8'-[(1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one]
- 10 • 8,8'-[(4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 15 • 8,8'-[(1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(4-(2-[2-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 20 • 8,8'-[(1-(2-[2-(2-(2-[2-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 25 • 8,8'-[(1-(2-[2-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxyl]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

- 8,8'-[(4-(2-[2-[2-(2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 5 • 8,8'-[(1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 10 • 8,8'-[(4-(3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(1-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 15

as well as the corresponding mercapto derivatives, or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

20

Preferred compounds are those of formula:



where X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' are defined as above.

The compounds of formula (XII) may be prepared in a number of ways well known to those skilled in the art. The compounds can be synthesized, for example, by application or adaptation of the methods described below, or variations thereon as appreciated by the skilled artisan. The appropriate modifications and substitutions will be readily apparent and well known or readily obtainable from the scientific literature to those skilled in the art. In particular, such methods can be found in R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Methods for synthesizing the tomaymycin derivatives which may be used in the invention are described in the International Application No. PCT/IB2007/000142. Compounds of the present invention may be prepared by a variety of synthetic routes. The reagents and starting materials are commercially available, or readily synthesized by well-known techniques by one of ordinary skill in the arts (see, for example, WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, FR1516743, M. Mori *et al.*, 1986, *Tetrahedron*, **42**: 3793-3806).

The conjugate molecules of the invention may be formed using any techniques. The tomaymycin derivatives of the invention may be linked to an antibody or other cell binding agent via an acid labile linker, or by a photolabile linker. The derivatives can be condensed with a peptide having a suitable sequence and subsequently linked to a cell binding agent to produce a peptidase labile linker. The conjugates can be prepared to contain a primary hydroxyl group, which can be succinylated and linked to a cell binding agent to produce a conjugate that can be cleaved by intracellular esterases to liberate free derivative. Preferably, the derivatives are synthesized to contain a free or protected thiol group, and then one or more disulfide or thiol-containing derivatives are each covalently linked to the cell binding agent via a disulfide bond or a thioether link.

Numerous methods of conjugation are taught in USP 5,416,064 and USP 5,475,092. The tomaymycin derivatives can be modified to yield a free amino group and then linked to an antibody or other cell binding agent via an acid labile linker or a photolabile linker. The tomaymycin derivatives with a free amino or carboxyl group can be condensed with a peptide and subsequently linked to a cell binding agent to produce a peptidase labile linker. The tomaymycin derivatives with a free hydroxyl group on the linker can be succinylated and linked to a cell binding agent to produce a conjugate that can be cleaved by intracellular esterases to liberate free drug. Most preferably, the

tomaymycin derivatives are treated to create a free or protected thiol group, and then the disulfide- or thiol containing tomaymycin dimers are linked to the cell binding agent via disulfide bonds.

Preferably, monoclonal antibody- or cell binding agent-tomaymycin derivative
5 conjugates are those that are joined via a disulfide bond, as discussed above, that are capable of delivering tomaymycin derivatives. Such cell binding conjugates are prepared by known methods such as by modifying monoclonal antibodies with succinimidyl pyridyl-dithiopropionate (SPDP) (Carlsson *et al.*, 1978, *Biochem. J.*, **173**: 723-737). The resulting thiopyridyl group is then displaced by treatment with thiol-
10 containing tomaymycin derivatives to produce disulfide linked conjugates. Alternatively, in the case of the arylthio- tomaymycin derivatives, the formation of the cell binding conjugate is effected by direct displacement of the aryl-thiol of the tomaymycin derivative by sulfhydryl groups previously introduced into antibody molecules. Conjugates containing 1 to 10 tomaymycin derivative drugs linked via a disulfide bridge
15 are readily prepared by either method.

More specifically, a solution of the dithio-nitropyridyl modified antibody at a concentration of 2.5 mg/ml in 0.05 M potassium phosphate buffer, at pH 7.5 containing 2 mM EDTA is treated with the thiol-containing tomaymycin derivative (1.3 molar eq./dithiopyridyl group). The release of thio-nitropyridine from the modified antibody is
20 monitored spectrophotometrically at 325 nm and is complete in about 16 hours. The antibody-tomaymycin derivative conjugate is purified and freed of unreacted drug and other low molecular weight material by gel filtration through a column of Sephadex G-25 or Sephacryl S300. The number of tomaymycin derivative moieties bound per antibody molecule can be determined by measuring the ratio of the absorbance at 230
25 nm and 275 nm. An average of 1-10 tomaymycin derivative molecules/antibody molecule can be linked via disulfide bonds by this method.

The effect of conjugation on binding affinity towards the antigen-expressing cells can be determined using the methods previously described by Liu *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 8618-8623. Cytotoxicity of the tomaymycin derivatives and their
30 antibody conjugates to cell lines can be measured by back-extrapolation of cell proliferation curves as described in Goldmacher *et al.*, 1985, *J. Immunol.*, **135**: 3648-3651. Cytotoxicity of these compounds to adherent cell lines can be determined by clonogenic assays as described in Goldmacher *et al.*, 1986, *J. Cell Biol.*, **102**: 1312-1319.

Leptomycin derivatives

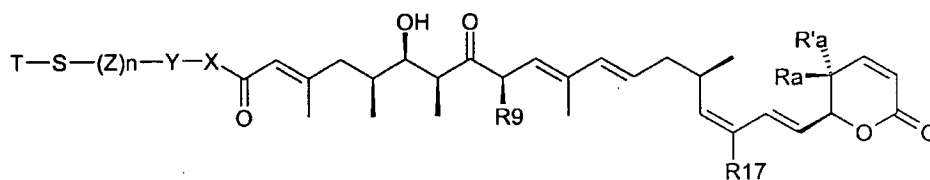
The cytotoxic according to the present invention may also a leptomycin derivative.

According to the present invention, "leptomycin derivatives" refer to members of the leptomycin family as defined in Kalesse *et al.* (2002, *Synthesis* 8: 981-1003), and

- 5 includes: leptomycins, such as leptomycin A and leptomycin B, callistatins, ratjadones such as ratjadone A and ratjadone B, anguinomycins such as anguinomycin A, B, C, D, kasusamycins, leptolstatin, leptofuranins, such as leptofuranin A, B, C, D. Derivatives of leptomycin A and B are preferred.

More specifically, the derivatives of the invention are of formula (I):

10



(I)

15 wherein

Ra and Ra' are H or -Alk; preferably Ra is -Alk, preferably methyl and Ra' is H;

R17 is alkyl optionally substituted by OR, CN, NRR', perfluoroalkyl; preferably, R17 is alkyl, more preferably methyl or ethyl;

20 R9 is alkyl optionally substituted by OR, CN, NRR', perfluoroalkyl; preferably, R9 is alkyl, more preferably methyl;

X is -O- or -NR-; preferably, X is -NR-;

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

preferably, when X is -O-, Y is -U-, -NR-U-, -U-NR-CO-;

25 where U is chosen from linear or branched -Alk-, -Alk(OCH₂CH₂)_m-, -(OCH₂CH₂)_m-Alk-, -Alk(OCH₂CH₂)_m-Alk-, -(OCH₂CH₂)_m-, -Cycloalkyl-, -Heterocyclic-, -Cycloalkyl-Alk-, -Alk-Cycloalkyl-, -Heterocyclic-Alk-, -Alk-Heterocyclic-;

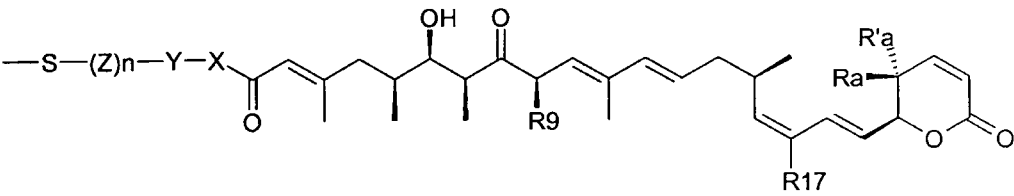
where m is an integer chosen from 1 to 2000;

preferably, U is linear or branched -Alk-,

Z is -Alk-;

n is 0 or 1; preferably n is 0;

- 5 T represents H, a thiol protecting group such as Ac, R₁ or SR₁, wherein R₁ represents H, methyl, Alk, Cycloalkyl, optionally substituted aryl or heterocyclic, or T represents



10

where:

R_a, R_{a'}, R₁₇, R₉, X, Y, Z, n are defined as above;

preferably, T is H or SR₁, wherein R₁ represents Alk, more preferably methyl;

R, R' identical or different are H or alkyl;

- 15 Alk represents a linear or branched alkyl; preferably Alk represents $-(CH_{2-q}(CH_3)_q)_p-$ where p represents an integer from 1 to 10; and q represents an integer from 0 to 2; preferably, Alk represents $-(CH_2)-$ ou $-C(CH_3)_2-$.

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers,

- 20 racemates, diastereomers or enantiomers.

Preferred compounds may be chosen from:

- (2-Methylsulfanyl-ethyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-Hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid

- Bis-[(2-mercaptoethyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid]
- 5 • (2-Mercapto-ethyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid
- (2-Methyldisulfanyl-ethyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid
- 10 • (2-Methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid
- (2-Mercapto-2-methyl-propyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid
- 15

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

- In order to link the derivative to a cell-binding agent, the derivative must include a moiety (linking group) that allows the derivatives to be linked to a cell binding agent via a linkage such as a disulfide bond, a sulfide (or called herein thioether) bond, an acid-labile group, a photo-labile group, a peptidase-labile group, or an esterase-labile group. The derivatives are prepared so that they contain a moiety necessary to link the leptomycin derivative to a cell binding agent via, for example, a disulfide bond, a thioether bond, an acid-labile group, a photo-labile group, a peptidase-labile group, or an esterase-labile group. In order to further enhance solubility in aqueous solutions, the linking group can contain a polyethylene glycol spacer. Preferably, a sulfide or disulfide linkage is used because the reducing environment of the targeted cell results in cleavage of the sulfide or disulfide and release of the derivatives with an associated increase in cytotoxicity.
- 20
- 25
- 30

Compounds of the present invention may be prepared by a variety of synthetic routes. The reagents and starting materials are commercially available, or readily synthesized by well-known techniques by one of ordinary skill in the art. Methods for synthesizing leptomycin derivatives that may be used in the cytotoxic conjugates of the present invention, along with methods for conjugating said leptomycin derivatives to cell binding agents such as antibodies, are described in detail in in European Patent Application No. 06290948.6, whose content is incorporated herein by reference.

CC-1065 Analogues

The cytotoxic agent used in the cytotoxic conjugates according to the present invention may also be CC-1065 or a derivative thereof.

CC-1065 is a potent anti-tumor antibiotic isolated from the culture broth of *Streptomyces zelensis*. CC-1065 is about 1000-fold more potent *in vitro* than are commonly used anti-cancer drugs, such as doxorubicin, methotrexate and vincristine (B.K. Bhuyan *et al.*, 1982, *Cancer Res.*, **42**, 3532-3537). CC-1065 and its analogs are disclosed in U.S. Patent Nos. 6,372,738, 6,340,701, 5,846,545 and 5,585,499.

The cytotoxic potency of CC-1065 has been correlated with its alkylating activity and its DNA-binding or DNA-intercalating activity. These two activities reside in separate parts of the molecule. Thus, the alkylating activity is contained in the cyclopropapyrroloindole (CPI) subunit and the DNA-binding activity resides in the two pyrroloindole subunits.

Although CC-1065 has certain attractive features as a cytotoxic agent, it has limitations in therapeutic use. Administration of CC-1065 to mice caused a delayed hepatotoxicity leading to mortality on day 50 after a single intravenous dose of 12.5 µg/kg (V. L. Reynolds *et al.*, 1986, *J. Antibiotics*, **XXIX**: 319-334). This has spurred efforts to develop analogs that do not cause delayed toxicity, and the synthesis of simpler analogs modeled on CC-1065 has been described (M.A. Warpehoski *et al.*, 1988, *J. Med. Chem.*, **31**: 590-603).

In another series of analogs, the CPI moiety was replaced by a cyclopropabenzindole (CBI) moiety (D.L. Boger *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.*, **55**: 5823-5833; D.L. Boger *et al.*, 1991, *BioOrg. Med. Chem. Lett.*, **1**: 115-120). These compounds maintain the high *in vitro* potency of the parental drug, without causing delayed toxicity in mice. Like CC-1065, these compounds are alkylating agents that bind to the minor groove of DNA in a covalent manner to cause cell death. However, clinical evaluation of the most

promising analogs, Adozelesin and Carzelesin, has led to disappointing results (B.F. Foster *et al.*, 1996, *Investigational New Drugs*, **13**: 321-326; I. Wolff *et al.*, 1996, *Clin. Cancer Res.*, **2**: 1717-1723). These drugs display poor therapeutic effects because of their high systemic toxicity.

- 5 The therapeutic efficacy of CC-1065 analogs can be greatly improved by changing the *in vivo* distribution through targeted delivery to the tumor site, resulting in lower toxicity to non-targeted tissues, and thus, lower systemic toxicity. In order to achieve this goal, conjugates of analogs and derivatives of CC-1065 with cell-binding agents that specifically target tumor cells have been described (US Patents; 5,475,092; 5,585,499; 10 5,846,545). These conjugates typically display high target-specific cytotoxicity *in vitro*, and exceptional anti-tumor activity in human tumor xenograft models in mice (R.V. J. Chari *et al.*, 1995, *Cancer Res.*, **55**: 4079-4084).

- Recently, prodrugs of CC-1065 analogs with enhanced solubility in aqueous medium have been described (European Patent Application No. 06290379.4). In these 15 prodrugs, the phenolic group of the alkylating portion of the molecule is protected with a functionality that renders the drug stable upon storage in acidic aqueous solution, and confers increased water solubility to the drug compared to an unprotected analog. The protecting group is readily cleaved *in vivo* at physiological pH to give the corresponding active drug. In the prodrugs described in EP 06290379.4, the phenolic 20 substituent is protected as a sulfonic acid containing phenyl carbamate which possesses a charge at physiological pH, and thus has enhanced water solubility. In order to further enhance water solubility, an optional polyethylene glycol spacer can be introduced into the linker between the indolyl subunit and the cleavable linkage such as a disulfide group. The introduction of this spacer does not alter the potency of the drug.
- 25 Methods for synthesizing CC-1065 analogs that may be used in the cytotoxic conjugates of the present invention, along with methods for conjugating the analogs to cell binding agents such as antibodies, are described in detail in EP 06290379.4 (whose content is incorporated herein by reference) and U.S. Patent Nos. 5,475,092, 5,846,545, 5,585,499, 6,534,660 and 6,586,618 and in U.S. Application Nos. 30 10/116,053 and 10/265,452.

Other Drugs

Drugs such as methotrexate, daunorubicin, doxorubicin, vincristine, vinblastine,

melphalan, mitomycin C, chlorambucil, calicheamicin, tubulysin and tubulysin analogs, duocarmycin and duocarmycin analogs, dolastatin and dolastatin analogs are also suitable for the preparation of conjugates of the present invention. The drug molecules can also be linked to the antibody molecules through an intermediary carrier molecule
5 such as serum albumin. Doxorubicin and Danorubicin compounds, as described, for example, in U.S. Patent No. 6,630,579, may also be useful cytotoxic agents.

Therapeutic Composition

The invention also relates to a therapeutic composition for the treatment of a hyperproliferative disorder in a mammal which comprises a therapeutically effective
10 amount of a compound of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment said pharmaceutical composition is for the treatment of cancer, including (but not limited to) the following: carcinoma, including that of the bladder, breast, colon, kidney, liver, lung, ovary, pancreas, stomach, cervix, thyroid and skin; including squamous cell carcinoma; hematopoietic tumors of lymphoid lineage,
15 including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Burkitt's lymphoma; hematopoietic tumors of myeloid lineage, including acute and chronic myelogenous leukemias and promyelocytic leukemia; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma; other tumors, including melanoma, seminoma, teratocarcinoma,
20 neuroblastoma and glioma; tumors of the central and peripheral nervous system, including astrocytoma, neuroblastoma, glioma, and schwannomas; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, and osteosarcoma; and other tumors, including melanoma, xeroderma pigmentosum, keratoactanthoma, seminoma, thyroid follicular cancer and teratocarcinoma, and other cancers yet to be
25 determined in which EphA is expressed predominantly. In a preferred embodiment, the pharmaceutical compositions of the invention are used for treatment of cancer of the lung, breast, colon, prostate, kidney, pancreas, ovary, cervix and lymphatic organs, osteosarcoma, synovial carcinoma, a sarcoma, head and neck, a glioma, gastric, liver or other carcinomas in which EphA is expressed. In particular, the cancer is a
30 metastatic cancer. In another embodiment, said pharmaceutical composition relates to other disorders such as, for example, autoimmune diseases, such as systemic lupus, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis; graft rejections, such as renal transplant rejection, liver transplant rejection, lung transplant rejection, cardiac transplant rejection, and bone marrow transplant rejection; graft versus host disease; viral

infections, such as mV infection, HIV infection, AIDS, etc.; and parasite infections, such as giardiasis, amoebiasis, schistosomiasis, and others as determined by one of ordinary skill in the art.

The instant invention provides pharmaceutical compositions comprising:

- 5
- an effective amount of an antibody, antibody fragment or antibody conjugate of the present invention, and
 - a pharmaceutically acceptable carrier, which may be inert or physiologically active.

As used herein, "pharmaceutically-acceptable carriers" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, and the like that are physiologically compatible. Examples of suitable carriers, diluents and/or excipients include one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol, and the like, as well as combination thereof. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, such as sugars, polyalcohols, or sodium chloride in the composition. In particular, relevant examples of suitable carrier include: (1) Dulbecco's phosphate buffered saline, pH ~ 7.4, containing or not containing about 1 mg/ml to 25 mg/ml human serum albumin, (2) 0.9% saline (0.9% w/v sodium chloride (NaCl)), and (3) 5% (w/v) dextrose; and may also contain an antioxidant such as tryptamine and a stabilizing agent such as Tween 20.

20 The compositions herein may also contain a further therapeutic agent, as necessary for the particular disorder being treated. Preferably, the antibody, antibody fragment or antibody conjugate of the present invention, and the supplementary active compound will have complementary activities, that do not adversely affect each other. In a preferred embodiment, the further therapeutic agent is an antagonist of fibroblast-growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), tissue factor (TF), protein C, 25 protein S, platelet-derived growth factor (PDGF), or HER2 receptor.

The compositions of the invention may be in a variety of forms. These include for example liquid, semi-solid, and solid dosage forms, but the preferred form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. Typical preferred 30 compositions are in the form of injectable or infusible solutions. The preferred mode of administration is parenteral (e.g. intravenous, intramuscular, intraperitoneal, subcutaneous). In a preferred embodiment, the compositions of the invention are

administered intravenously as a bolus or by continuous infusion over a period of time. In another preferred embodiment, they are injected by intramuscular, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intratumoral, peritumoral, intralesional, or perilesional routes, to exert local as well as systemic therapeutic effects.

- 5 Sterile compositions for parenteral administration can be prepared by incorporating the antibody, antibody fragment or antibody conjugate of the present invention in the required amount in the appropriate solvent, followed by sterilization by microfiltration. As solvent or vehicle, there may be used water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol, and the like, as well as a combination thereof. In many
10 cases, it will be preferable to include isotonic agents, such as sugars, polyalcohols, or sodium chloride in the composition. These compositions may also contain adjuvants, in particular wetting, isotonizing, emulsifying, dispersing and stabilizing agents. Sterile compositions for parenteral administration may also be prepared in the form of sterile solid compositions which may be dissolved at the time of use in sterile water or any
15 other injectable sterile medium.

The antibody, antibody fragment or antibody conjugate of the present invention may also be orally administered. As solid compositions for oral administration, tablets, pills, powders (gelatine capsules, sachets) or granules may be used. In these compositions, the active ingredient according to the invention is mixed with one or more inert diluents,
20 such as starch, cellulose, sucrose, lactose or silica, under an argon stream. These compositions may also comprise substances other than diluents, for example one or more lubricants such as magnesium stearate or talc, a coloring, a coating (sugar-coated tablet) or a glaze.

As liquid compositions for oral administration, there may be used pharmaceutically
25 acceptable solutions, suspensions, emulsions, syrups and elixirs containing inert diluents such as water, ethanol, glycerol, vegetable oils or paraffin oil. These compositions may comprise substances other than diluents, for example wetting, sweetening, thickening, flavoring or stabilizing products.

The doses depend on the desired effect, the duration of the treatment and the route of
30 administration used; they are generally between 5 mg and 1000 mg per day orally for an adult with unit doses ranging from 1 mg to 250 mg of active substance. In general, the doctor will determine the appropriate dosage depending on the age, weight and any other factors specific to the subject to be treated.

Therapeutic methods of use

In another embodiment, the present invention provides a method for inhibiting the EphA2 receptor activity by administering an antibody which antagonizes said EphA2 receptor, to a patient in need thereof. Any of the type of antibodies, antibody fragments, or cytotoxic conjugates of the invention, may be used therapeutically. The invention thus includes the use of antagonistic anti-EphA2 antibodies, fragments thereof, or cytotoxic conjugates thereof as medicaments.

In a preferred embodiment, antibodies, antibody fragments, or cytotoxic conjugates of the invention are used for the treatment of a hyperproliferative disorder in a mammal. In a more preferred embodiment, one of the pharmaceutical compositions disclosed above, and which contains an antibody, antibody fragment, or cytotoxic conjugate of the invention, is used for the treatment of a hyperproliferative disorder in a mammal. In one embodiment, the disorder is a cancer. In particular, the cancer is a metastatic cancer. The antibodies, antibody fragments, and cytotoxic conjugates of the invention can also be used to treat the neovascularization of said cancer tumor.

Accordingly, the pharmaceutical compositions of the invention are useful in the treatment or prevention of a variety of cancers, including (but not limited to) the following: carcinoma, including that of the bladder, breast, colon, kidney, liver, lung, ovary, pancreas, stomach, cervix, thyroid and skin; including squamous cell carcinoma; hematopoietic tumors of lymphoid lineage, including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Burkitt's lymphoma; hematopoietic tumors of myeloid lineage, including acute and chronic myelogenous leukemias and promyelocytic leukemia; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma; other tumors, including melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma and glioma; tumors of the central and peripheral nervous system, including astrocytoma, neuroblastoma, glioma, and schwannomas; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, and osteosarcoma; and other tumors, including melanoma, xeroderma pigmentosum, keratoactanthoma, seminoma, thyroid follicular cancer and teratocarcinoma, and other cancers yet to be determined in which EphA is expressed predominantly. In a preferred embodiment, the cancer is a cancer of the lung, breast, colon, prostate, kidney, pancreas, uterus, ovary, cervix and lymphatic organs, osteosarcoma, synovial carcinoma, a sarcoma, head and neck, a glioma, gastric, liver or other carcinomas in which EphA is expressed. In another embodiment, said

pharmaceutical composition relates to other disorders such as, for example, autoimmune diseases, such as systemic lupus, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis; graft rejections, such as renal transplant rejection, liver transplant rejection, lung transplant rejection, cardiac transplant rejection, and bone marrow transplant rejection; graft versus host disease; viral infections, such as mV infection, HIV infection, AIDS, etc.; and parasite infections, such as giardiasis, amoebiasis, schistosomiasis, and others as determined by one of ordinary skill in the art.

Similarly, the present invention provides a method for inhibiting the growth of selected cell populations comprising contacting target cells, or tissue containing target cells, with an effective amount of an antibody, antibody fragment or antibody conjugate of the present invention, or an antibody, antibody fragment or a therapeutic agent comprising a cytotoxic conjugate, either alone or in combination with other cytotoxic or therapeutic agents.

The method for inhibiting the growth of selected cell populations can be practiced *in vitro*, *in vivo*, or *ex vivo*. As used herein, "inhibiting growth" means slowing the growth of a cell, decreasing cell viability, causing the death of a cell, lysing a cell and inducing cell death, whether over a short or long period of time.

Examples of *in vitro* uses include treatments of autologous bone marrow prior to their transplant into the same patient in order to kill diseased or malignant cells; treatments of bone marrow prior to its transplantation in order to kill competent T cells and prevent graft-versus-host-disease (GVHD); treatments of cell cultures in order to kill all cells except for desired variants that do not express the target antigen; or to kill variants that express undesired antigen.

The conditions of non-clinical *in vitro* use are readily determined by one of ordinary skill in the art.

Examples of clinical *ex vivo* use are to remove tumor cells or lymphoid cells from bone marrow prior to autologous transplantation in cancer treatment or in treatment of autoimmune disease, or to remove T cells and other lymphoid cells from autologous or allogeneic bone marrow or tissue prior to transplant in order to prevent graft versus host disease (GVHD). Treatment can be carried out as follows. Bone marrow is harvested from the patient or other individual and then incubated in medium containing serum to which is added the cytotoxic agent of the invention. Concentrations range

from about 10 μ M to 1 pM, for about 30 minutes to about 48 hours at about 37°C. The exact conditions of concentration and time of incubation, i.e., the dose, are readily determined by one of ordinary skill in the art. After incubation the bone marrow cells are washed with medium containing serum and returned to the patient by i.v. infusion according to known methods. In circumstances where the patient receives other treatment such as a course of ablative chemotherapy or total-body irradiation between the time of harvest of the marrow and reinfusion of the treated cells, the treated marrow cells are stored frozen in liquid nitrogen using standard medical equipment.

For clinical *in vivo* use, the antibody, the epitope-binding antibody fragment, or the cytotoxic conjugate of the invention will be supplied as solutions that are tested for sterility and for endotoxin levels. Examples of suitable protocols of cytotoxic conjugate administration are as follows. Conjugates are given weekly for 4 weeks as an i.v. bolus each week. Bolus doses are given in 50 to 100 ml of normal saline to which 5 to 10 ml of human serum albumin can be added. Dosages will be 10 μ g to 100 mg per administration, i.v. (range of 100 ng to 1 mg/kg per day). More preferably, dosages will range from 50 μ g to 30 mg. Most preferably, dosages will range from 1 mg to 20 mg. After four weeks of treatment, the patient can continue to receive treatment on a weekly basis. Specific clinical protocols with regard to route of administration, excipients, diluents, dosages, times, etc., can be determined by one of ordinary skill in the art as the clinical situation warrants.

Diagnostic

The antibodies or antibody fragments of the invention can also be used to detect EphA2 in a biological sample *in vitro* or *in vivo*. In one embodiment, the anti-EphA2 of the invention are used to determine the level of EphA2 in a tissue or in cells derived from the tissue. In a preferred embodiment, the tissue is a diseased tissue. In a preferred embodiment of the method, the tissue is a tumor or a biopsy thereof. In a preferred embodiment of the method, a tissue or a biopsy thereof is first excised from a patient, and the levels of EphA2 in the tissue or biopsy can then be determined in an immunoassay with the antibodies or antibody fragments of the invention. The tissue or biopsy thereof can be frozen or fixed. The same method can be used to determine other properties of the EphA2 protein, such as its level of tyrosine phosphorylation, cell surface levels, or cellular localization.

The above-described method can be used to diagnose a cancer in a subject known to

or suspected to have a cancer, wherein the level of EphA2 measured in said patient is compared with that of a normal reference subject or standard. Said method can then be used to determine whether a tumor expresses EphA2, which may suggest that the tumor will respond well to treatment with the antibodies, antibody fragments or antibody conjugates of the present invention. Preferably, the tumor is a cancer of the lung, breast, colon, prostate, kidney, pancreas, uterus, ovary, cervix and lymphatic organs, osteosarcoma, synovial carcinoma, a sarcoma, a glioma, gastric, liver, head and neck or other carcinomas in which EphA2 is expressed, and other cancers yet to be determined in which EphA2 is expressed predominantly.

- 10 The present invention further provides for monoclonal antibodies, humanized antibodies and epitope-binding fragments thereof that are further labeled for use in research or diagnostic applications. In preferred embodiments, the label is a radiolabel, a fluorophore, a chromophore, an imaging agent or a metal ion.

15 A method for diagnosis is also provided in which said labeled antibodies or epitope-binding fragments thereof are administered to a subject suspected of having a cancer, and the distribution of the label within the body of the subject is measured or monitored.

Kit

- 20 The present invention also includes kits, e.g., comprising a described cytotoxic conjugate and instructions for the use of the cytotoxic conjugate for killing of particular cell types. The instructions may include directions for using the cytotoxic conjugates *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo*.

25 Typically, the kit will have a compartment containing the cytotoxic conjugate. The cytotoxic conjugate may be in a lyophilized form, liquid form, or other form amendable to being included in a kit. The kit may also contain additional elements needed to practice the method described on the instructions in the kit, such a sterilized solution for reconstituting a lyophilized powder, additional agents for combining with the cytotoxic conjugate prior to administering to a patient, and tools that aid in administering the conjugate to a patient.

30

EXAMPLES

Example 1

Generation of Anti-EphA2 Monoclonal Antibody Hybridomas

Four BALB/c VAF mice were immunized with human EphA2-transfected 300-19 cells, a pre-B cell line derived from a BALB/c mouse. The stably transfected cells over-expressing the antigen were generated by transfection of 300-19 cells with the full-length human EphA2 cDNA and selected for the high expression clones by flow cytometry. Clone 4-6, a clone that highly expresses the human EphA2 receptor on the cell surface, was selected as immunogen for immunization of mice and for antibody screening of hybridomas. The EphA2-transfected cells were maintained in the selection medium containing G418 at a final concentration of 1mg/mL and were tested for the EphA2 expression regularly using a commercially available antibody.

The Balb/c mice were subcutaneously injected with approximately 5×10^6 EphA2-transfected 300-19 cells in 200 μ L of phosphate buffered saline (PBS) per mouse. The injections are performed every 2-3 weeks by standard immunization protocols used at ImmunoGen, Inc. Three days before cell fusion, the mice were intraperitoneally boosted one more time with the same dose of antigen, and sacrificed for the preparation of spleen cells according to the standard protocols for animal use procedures on the day of cell fusion.

The spleen was collected from the immunized mouse under sterilized surgical conditions and was ground between two sterile and frosted microscopic slides to obtain single cell suspension in RPMI-1640 medium. The splenocytes were pelleted and washed twice with RPMI-1640 medium before cell fusion. The spleen cells were mixed and fused with murine myeloma P3X63Ag8.653 cells (Kearney, J.F. *et al.*, 1979. *J. Immunol.*, 123: 1548-1550) using polyethylene glycol-1500 as fusogen (Roche 783 641). After cell fusion and centrifugation, the cells were suspended in complete RPMI-1640 medium (200 mL) containing hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) supplement (Sigma H-0262), and were plated into ten 96-well flat-bottomed plates (Corning-Costar 3596, 200 μ L of cell suspension per well). Following incubation at 37°C, 5% CO₂ for 5 days, 100 μ L of culture supernatant were removed from each well of the plates and replaced with an equal volume of complete RPMI-1640 medium containing hypoxanthine-thymidine (HT) supplement (Sigma H-0137). The incubation

(in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C) was continued until hybridoma clones had grown large enough colonies for antibody screening.

- On day 10 post-fusion when hybridoma cells had grown to half confluence in the wells and the supernatant had changed to an orange color, hybridoma supernatants were
- 5 sampled from the fusion plates for antibody screening by immunoassays. For preliminary screening, hybridoma supernatants were tested on EphA2-transfected cells vs. the parental 300-19 cells by flow cytometry. Cells were stained with 50 µL of hybridoma supernatant, followed by incubation with fluorescein-goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate, and analyzed by flow cytometry with Becton Dickinson FACSCalibur
- 10 or FACSArray machine. Hybridoma clones that analyzed positive for EphA2-transfected cells but negative for 300-19 cells were selected, expanded, frozen for storage, or subcloned by limiting dilutions to attain a monoclonal population. The specific antibodies secreted by hybridoma cells were isotyped using commercially available isotyping reagents (Roche 1493027).
- 15 Based on flow cytometric data, 29 hybridoma clones, which were specifically reactive with human EphA2-transfected cells but not with the parental 300-19 cells, were identified and selected from the immunization of mice with human EphA2 antigens.

Example 2

Binding Characterization of Anti-EphA2 Antibodies, 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 and EphA2-N2.

- The specific binding of each of the purified anti-EphA2 antibodies, 37.3D7, 37.1F5 and 53.2H11 was demonstrated by fluorescence activated cell sorting (FACS) using cells overexpressing human EphA2 and by using cells that do not express EphA2 (FIG. 1A, B, and C). Incubation of 37.3D7 antibody, or 37.1F5 antibody or 53.2H11 antibody (60
- 25 nM) in 100 µl cold FACS buffer (1mg/mL BSA in Dulbecco's MEM medium) was performed using cells overexpressing EphA2 and cells that do not express EphA2 in a round-bottom 96-well plate on ice. After 1 h, the cells were pelleted by centrifugation and washed with cold FACS buffer and then incubated with goat-anti-mouse IgG-antibody-FITC conjugate (100 µL, 6 µg/ml in FACS buffer) on ice for 1 h. The cells
- 30 were then pelleted, washed, and resuspended in 200 µL of 1% formaldehyde solution in PBS. The cell samples were then analyzed using a FACSCalibur reader (BD Biosciences).

A strong fluorescence shift was obtained upon incubation of human EphA2-overexpressing cells with 37.3D7, 37.1F5, or 53.2H11 antibody, in contrast to an insignificant shift upon incubation of cells that do not express human EphA2 with 37.3D7, 37.1F5, or 53.2H11 antibody (FIG. 1A, 1B, and 1C), which demonstrates that the 37.3D7, 37.1F5 and 53.2H11 antibodies were selectively binding to human EphA2. The positive control anti-EphA2 antibody, B2D6 (Upstate), showed a similar fluorescence shift upon incubations with cells that over-expressed human EphA2 (FIG. 1A). A strong fluorescence shift was also observed by FACS assay using 37.3D7 and human cancer cells, such as human breast cancer MDA-MB-231 cells, human colon cancer HT-29 cells, human pancreatic cancer BxPC3 cells, which shows that 37.3D7 antibody binds to human EphA2 on the surface of human tumor cells (FIG. 2). Similar data were also obtained using 37.1F5 and 53.2H11 antibodies with human tumor cell lines.

The apparent dissociation constants (K_D) for the binding of 37.3D7, 37.1F5 and 53.2H11 antibodies with human EphA2 on the surface of cells was determined by FACS assays of the binding of antibody at several concentrations to cells over expressing human EphA2 and human breast cancer MDA-MB-231 cells (FIG. 3). The values of K_D were estimated by non-linear regression for one-site binding. The binding curves yielded the apparent K_D values of 0.3 nM for 37.3D7 antibody, 0.07 nM for 37.1F5 antibody, and 0.14 nM for 53.2H11 antibody (FIG. 3A, 3C, and 3E).

Using the same experimental protocol, apparent K_D values of 0.18 nM and 0.05 nM were determined for EphA2-N1 and EphA2-N2, respectively.

A strong fluorescence shift was obtained upon incubation of cells that over-express murine EphA2 or rat EphA2 with 37.3D7 antibody or 53.2H11 antibody, in contrast to an insignificant shift upon incubation of cells that do not express murine EphA2 or rat EphA2 with 37.3D7 antibody or 53.2H11 antibody (FIG. 4), which demonstrates that the 37.3D7 and 53.2H11 antibodies bind also to murine EphA2 and rat EphA2. A strong fluorescence shift was also observed by FACS assay using 37.3D7 or 37.1F5 or 53.2H11 antibody with monkey (*Cercopithecus aethiops*) epithelial VERO cells (FIG. 5A), which shows that 37.3D7, 37.1F5 and 53.2H11 bind to monkey EphA2 as well. The apparent values of K_D were estimated by non-linear regression for one-site binding. The binding curves by FACS assay yielded K_D values of 0.15 nM for 37.3D7, 0.05 nM for 37.1F5, and 0.07 nM for 53.2H11 on monkey cells (FIG. 5B, 5D and 5F).

Example 3**Inhibition of Binding of EphrinA1 to MDA-MB-231 cells by 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 and EphA2-N2 Antibodies**

- The binding of ephrinA1 to MDA-MB-231 human breast cancer cells was inhibited by 37.3D7, 37.1F5 and 53.2H11 antibodies (FIG. 6). MDA-MB-231 cells were incubated with or without 5 µg/mL 37.3D7, 37.1F5, or 53.2H11 antibody for 2 h, followed by incubation with 100 ng/mL biotinylated ephrinA1 for 30 min at 4°C. The cells were then washed twice with serum-free medium to remove unbound biotin-ephrinA1, and were then lysed in 50 mM HEPES buffer, pH 7.4, containing 1% NP-40 and protease inhibitors. An Immulon-2HB ELISA plates were coated with a mouse monoclonal anti-EphA2 antibody (D7, Upstate) and were used to capture the EphA2 and bound biotin-ephrinA1 from the lysate. The binding of the coated antibody to the cytoplasmic C-terminal domain of the EphA2 did not interfere with the binding of biotin-ephrinA1 to the extracellular domain of EphA2. The wells were washed, incubated with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, washed again, and then developed with ABTS/H₂O₂ substrate. The inhibition of ephrinA1 binding to MDA-MB-231 cells by 5 µg/mL 37.3D7, 37.1F5, or 53.2H1 antibody was essentially quantitative; the signal was almost equivalent to that of the ELISA background signal obtained using a control lacking biotin-ephrinA1 (Fig 6A, 6B and 6C).
- Both EphA2-N1 and EphA2-N2 were capable of inhibiting binding of human ephrinA1 to MDA-MB-231 cells to the same extent as 37.3D7.

Example 4**Inhibition of EphA2 Mediated Cell Signaling by 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 and EphA2-N2 Antibodies**

- Treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells with 37.3D7, or 37.1F5 antibody completely inhibited intracellular EphA2 receptor signaling as shown by the inhibition of EphA2 receptor autophosphorylation (FIG. 7A) and by the inhibition of phosphorylation of its downstream effectors such as Akt (FIG. 7B). Treatment of pancreatic cancer CFPAC-1 cells with 37.3D7 antibody or 53.2H11 antibody completely inhibited intracellular EphA2 receptor signaling as shown by the inhibition of EphA2 receptor autophosphorylation (FIG. 7C).

In FIG. 7A and 7C, the mammary MDA-MB-231 cells or the pancreatic CFPAC-1 cells were grown in regular medium (as suggested from ATCC for each cell line) with serum for 3 days, then cultured in serum-free medium for 12-14 h. Serum-starved cells were treated with 15 µg/mL 37.3D7, 37.1F5, or 53.2H11 antibody or control IgG₁ for 2 h, followed by stimulation with 1 µg/mL ephrin A1-Fc (R&D) for 10 min at 37°C. The cells were then lysed in ice-cold lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors (50 mM HEPES buffer, pH 7.4, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2.5 mM EDTA, 10 µM leupeptin, 5 µM pepstatin, 1 mM PMSF, 5 mM benzamidine, and 5 µg/mL aprotinin). The lysates were immunoprecipitated with anti-EphA2 antibody D7 (Upstate) coupled to protein A/G beads. The immunoprecipitated EphA2 was resolved on an SDS-polyacrylamide gel and Western blotted with phosphotyrosine specific monoclonal antibody, 4G10 (Cell Signaling Technology). To evaluate the EphA2 protein level in each immunoprecipitated sample, the same membrane was re-blotted with anti-EphA2 antibody, D7 (Upstate). Use of a control antibody showed no inhibition of the ephrin A1-stimulated autophosphorylation of EphA2 receptor (Fig. 7C). In contrast, a complete inhibition of the ephrinA1-stimulated autophosphorylation of EphA2 receptor was obtained upon treatment with 37.3D7, 37.1F5, or 53.2H11 antibody (Fig. 7A and 7C). The ephrin A1-stimulated activation of the downstream effectors, such as Akt, was also inhibited in MDA-MB-231 cells by 37.3D7 or 37.1F5 antibody, as shown using Western blots of lysates and rabbit polyclonal anti-phospho-Ser⁴⁷³ Akt antibody (Cell Signaling Technology) (FIG. 7B).

The 37.3D7 and 53.2H11 antibodies by themselves did not stimulate EphA2 autophosphorylation in human breast cancer MDA-MB-231 cells, in contrast to the stimulatory effect of ephrinA1 on EphA2 autophosphorylation in MDA-MB-231 cells (FIG. 8A and 8B). Similar data were obtained for the 37.1F5 antibody using MDA-MB-231 cells. In FIG. 8, the MDA-MB-231 cells were grown in regular medium with serum for 3 days, then cultured in serum-free medium for 12-14 h. Serum-starved cells were treated with 1 µg/mL ephrinA1-Fc or 15 µg/mL 37.3D7 or 53.2H11 antibody for 10 min. The cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-EphA2 antibody, D7 (Upstate). After separation on a SDS-polyacrylamide gel, the blot was probed with anti-phosphotyrosine antibody, 4G10 (Cell Signaling Technology) and anti-EphA2 antibody D7 (Upstate). Similar results were obtained with both EphA2-N1 and EphA2-N2 in human breast cancer MDA-MB-231 cells, as neither antibody stimulates EphA2 autophosphorylation by itself, whereas each of them prevents ephrinA1-dependent

phosphorylation of the EphA2 receptor.

The 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, and EphA2-N2 antibodies are therefore unique among all known anti-EphA2 antibodies in their effectiveness to inhibit ephrinA1-stimulated EphA2 intracellular signaling.

5 **Example 5**

Inhibition of Serum-Stimulated Growth and Survival of Human Tumor Cells by 37.3D7 and 53.2H11 Antibodies

Several human tumor cell lines were tested in serum-free conditions for their growth and survival response to serum in the presence of 37.3D7 or 53.2H11 antibody.

- 10 Approximately 3000 cells/well were plated in a 96-well plate in regular medium (as suggested from ATCC for each cell line) with serum, which was replaced with serum-free medium the following day. After one day of growth in serum-free medium, the cells were incubated with 15 µg/mL 37.3D7 antibody or 53.2H11 antibody or control IgG₁, followed by the addition of serum to obtain a final concentration of 1% or 1.5% serum.
- 15 The cells were then allowed to grow for another 3 days. A solution of MTT [3-(4, 5)-dimethylthiazol-2-yl-2,3-diphenyltetrazolium bromide; 25 µL of a 5 mg/mL solution in PBS] was then added and the cells were returned to the incubator for 2-3 h. The medium was then removed and replaced by 100 µL DMSO, mixed, and the absorbance of the plate was measured at 545 nm. Several human tumor cell lines showed a growth
- 20 and survival response upon addition of serum that was significantly inhibited by 37.3D7 or 53.2H11 antibody. As examples, the findings with the colon tumor cell lines, HT-29, LoVo; the pancreatic tumor cell line, CFPAC-2, BxPC3; and melanoma UACC-257 are shown.

- 25 The 37.3D7 antibody strongly inhibited serum-stimulated growth and survival of human colon cancer HT-29 cells (FIG. 9A). In another experiment, the 37.3D7 antibody strongly inhibited serum-stimulated growth and survival of BxPC3 human pancreatic cancer cells in a dose-dependent manner with an IC₅₀ value of 4 nM (FIG. 10A). In addition, the 37.3D7 or 53.2H11 antibody strongly inhibited serum-stimulated growth and survival of LoVo human colon cancer cells (FIG. 9B), CFPAC-1 human pancreatic
- 30 cancer cells (FIG. 9C) and UACC-257 melanoma cancer cells (FIG. 9D) and the 53.2H11 antibody inhibited serum or EGF-stimulated growth and survival of LoVo cells in a dose-dependent manner with an IC₅₀ value of 2 nM (FIG. 10B and 10C). In FIG.

10, OD₅₄₅ values for 0% serum-treated samples were set to 100% inhibition and 0% inhibition was set using samples treated with 1.5% serum or 10 ng/ml EGF. None of the previous reported anti-EphA2 antibodies have inhibitory activities on the anchorage-dependent (monolayer) growth of human tumor cells. Therefore, 37.3D7 and 53.2H11 antibodies are unique in their ability to inhibit anchorage-dependent growth (monolayer growth) of human tumor cells.

Example 6

Inhibition of VEGF-Mediated Cell Signaling and VEGF-Stimulated Growth and Survival of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) by 37.3D7, 37.1F5, and 53.2H11 Antibody

A strong fluorescence shift was obtained upon incubation of HUVEC cells with 37.3D7, 37.1F5, or 53.2H11 antibody by FACS analysis, indicating that 37.3D7, 37.1F5 and 53.2H11 antibodies bind to EphA2 receptors expressed on HUVEC cells.. The apparent dissociation constants (K_D) for the binding of 37.3D7, 37.1F5, and 53.2H11 antibodies with EphA2 on the surface of the cells were determined from the binding curves established with FACS binding assays performed at several concentrations and shown in FIG. 11. A value of $K_D = 0.3$ nM for the 37.3D7 antibody was estimated by non-linear regression for one-site binding (FIG. 11), which is similar to the K_D value of the binding of 37.3D7 antibody to human cancer cells. A value of $K_D = 0.01$ nM for the 37.1F5 antibody and a value of $K_D = 0.06$ nM for the 53.2H11 antibody were similarly obtained. This indicates that 37.3D7, 37.1F5 and 53.2H11 antibodies specifically bind to HUVEC cells through the EphA2 receptor.

The 37.3D7 antibody strongly inhibited VEGF-induced HUVEC growth and survival. The activity is similar or better than that of Avastin[®], an anti-VEGF blocking antibody (Genentech) (FIG. 12). An agonistic anti-EphA2 antibody did not inhibit VEGF-induced HUVEC growth and survival (FIG. 12). In FIG. 12, HUVEC cells were grown in EBM-2 medium with serum and endothelial cell (EC) supplements (Clonetics) for 3 days. Cells were cultured in serum-free medium plus EC growth supplements lacking VEGF for 12-14 h. Following serum starvation, cells were stimulated with 5 ng/mL VEGF plus 0.4% serum with or without indicated antibodies (100 µg/mL). The effects of the antibodies on VEGF-induced HUVEC cell growth and survival was determined 3 days after addition of antibodies and VEGF using the MTT assay as described in Example 5. The percent inhibition of VEGF-mediated growth and survival by antibodies is shown in FIG.

12. OD₅₄₅ values for vehicle-treated samples were set to 0% inhibition and 100% inhibition was set using samples lacking VEGF.

That treatment of HUVEC cells with 37.3D7 antibody inhibits intracellular EphA2 receptor signaling was shown by measuring the inhibition of phosphorylation of its downstream effectors such as Akt.

The inhibition is similar to that of Avastin®, an anti-VEGF blocking antibody (Genentech) (FIG. 13). agonistic anti-EphA2 antibody did not inhibit VEGF-induced Akt phosphorylation in HUVEC cells. In FIG. 13, HUVEC cell were starved for 12-14 h in serum-free medium plus EC supplements lacking VEGF. Cells were treated with antibodies (20 µg/mL) for 1 h before addition of VEGF (100 ng/mL). Cells were lysed 15 min after VEGF addition and immunoblots were probed with the indicated antibodies.

Example 7

Suppression of Growth of Human Colon Cancer HT-29 Xenograft in Mice by 37.3D7 Antibody (FIG. 14)

Human colon cancer HT-29 xenografts were established in SCID mice by subcutaneous injection of 2×10^6 HT-29 cells. When the mice showed palpable (50 mm³) HT-29 xenograft tumors, they were treated with 37.3D7 antibody or a control antibody (IgG₁) (1 mg/mouse, i. v., two times per week) or PBS alone (100 µL/mouse, i. v., two times per week). The growth of tumors was significantly slowed by 37.3D7 antibody treatment compared to a control antibody treatment or PBS alone. No toxicity of 37.3D7 antibody was observed, based on measurements of the weights of the mice.

Example 8

Inhibition of early mammary MDA-MB-231 metastasis by the anti-EphA2 antibody hu53.2H11

Anti-tumor activity of the anti-EphA2 antibody hu532H11 was evaluated at one dose level against early mammary MDA-MB-231 tumor implanted subcutaneously in female SCID mice. The effect of this antibody on the MDA-MB-231 tumor invasion in the superficial axil and inguinal lymph nodes was also investigated. To do so, hu532H11

was administered at 40 mg/kg/adm by iv route, on days 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 and 26 post tumor implantation. Control group was left untreated.

- For the evaluation of anti-tumor activity of hu532H11, animals were weighed daily and tumors were measured 2-3 times weekly by caliper. Tumor weights were calculated using the formula $\text{mass (mg)} = [\text{length (mm)} \times \text{width (mm)}^2] / 2$. Antitumor activity was evaluated according to 3 criteria: 1) including T/C, defined as median tumor weight (mg) of a treated group divided by median tumor weight of the nontreated control; 2) the determination of tumor growth delay (T-C), where T is defined as the median time in days required for treatment group tumors to reach 750 mg and C is the median time for the control group tumors to reach the same size, and 3) tumor cell kill is defined as $\log_{10} \text{ cell kill (gross)} = [T-C \text{ value in days}] / (T_d \times 3.32)$. T-C is defined above, and T_d is the tumor volume doubling time in days of the control tumors, which is estimated from the best fit straight line from a log-linear growth plot of the control group tumors in exponential growth (100-1,000 mg range).
- 15 In a parallel study, animals were treated as described before, and on day 28 post tumor implantation all mice were sacrificed and axillary and inguinal lymph nodes were collected (median tumor size in the control group = 1558 mg). The human Ki67 antibody was used in order to specifically identify MDA-MB-231 tumor cells in the lymph nodes by immunostaining. The surface area of metastases in lymph nodes was calculated (mean of 2 sections) as $S = \text{human Ki67 surface area} \times 100 / \text{lymph node surface area}$.
- Efficacy on primary tumor:

hu532H11 was well tolerated at 40 mg/kg/adm (total dose 320 mg/kg) with +8.9% body weight change on day 27. This dose delayed tumor growth of the primary tumor ($T/C = 27\%$ and 1.0 log cell kill gross), even though the tumor escaped under therapy.
 - Anti-metastatic activity:

hu532H11 induced a reduction of metastases surface ($> 50\%$) in both axillary and inguinal lymph nodes.
- 30 In conclusion in mice bearing mammary tumor MDA-MB-231, hu532H11 delays the growth of the primary tumor treated at an early stage of tumor development ($T/C = 27\%$

and 1.0 log cell kill gross), and reduces the metastases surface (> 50 %) in both axillary and inguinal lymph nodes.

In another study, the activity of an anti-EphA2 antibody can be evaluated in the human colon HT29 liver "metastasis" model. The murine anti-EphA2 antibody 53.2H11 is administered iv, twice weekly, from day 4 post intrasplenic implantation of HT29 cells in SCID female mice (n = 20 mice per group for non-tumor bearing animals (NTBA), treated and control). On day 50, 3 days post the 13th anti-EphA2 administration, the mice are necropsied and their spleen and liver are weighed in order to evaluate tumor mass either at the primary tumor site (spleen) or at site of metastasis (liver). Number of metastases is also evaluated. Data is analysed using the statistical tools known to the person skilled in the art.

- Treatment with anti-EphA2 at 40 mg/kg/inj (total dose of 520 mg/kg) is well tolerated.
- Primary tumor weight (spleen): A significant difference of spleen weight is observed between NTBA and control-implanted mice, the latter being bigger. There is no significant difference between spleen weight of control implanted mice and the one of anti-EphA2 treated mice.
- Metastases weight (liver): the liver weight of control-implanted mice is significantly bigger than the liver weight of NTBA; on the other hand, it is significantly smaller in anti-EphA2 treated mice than in control-implanted mice.
- Number of liver metastases: no statistical difference is observed between control implanted and anti-EphA2 treated mice.

In conclusion, intrasplenic implantation of human colic adenocarcinoma HT-29 significantly induces an increase in liver weight due to the metastatic tumor burden. Anti-EphA2 treatment is able to significantly decrease metastatic tumor burden as observed by the reduction of the liver weight of implanted mice without affecting the number of metastases counted on the liver.

Example 9

Cloning and Sequencing of the Light and Heavy Chains of 37.1F5 Antibody.

RNA preparation from hybridoma cells that produces the 37.1F5 antibody

Preparations of total RNA were obtained from 5×10^6 hybridoma cells, which produce 37.1F5 antibody, using Qiagen's RNeasy miniprep kit. Briefly, 5×10^6 cells were pelleted and resuspended in 350 μ L RLT buffer (containing 1% β -mercaptoethanol). The suspension was homogenized by passing it through a 21.5 gauge needle and syringe roughly 10 – 20 times or until it was no longer viscous. Ethanol (350 μ L of 70% aqueous ethanol) was added to the homogenate, which was mixed well. The solution was transferred to a spin column, placed in a 2-mL collection tube and spun at $>8000 \times g$ for 15 seconds. The column was washed twice with 500 μ L RPE buffer, then transferred to a fresh tube and eluted with 30 μ L RNase free water and a 1-minute spin. The eluate (30 μ L) was placed back on the column for a second 1-minute elution spin. An aliquot of the 30 μ L eluate was diluted with water and used to measure the UV absorption at 260 nm for RNA quantitation.

cDNA Preparation with Reverse Transcriptase (RT) reaction

The variable region 37.1F5 antibody cDNA was generated from the total RNA using Invitrogen's SuperscriptII kit. The kit protocols were followed closely, utilizing up to 5 μ g of total RNA from the Qianeasy mini preps. Briefly, the RNA, 1 μ L random primers, and 1 μ L dNTP mix were brought up to 12 μ L with RNase free sterile distilled water and incubated at 65 °C for 5 minutes. The mix was then put on ice for at least 1 minute. Next 4 μ L of 5 x reaction buffer, 2 μ L 0.1 M DTT, and 1 μ L RNaseOUT were added and the mix was incubated at 25 °C for 2 minutes in an MJ Research thermocycler. The thermocycler was paused so that 1 μ L of SuperscriptII enzyme could be added and then restarted for an additional 10 minutes at 25 °C before shifting to 55 °C for 50 minutes. The reaction was heat inactivated by heating to 70 °C for 15 min and the RNA was removed by adding 1 μ L RNase H and incubating at 37 °C for 20 minutes.

Degenerate PCR reactions

The procedure for the first round degenerate PCR reaction on the cDNA derived from hybridoma cells was based on methods described in Wang *et al.* (2000; *J Immunol Methods.*; **233**(1-2):167-77) and Co *et al.* (1992; *J Immunol.*; **148**(4):1149-54). The primers for this round (Table 2) contain restriction sites to facilitate cloning into the pBluescriptII plasmids.

The PCR reaction components (Table 3) were mixed on ice in thin walled PCR tubes and then transferred to an MJ research thermocycler preheated and paused at 94 °C.

The reactions were performed using a program derived from Wang *et al.* (2000; *J Immunol Methods.*; **233**(1-2):167-77), as follows:

Name: Wang45

- 1) 94°C 3:00 min
- 5 2) 94°C 0:15 sec
- 3) 45°C 1:00 min
- 4) 72°C 2:00 min
- 5) Goto 2 29 times
- 6) 72°C 6:00 min
- 10 7) 4°C for ever
- 8) end

The PCR reaction mixtures were then run on a 1% low melt agarose gel, the 300 to 400 bp bands were excised, purified using Zymo DNA mini columns, and sent to Agencourt biosciences for sequencing. The respective 5' and 3' PCR primers were
15 used as sequencing primers to generate the 37.1F5 variable region cDNAs from both directions.

Cloning the 5' end sequence

Since the degenerate primers used to clone the 37.1F5 variable region light chain and heavy chain cDNA sequences alters the 5'end sequences, additional sequencing
20 efforts were needed to decipher the complete sequences. The preliminary cDNA sequence from the methods described above were used to search the NCBI IgBlast site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) for the murine germline sequences from which the 37.1F5 sequence is derived. PCR primers were designed (Table 4) to anneal to the leader sequence of the murine antibody so that a new PCR reaction could yield
25 the complete variable region cDNA, unaltered by the PCR primers. The PCR reactions, band purifications, and sequencing were performed as described above. The germline sequences from which the light chain and heavy chain of mu37.1F5 are likely derived, are accessible under the Genbank accession numbers MUSIGKVR3 and AF303839,

respectively.

Peptide analysis for sequence confirmation

The cDNA sequence information for the variable region was combined with the germline constant region sequence to obtain full length antibody cDNA sequences. The
 5 molecular weights of the heavy chain and light chain were then calculated and compared with the molecular weights obtained by LC/MS analyses of the murine 37.1F5 antibody.

Table 5 gives the calculated mass from the cDNA sequences for 37.1F5 LC and HC together with the values measured by LC/MS. The molecular weight measurements are
 10 consistent with the cDNA sequences for both the 37.1F5 light and heavy chain.

Essentially the same method was used for cloning of the light and heavy chains of 37.3D7 and 53.2H11. The Genbank accession numbers of the germline sequences from which the light chain and and of the heavy chain of 37.3D7 are likely derived, are respectively MMU231217 and AF303868. For 53.2H11, they are respectively
 15 MMU231196 and AF303833; for EphA2-N1, K02161 and J00488 respectively; and for EphA2-N2, AJ231222 and J00488 respectively.

Example 10

Inhibition of the growth of EphA2 expressing tumor cells by humanized-37.3D7-SPDB-DM4 and humanized-53.2H11-SPDB-DM4

20 Humanized 37.3D7 and humanized 53.2H11 antibodies were conjugated to L-DM4 N²deacetyl-N²(4-methyl-4-mercapto-1-oxopentyl)-maytansine using SPDB (4-[2-pyridyldithio]butanoic acidN-hydroxsuccinimide ester) linker. Briefly, the antibody was modified at 8 mg/mL with 5.5 or 6.5 folds molar excess of SPDB for hu53.2H11 and hu37.3D7 respectively. The reaction was carried out in Buffer A (50 mM KP/50 mM
 25 NaCl/2 mM EDTA, pH 6.5, 95% v/v) with EtOH (5% v/v) for 90 minutes at room temperature. The modified antibody was then purified by SephadexG25 desalting column with Buffer A. Next, the modified antibody was reacted with a 1.7-fold molar excess of DM4 over SPDB linker. The reaction was carried out at 2.5 mg/mL antibody in Buffer A (97% v/v) and DMA (dimethylacetamide, 3% v/v) at room temperature for 20
 30 hours. The conjugate was purified by SephadexG25 desalting column with 10 mM

Histidine, 130 mM Glycine, 5% sucrose, pH5.5. The drug to antibody ratio was 4.0 for hu37.3D7-SPDB-DM4 and 3.1 for hu53.2H11-SPDB-DM4.

The effects of hu37.3D7-SPDB-DM4 and hu53.2H11-SPDB-DM4 on the growth of EphA2 expressing tumor cells were first tested using the *in vitro* cell proliferation WST-8 ((2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) assay (Catalog# CK04-11, Dojindo Molecular Technologies, Inc).

Several human tumor cell lines were tested. Approximately 2000 cells/well were plated in a 96-well plate in regular medium (as suggested from ATCC for each cell line) with 10% serum in the presence of a variety of concentration of hu37.3D7-SPDB-DM4 or hu53.2H11-SPDB-DM4. The cells were then allowed to grow for 5 days. A solution of WST-8 [20 μ L solution] was then added and the cells were returned to the incubator for 2-3 h. The absorbance of the plate was measured at 450 nm and 650 nm. Two control groups were used in the experiments. 0% survival is the medium only control. 100% survival is the cells only control. For data analysis, the A650 nm (reference wavelength) values were first subtracted from the corresponding A450 nm values. Then, A450 nm values of each sample were normalized by subtraction of A450 nm values of the background control (medium only). The survival fractions were calculated by the normalized A450 values of the samples divided by the normalized A450 values from the cells only controls (100% survival -0% survival). Log [Ab-DM4] values were plotted on the x-axis and survival fractions were plotted on y-axis.

Hu37.3D7-SPDB-DM4 and hu53.2H11-SPDB-DM4 significantly inhibited the growth of EphA2 expressing human tumor cells, including PC3 prostate tumor cells, MDA-MDA-MB-231 breast tumor cells, WM-115 melanoma cells, A375 melanoma cells and LoVo colon tumor cells. As an example, the findings with the PC3 prostate tumor cells are shown. The hu37.3D7-SPDB-DM4 or hu53.2H11-SPDB-DM4 strongly inhibited the growth of PC3 cells in a dose-dependent manner with an similar IC₅₀ value of 0.02 nM (FIG. 15A & 15B). The potency of conjugates correlated with the EphA2 expression levels. More than 50-fold higher concentration of hu37.3D7-SPDB-DM4 or hu53.2H11-SPDB-DM4 was required to inhibit the growth of the SK-Mel28 cells (IC₅₀ values: 1.3 nM and >5 nM, respectively; FIG. 15A & 15B), which expressed almost undetectable level of EphA2 on cell surface (measured by FACS data not shown) (FIG. 15A & 15B). Therefore, results of the *in vitro* growth inhibition assays demonstrated the ability of antagonist anti-EphA2 antibody-conjugates to specifically inhibit the growth of EphA2 expressing tumor cell lines.

The effects of hu37.3D7-SPDB-DM4 and hu53.2H11-SPDB-DM4 on the growth of EphA2 expressing tumor xenografts were tested. A study using MDA-MB-231 breast tumor xenograft model is shown as one example. Human breast cancer MDA-MB-231 xenografts were established in female CB17 SCID mice 5 weeks of age by

5 subcutaneous injection of 1×10^7 MDA-MB-231 cells. When MDA-MB-231 xenograft tumors were established (average size of 83 mm^3), mice were treated with a single i. v injection of hu3D7-SPDB-DM4 or hu2H11-SPDB-DM4 or PBS. The doses of antibodies were 15mg/kg of mouse body weight, 7.5mg/kg of mouse body weight and 3.25 mg/kg of mouse body weight. The growths of MDA-MB-231 tumors were completely inhibited

10 by either hu3D7-SPDB-DM4 or hu2H11-SPDB-DM4 antibody-conjugates at all of the tested concentrations except at 3.25 mg/kg of hu2H11-SPDB-DM4, which shows marked delay of tumor cell growth relative to PBS control (FIG.16A &16B). The median tumor volumes in each group (6 mice per group) are shown in the FIG. 16A & B. In summary, both hu3D7-SPDB-DM4 and hu2H11-SPDB-DM4 have potent growth

15 inhibitory activities on EphA2 expressing tumors *in vivo*. No toxicities of both antibody-conjugates were observed, based on the body weight measurements.

T A B L E S

Table 1A:

20 The mu37.3D7 light chain framework surface residues and corresponding residues at the same Kabat position in the human 28E4 antibody. The residues that are different and therefore changed in the hu37.3D7 antibody are in grayed boxes.

mu37.3D7 Light Chain Framework Surface Residues And Corresponding Residues In The Human 28E4 Antibody		
Kabat Position	mu37.3D7	28E4
1	Q	E
3	V	V
5	T	T
9	A	A
10	I	T
15	L	P
18	R	R
40	P	P
41	G	G
57	G	G
60	A	A
67	S	S
80	S	S
81	E	E
100	S	G
107	K	K
108	R	R

Table 1B:

- 5
- The mu37.3D7 heavy chain framework surface residues and corresponding residues at the same Kabat position in the human 28E4 antibody. The residues that are different and therefore changed in the hu37.3D7 antibody are in grayed boxes. The starred (*) residues are back mutated to the mu37.3D7 residue in one or more hu37.3D7 variants.

mu37.3D7 Heavy Chain Framework Surface Residues And Corresponding Residues In The Human 28E4 Antibody		
Kabat Position	mu37.3D7	28 ^E 4
1	Q	Q
3	Q	Q
5	Q	V
9	S	A
11	L	V
13	R	K
14	P	P
15	G	G
19	Q	K
23	K	K
28*	S*	N*
41	P	P
42	G	G
43	Q	Q
61	E	Q
62	K	K
64	M	Q
65	N	G
73	T	T
74*	Y*	S*
75	S	T
82B	S	S
84	S	S
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

Table 2:

Primers used for the degenerate PCR reactions are based on those in Wang *et al.*, 2000 except HindKL (SEQ ID NO: 58) which is based on Co *et al.* 1992. Mixed bases
5 are defined as follows: H=A+T+C, S=g+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+g,

W=A+T, V = A+C+G.

Primer	Sequence
BamIlgG1 (SEQ ID NO: 53)	GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
IgG2Abam (SEQ ID NO: 54)	GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
EcoMH1 (SEQ ID NO: 55)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
EcoMH2 (SEQ ID NO: 56)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
Sac1MK (SEQ ID NO: 57)	GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
HindKL (SEQ ID NO: 58)	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTG GTGC

Table 3:

5 The light and heavy chain PCR reaction mixes for cloning of the 37.1F5 variable region cDNA sequences.

Light Chain Reaction Mix	Heavy Chain Reaction Mix
5 µl 10 X PCR reaction buffer (Roche) 4 µl 10mM dNTP mix (2.5mM each) 2 µl Template (RT reaction) 5 µl 10 µM Sac1MK left primer 5 µl 10 µM HindKL right primer 5 µl DMSO 0.5 µl Taq Polymerase (Roche) <u>23.5 µl</u> sterile distilled H ₂ O	5 µl 10 X PCR reaction buffer (Roche) 4 µl 10mM dNTP mix (2.5mM each) 2 µl Template (RT reaction) 2.5 µl 10 µM EcoMH1 left primer 2.5 µl 10 µM EcoMH2 left primer 5 µl 10 µM BamIlgG1 right primer 5 µl DMSO 0.5 µl Taq Polymerase (Roche) <u>23.5 µl</u> sterile distilled H ₂ O
50 µl Total	50 µl Total

Table 4:

The 5'end murine leader sequence primers used for the 37.1F5 second round PCR reactions. The 3'end primers are identical to those used in the first round reactions since they prime to the respective constant region sequences.

Primer	Sequence
Light Chain	
38SB13 LC Leader (SEQ ID NO: 59)	GACAGACACACTCCTGCTATGGG
Heavy Chain	
5F85 HC Leader (SEQ ID NO: 60)	GCAGAATTCATGGGATGGAGCYGGATCTTTCT

5

Table 5:

The cDNA calculated and LC/MS measured molecular weights of the murine 37.1F5 antibody light and heavy chains.

	Light Chain			Heavy Chain		
	cDNA	LC/MS	Difference	cDNA	LC/MS	Difference
37.1F5	24031 Da	24029 Da	2 Da	49316 Da	49333 Da	17 Da

CLAIMS

- 1) An antibody or an epitope-binding fragment thereof that specifically binds to an EphA2 receptor and is an antagonist of said receptor.
- 2) The antibody or epitope-binding fragment thereof claim 1, characterized in that
5 said antibody or epitope-binding fragment thereof is a monoclonal antibody.
- 3) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 1, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is a Fab, Fab', F(ab')₂ or F_v fragment.
- 4) The antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous
10 claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is capable of inhibiting the growth of a cancer cell.
- 5) The antibody or epitope-binding fragment thereof of according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is capable of inhibiting the migration of a cancer cell.
- 15 6) The antibody or an epitope-binding fragment thereof according to any of claims 4 and 5, characterized in that said cancer cell is a cell of a cancer selected from the group consisting of a breast cancer, colon cancer, endometrial cancer, ovarian carcinoma, osteosarcoma, cervical cancer, prostate cancer, lung cancer, synovial carcinoma pancreatic cancer, a sarcoma, a glioma, head and neck cancer, gastric
20 cancer, liver cancer, and other carcinomas.
- 7) The antibody or epitope-binding fragment thereof of according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is capable of inhibiting angiogenesis.
- 8) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous
25 claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is devoid of agonist activity.
- 9) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 8, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof does not stimulate EphA2 tyrosine phosphorylation.

- 10) The antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is capable of inhibiting the binding of a ligand to said receptor.
- 5 11) The antibody or epitope-binding fragment thereof of claim 10, characterized in that said ligand is ephrinA1.
- 12) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is capable of inhibiting EphA2 tyrosine phosphorylation.
- 10 13) An antibody or epitope-binding fragment thereof of claim 12, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is capable of inhibiting EphA2 tyrosine phosphorylation in presence of ephrinA1.
- 14) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is capable of inhibiting EphA2-mediated signaling.
- 15 15) An antibody or epitope-binding fragment thereof of claim 14, characterized in that EphA2-mediated signaling is an increase in Akt phosphorylation.
- 16) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof binds EphA2 with a K_D of 3×10^{-10} M or smaller.
- 20 17) The antibody or epitope-binding fragment thereof of according to any of the previous claims, characterized in that said EphA2 receptor is human.
- 18) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more complementarity-determining region having an amino acid
25 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, and 72.
- 19) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof
30 comprises a light chain variable region having an amino acid sequence selected

from the group consisting of SEQ ID NOS: 26, 28, 30, 78, and 80.

- 5 **20)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a heavy chain variable region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 20, 22, 24, 74, and 76.
- 10 **21)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1, 2, and 3, and wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 4, 5, and 6.
- 15 **22)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 21, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 26.
- 20 **23)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 21, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more of a heavy chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 20.
- 25 **24)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-20, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 7, 8, and 9, and wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 10, 11, and 12.
- 30 **25)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 24, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 28.

- 26) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 24, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more of a heavy chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 22.
- 5 27) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-20, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 13, 14, and 15, and wherein said
10 light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 16, 17, and 18.
- 28) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 27, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID
15 NO: 30.
- 29) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 27, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more of a heavy chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 24.
- 20 30) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-20, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 61, 62, and 63, and wherein said
25 light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 64, 65, and 66.
- 31) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 30, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID
30 NO: 78.
- 32) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 30, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises

one or more of a heavy chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 74.

- 5 **33)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-20, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 67, 68, and 69, and wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 70, 71, and 72.
- 10 **34)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 33, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 80.
- 15 **35)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 33, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more of a heavy chain variable region having an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 76.
- 20 **36)** An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said antibody or epitope-binding fragment thereof is a murine antibody or epitope-binding fragment thereof and is produced by a hybridoma designated 37.3D7, wherein said hybridoma is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTA-7660; a hybridoma designated 37.1F5, wherein said hybridoma is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTA-7661; a hybridoma designated 53.2H11, wherein said hybridoma is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTA-7662; a hybridoma designated EphA2-N1, wherein said hybridoma is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTM-8407; or a hybridoma designated EphA2-N2, wherein said hybridoma is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTM-8408.
- 30 **37)** A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof that binds the same epitope as an antibody or epitope-binding fragment thereof

according to any of the previous claims.

- 38) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more complementarity-determining region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, and 72.
- 39) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 47, 48, 49, 50, and 52.
- 40) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a heavy chain variable region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, and 45.
- 41) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1, 2, and 3, and wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 4, 5, and 6.
- 42) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 41, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having a sequence represented by SEQ ID NO: 47.
- 43) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 41, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more of a heavy

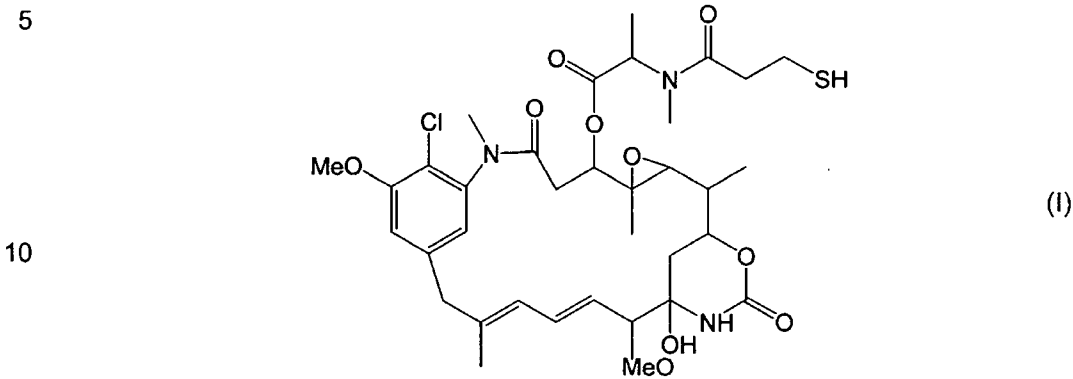
chain variable region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 32, 34, and 36.

- 5 **44)** A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-40, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 7, 8, and 9, and wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 10, 11, and 12.
- 10 **45)** A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 44, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 48, 49, and 50.
- 15 **46)** A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 44, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more of a heavy chain variable region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 37, and 38.
- 20 **47)** A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-40, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 13, 14, and 15, and wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 16, 17, and 18.
- 25 **48)** A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 47, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises a light chain variable region having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 52.
- 30

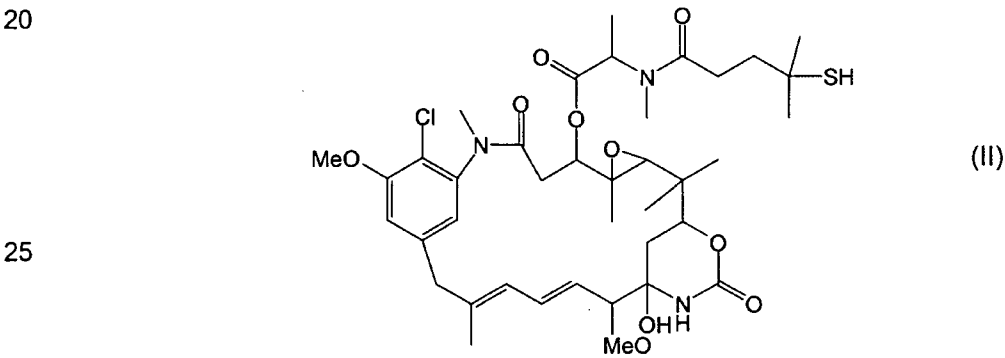
- 49) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to claim 47, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises one or more of a heavy chain variable region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS:40, 42, 43, and 45.
- 50) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-40, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, and said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 61, 62, and 63, and said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 64, 65, and 66.
- 51) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-40, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof comprises at least one heavy chain and at least one light chain, and said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 67, 68, and 69, and said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 70, 71, and 72.
- 52) A humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of the previous claims, characterized in that said humanized or resurfaced antibody or epitope-binding fragment thereof is selected from a group consisting of hu37.3D7, hu37.1F5, hu53.2H11, huEphA2-N1, and huEphA2-N2.
- 53) A conjugate comprising the antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-52 linked to a cytotoxic agent.
- 54) The conjugate of claim 53, characterized in that said cytotoxic agent is selected from the group consisting of a maytansinoid, a small drug, a tomaymycin derivative, a leptomyacin derivative, a prodrug, a taxoid, CC-1065 and a CC-1065

analog.

55) The conjugate of claim 53, characterized in that said cytotoxic agent is the maytansine DM1 of formula:



56) The conjugate of claim 53, characterized in that said cytotoxic agent is the maytansine DM4 of formula:



57) The conjugate of claim 53, characterized in that said cytotoxic agent is a tomaymycin derivative selected from the group consisting of:

- 8,8'-[1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

- 8,8'-[5-methoxy-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[1,5-pentanediylobis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 5 • 8,8'-[1,4-butanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[3-methyl-1,5-pentanediylobis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 10 • 8,8'-[2,6-pyridinediylobis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropoxy)-2,6-pyridinediylobis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 15 • 8,8'-[5-(3-aminopropoxy)-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 20 • 8,8'-{5-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)propoxy]-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[5-acetylthiomethyl-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 25 • bis-{2-[(S)-2-methylene-7-methoxy-5-oxo-1,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester
- 8,8'-[3-(2-acetylthioethyl)-1,5-pentanediylobis(oxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-

methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

- 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 5 • 8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 10 • 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-methyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 15 • 8,8'-[(1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one]
- 20 • 8,8'-[(4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 25 • 8,8'-[(4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanoyl]-piperazin-1-yl)-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanoyl]-piperazin-1-yl)-propyl)-

- benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
 - 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
 - 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
 - 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy]-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
 - 8,8'-[(1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
 - 8,8'-[(4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
 - 8,8'-[(4-(3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
- 8,8'-[(1-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one].
- 58) The conjugate of claim 53, characterized in that the cytotoxic agent is a leptomycin derivative selected from the group consisting of:

- (2-Methylsulfanyl-ethyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6^H-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid (2-methylsulfanyl-ethyl)-amid
- 5 • Bis-[(2-mercaptoethyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid]
- 10 • (2-Mercapto-ethyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid
- (2-Methyldisulfanyl-ethyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid
- 15 • (2-Methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid
- (2-Mercapto-2-methyl-propyl)-amid of (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptamethyl-19-((2S,3S)-3-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic acid.
- 20 59) A pharmaceutical composition containing an antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-52, or a conjugate according to any of claims 53-58, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipients.
- 60) An antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-52, or a conjugate according to any of claims 53-58, for use as a medicament.
- 25 61) The use of an antibody or epitope-binding fragment thereof according to any of claims 1-52, or a conjugate according to any of claims 53-58, to make a medicament to treat cancer.
- 62) The use of claim 61, characterized in that said cancer is a metastatic cancer.
- 63) The use of claims 61-62, characterized in that said antibody or epitope-binding

fragment thereof, or said conjugate inhibit tumor neovascularization.

- 5 **64)** The use of any of claims 61-63 characterized in that said cancer is selected from the group consisting of breast cancer, colon cancer, endometrial cancer, ovarian carcinoma, osteosarcoma, cervical cancer, kidney cancer, prostate cancer, lung cancer, synovial carcinoma pancreatic cancer, a sarcoma, glioma, head and neck cancer, gastric cancer, liver cancer, and other carcinomas.
- 65)** The use according to any of claims 61-64, further comprising the use of a further therapeutic agent in the manufacture of the same or different composition.
- 10 **66)** The use according to claim 65 characterized in that the further therapeutic agent is an antagonist of fibroblast-growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), tissue factor (TF), protein C, protein S, platelet-derived growth factor (PDGF), or HER2 receptor.
- 67)** A method of diagnosing a cancer in a subject known to or suspected to have a cancer, said method comprising:
- 15 a) Contacting cells of said patient with an antibody or epitope-binding fragment thereof,
- b) Measuring the binding of said antibody or epitope-binding fragment thereof to said cells, and
- c) Comparing the expression in part (b) with that of a normal reference
20 subject or standard.
- 68)** The method of claim 67, wherein said cancer is a cell of a cancer selected from the group consisting of a breast cancer, colon cancer, endometrial cancer, ovarian carcinoma, osteosarcoma, cervical cancer, kidney cancer, prostate cancer, lung cancer, synovial carcinoma pancreatic cancer, a sarcoma, glioma,
25 head and neck cancer, gastric cancer, liver cancer, and other carcinomas.
- 69)** The method of claim 68, characterized in that the said cells are in frozen or fixed tissue or cells from said patient.
- 70)** A polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24,

26, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 76, 78 and 80.

- 5 **71)** A polynucleotide according to claim 70 characterized in that said polynucleotide has a sequence sharing at least 80 % homology with a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 39, 41, 44, 46, 51, 73, 75, 77, and 79.
- 72)** A recombinant vector comprising a nucleic acid of any of claims 70 and 71.
- 73)** A host cell comprising a vector of claim 72.
- 10 **74)** An hybridoma cell line characterised in that it is selected from the group consisting of the hybridoma cell line designated 37.3D7 wherein said hybridoma cell line is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTA-7660; the hybridoma cell line designated 37.1F5, wherein said hybridoma cell line is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTA-7661; the hybridoma cell line designated 53.2H11, 15 wherein said hybridoma cell line is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTA-7662; the hybridoma cell line designated EphA2-N1, wherein said hybridoma cell line is deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTM-8407; or the hybridoma cell line designated EphA2-N2, wherein said hybridoma cell line is 20 deposited at the American Type Culture Collection under the accession number PTM-8408.

1/23

Fig. 1A

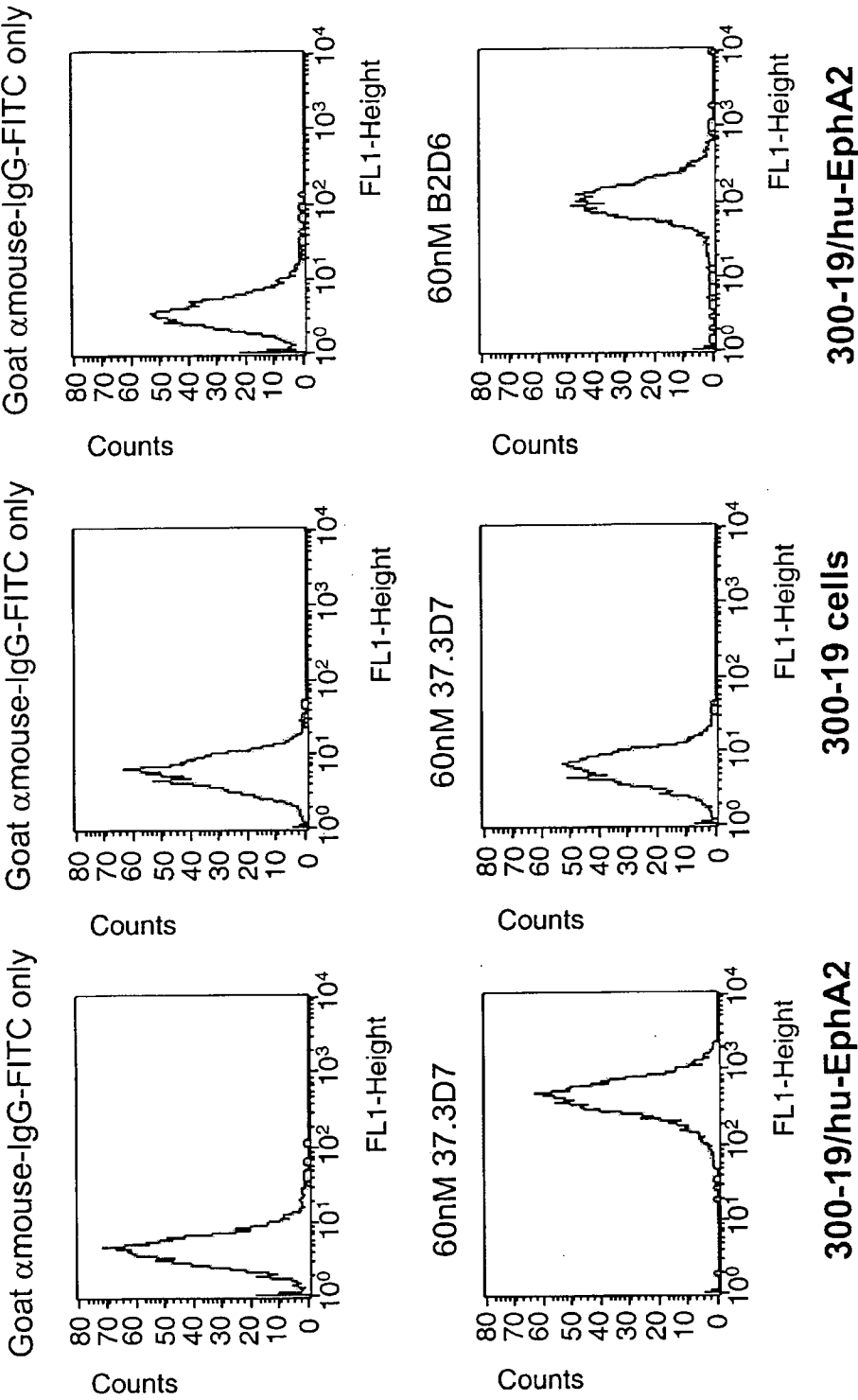
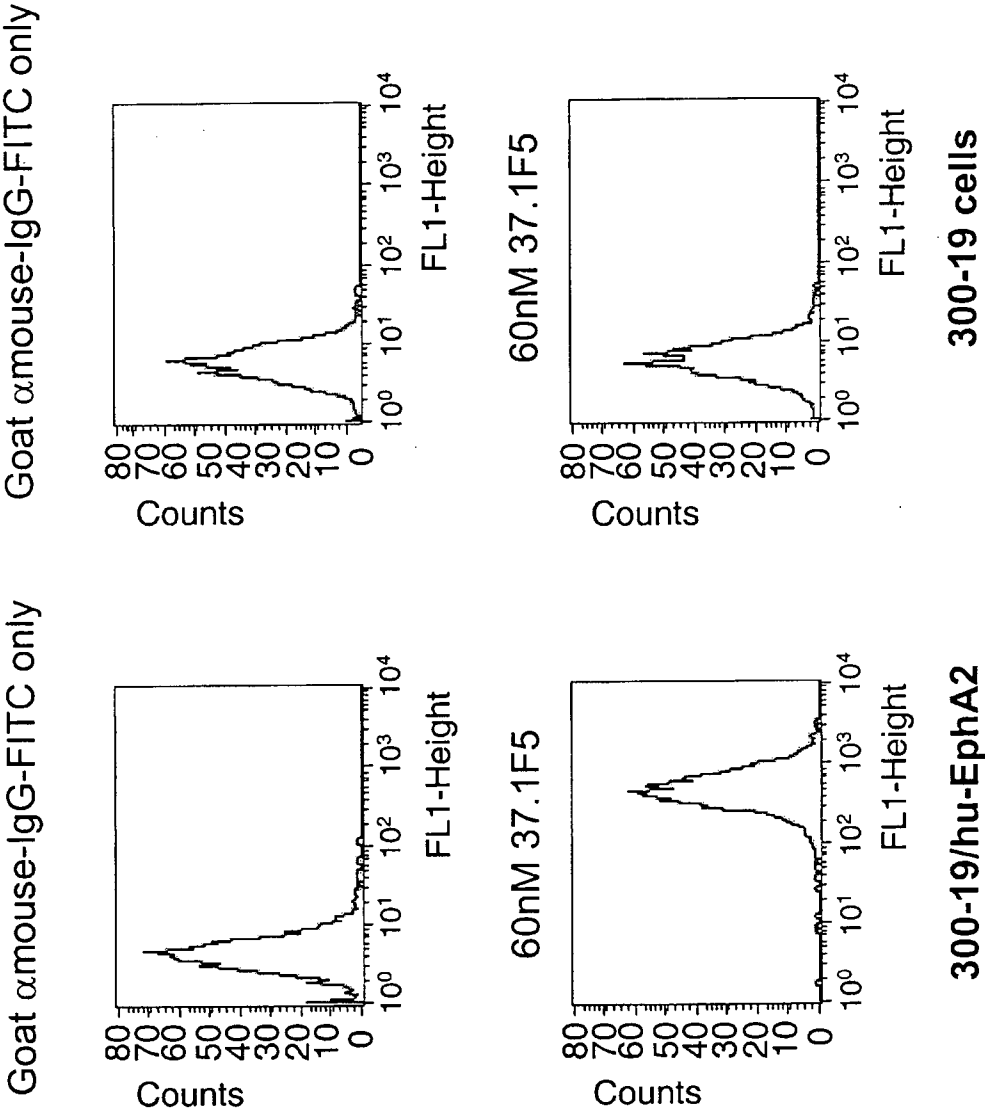
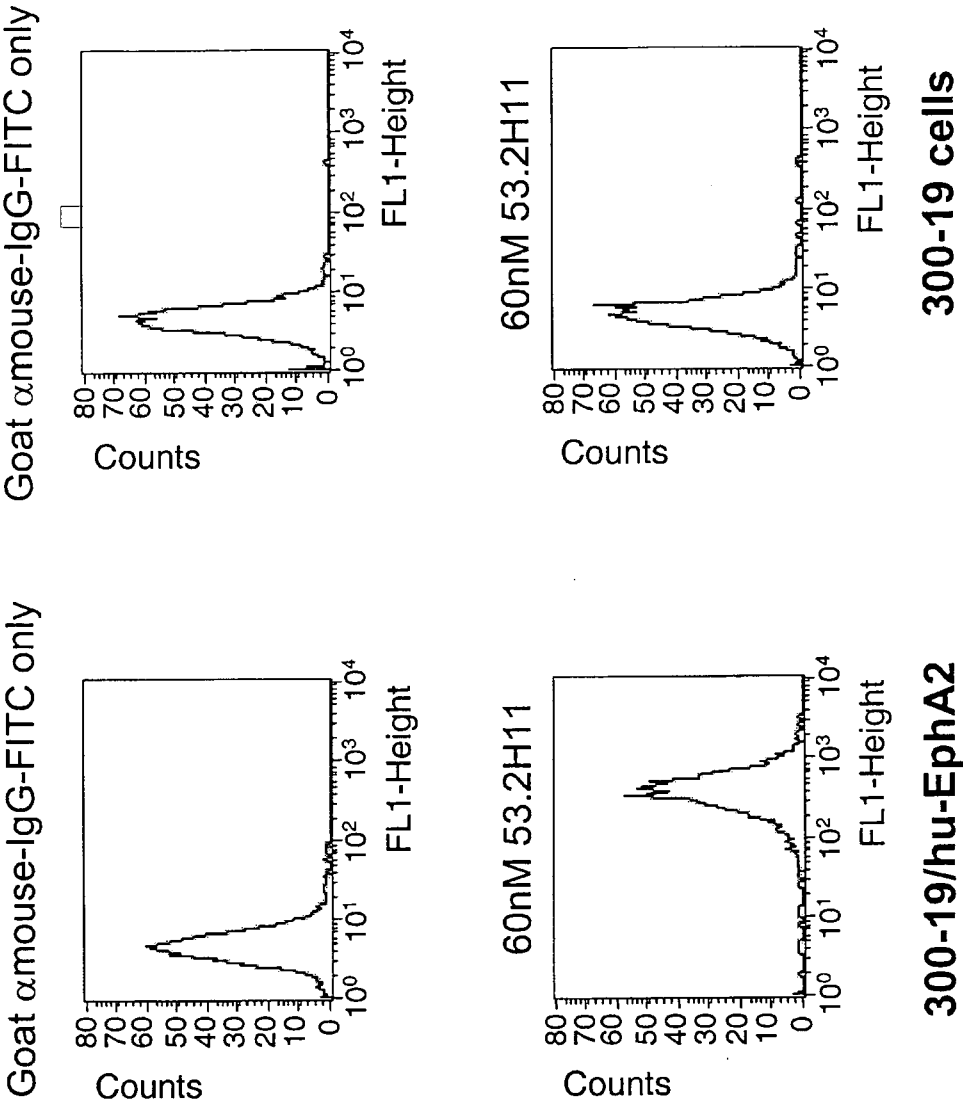


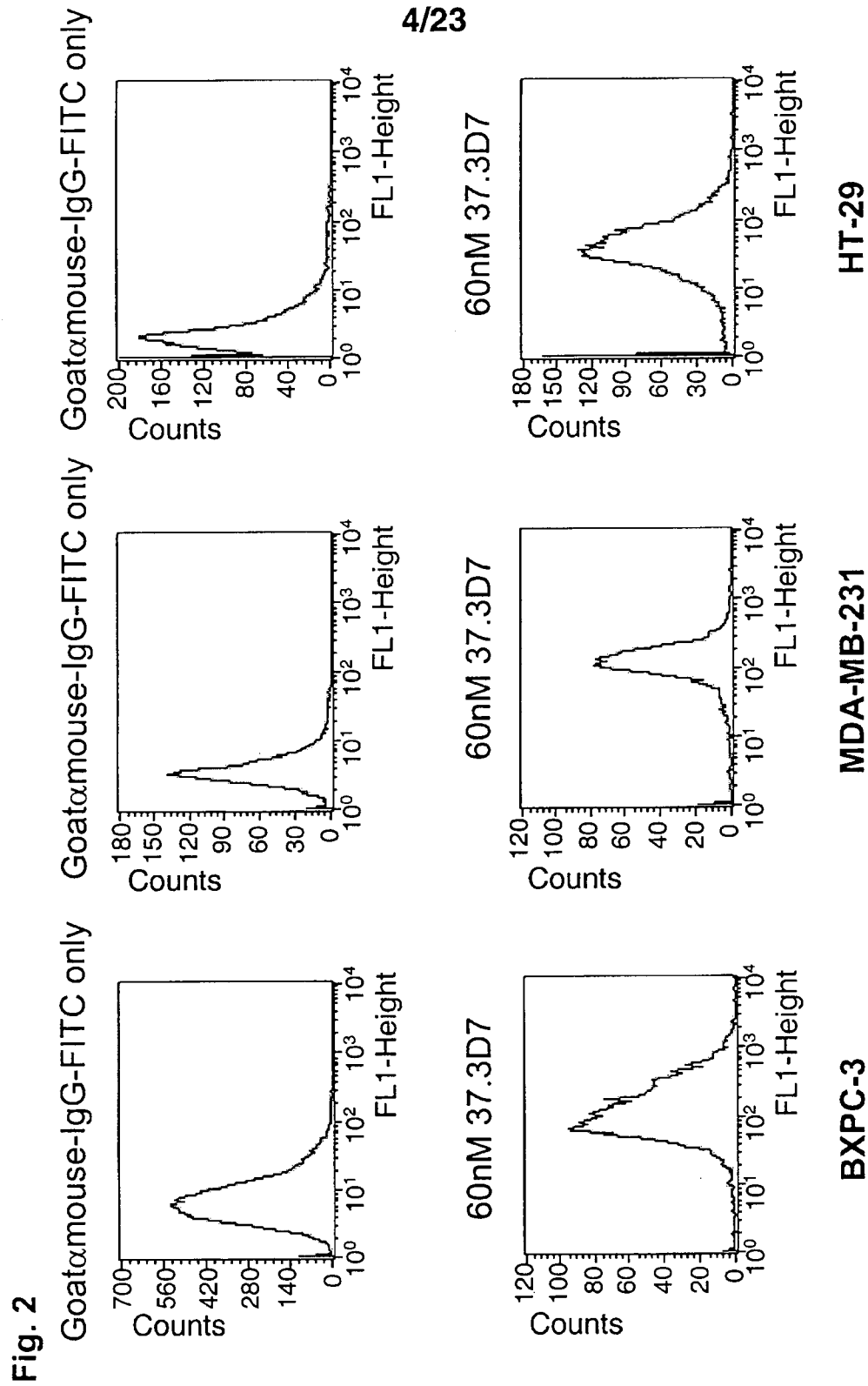
Fig. 1B



3/23

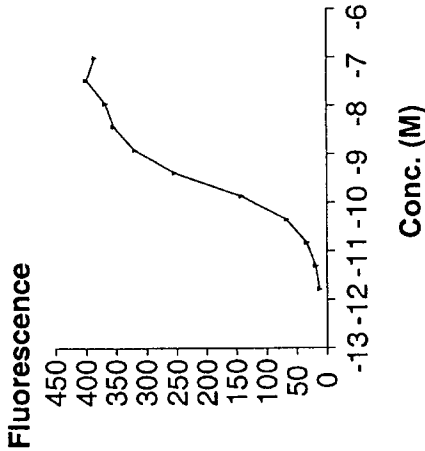
Fig. 1C





5/23

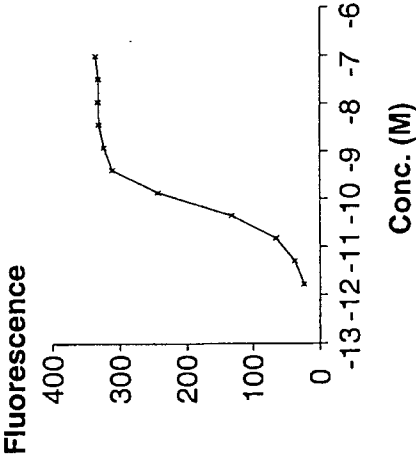
Fig. 3A



37.3D7

300-19/hu-EphA2

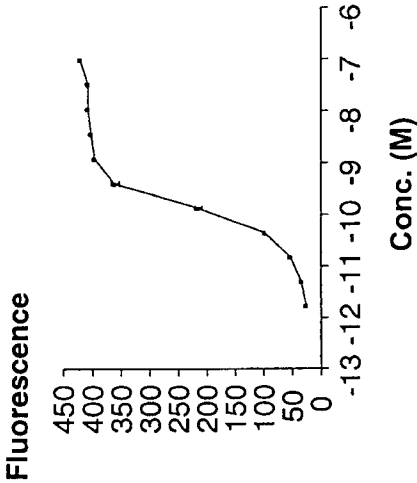
Fig. 3B



37.1F5

300-19/hu-EphA2

Fig. 3C



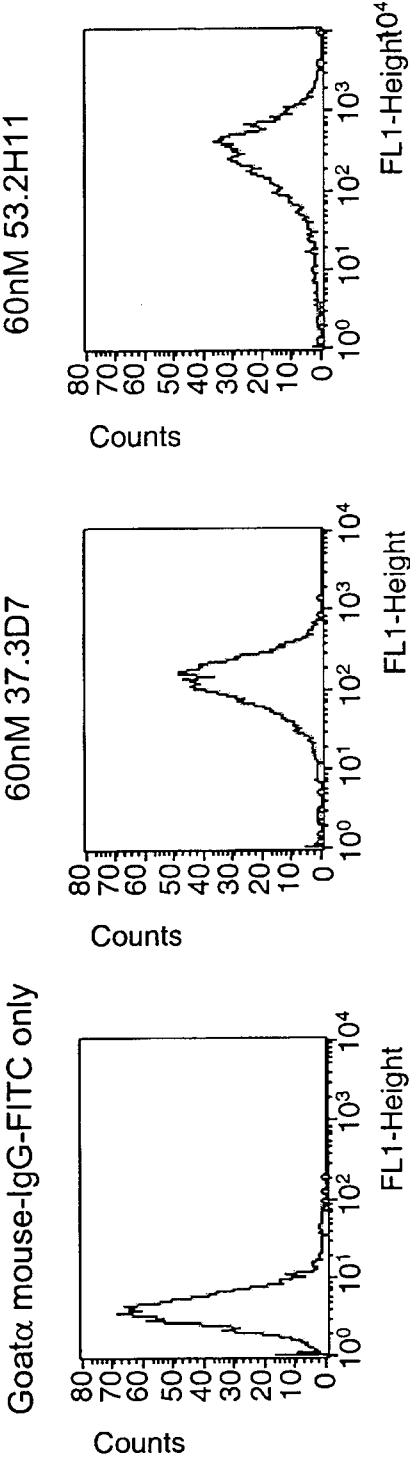
53.2H11

300-19/hu-EphA2

6/23

Fig. 4A

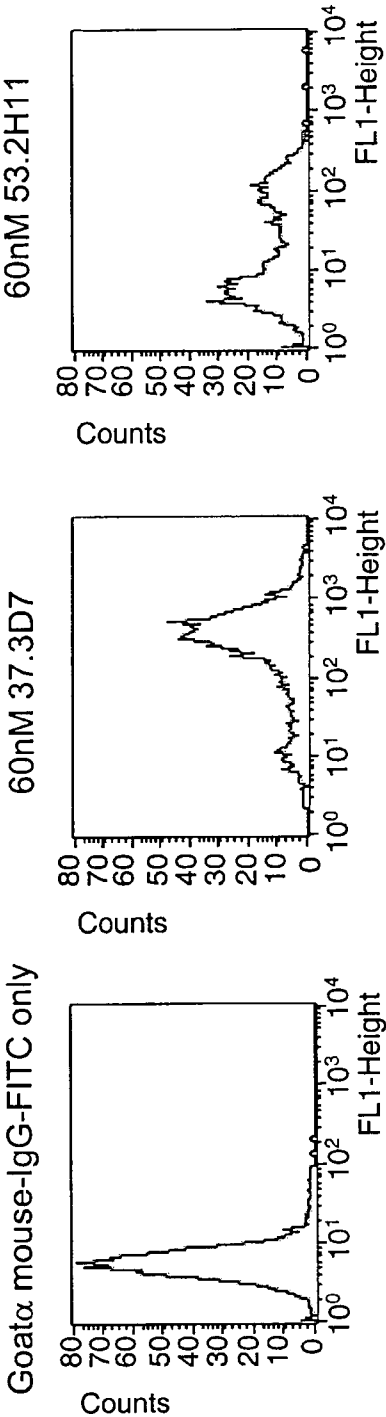
300-19/ μ -EphA2



7/23

Fig. 4B

300-19/Rat-EphA2



8/23

Fig. 5 A

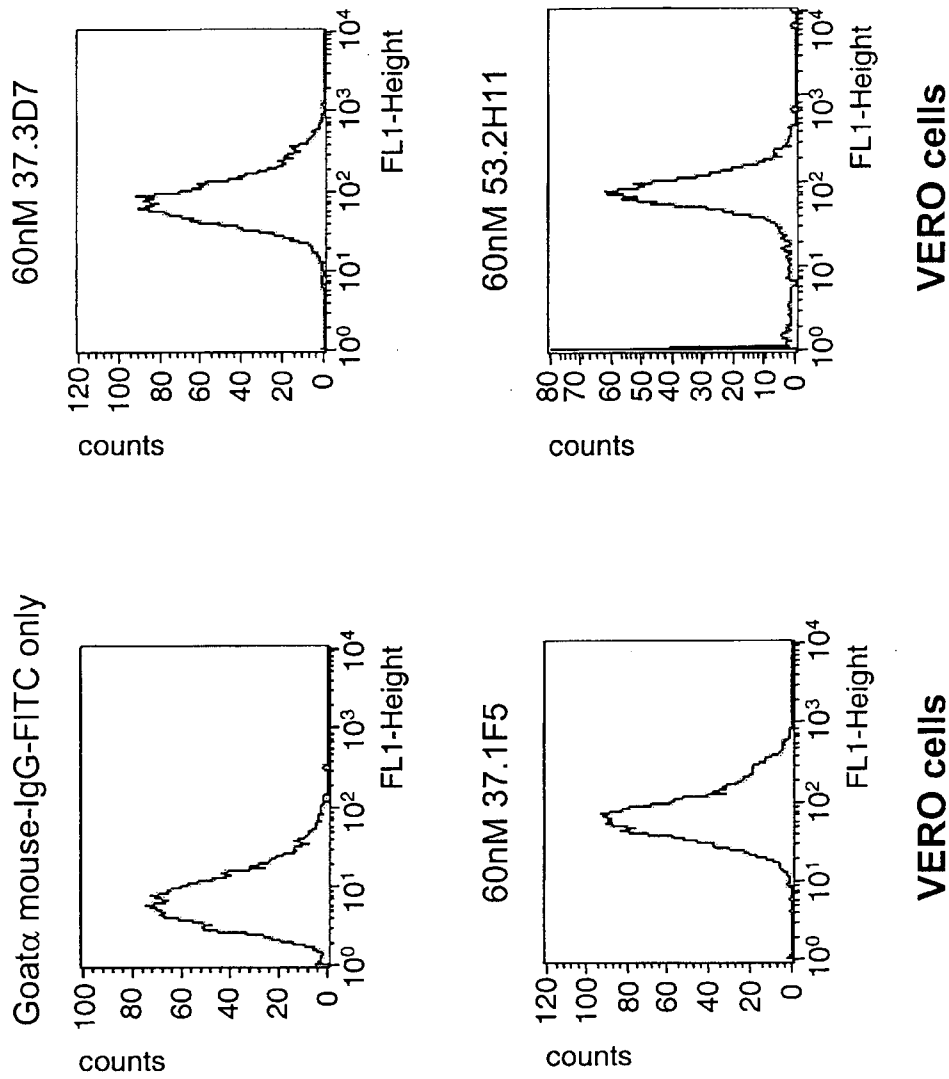
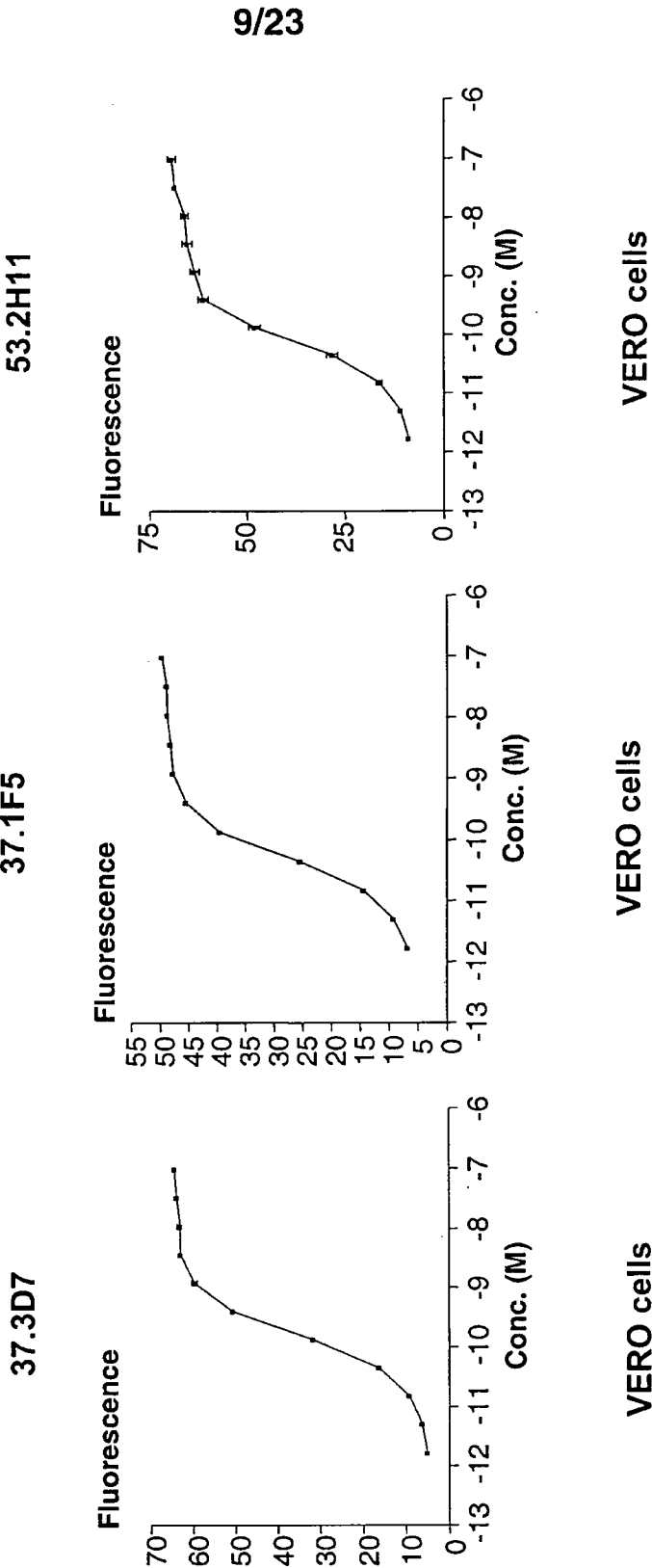


Fig. 5 B



10/23

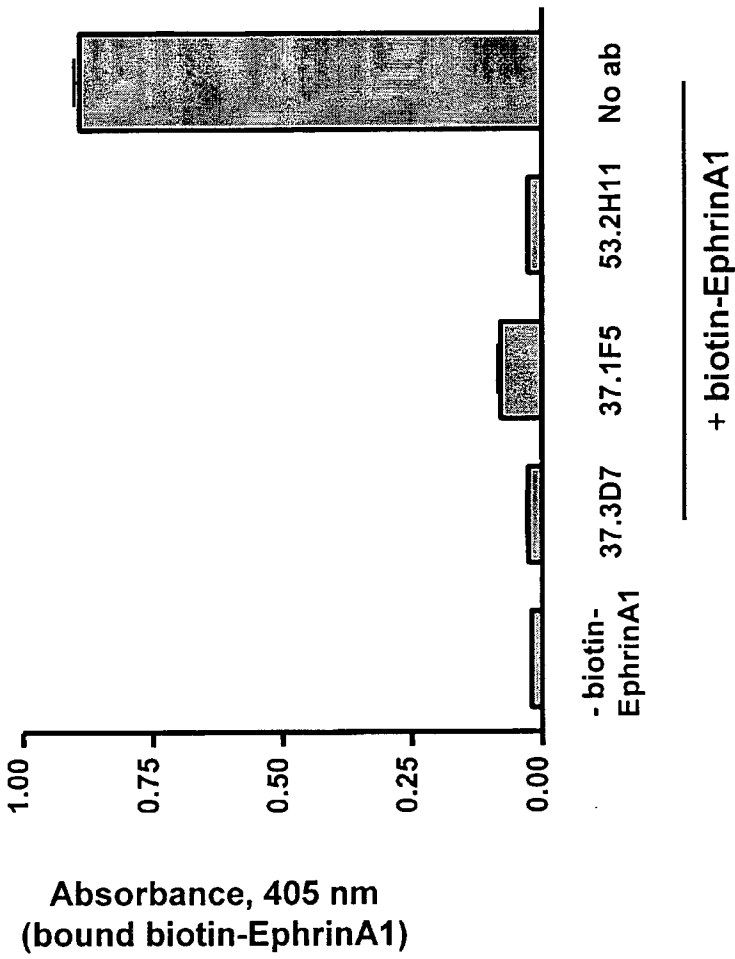


Fig. 6

11/23

Fig. 7A

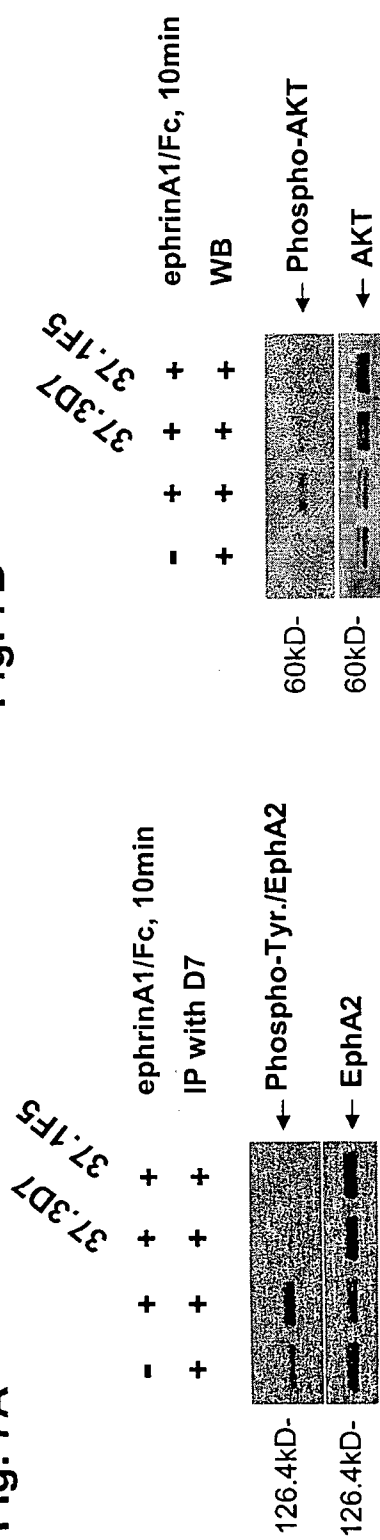


Fig. 7B

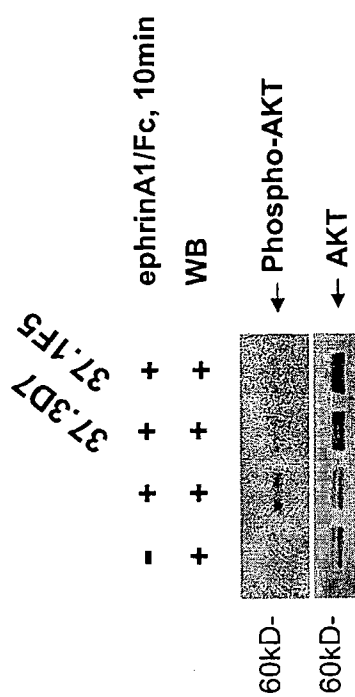
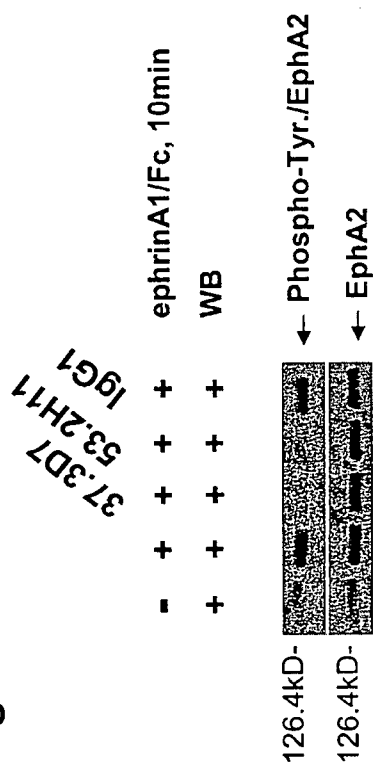


Fig. 7C



13/23

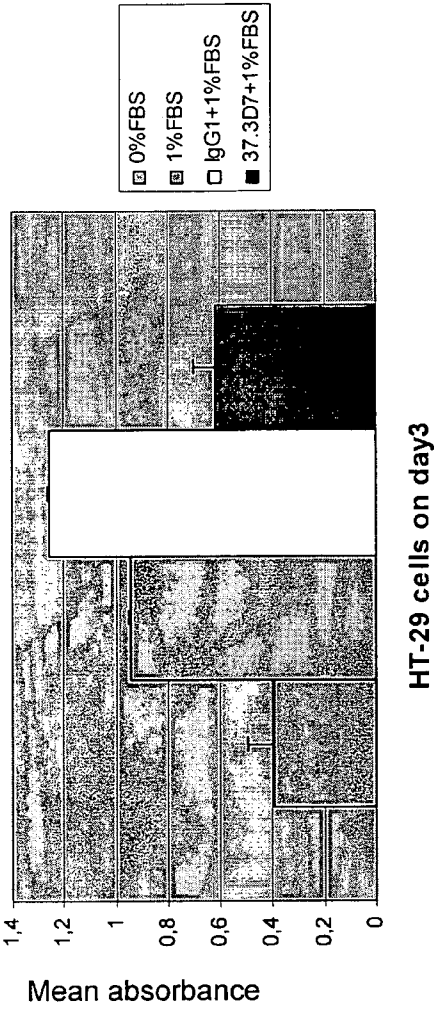


Fig. 9A

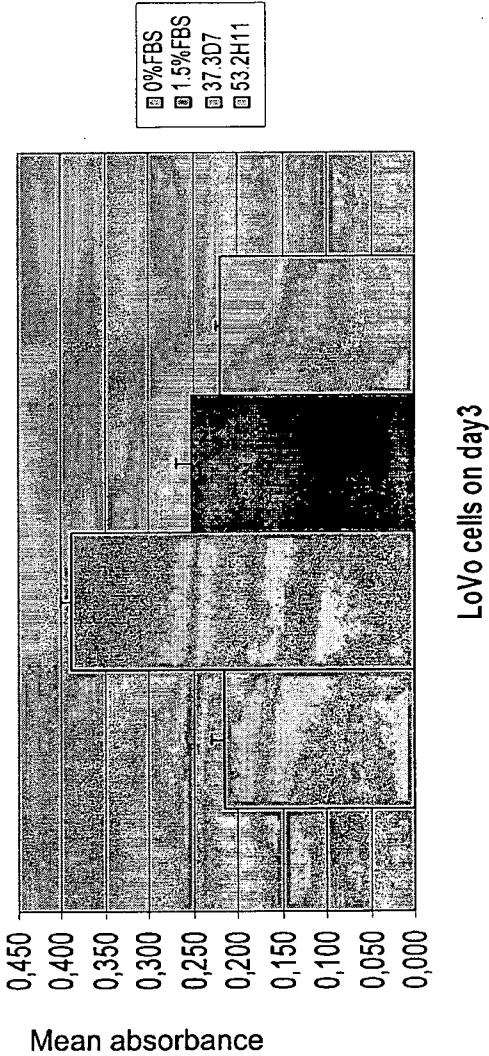


Fig. 9B

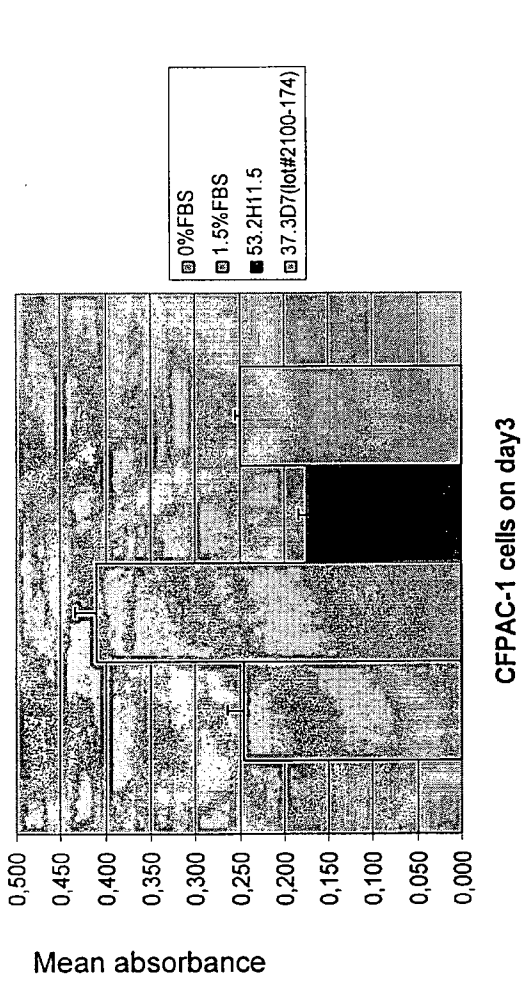


Fig. 9C

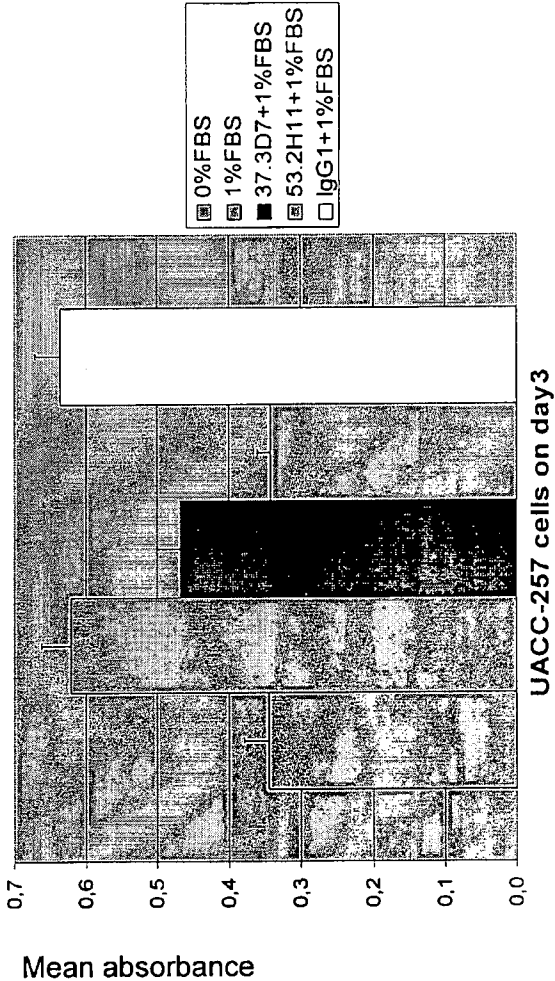
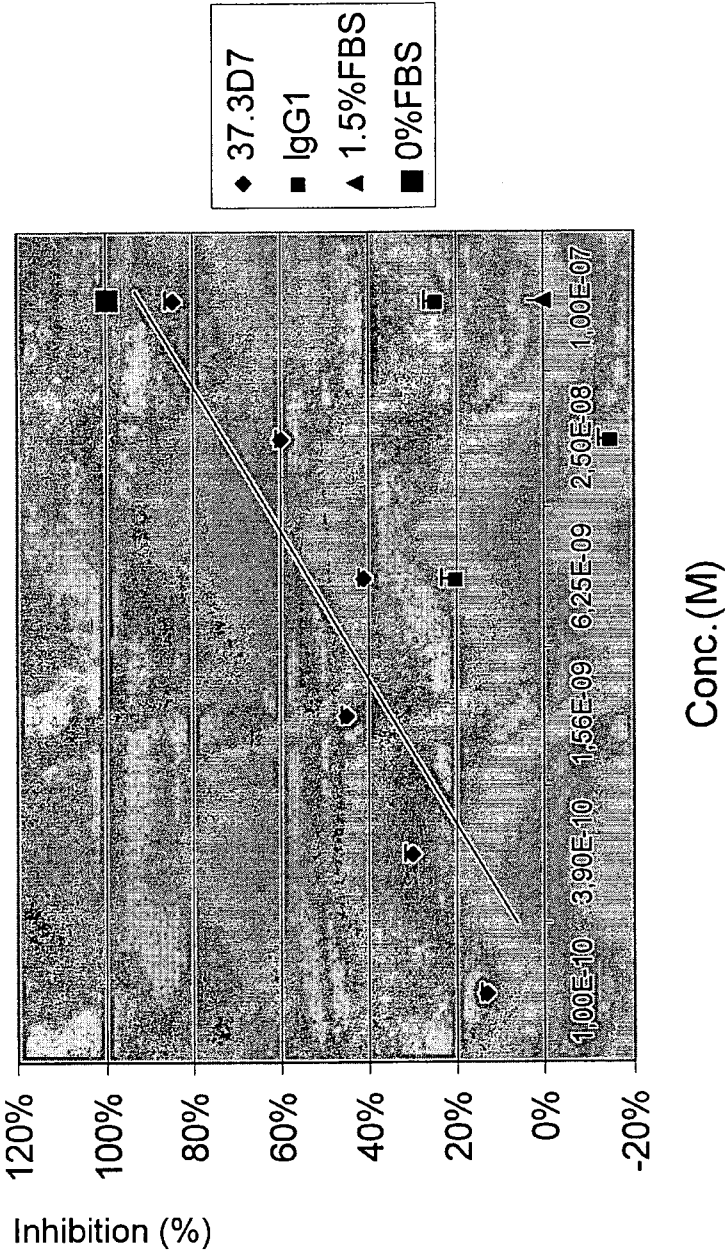


Fig. 9D

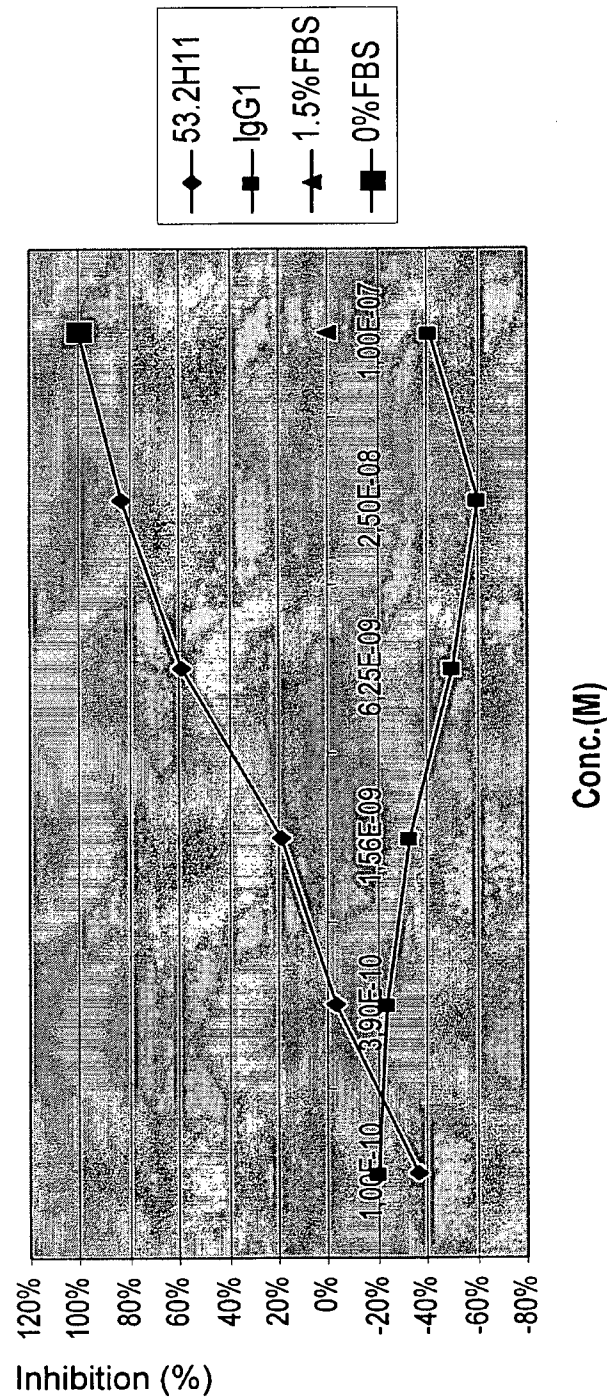
15/23

Fig. 10A



16/23

Fig. 10B



17/23

Fig. 10C

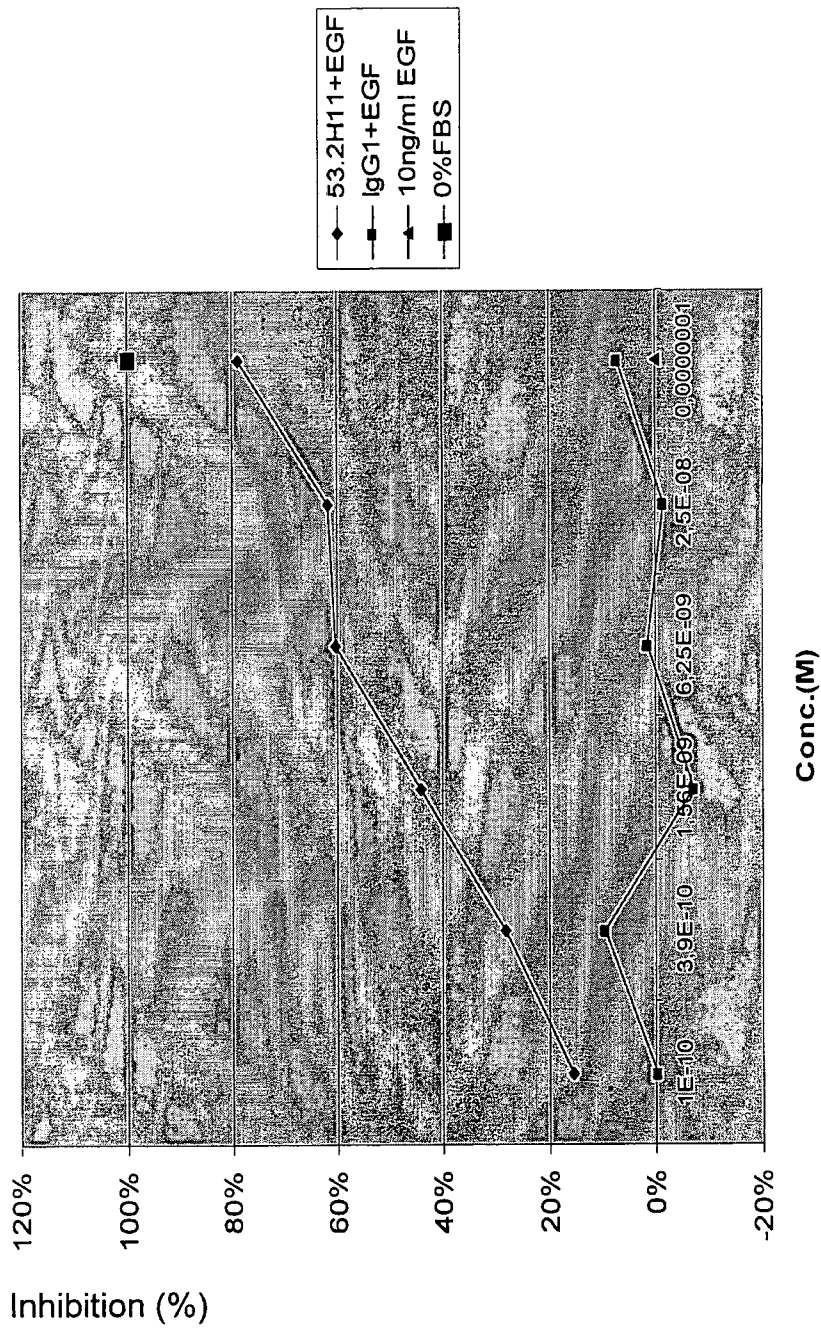


Fig. 11B

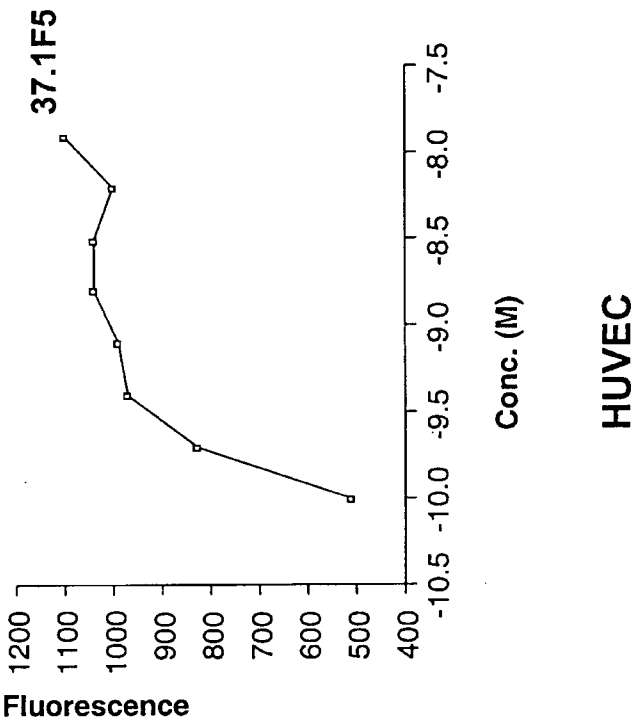
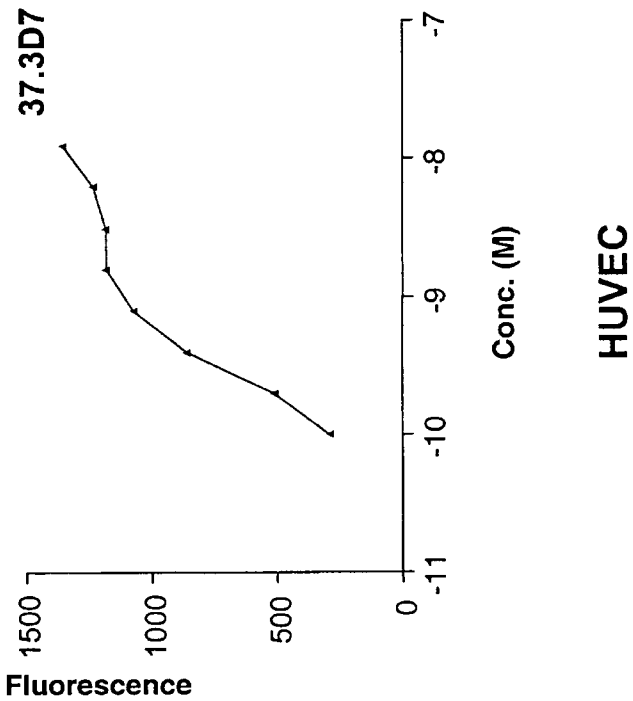


Fig. 11A



19/23

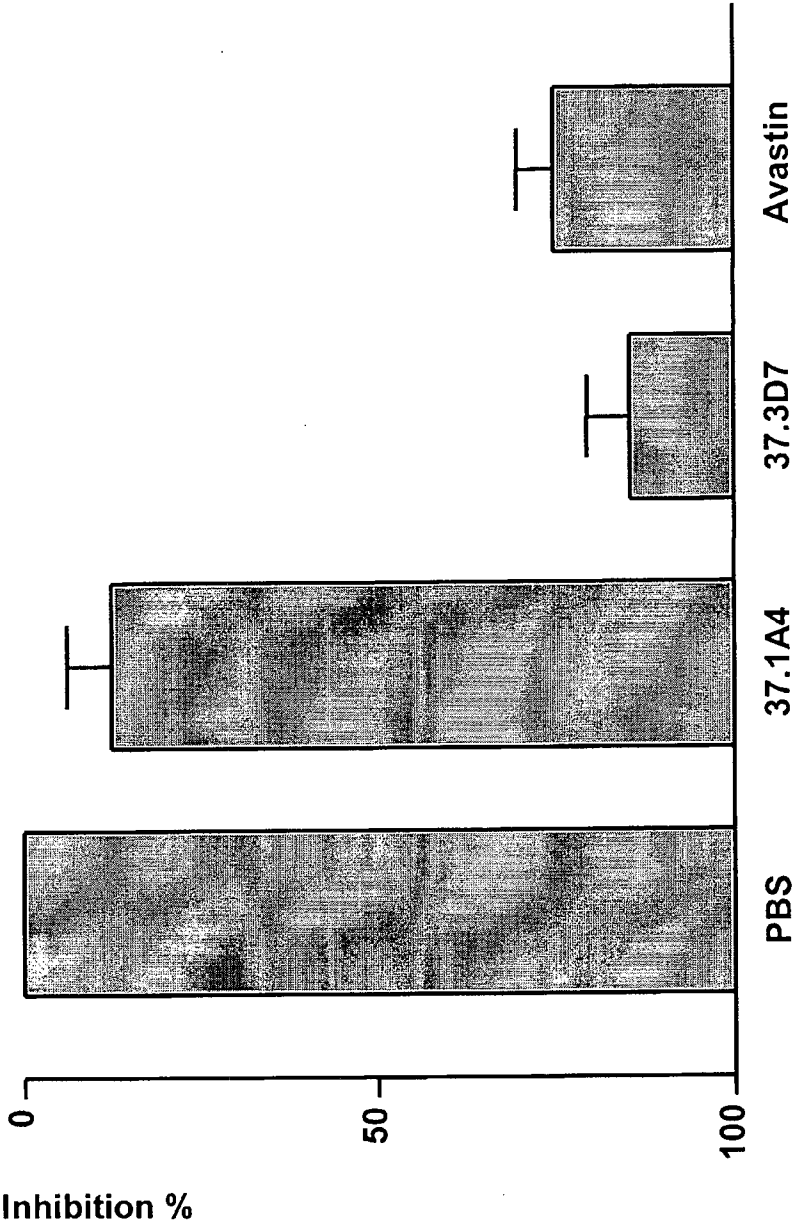


Fig. 12

20/23

Fig. 13

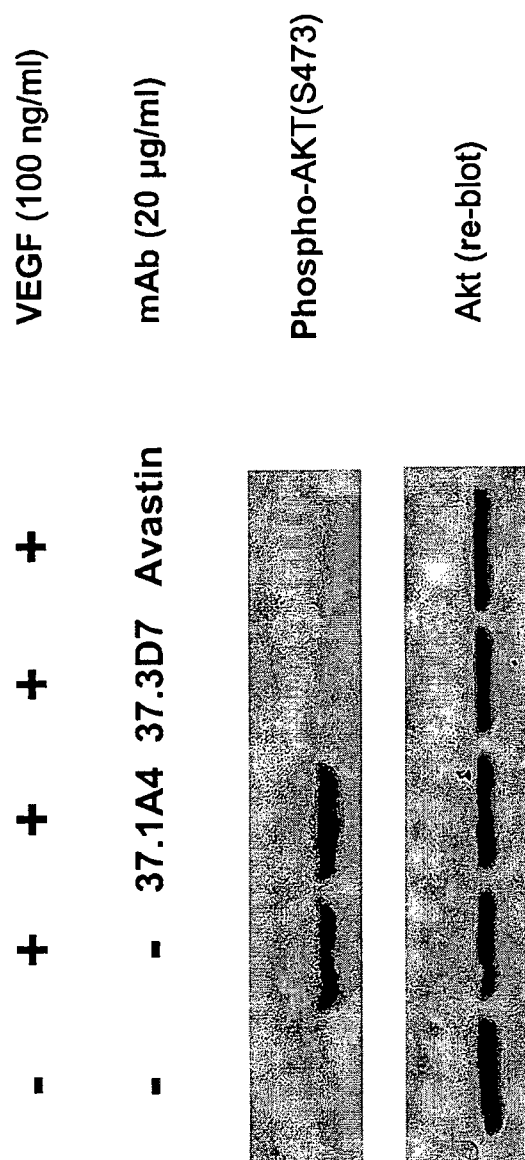
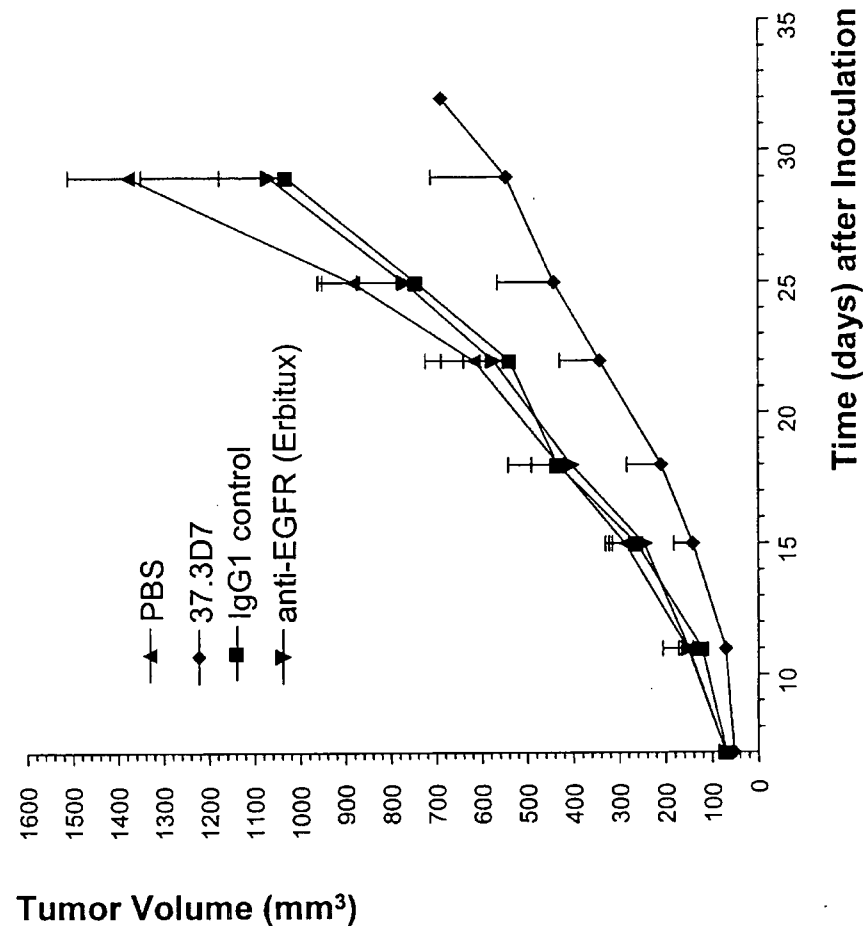


Fig. 14



22/23

Fig. 15B

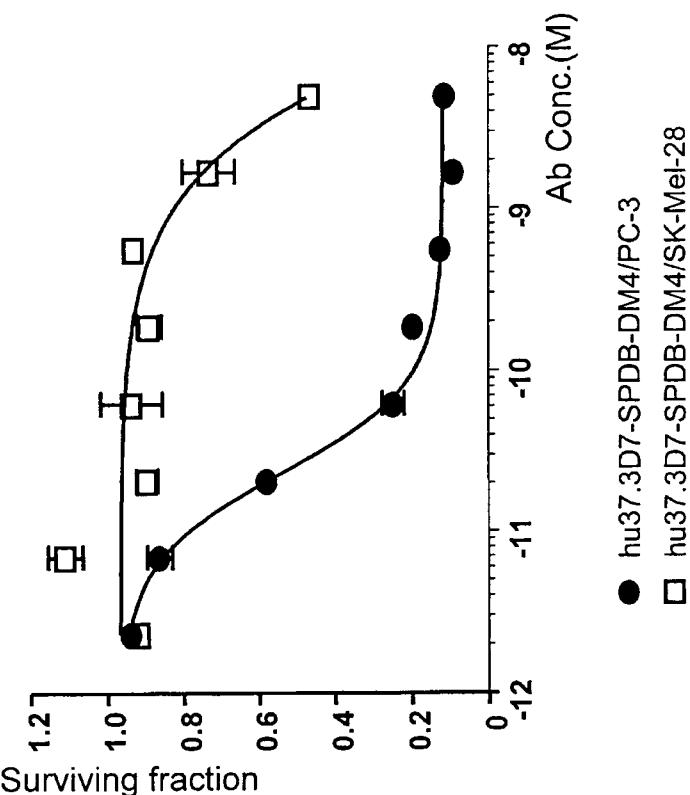
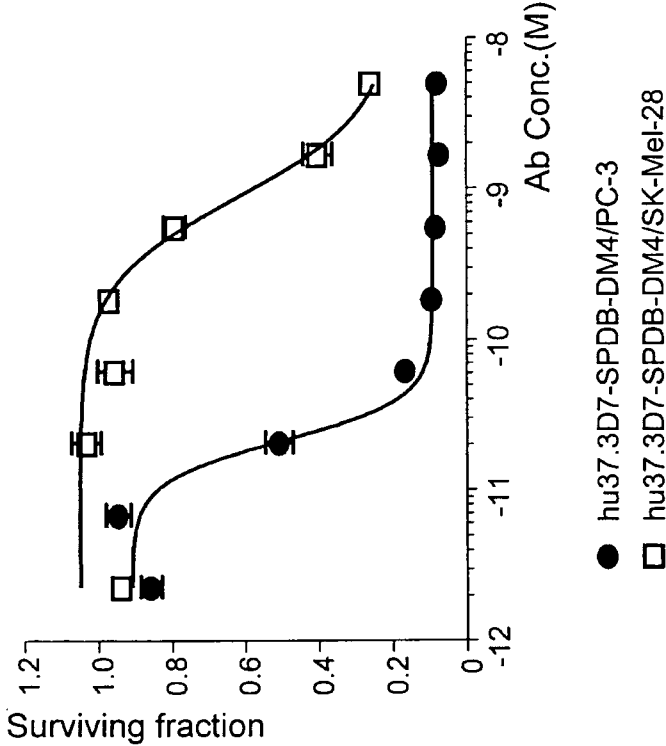


Fig. 15A



22

Fig. 16B

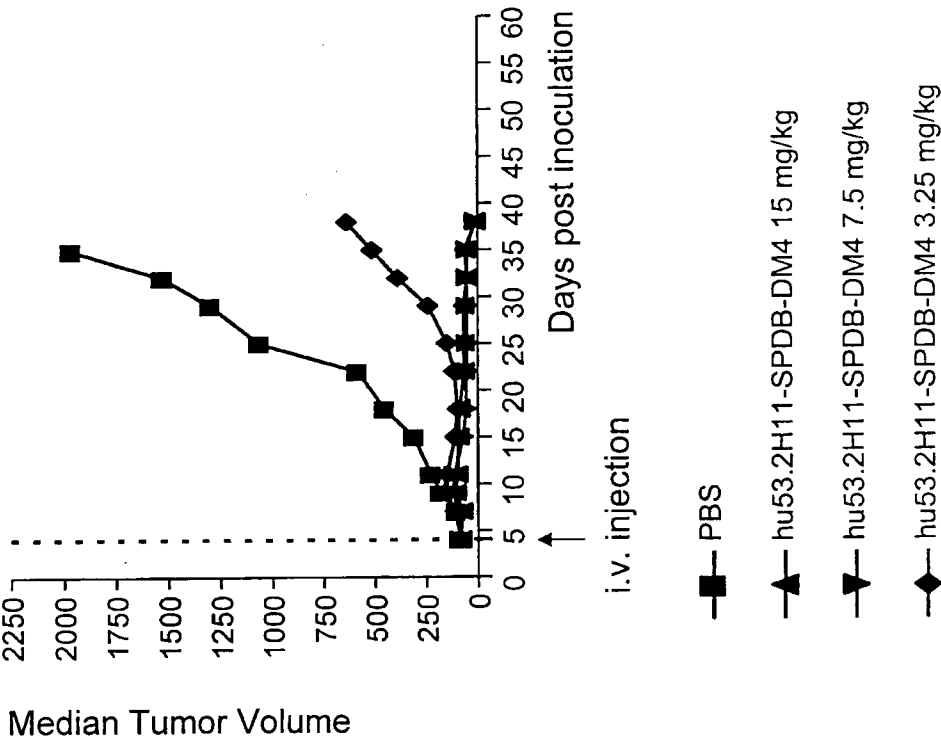
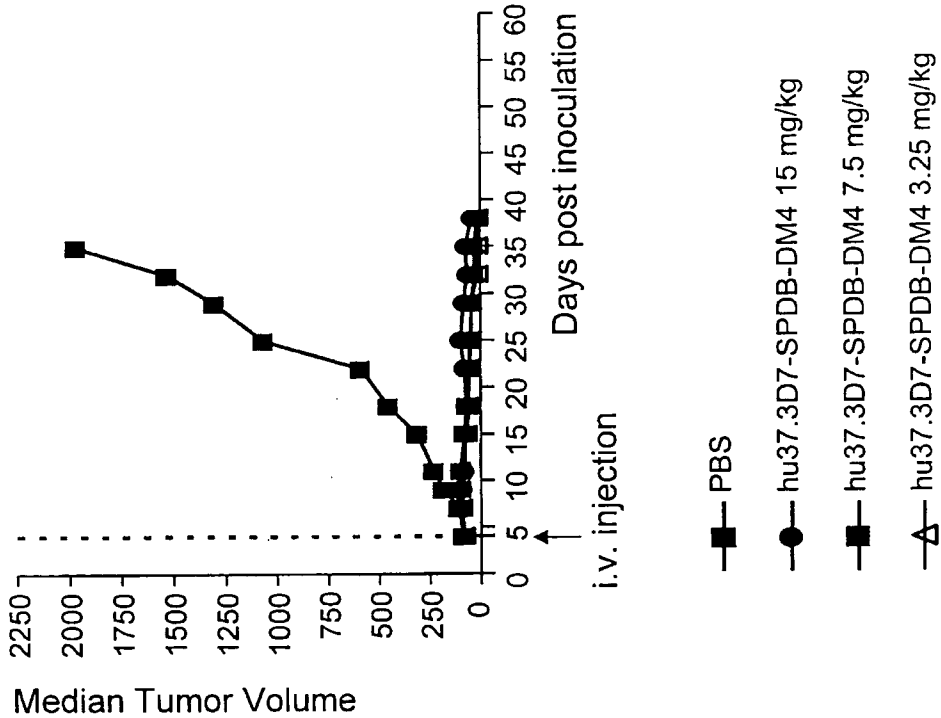


Fig. 16A



ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Sanofi-Aventis
Attn: Jiawen Han
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139

Deposited on Behalf of: Sanofi-Aventis, 174 Avenue de France, 75013 Paris, France

Identification Reference by Depositor:

Mouse Hybridoma: 37.3D7
Mouse Hybridoma: 37.1F5

Patent Deposit Designation

PTA-7660
PTA-7661

The deposits were accompanied by: ☒ a scientific description, a proposed taxonomic description indicated above. The deposits were received June 16, 2006 by this International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested July 21, 2006. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Marie Harris
Marie Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: July 29, 2006

cc: Philippe Bouvet
Docket or Case No: FR2006/030

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Sanofi-Aventis
Attn: Jiawen Han
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139

Deposited on Behalf of: Sanofi-Aventis, 174 Avenue de France, 75013 Paris, France

Identification Reference by Depositor:

Patent Deposit Designation:

Mouse Hybridoma: 53.2H11

PTA-7662

The deposit was accompanied by: X a scientific description a proposed taxonomic description indicated above.

The deposit was received June 16, 2006 by this International Depository Authority and has been accepted.

AT YOUR REQUEST: X We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace it with living culture of the same.

The strain will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested July 26, 2006. On that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Marie Harris
Marie Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: July 29, 2006

cc: Philippe Bouvet
Docket or Case No: FR2006/030

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.**

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Immunogen, Inc.
ATTN: Jiawen Han Ph. D.
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139

Deposited on Behalf of: Sanofi-Aventis, Paris, France

Identification Reference by Depositor:
Mouse hybridoma cell line: EphA2-N1
Mouse hybridoma cell line: EphA2-N2

Patent Deposit Designation:
PTA-8407
PTA-8408

The deposits were accompanied by: ☒ a scientific description, a proposed taxonomic description indicated above.

The deposits were received May 3, 2007 by this International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

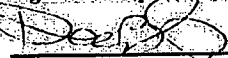
If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested May 25, 2007. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:



Dee Bishop, ATCC Patent Depository

Date: May 30, 2007

cc: Philippe Bouvet

Ref: Docket or Case #: FR2006/030

Applicant's or agent's file reference FR2006/030	International application No.
---	-------------------------------

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 4, line 28 TO 33	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, USA	
Date of deposit June 16, 2006	Accession Number PTA7660
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
Applicants request that availability to the deposited biological materials referred to in the instant application be effected only by the issue of a sample to an expert under Rule 13 bis.3 of the Regulations under the Patent Cooperation Treaty.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
For all designated States	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Applicant's or agent's file reference FR2006/030	International application No.
--	-------------------------------

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>4</u> , line <u>28 TO 33</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, USA	
Date of deposit June 16, 2006	Accession Number PTA7661
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
Applicants request that availability to the deposited biological materials referred to in the instant application be effected only by the issue of a sample to an expert under Rule 13 bis.3 of the Regulations under the Patent Cooperation Treaty.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
For all designated States	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Applicant's or agent's file reference FR2006/030	International application No.
---	-------------------------------

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>4</u> , line <u>28 TO 33</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, USA	
Date of deposit June 16, 2006	Accession Number PTA7662
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
Applicants request that availability to the deposited biological materials referred to in the instant application be effected only by the issue of a sample to an expert under Rule 13 bis.3 of the Regulations under the Patent Cooperation Treaty.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
For all designated States	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Applicant's or agent's file reference FR2006/030	International application No.
---	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 4 , line 28 TO 33	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, USA	
Date of deposit May 3 2007	Accession Number PTA8407
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
Applicants request that availability to the deposited biological materials referred to in the instant application be effected only by the issue of a sample to an expert under Rule 13 bis.3 of the Regulations under the Patent Cooperation Treaty.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
For all designated States	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Applicant's or agent's file reference FR2006/030	International application No.
---	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 4 , line 28 TO 33	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, USA	
Date of deposit May 3 2007	Accession Number PTA8408
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
Applicants request that availability to the deposited biological materials referred to in the instant application be effected only by the issue of a sample to an expert under Rule 13 bis.3 of the Regulations under the Patent Cooperation Treaty.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
For all designated States	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

237

<110> SANOFI-AVENTIS
<120> Antagonist antibody for the treatment of cancer.
<130> FR2006030 PCT
<150> EP 06291160.7
<151> 2006-07-18
<160> 80
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 1
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 2
Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Met
1 5 10 15

Asn

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 3
Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 4
Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 5
Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser
1 5

<210> 6
<211> 10

<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 6

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Gln Phe Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 7

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 8

Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 9

Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
1 5

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 10

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

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 11

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 12

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 13

Ala Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 14

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

Asp

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 17

Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 18

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Arg Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 363
 <212> DNA

<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 19
cag gtc caa ctg caa caa cct ggg tct gaa ctg gtg agg cct gga gct 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 20
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 354
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)

<400> 21
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct gga gct 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
tca atg aag att tcc tgc agg gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96
Ser Met Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
acc atg aac tgg gtg agg cag agc cat gga aag aac ctt gag tgg att 144
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
gga ctt att aat cct cac aat ggt ggt tct agc tac aac ctg aag ttc 192
Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe
50 55 60
aag ggc aag gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gag ctc ctc agt ctg aca tct gaa gac tct gca gtc tat tac tgt 288
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gta aga tgg ggt gac tac ggc tct ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336
Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
ctg gtc act gtc tct gca 354
Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 22
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 22
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 23
<211> 357
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 23
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
Glu Val Gln Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act gcc tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
20 25 30
tac atg cac tgg gtg aag caa agt cat gta aag agt ctt gag tgg att 144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
gga ctt gtt aat cct tac aat ggt ttt agt agc tac aac cag aat ttc 192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60
gag gac aag gcc agc ttg act gta gat aag ttc tcc agc acc gcc tac 240
Glu Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Phe Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gaa ctc cac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gca aga gaa ttc tac ggc tac cgg tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg 336
Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
100 105 110
acc gcg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 24
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 333
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(333)

<400> 25
caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cta ggg 48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

gaa cgg gtc acc atg acc tgc act gtc agc tca agt gtg aat tcc agt 96
Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
20 25 30

tac ttg cac tgg tac cag cag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg 144
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

att tat agc aca tcc aac ctg cct tct gga gtc cca gct cgc ttc agt 192
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc acc ata gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu
65 70 75 80

tct gaa gat gct gcc act tat tac tgt cac cag tat cat cgt tcc cca 288
Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
85 90 95

caa ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa cgg gct 333
Gln Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105 110

<210> 26
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

<400> 27
gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat act ttt 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30
ggc tat agt ttt ata tac tgg tac cag cag aag cca gga cag cca ccc 144
Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc 192
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
agg ttc agt gcc agt ggg tct agg aca gac ttc acc ctc acc att aat 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80
cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa agt aat 288
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95
gag gat cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg 336
Glu Asp Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 28

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

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

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

FR2006030 PCT.ST25.txt

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

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

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

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

<210> 29
<211> 339
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)

<400> 29
gat gtt gtg atg tcc cag att cca ctc act ttg tcg gtc acc att gga 48
Asp Val Val Met Ser Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc ata cat agt 96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30

gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct 144
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca aag cgc cta att tat ctg gtg tct aga ctg gac tct gga gtc cct 192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

tca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 336
Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

cgg 339
Arg

<210> 30
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 30
Asp Val Val Met Ser Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Arg

<210> 31
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<220>
<221> source
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (148)..(192)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (193)..(294)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (295)..(330)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (331)..(363)
<223> homo sapiens

<400> 31
cag gtt cag ctt gtc cag cct gga gct gaa gtg gta aag cca gga gcc
Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

48

FR2006030 PCT.ST25.txt

tct	gtg	aag	ctc	tct	tgt	aaa	gca	agc	ggc	tac	aac	ttc	acc	agc	tat	96
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Thr	Ser	Tyr	
			20					25					30			
tgg	atg	cac	tgg	gtg	cgt	cag	cgt	ccc	ggc	cag	gga	ctc	cag	tgg	ata	144
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Ile	
		35				40					45					
ggc	aac	atc	tac	ccc	ggc	acc	ggt	aat	aca	aac	tat	gac	cag	aag	ttc	192
Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Gly	Thr	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asp	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
caa	ggc	aag	gct	acc	ctt	aca	gtt	gac	acc	tct	acc	agc	act	act	tat	240
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Tyr	
	65				70				75						80	
atg	caa	ttg	tcc	agc	ctg	act	agc	gag	gat	tcc	gcc	gtg	tat	tat	tgt	288
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90					95			
gcc	agg	tgg	ggc	ctt	gtt	agg	tac	ttc	ttc	gct	atg	gat	tac	tgg	ggg	336
Ala	Arg	Trp	Gly	Leu	Val	Arg	Tyr	Phe	Phe	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	
			100					105					110			
cag	ggt	act	agc	gtt	aca	gtt	tcc	agt								363
Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120									

<210> 32
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 32

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Gly	Thr	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asp	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Tyr
	65				70				75						80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Trp	Gly	Leu	Val	Arg	Tyr	Phe	Phe	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 33
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Humanized antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<220>
<221> source
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (148)..(192)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (193)..(294)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (295)..(330)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (331)..(363)
<223> homo sapiens

<400> 33
cag gtg cag ctc gtc cag ccc ggt gcc gaa gtg gtg aaa ccc ggt gct 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Ser val Thr val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Humanized antibody

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<220>
 <221> source
 <222> (1)..(90)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> (91)..(105)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (106)..(147)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> (148)..(192)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (193)..(294)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> (295)..(330)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (331)..(363)
 <223> homo sapiens

<400> 35
 cag gtg cag ctg gtg cag ccc ggg gct gag gtg gta aag cca gga gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 agt gtg aag ttg tcc tgc aag gcc tcc ggg tac aat ttc acc tct tac 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 tgg atg cat tgg gtg cgt cag cgg cct ggg caa gga ctt caa tgg atc 144
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45
 ggg aat att tac ccc ggt acc ggc aat aca aat tat gat cag aag ttc 192
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc aag gct aca ttg acc gtg gat acc tac act tct act act tac 240
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80
 atg caa ctg agc tca ctg acc tcc gag gac tca gcc gtg tac tat tgc 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca cgc tgg gga ctc gtc agg tat ttc ttt gcc atg gat tac tgg gga 336
 Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 cag ggg acc tct gtc acc gtg agc agt 363
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 36
 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Thr Ser Thr Thr Tyr

65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>	37
<211>	118
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Humanized antibody

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210>	38
<211>	118
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Humanized antibody

<400> 38

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

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

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

35

40

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> source
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

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

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

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

<220>
<221> source
<222> (325)..(357)
<223> homo sapiens

<400> 39
cag gtg caa ctg gtg caa tcc ggt gcc gag gtc gtc aaa ccc gga gca
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

48

FR2006030 PCT.ST25.txt

tct	gtg	aag	ata	tcc	tgt	aag	gcc	tcc	ggc	tac	act	ttt	aca	gcc	tac	96
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ala	Tyr	
		20						25					30			
tat	atg	cat	tgg	gtt	aaa	cag	agt	ccc	gtg	cag	tcc	ctg	gaa	tgg	atc	144
Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Val	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
ggc	ttg	gtg	aac	cct	tat	aac	gga	ttc	tca	agt	tac	aat	caa	aag	ttt	192
Gly	Leu	Val	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Phe	Ser	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
cag	ggc	aag	gct	tcc	ctg	act	gta	gac	aag	agc	agt	tcc	aca	gcc	tac	240
Gln	Gly	Lys	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65				70				75						80	
atg	gag	ctc	cat	tca	ctg	aca	tca	gaa	gac	agc	gcc	gta	tac	tat	tgc	288
Met	Glu	Leu	His	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
gca	cgt	gag	ttc	tac	ggc	tat	aga	tac	ttt	gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggc	336
Ala	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
aca	gcc	gtc	aca	gtg	agc	tct										357
Thr	Ala	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115													
<210>	40															
<211>	119															
<212>	PRT															
<213>	Artificial															
<220>																
<223>	Synthetic Construct															
<400>	40															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1		5						10					15		
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ala	Tyr	
			20					25					30			
Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Val	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
Gly	Leu	Val	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Phe	Ser	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
Gln	Gly	Lys	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65				70				75						80	
Met	Glu	Leu	His	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Ala	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115													
<210>	41															
<211>	357															
<212>	DNA															
<213>	Artificial															

<220>
<223> Humanized antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> source
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

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

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

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

<220>
<221> source
<222> (325)..(357)
<223> homo sapiens

<400> 41	
cag gtc cag ttg gtg cag tct gga gca gag gtt gtg aaa cca ggc gca	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
agt gtc aaa atc agc tgt aag gct agc gga tac tcc ttt aca gca tat	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr	
20 25 30	
tat atg cac tgg gtg aag cag agc cct gtt cag agc ctg gaa tgg atc	144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
ggg ctc gtc aac cct tat aat gga ttt tct tct tat aac caa aag ttc	192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc aaa gcc agc ctg aca gtg gat aag agt agc agc act gcc tat	240
Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gaa ctg cat tct ctc acc tct gaa gat agt gca gtg tac tat tgt	288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gct cgc gag ttc tac ggt tat cga tat ttc gac gtg tgg ggc cag ggt	336
Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
act gcc gtg aca gta agc agt	357
Thr Ala Val Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized antibody

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> source
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> source
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> source
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

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

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

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

<220>
<221> source
<222> (325)..(357)
<223> homo sapiens

<400> 44	
cag gtt caa ctg gtt cag agt ggg gca gaa gtc gta aag ccc gga gct	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tcc gtt aag att agc tgt aaa gcc tcc ggc tat agc ttt aca gct tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr	
20 25 30	
tat atg cac tgg gtc aag caa tct cct ggg cag agc ctg gag tgg atc	144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
ggc ctg gtc aat cca tac aat ggc ttc tct agt tac aac caa aaa ttt	192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag gga aaa gcc tcc ctt aca gta gac aag tca tct tcc act gcc tac	240
Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	

FR2006030 PCT.ST25.txt
75

[illegible]

<210>	45
<211>	119
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210>	46
<211>	330
<212>	DNA
<213>	Artificial

<220>
<223> Humanized antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(330)

```
<220>
<221> source
<222> (1)..(71)
<223> homo sapiens
```

$\langle 220 \rangle$

FR2006030 PCT.ST25.txt

<221> source
 <222> (72)..(105)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (106)..(150)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> (151)..(171)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (172)..(269)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> (270)..(299)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (300)..(330)
 <223> homo sapiens

<400> 46
 gag atc gtt ctc aca cag tca cca gcc acc atg agc gcc tct ccc ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa cga gtg acc atg act tgt aca gta tcc tcc tct gtg aac tct tct 96
 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
 20 25 30
 tac ctg cat tgg tac cag cag aag cct ggt tcc agc ccc aaa ctc tgg 144
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45
 atc tac agt aca agc aat ctg ccc tca ggc gtt ccc gct agg ttc tcc 192
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 ggt tca ggt tct ggc act agt tac tct ctg acc atc agc acc atc gaa 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu
 65 70 75 80
 tcc gaa gat gct gca aca tac tac tgt cac cag tat cac agg tcc ccc 288
 Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95
 cag ttt aca ttc ggt ggc ggc acc aaa ctt gag att aag cgt 330
 Gln Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 47
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 47
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
 20 25 30

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

<210> 48
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized antibody
<400> 48

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

<210> 49
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized antibody
<400> 49

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

FR2006030 PCT.ST25.txt

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

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

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

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

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

<210> 50
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Humanized antibody

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

<210> 51
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Humanized antibody

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<220>
 <221> source
 <222> (1)..(69)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> (70)..(117)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (118)..(162)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> (163)..(183)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (184)..(279)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> (280)..(306)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> source
 <222> (307)..(339)
 <223> homo sapiens

<400> 51
 gac gtc gtg atg aca caa acc cct ctg tcc ctg agc gtc act ctg gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 caa ccc gct tcc att agc tgc aaa tca tca caa tct ctg atc cac tca 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
 20 25 30
 gac ggc aaa aca tac ctc aat tgg ctg ctg cag aga cca gga cag tcc 144
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 cct aaa agg ctt atc tac ctg gtc tct cgt ttg gac tct ggt gta cca 192
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 gac cgg ttt act ggt tcc ggg gcc gga acc gat ttc act ctg aag att 240
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 tcc agg gtg gaa gct gaa gat ctc gga gtg tat tat tgc tgg cag ggc 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 agc cat ttc ccc cgt act ttt ggt ggg ggt acc aaa ttg gaa att aag 336
 Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 cgt 339
 Arg

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

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 52
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly

15FR2006030 PCT.ST25.txt105

1202530

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100105110

Arg

<210> 53<211> 36<212> DNA<213> Mus sp.

<400> 53ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt tttggc36

<210> 54<211> 32<212> DNA<213> Mus sp.

<400> 54ggaggatccc ttgaccaggc atcctagagt ca32

<210> 55<211> 32<212> DNA<213> Mus sp.

<220> misc_feature<221> (1)..(32)<222> mixed bases are defined as follows: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T<223> n is a, c, g, or t

<400> 55cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc32

<210> 56<211> 35<212> DNA<213> Mus sp.

<220> misc_feature<221> (18)..(18)<222> n is a, c, g, or t<223> n is a, c, g, or t

<400> 56
cttcggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg

35

<210> 57
<211> 31
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> mixed bases are defined as follows: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K=
G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 57
ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a

31

<210> 58
<211> 46
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 58
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tggtgc

46

<210> 59
<211> 23
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 59
gacagacaca ctctgctat ggg

23

<210> 60
<211> 32
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> mixed bases are defined as follows: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K=
G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 60
gcagaattca tgggatggag cyggatcttt ct

32

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 61

Glu Tyr Asn Met His
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 62

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

Asn

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 63

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

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 64

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

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 65

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 66

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 67

Asp Tyr Asn Met His
1 5

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 68

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

Asn

<210> 69
<211> 10

<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 69

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

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 70

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 71

Ile Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 72

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 73
<211> 360
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 73	
gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gac ctg gtg aaa cct ggg gcc	48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct gga tac aga ttc act gaa tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Glu Tyr	
20 25 30	
aat atg cac tgg atg aag cag agc cat gga gag agc ctt gag tgg att	144
Asn Met His Trp Met Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga tat att tat cct tac aat ggt gat act ggc tac agg cag aaa ttc	192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe	
50 55 60	
aag aac atg gcc aca ttg act gca gac att tcc tcc aat aca gcc tac	240
Lys Asn Met Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gaa ctc cgc agc ctg aca tct gac gac tct gca gtc tat ttc tgt	288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	

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

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

<210> 74
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 75
<211> 357
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 75 48
gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gag ctg gtg aaa cct ggg gcc
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

FR2006030 PCT.ST25.txt

aag aac aag gcc aca ttg act gta gac act tcc tcc agc aca gcc tac 240
Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gag gtc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt 288
Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
gca agg gga tat tac tac ggt agg cac ttt gac tac tgg ggc caa ggc 336
Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
acc act ctc aca gtc tcc tca 357
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 76
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Phe Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

<400> 77
gac att gtg ctg acc caa tct cca ggt tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gac act tat 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
20 25 30
ggc aat agt ttc atg cac tgg tac cag cag aaa gca gga cag ccg ccc 144

FR2006030 PCT.ST25.txt

Gly	Asn	Ser	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Gln	Pro	Pro	
	35						40					45				
aga	ctc	ctc	atc	tat	cgt	gca	tcc	aac	cta	gaa	tct	ggg	atc	cct	gcc	192
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	
	50					55					60					
agg	ttc	agt	ggc	agt	ggg	tct	agg	aca	gac	ttc	acc	ctc	acc	att	aat	240
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	
	65				70				75					80		
cct	gtg	gag	gct	gat	gat	gtt	gca	acc	tat	tac	tgt	cag	caa	agt	aat	288
Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	
				85				90						95		
gag	gat	cct	ctc	acg	ttc	ggg	gct	ggg	acc	aag	ctg	gag	ctg	aaa	cgg	336
Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	
			100					105					110			

<210> 78
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 78

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Thr	Tyr
			20					25					30		

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

<210> 79
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

caa	att	gtt	ctc	acc	cag	tct	cca	gca	ctc	atg	tct	gca	tct	cca	ggg	48
Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	
1				5				10						15		
gag	aag	gtc	acc	atg	acc	tgc	agt	gcc	agc	tca	agt	gtg	agt	tac	atg	96
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	
			20					25				30				
tac	tgg	tac	cag	cag	aag	cca	aga	tcc	tcc	ccc	aaa	ccc	tgg	att	tat	144
Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Arg	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	

FR2006030 PCT.ST25.txt
45

35

40

atc	aca	tcc	aac	ctg	gct	tct	gga	gtc	cct	gct	cgc	ttc	agt	ggc	agt	192
Ile	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
50						55					60					
ggg	tct	ggg	acc	tct	tac	tct	ctc	aca	atc	agc	agc	atg	gag	gct	gaa	240
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	
65					70					75					80	
gat	gct	gcc	act	tat	tac	tgc	cag	cag	tgg	agt	agt	aac	cca	ccc	acg	288
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr	
				85					90					95		
ttc	gga	ggg	ggg	acc	aag	ctg	gaa	ata	aaa	cgg						321
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg						
			100					105								

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 80

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

ANTICUERPO ANTAGONISTA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales murinos nuevos anti-Eph o fragmentos de éstos, y versiones de éstos humanizadas o modificadas en superficie.

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

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

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Los receptores con actividad tirosina quinasa juegan un papel diverso en el crecimiento y diferenciación celular durante las repuestas fisiológicas normales y en la transformación oncogénica y la progresión tumoral. Los receptores Eph son una familia única de receptores con actividad tirosina quinasa (RTK), la más grande en el
- 25 genoma, que consiste en al menos 16 receptores que interaccionan con nueve ligandos efrina unidos a la membrana (Pasquale, E. B. *et al.*, 2005, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, 6: 462-475). Pueden dividirse en dos grupos, clase A y B, en base a la homología de secuencia y la afinidad de unión (Pasquale, E. B. *et al.*, 2005, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, 6: 462-475). La clase A de receptores Eph interacciona con
- 30 múltiples ligandos de la familia de la efrina A, un grupo de proteínas de membrana unidas por glicosil-fosfatidilinositol (GPI), mientras que la clase B de receptores Eph se unen a ligandos efrina B, una familia de proteínas transmembrana. La unión de los receptores Eph a sus ligandos induce la agrupación de los receptores, la activación de la actividad quinasa, y la trans-fosforilación posterior de los dominios citoplasmáticos

en restos tirosina, creando sitios de acoplamiento para varias proteínas de señalización (Kullander, K. y Klein, R., 2002, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, **3**: 475-486; Noren, N. K. y Pasquale, E. B., 2004, *Cell signal.*, **16**: 655-666).

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

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

Se ha mostrado que la fosforilación de EphA2 está asociada a su abundancia. El EphA2 fosforilado en tirosina se internaliza rápidamente y se degrada, mientras que el EphA2 no fosforilado muestra una velocidad de recambio reducida y, por lo tanto, se acumula en la superficie celular. Actualmente se cree que esta clase de modelo puede contribuir a la alta frecuencia de sobreexpresión de EphA2 en el cáncer (Landen, C. N. *et al.*, 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **9** (6): 1179-1187). Sin embargo, la realidad puede ser más compleja, ya que datos recientes parecen indicar que existe un papel para las funciones dependientes e independientes de la quinasa de EphA2 en la progresión tumoral (Fang W. B., 2005, *Oncogene*, **24**: 7859-7868).

Se han desarrollado anticuerpos agonistas que promueven la fosforilación en tirosina y

la internalización de EphA2, resultando finalmente en la inhibición del crecimiento de las células tumorales (Dodge-Zantek *et al.*, 1999, *Cell Growth & Differ.*, **10**: 629-638; WO 01/12172, WO 03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642). Estos anticuerpos están dirigidos
5 frente al dominio extracelular de EphA2. Debido a que estos anticuerpos agonistas no inhiben sino que estimulan la fosforilación del receptor EphA2 y las señales posteriores, estos anticuerpos pueden no ser eficaces en tumores que se aprovechan de la actividad quinasa de EphA2. Por otra parte, se ha propuesto la utilización de agentes antagonistas, incluyendo anticuerpos (WO 2004/092343), pero no se ha
10 descrito ningún anticuerpo antagonista en ese trabajo. Más aún, se propuso que dichos anticuerpos estimulan, en lugar de inhibir, la proliferación celular. La solicitud WO 2006/084226 describe anticuerpos que ni incrementan ni disminuyen la actividad quinasa de EphA2 pero que son capaces de impedir la proliferación de las células tumorales. Sin embargo, no existe ninguna indicación en ese trabajo de que estos
15 anticuerpos impidan la unión de efrinaA1 al receptor e inhiban la fosforilación de EphA2 inducida por efrinaA1. En lugar de esto, pueden influir en la proliferación de las células tumorales a través de un mecanismo totalmente diferente, por ejemplo, impidiendo la agrupación de los receptores posterior a la unión de efrinaA1. El experto en la técnica podría, por lo tanto, no haber concluido que estos anticuerpos son
20 antagonistas, sino que su mecanismo de acción no está claro.

Por lo tanto, existe una necesidad de anticuerpos nuevos antagonistas anti-EphA2, que se unan a los dominios extracelulares del receptor EphA2, inhibiendo su activación por el ligando efrina A1 e inhibiendo el crecimiento de las células tumorales dependiente de la quinasa de EphA2. Dichos anticuerpos antagonistas deberían ser
25 útiles para el tratamiento del cáncer.

COMPENDIO DE LA INVENCION

De acuerdo con esto, es un objeto de la invención proporcionar agentes que se unan específicamente a la clase A de los miembros de la familia de receptores Eph, tales como EphA2, y que inhiban la actividad celular del receptor antagonizando el receptor.
30 Así, la presente invención incluye anticuerpos o fragmentos de éstos que reconocen el receptor EphA2, preferiblemente humano, y que funcionan como antagonistas de dicho receptor.

El receptor EphA2 tiene una función en el desarrollo y crecimiento de tumores, y también se ha implicado en la metástasis. En algunas realizaciones, los anticuerpos de

la invención son capaces de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa. En algunas otras realizaciones, los anticuerpos de la invención son capaces de impedir la migración de células cancerosas metastásicas. En las realizaciones preferidas, la célula cancerosa es una célula de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en

5 cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial y cáncer pancreático, sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas. En otra realización, los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir la angiogénesis.

10 Mientras los anticuerpos anti-EphA2 descritos en la técnica anterior eran principalmente agonistas (por ejemplo, WO 03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642), esta invención engloba anticuerpos que reconocen dicho receptor y que tienen una actividad agonista mínima, o, preferiblemente, que carecen de cualquier actividad agonista frente al

15 receptor. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención no estimulan la fosforilación en tirosina de EphA2.

Los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir la unión de un ligando, preferiblemente efrina A1, al receptor EphA2. En algunas realizaciones, son capaces de inhibir la fosforilación en tirosina de EphA2. En otra realización, la fosforilación en

20 tirosina de EphA2 se inhibe mediante los anticuerpos de la invención incluso en presencia de efrinaA1. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden bloquear la señalización mediada por EphA2; en particular, son capaces de inhibir la fosforilación de Akt dependiente de EphA2.

Esta invención también proporciona anticuerpos que se unen al receptor EphA2 con

25 una K_D de $0,3 \times 10^{-9}$ M o menor.

Los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales. Los fragmentos que se unen al epítipo tales como los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, o Fv están incluidos en el alcance de esta invención. Se prefieren los anticuerpos anti-EphA2 monoclonales. En una realización más preferida, se proporcionan anticuerpos

30 murinos seleccionados de 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, que están totalmente caracterizados en la presente memoria con respecto a las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, secuencias de ADNc de los genes de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, identificación de sus CDR (regiones determinantes de la

complementariedad), identificación de sus aminoácidos de superficie, y medios para su expresión en forma recombinante. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales murinos anti-EphA2 37.3D7, 37.1F5, y 53.2H11, y EphA2-N1 y EphA2-N2 se han depositado bajo el Tratado de Budapest el 16 de junio, 2006 y el 3 de mayo, 5 2007, respectivamente, en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EEUU, con los números de registro PTA-7660, PTA-7661, PTA-7662, PTA-8407, y PTA-8408, respectivamente.

La presente invención incluye el anticuerpo monoclonal murino anti-EphA2 seleccionado de 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y EphA2-N2, y versiones 10 modificadas en superficie o humanizadas de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y EphA2-N2 en los que los restos expuestos en la superficie de los marcos de la región variables de los anticuerpos, o sus fragmentos de unión al epítipo, se han reemplazado tanto en las cadenas ligeras como pesadas, para hacerlos más semejantes a superficies conocidas de anticuerpos humanos. Los anticuerpos 15 humanizados y los fragmentos de éstos de unión al epítipo de la presente invención presentan propiedades mejoradas ya que son menos inmunogénicos (o totalmente no inmunogénicos) que las versiones murinas en sujetos humanos a los que se administran. Así, las diferentes versiones de los anticuerpos humanizados 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2 y los fragmentos de éstos de unión al 20 epítipo de la presente invención reconocen específicamente el receptor EphA2 y no son inmunogénicos para un ser humano.

Las versiones humanizadas de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y EphA2-N2 de la presente invención están completamente caracterizadas en la presenta memoria respecto a sus secuencias de aminoácidos respectivas de las 25 regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, secuencias de ADN de los genes de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, identificación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), identificación de sus restos de aminoácidos de superficie del marco de la región variable, y descripción de un medio para su expresión en forma recombinante.

30 Esta invención también contempla la utilización de conjugados entre conjugados citotóxicos que comprenden (1) un agente de unión a células que reconoce y se une al receptor EphA, tal como el receptor EphA2, y (2) un agente citotóxico. En los conjugados citotóxicos, el agente de unión a células tiene una alta afinidad por el receptor EphA (por ejemplo, el receptor EphA2) y el agente citotóxico tiene un alto 35 grado de citotoxicidad para las células que expresan el receptor EphA, de manera que

los conjugados citotóxicos de la presente invención forman agentes tóxicos eficaces.

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

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

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

La presente invención también incluye un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el receptor EphA2. En las realizaciones preferidas, el método para inhibir el crecimiento de la célula que expresa el receptor EphA2 se produce *in vivo* y resulta en la muerte de la célula, aunque también se incluyen las aplicaciones *in vitro* y *ex vivo*.

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

La presente invención incluye además un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer utilizando la composición terapéutica. En algunas realizaciones, el cáncer es un

cáncer metastásico. En particular, la célula cancerosa es una célula de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial y cáncer pancreático, sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas. En las realizaciones preferidas, el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo anti-EphA2 y un agente citotóxico. En las realizaciones más preferidas, el conjugado citotóxico comprende un conjugado anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y EphA2-N2-DM1, anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y EphA2-N2-DM4, un conjugado anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y EphA2-N2-taxano, o un conjugado anticuerpo humanizado 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y EphA2-N2-derivado de tomaimicina, y el conjugado se administra junto con un vehículo o excipientes aceptables farmacéuticamente.

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

La presente invención también incluye un kit que comprende un anticuerpo anti-EphA2 o un conjugado anticuerpo anti-EphA2-agente citotóxico e instrucciones para su utilización. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-EphA2 son los anticuerpos humanizados 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y EphA2-N2, el agente citotóxico es un compuesto maitansina, tal como DM1 o DM4, un taxano, un derivado de leptomicina, o un derivado de tomaimicina, y las instrucciones son para utilizar los conjugados en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer. El kit también puede incluir componentes necesarios para la preparación de una formulación aceptable farmacéuticamente, tal como un diluyente si el conjugado está en estado liofilizado o en forma concentrada, y para la administración de la formulación.

A no ser que se indique otra cosa, todas las referencias y patentes citadas en la presente memoria se incorporan por referencia.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

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

La Fig. 2 muestra la unión específica del anticuerpo purificado 37.3D7 a células de

cáncer pancreático humano BxPC3, células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, y células de cáncer de colon humano HT-29. Se muestran los histogramas del análisis FACS.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La Fig. 10A muestra la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento estimulado

por suero de células pancreáticas BxPC3 por el anticuerpo 37.3D7.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En la presente memoria se proporcionan nuevos agentes capaces de unirse específicamente a los receptores EphA y antagonizar dichos receptores. En particular, los presentes inventores han descubierto nuevos anticuerpos que se unen específicamente a los receptores EphA en la superficie celular. Mientras que los anticuerpos conocidos previamente que se unen específicamente al receptor EphA también lo activan incluso en ausencia de sus ligandos, los anticuerpos o fragmentos de la presente invención preferiblemente carecen de cualquier actividad agonista. Por otra parte, presentan la capacidad única de inhibir las funciones celulares del receptor

incluso en presencia de sus ligandos, una característica de la que carecen totalmente los anticuerpos que se unen a EphA2 conocidos previamente. Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antagonistas de la presente invención inhiben el crecimiento y/o la migración de células tumorales humanas, y/o la angiogénesis, tres
5 propiedades que no se podían prever a la vista de la técnica anterior (Landen, C. N. *et al.*, 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **9** (6): 1179-1187; WO 01/12172; WO 2004/014292; WO 2004/092343).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "receptor Eph" se refiere a una tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores Eph (revisado en
10 Pasquale, E. B. *et al.*, 2005, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, **6**, 462-475). La "clase A de la familia de receptores Eph" o "receptores EphA" tal y como se utiliza en la presente memoria interaccionan preferiblemente con ligandos unidos por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (de la subclase A de efrina, que comprende actualmente cinco ligandos). Los receptores EphA específicos incluyen: EphA1 (también
15 denominado Eph y Esk); EphA2 (también denominado Eck, mEck, Myk2, Sek2); EphA3 (también denominado Hek, Mek4, Tyro4 y Cek4); EphA4 (también conocido como Hek8, Sek1, Tyrol, y Cek8); EphA5 (también denominado Hek7, Bsk, Ehk1, Rek7 y Cek7); EphA6 (también denominado mEhk2 y Ehk2); EphA7 (también denominado Hek11, Mdk1, Ebk, Ehk3); y EphA8 (también denominado Eek y mEek) y
20 variantes naturales de éstos. El receptor Eph preferido en la presente memoria es el "receptor EphA2", que comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos como en los números de registro de Genbank NM_004431 (EphA2 humano), NM_010139 (EphA2 murino), o NXM_345596 (EphA2 de rata). El término "ligando Eph" tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína que se une a, y
25 opcionalmente activa (por ejemplo, estimula la autofosforilación de), un receptor Eph. Un ligando Eph preferido es "efrinaA1", que se une al receptor EphA2 y comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos como en el registro de Genbank NM_004428 (efrinaA1 humana).

El término "antagonista" tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una
30 molécula que es capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de una molécula diana, tal como un receptor EphA. Los antagonistas pueden actuar interfiriendo en la unión de un receptor a un ligando y viceversa, disminuyendo la fosforilación de EphA2, y/o incapacitando o matando a las células que han sido activadas por un ligando. El antagonista puede bloquear completamente las
35 interacciones receptor-ligando o puede reducir sustancialmente dichas interacciones.

Todos estos puntos de intervención de un antagonista deben considerarse para los propósitos de esta invención. Así, en el alcance de la invención están incluidos antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen al receptor EphA, al ligando Eph o a un complejo de un receptor Eph y un ligando Eph; variantes o derivados de la secuencia de aminoácidos de un receptor EphA o ligando EphA que antagonizan la interacción entre un receptor EphA y un ligando EphA; receptor EphA soluble o ligando EphA soluble, opcionalmente fusionado con una molécula heteróloga tal como una región de inmunoglobulina (por ejemplo, una inmunoadhesina); un complejo que comprende un receptor EphA en asociación con un ligando EphA; secuencias peptídicas sintéticas o nativas que se unen al receptor EphA o al ligando EphA.

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

Así, en una realización preferida la presente invención proporciona, entre otras características, anticuerpos monoclonales anti-EphA, anticuerpos humanizados anti-EphA, y fragmentos de los anticuerpos anti-EphA. Cada uno de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención, se diseña para reconocer y unirse específicamente al receptor EphA2, y actúa como un antagonista del receptor EphA2. Más aún, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antagonistas de la invención tienen las propiedades únicas de ser capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales humanas, y/o la migración de células cancerosas metastásicas, y/o la angiogénesis.

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

El receptor EphA2 pertenece a una familia de receptores en los que, después de la unión del ligando, se incrementa la fosforilación de su cola citoplásmica para interactuar con varias proteínas adaptadoras y señalizadoras, lo que da lugar a la activación de diferentes rutas de señalización celular posteriores (Kullander, K. y Klein, R., 2002, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, **3**: 475-486; Noren, N. K. y Pasquale, E. B.,

2004, *Cell signal.*, **16**: 655-666). Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "señalización mediada por EphA2" se refiere a todos los eventos celulares que se producen en respuesta a la unión del ligando a EphA2. Mientras que los anticuerpos descritos en la técnica anterior actúan como agonistas del receptor

5 EphA2, y, en particular, incrementan la fosforilación en tirosina de la proteína EphA2, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención carecen preferiblemente de cualquiera de dichas propiedades agonistas. En particular, son incapaces de estimular la fosforilación de EphA2 por sí mismos.

Por otra parte, esta invención proporciona los primeros anticuerpos anti-EphA2

10 ~~antagonistas reales~~. En una realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos ~~de la invención pueden inhibir la unión de un ligando a un receptor EphA~~. En una realización preferida, se impide la unión de efrinaA1 a EphA2 mediante los anticuerpos y fragmentos de éstos proporcionados por esta invención. De manera extraordinaria, en otra realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención son

15 capaces de inhibir la fosforilación en tirosina del receptor EphA2, incluso en presencia de efrinaA1. Más aún, dichos anticuerpos y fragmentos de éstos son capaces de inhibir la señalización mediada por EphA2. En particular, puede evitarse la fosforilación de Akt dependiente de efrinaA1 por los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención.

20 **Anticuerpos**

El término "anticuerpo" se utiliza en la presente memoria en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa) de cualquier isotipo tal como IgG, IgM, IgA, IgD, e

25 IgE, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, y fragmentos de anticuerpos. Un anticuerpo reactivo con un antígeno específico puede generarse mediante métodos recombinantes tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores fagos o similares, o mediante inmunización de un animal con el antígeno o un ácido nucleico que codifica el antígeno.

Un anticuerpo típico está comprendido por dos cadenas pesadas idénticas y dos

30 cadenas ligeras idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable. Cada región variable contiene tres segmentos denominados "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR") o "regiones hipervariables", que son las principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Se refieren habitualmente como

CDR1, CDR2, y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N terminal. Las partes más altamente conservadas de las regiones variables se denominan "regiones marco".

- Tal y como se utiliza en la presente memoria, "V_H" o "VH" se refiere a la región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab', o F(ab')₂. La referencia a "V_L" o "VL" se refiere a la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena ligera de un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab', o F(ab')₂.
- 10 Un "anticuerpo policlonal" es un anticuerpo que se ha producido entre o en presencia de uno o más, anticuerpos no idénticos diferentes. En general, los anticuerpos policlonales se producen a partir de un linfocito B en presencia de otros muchos linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Habitualmente, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente de un animal inmunizado.
- 15 Un "anticuerpo monoclonal", tal y como se utiliza en la presente memoria, es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que forman esta población son esencialmente idénticos excepto por mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades muy pequeñas. Estos anticuerpos están dirigidos frente a un
- 20 único epítopo y son, por lo tanto, altamente específicos.
- Un "epítopo" es el sitio en el antígeno al que se une un anticuerpo. Puede estar formado por restos contiguos o por restos no contiguos que se aproximan mucho por el plegamiento de una proteína antigénica. Los epítopos formados por aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes,
- 25 mientras que los epítopos formados por aminoácidos no contiguos se pierden típicamente bajo dicha exposición.
- Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "K_D" se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo/antígeno particular.
- La presente invención se realiza a partir de anticuerpos murinos anti-EphA2, en la presente memoria 37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, que están
- 30 completamente caracterizados con respecto a las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada, identificación de las CDR, identificación de los aminoácidos de superficie, y medios para su expresión en forma recombinante. Las secuencias primarias de aminoácidos y ADN de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos

37.3D7; 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1; y EphA2-N2, y de las versiones humanizadas, se describen en la presente memoria.

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

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

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

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

En una realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres
30 CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, y 6. En una realización aún más preferida, se proporciona un anticuerpo 37.3D7, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 1, 2, y 3, y dicha cadena ligera

comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 4, 5, y 6.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 7, 8, 9, 10, 11, y 12. En una realización aún más preferida, se proporciona un anticuerpo 37.1F5, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 7, 8, y 9, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 10, 11, y 12.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17, y 18. En una realización aún más preferida, se proporciona un anticuerpo 53.2H11, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 13, 14, y 15, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 16, 17, y 18.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, y 66. En una realización aún más preferida, se proporciona un anticuerpo EphA2-N1, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 61, 62, y 63, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 64, 65, y 66.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 67, 68, 69, 70, 71, y 72. En una realización aún más preferida, se proporciona un anticuerpo EphA2-N2, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 67, 68, y 69, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 70, 71, y 72.

En otra realización, los anticuerpos de la invención comprenden una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 20, 22, 24, 74 y 76. En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo 37.3D7 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID
5 NO 20. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo 37.1F5 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 22. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo 53.2H11 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID
10 NO 24. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo EphA2-N1 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 74. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo EphA2-N2 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 76.

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

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

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

el que la región variable, o una parte de ésta, está alterada, reemplazada, o intercambiada, de manera que la región constante está unida a la región variable de una especie diferente, o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo.

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

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

Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando varias técnicas diferentes incluyendo

injerto de CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de EEUU Nos. 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, *Molecular Immunology* **28**(4/5): 489-498; Studnicka G. M. *et al.*, 1994, *Protein Engineering* **7**(6): 805-814; Roguska M.A. *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**:969-973), e intercambio de cadenas (Patente de EEUU No. 5.565.332).
5 Los anticuerpos humanos pueden obtenerse mediante varios métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de exposición en fagos. Véanse también las Patentes de EEUU Nos. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806, y 5.814.318; y las publicaciones de solicitud de patente internacional números WO 98/46645, WO 98/50433, WO
10 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741 (dichas referencias se incorporan por referencia en su totalidad).

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

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

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

Las versiones humanizadas de los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1, y

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

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

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

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

células de la presente invención.

Por lo tanto, en una realización, esta invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmento de éste que se une al epitopo que comprende una o más CDR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:

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

10 13, 14, 15, 61, 62, 63, 67, 68, y 69, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 64, 65, 66, 70, 71, y 72. En una realización adicional preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que

15 dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 1, 2, y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 4, 5, y 6. En otra realización adicional preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y

20 al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 7, 8, y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 10, 11, y 12. En otra realización adicional preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que

25 dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14, y 15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17, y 18. En otra realización más preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y

30 al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 61, 62, y 63, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 64, 65, y 66. En

35 otra realización más preferida, los anticuerpos humanizados de la invención

comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 67, 68, y 69, y en el que dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 70, 71, y 72.

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

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

Los anticuerpos humanizados 37.3D7 y los fragmentos de éstos que se unen al epítipo de la presente invención también pueden incluir sustitución de los restos de aminoácidos de la cadena ligera y/o pesada en una o más posiciones definidas por los restos grises en la Tabla 1A y 1B que representan los restos de superficie del marco murino que se han cambiado del resto murino original al resto correspondiente de superficie del marco en el anticuerpo humano, 28E4. Los restos con asterisco (*) en la Tabla 1B corresponden a las retromutaciones murinas en las variantes humanizadas de la cadena pesada 37.3D7 (SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 36). Los restos de las retromutaciones están próximos a CDR y se eligieron como se describe en la patente

de EEUU No. 5.639.641 o de manera análoga a la selección de restos que han resultado, en intentos previos de humanización, en una disminución de la afinidad de unión al antígeno (Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.*;9(10): 895-904; publicaciones de solicitud de patente de EEUU 2003/0235582 y 2005/0118183).

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

Polinucleótidos, vectores y células anfitrionas

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

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

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

Con el fin de expresar la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos anti-EphA2 de la invención, los polinucleótidos que codifican dichas cadenas pesadas y/o ligeras se insertan en vectores de expresión de manera que los genes están unidos de manera operativa a secuencias de transcripción y traducción. Los vectores de expresión

incluyen plásmidos, YAC, cósmidos, retrovirus, episomas derivados de EBV, y todos los demás vectores que el experto en la técnica sabrá que son convenientes para asegurar la expresión de dichas cadenas pesadas y/o ligeras. El experto en la técnica se dará cuenta de que los polinucleótidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden clonarse en diferentes vectores o en el mismo vector. En una realización preferida, dichos polinucleótidos se clonan en el mismo vector.

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

Fragmentos de Anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos de longitud completa discutidos anteriormente, así como fragmentos que se unen al epítipo. Tal y como se utiliza en la presente memoria, "fragmentos de anticuerpo" incluyen cualquier parte de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo de longitud completa, denominados de manera general "fragmentos que se unen al epítipo". Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, Fab, Fab' y $F(ab')_2$, Fd, Fv de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, Fv unidos por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden una región V_L o V_H . Los fragmentos que se unen al epítipo, incluyendo los anticuerpos de cadena única, pueden comprender las regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: región bisagra, dominios C_H1 , C_H2 , y C_H3 .

Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento $F(ab')_2$. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpos contienen las seis CDR del anticuerpo completo, aunque también son funcionales los fragmentos que contienen menos de todas estas regiones tal como tres, cuatro o cinco CDR. Además, los fragmentos pueden ser o pueden combinar miembros de una cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de éstas.

Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ pueden producirse mediante degradación proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (fragmentos Fab) o pepsina (fragmentos $F(ab')_2$).

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

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

Los fragmentos de anticuerpos de cadena única pueden generarse mediante clonación
35 molecular, biblioteca de exposición de anticuerpos en fagos o técnicas similares muy

conocidas por el experto en la técnica. Estas proteínas pueden producirse, por ejemplo, en células eucariotas o células procariotas, incluyendo bacterias. Los fragmentos que se unen al epítipo de la presente invención también pueden generarse utilizando varios métodos de exposición en fagos conocidos en la técnica.

- 5 En los métodos de exposición en fagos, los dominios funcionales del anticuerpo se exponen en la superficie de las partículas del fago que contienen las secuencias de polinucleótido que las codifican. En particular, dicho fago puede utilizarse para exponer dominios que se unen al epítipo expresados de un repertorio o de una biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). Los fagos que expresan un
- 10 dominio que se une al epítipo que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse utilizando, por ejemplo, un antígeno marcado unido o capturado en una superficie o lecho sólido. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos incluyendo los dominios de unión de fd y M13 expresados a partir de fagos con los dominios del anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro
- 15 fusionados por recombinación con la proteína del fago del gen III o gen VIII.

Los ejemplos de métodos de exposición en fagos que pueden utilizarse para obtener los fragmentos que se unen al epítipo de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods*, **182**: 41-50; Ames *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods*, **184**: 177-186; Kettleborough *et al.*, 1994, *Eur. J. Immunol.*, **24**:952-

20 958; Persic *et al.*, 1997, *Gene* **187**: 9-18; Burton *et al.*, 1994, *Advances in Immunology*, **57**: 191-280; solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Pat. de EEUU Nos. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225;

25 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108; cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Después de la selección del fago, las regiones del fago que codifican los fragmentos pueden aislarse y utilizarse para generar los fragmentos que se unen al epítipo mediante expresión en un anfitrión elegido, incluyendo células de mamíferos, células

30 de insectos, células de plantas, levaduras, y bacterias, utilizando tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe con detalle más adelante. Por ejemplo, también pueden utilizarse técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.*, 1992, *BioTechniques*, **12**(6): 864-

35 869; Sawai *et al.*, 1995, *AJRI*, **34**: 26-34; y Better *et al.*, 1988, *Science*, **240**: 1041-

1043; incorporándose dichas referencias por referencia en su totalidad. Los ejemplos de técnicas que pueden utilizarse para producir Fv y anticuerpos de cadena única incluyen los descritos en las Pat. de EEUU Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, 1991, *Methods in Enzymology* **203**: 46-88; Shu *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 7995-7999; Skerra *et al.*, 1988, *Science*, **240**: 1038-1040.

Equivalentes Funcionales

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

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

Un anticuerpo quimérico es uno en el que diferentes partes de un anticuerpo se obtienen a partir de diferentes especies de animales. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable obtenida a partir de un anticuerpo monoclonal murino emparejada con una región constante de una inmunoglobulina humana. Los métodos

para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science*, **229**: 1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques*, **4**: 214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods*, **125**: 191-202; Pat. de EEUU Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

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

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

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud también incluyen anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos modificados mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, degradación proteolítica, unión a un ligando

celular u otra proteína, etc. La unión covalente no impide al anticuerpo generar una respuesta anti-idiotípica. Estas modificaciones pueden realizarse mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, degradación química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

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

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

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

Anticuerpos Mejorados

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

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

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

10 En estos estudios, se generaron equivalentes del anticuerpo primario cambiando las secuencias de los genes de la cadena pesada y ligera en las regiones CDR1, CDR2, CDR3, o marco, utilizando métodos tales como mutagénesis dirigida a sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis en casete, PCR tendente a error, transposición de secuencias de ADN, o cepas mutadoras de *E. coli* (Vaughan, T. J. *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 535-539; Adey, N. B. *et al.*, 1996, Capítulo 16, p. 277-291, en "*Phage Display of Peptides and Proteins*", Eds. Kay, B. K. *et al.*, Academic Press). Estos métodos para cambiar la secuencia del anticuerpo primario han resultado en
15 afinidades mejoradas de los anticuerpos secundarios (Gram, H. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 3576-3580; Boder, E. T. *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**: 10701-10705; Davies, J. y Riechmann, L., 1996, *Immunotechnology*, **2**: 169-179; Thompson, J. *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.*, **256**: 77-88; Short, M. K. *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.*, **277**: 16365-16370; Furukawa, K. *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.*, **276**: 27622-20 27628).

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

25 Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, y (4) confieren o modifican otras propiedades físico-químicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir varias muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica natural. Por
30 ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia natural (preferiblemente en la parte del polipéptido fuera del dominio o de los dominios que forman los contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia
35 parental (por ejemplo, un aminoácido de reemplazamiento no debe romper una hélice

que está presente en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructuras secundarias que caracterizan a la secuencia parental). Los ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica están descritos en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N. Y. (1991)); y Thornton *et al.*, 1991, *Nature*, **354**: 105, que se incorpora cada una en la presente memoria por referencia.

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

La presente invención también incluye conjugados citotóxicos. Estos conjugados citotóxicos comprenden dos componentes principales, un agente de unión a células y un agente citotóxico.

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

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

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

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

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

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

Agentes de Unión a Células

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

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

- 25
- anticuerpos policlonales;
 - anticuerpos monoclonales;
 - fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', y F(ab')₂, Fv (Parham, 1983, *J. Immunol.*, **131**:2895-2902; Spring *et al.*, 1974, *J. Immunol.*, **113**: 470-478; Nisonoff *et al.*, 1960, *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**: 230-244).
- 30 Preferiblemente, se utiliza un anticuerpo humanizado anti-EphA como el agente de unión a células de la presente invención. Más preferiblemente el anticuerpo humanizado anti-EphA se selecciona de anticuerpos humanizados o modificados en superficie 37.3D7, 37.1F5; 53.2H11; EphA2-N1 y EphA2-N2.

Agentes Citotóxicos

- En otra realización, el anticuerpo humanizado o un fragmento de éste que se une al epítipo puede conjugarse con un fármaco, tal como un maitansinoide o un derivado de tomaimicina, para formar un profármaco que tiene una citotoxicidad específica frente a
- 5 células que expresan el antígeno dirigiendo el fármaco hacia el receptor EphA2. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y un fármaco pequeño altamente tóxico (por ejemplo, maitansinoides, taxanos, derivados de tomaimicina, un derivado de leptomicina, CC-1065, y análogos de CC-1065) pueden utilizarse como un terapéutico para el tratamiento de tumores, tales como tumores de mama y de ovario.
- 10 El agente citotóxico utilizado en el conjugado citotóxico de la presente invención puede ser cualquier compuesto que resulta en la muerte de una célula, o induce la muerte celular, o de alguna manera disminuye la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, un profármaco, derivados de tomaimicina, taxoides, un derivado de leptomicina, CC-1065
- 15 y análogos de CC-1065, definidos a continuación. Estos agentes citotóxicos se conjugan con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos como se describe en la presente memoria.

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

Maitansinoides

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

Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados están descritos en las Patentes de EEUU Nos.

4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

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

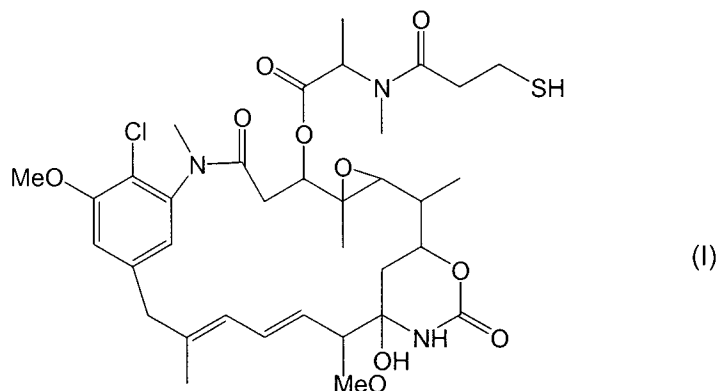
- (1) C-19-decloro (Pat. de EEUU No. 4.256.746) (preparado por reducción con LAH de ansamitocina P2);
- (2) C-20-hidroxi (o C-20-demetil) +/-C-19-decloro (Pat. de EEUU Nos. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o desclorinación utilizando LAH); y
- (3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Pat. de EEUU No 4.294.757) (preparado por acilación utilizando cloruros de acilo).

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

- (1) C-9-SH (Pat. de EEUU No. 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H_2S o P_2S_5);
- (2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/ CH_2OR) (Pat. de EEUU No. 4.331.598);
- (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH_2OH o CH_2OAc) (Pat. de EEUU No. 4.450.254) (preparado de *Nocardia*);
- (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Pat. de EEUU No. 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*);
- (5) C-15-metoxi (Pat. de EEUU Nos. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*);
- (6) C-18-N-desmetilo (Pat. de EEUU Nos. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y
- (7) 4,5-desoxi (Pat. de EEUU No 4.371.533) (preparado por la reducción tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

En una realización preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), denominado formalmente $N^{2'}$ -desacetil- $N^{2'}$ -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. DM1 está representado por la fórmula estructural siguiente (I):

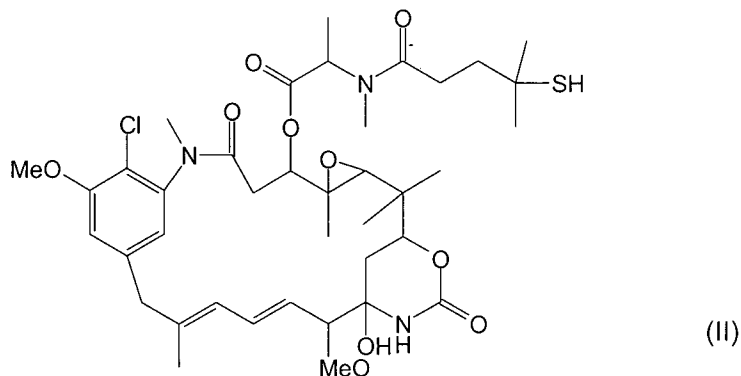
5



10

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

15



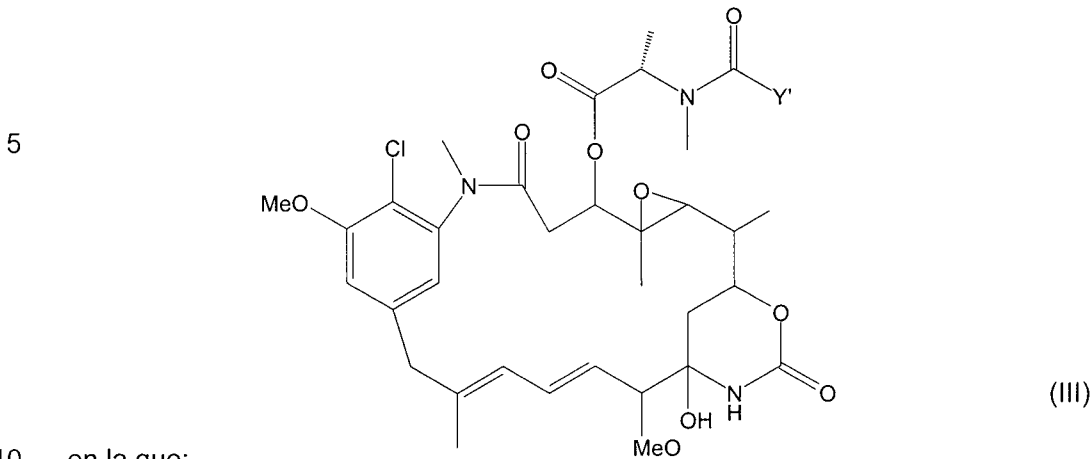
20

25

30

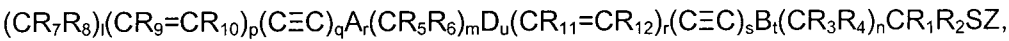
En realizaciones adicionales de la invención, pueden utilizarse otras maitansinas, incluyendo maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que presentan una mono o dialquil sustitución en el átomo de carbono que presenta el átomo de azufre. Éstos incluyen un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilada con un grupo acilo que presenta un grupo sulfhidrilo, en el que el átomo de carbono del grupo acilo que presenta la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, siendo estos sustituyentes CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal o ramificado que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además en el que uno de los sustituyentes puede ser H, y en el que el grupo acilo tiene una cadena lineal con una longitud de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

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



en la que:

Y' representa



en la que:

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

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

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

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

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

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

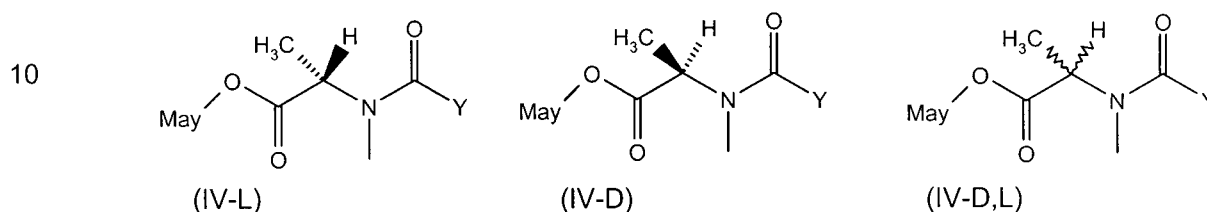
R_1 es metilo, R_2 es H y Z es H.

R_1 y R_2 son metilo y Z es H.

5 R_1 es metilo, R_2 es H, y Z es $-\text{SCH}_3$.

R_1 y R_2 son metilo, y Z es $-\text{SCH}_3$.

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



en las que:

Y representa $(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

15 en la que:

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

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

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

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

30 May representa un maitansinoide que presenta la cadena lateral en C-3, C-14

hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

Las realizaciones preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) incluyen los compuestos de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) en las que:

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

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

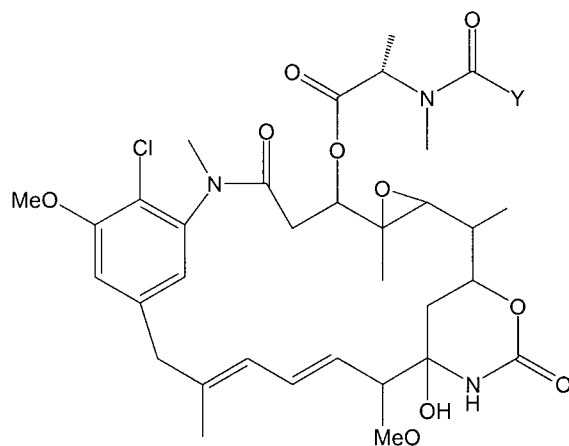
R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es $-\text{SCH}_3$.

10 R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-\text{SCH}_3$.

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

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

15



(V)

en la que:

Y representa $(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

en la que:

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

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

aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

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

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

Las realizaciones preferidas de la fórmula (V) incluyen los compuestos de fórmula (V) en la que:

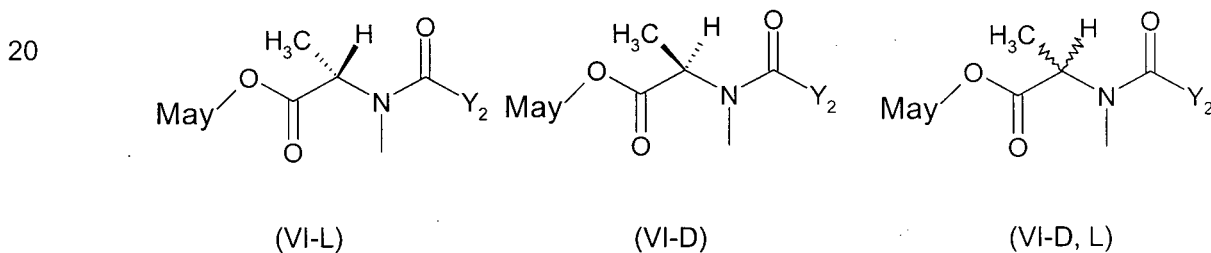
10 R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H.

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

R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

15 R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

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



en las que:

25 Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

en la que:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

30

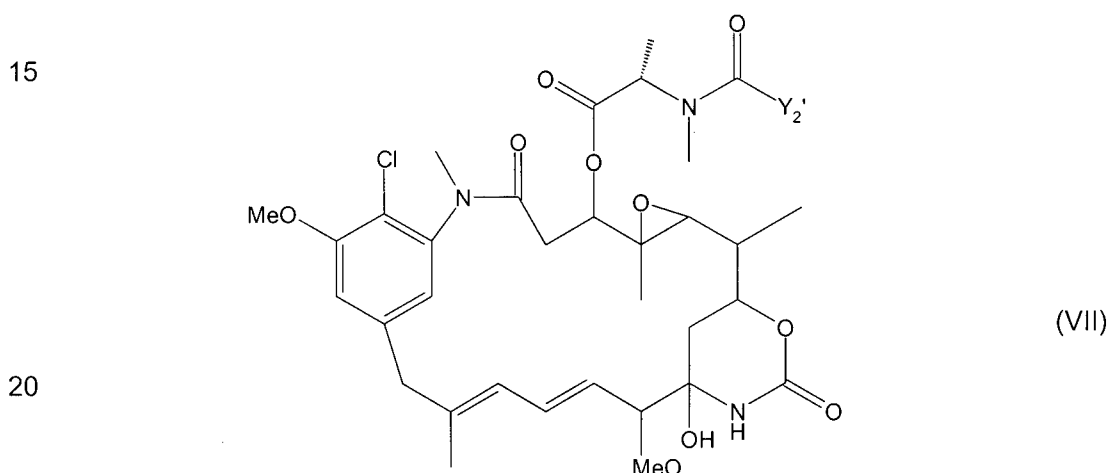
R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

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

Z_2 es SR o -COR, en el que R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical aromático heterocíclico o
10 heterocicloalquilo; y

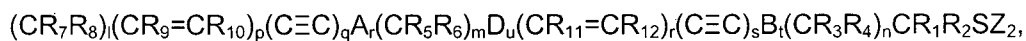
May es un maitansinoide.

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



en la que:

Y_2' representa



25 en la que:

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

30 A, B y D son cada uno independientemente cicloalquilo o cicloalquenilo que

tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

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

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

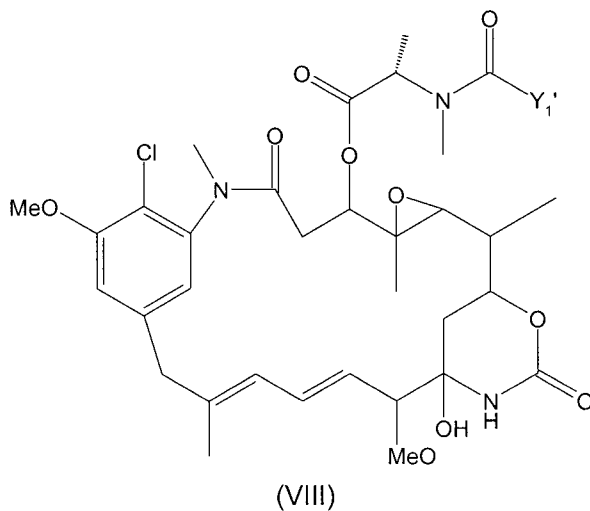
Z_2 es SR o -COR, en el que R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

Las realizaciones preferidas de la fórmula (VII) incluyen los compuestos de fórmula (VII) en la que: R_1 es metilo, R_2 es H.

Los maitansinoides mencionados anteriormente pueden conjugarse con un anticuerpo anti-EphA 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2 o un homólogo o fragmento de éste, en el que el anticuerpo se une al maitansinoide utilizando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácidos acilada que se encuentra en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo del maitansinoide, y en el que el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácidos acilada tiene su funcionalidad tiol o disulfuro localizada en un átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH_3, C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en el que el grupo acilo tiene una cadena lineal con una longitud de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

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

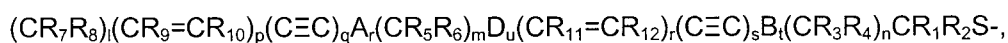
5



10

en la que:

Y_1' representa



en la que:

15

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

20

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

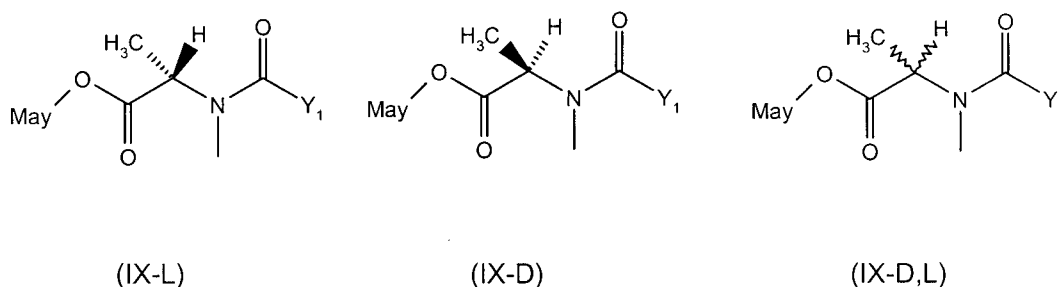
l, m, n, o, p, q, r, s , y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, siempre que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento.

25

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

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

5



10 en la que:

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

en la que:

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

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

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

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

25 Las realizaciones preferidas de las fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,L) incluyen los compuestos de las fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,L) en las que:

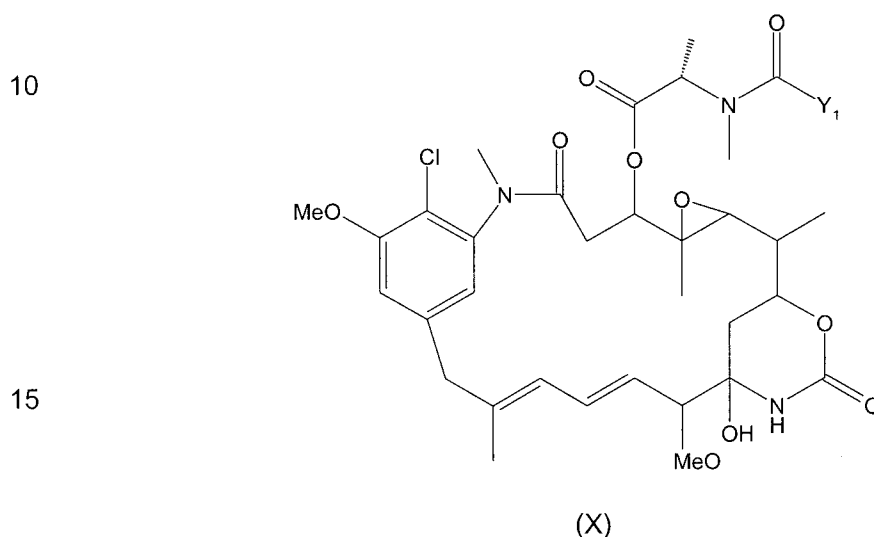
R_1 es metilo, R_2 es H, o R_1 y R_2 son metilo,

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

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

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

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



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

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

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

- 25 Además, se prefiere el estereoisómero *L*-aminoacilo.

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

de la solicitud de patente de EEUU número 10/849.136 se incorpora en la presente memoria por referencia.

Grupos conectores que contienen disulfuro

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

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

Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son *N*-succinimidil ésteres y *N*-sulfosuccinimidil ésteres.

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

Muchas posiciones de los maitansinoides pueden servir como posición para unir químicamente el resto conector. Por ejemplo, es esperable que sean útiles la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. Sin embargo, se prefiere la posición C-3 y la posición C-3 del maitansinol es especialmente preferida.

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

La síntesis de maitansinoides y derivados de maitansinoide que tienen un resto disulfuro que presenta un grupo reactivo está descrita en las Patentes de EEUU Nos. 6.441.163 y 6.333.410, y en la Solicitud de EEUU No. 10/161.651, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia.

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

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

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

- 20 El número de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo puede determinarse midiendo espectrofotométricamente la proporción de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Se prefiere una media de 1-10 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo.

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

Grupos conectores que contienen PEG

Los maitansinoides también pueden unirse a los agentes de unión a células utilizando

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

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

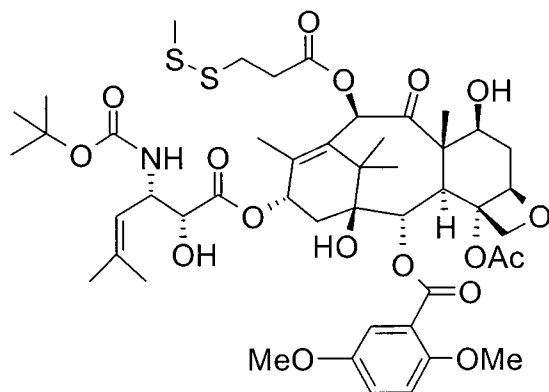
Taxanos

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

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

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

5



(XI)

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

15 Derivados de tomaimicina

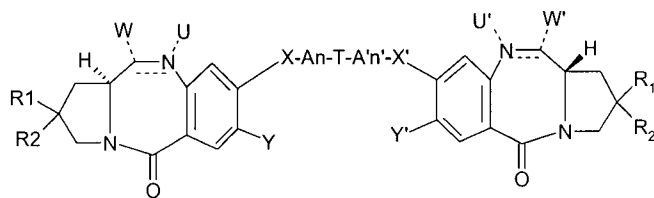
El citotóxico según la presente invención también puede ser un derivado de
tomaimicina. Los derivados de tomaimicina son pirrolo[1,4]benzodiazepinas (PBD),
una clase conocida de compuestos que ejercen sus propiedades biológicas por medio
de la unión covalente al N2 de la guanina en el surco menor del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

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

El agente citotóxico según la presente invención comprende uno o más derivados de
tomaimicina, unidos a un agente de unión a células, tal como el anticuerpo 37.3D7,
37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 o EphA2-N2, a través de un grupo conector. El grupo

conector es parte de un resto químico que está unido covalentemente a un derivado de tomamicina mediante métodos convencionales. En una realización preferida, el resto químico puede estar unido covalentemente al derivado de tomamicina mediante un enlace disulfuro.

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



(XII)

en la que

---- representa un enlace sencillo opcional;

— representa un enlace sencillo o un enlace doble;

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

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

- 30 • R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre un Haluro o Alquilo sustituido opcionalmente con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR,

Arilo, Het, $S(O)_qR$, o $R1$ y $R2$ y $R1'$ y $R2'$ forman juntos un grupo que contiene un enlace doble $=B$ y $=B'$ respectivamente.

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

- 5 ▪ B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquenilo que está sustituido opcionalmente con uno o más Hal, CN, NRR' , CF_3 , OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$ o B y B' representan un átomo de oxígeno.

Preferiblemente, $B=B'$.

Más preferiblemente, $B=B' = CH_2$ o $=CH-CH_3$.

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

Preferiblemente, $X=X'$.

Más preferiblemente, $X=X'=O$.

- 15 ▪ A , A' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquilo o Alquenilo que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de azufre, estando cada uno de ellos sustituido opcionalmente con uno o más Hal, CN, NRR' , CF_3 , OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het, Alquilo, Alquenilo.

Preferiblemente, $A=A'$.

Más preferiblemente, $A=A'$ =alquilo lineal sin sustituir.

- 20 ▪ Y , Y' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, OR;

Preferiblemente, $Y=Y'$.

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

- 25 ▪ T es $-NR-$, $-O-$, $-S(O)_q-$, o un grupo arilo, cicloalquilo, un grupo heterocíclico o heteroarilo de 4 a 10 miembros, estando cada uno de ellos sustituido opcionalmente con uno o más Hal, CN, NRR' , CF_3 , R, OR, $S(O)_qR$, y/o conector(es), o un Alquilo ramificado, sustituido opcionalmente con uno o más Hal, CN, NRR' , CF_3 , OR, $S(O)_qR$ y/o conector(es), o un Alquilo lineal sustituido con uno o más Hal, CN, NRR' , CF_3 , OR, $S(O)_qR$ y/o conector(es).

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

Dicho conector comprende un grupo de unión. Los grupos de unión adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen grupos tiol, sulfuro, disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles y grupos esterasa lábiles. Se prefieren los grupos disulfuro y tioéter.

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

Preferiblemente, dicho conector es de fórmula:

- 10 -G-D-(Z)_p-S-Z'

en la que

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

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

- 15 en el que E y F son iguales o diferentes y se eligen independientemente de -
(OCH₂CH₂)_iAlquilo(OCH₂CH₂)_j-, -Alquilo(OCH₂CH₂)_iAlquilo-, -(OCH₂CH₂)_i-,
(OCH₂CH₂)_iCicloalquilo(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iHeterocíclico(OCH₂CH₂)_j-,
(OCH₂CH₂)_iArilo(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iHeteroarilo(OCH₂CH₂)_j-, -Alquilo-
(OCH₂CH₂)_iAlquilo(OCH₂CH₂)_j-, -Alquilo-(OCH₂CH₂)_i-, -Alquilo-
20 (OCH₂CH₂)_iCicloalquilo(OCH₂CH₂)_j-, -Alquilo(OCH₂CH₂)_iHeterocíclico(OCH₂CH₂)_j-,
-Alquilo-(OCH₂CH₂)_iArilo(OCH₂CH₂)_j-, -Alquilo(OCH₂CH₂)_iHeteroarilo(OCH₂CH₂)_j-,
-Cicloalquil-Alquilo-, -Alquil-Cicloalquilo-, -Heterocíclico-Alquilo-, -Alquil-Heterocíclico-,
-Alquil-Arilo-, -Aril-Alquilo-, -Alquil-Heteroarilo-, -Heteroaril-Alquilo- lineales o
ramificados;

- 25 en el que i y j, iguales o diferentes, son números enteros y se eligen independientemente entre 0, 1 a 2.000;

Z es -Alquil- lineal o ramificado;

p es 0 ó 1;

- Z' representa H, un grupo protector de tiol tal como COR, R₂₀ o SR₂₀, en el que R₂₀
30 representa H, metilo, Alquilo, Cicloalquilo sustituido opcionalmente, arilo, heteroarilo o
un grupo heterocíclico, con la condición de que cuando Z' es H, dicho compuesto esté
en equilibrio con el compuesto correspondiente formado por ciclación intramolecular

producida por la adición del grupo tiol –SH al enlace imina –NH= de uno de los restos PBD.

▪ n, n', iguales o diferentes, son 0 ó 1.

▪ q es 0, 1 ó 2.

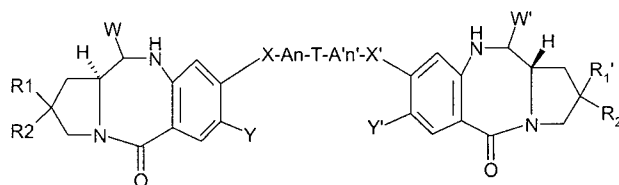
- 5 ▪ R, R' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, Alquilo, Arilo, estando cada uno de ellos sustituido opcionalmente con Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, Arilo, Het;

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

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

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

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



(XIII)

en la que A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (XII) y W, W' son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, -COOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como -OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10

y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como -SO₃-, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como -NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como -NRCOR, -NRCONRR', un azido tal como -N₃, un ciano, un halo, un trialquilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido. Preferiblemente, W y W' son iguales o diferentes y son OH, Ome, Oet, NHCONH₂, SMe.

Por lo tanto, los compuestos de fórmula (XIII) pueden considerarse como solvatos, incluyendo el agua cuando el disolvente es agua; estos solvatos pueden ser particularmente útiles.

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

- 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 • 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 • 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[2,6-piridindiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 • 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridindiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30 • 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

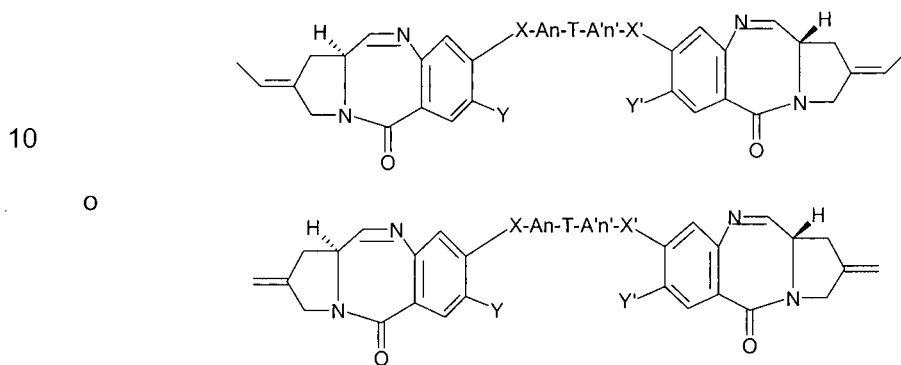
- 8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 • 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- éster terc-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metilen-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10 • 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 • 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 • 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 • 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30 • 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 • 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10 • 8,8'-[(4-(2-[2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-[2-(2-(2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 • 8,8'-[(1-(2-[2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-[2-(2-(2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 • 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 • 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30 • 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

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

Los compuestos preferidos son los de fórmula:



15 en la que X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' son como se han definido anteriormente.

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

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

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

En los documentos USP 5.416.064 y USP 5.475.092 se describen numerosos métodos de conjugación. Los derivados de tomaimicina pueden modificarse para proporcionar un grupo amino libre y luego unirse al anticuerpo o a otro agente de unión a células mediante un conector ácido lábil o un conector fotolábil. Los derivados de tomaimicina con un grupo amino o carboxilo libre pueden condensarse con un péptido y, posteriormente, unirse a un agente de unión a células para producir un conector peptidasa lábil. Los derivados de tomaimicina con un grupo hidroxilo libre en el conector pueden succinilarse y unirse a un agente de unión a células para producir un conjugado que puede escindirse por esterasas intracelulares para liberar el fármaco libre. Lo más preferiblemente, los derivados de tomaimicina se tratan para crear un grupo tiol libre o protegido y luego los dímeros de tomaimicina que contienen disulfuro o tiol se unen al agente de unión a células mediante enlaces disulfuro.

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

previamente introducidos en las moléculas del anticuerpo. Los conjugados que contienen de 1 a 10 fármacos de derivado de tomamicina unidos mediante un puente disulfuro se preparan fácilmente por cualquier método.

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

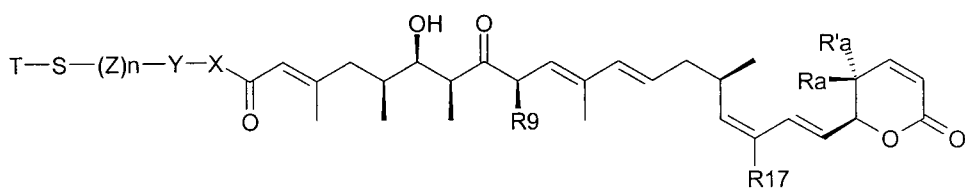
El efecto de la conjugación en la afinidad de unión a las células que expresan el antígeno puede determinarse utilizando los métodos descritos previamente por Liu *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 8618-8623. La citotoxicidad de los derivados de tomamicina y sus conjugados con anticuerpo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

25 Derivados de leptomicina

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

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

58



(I)

5 en la que:

R_a y $R_{a'}$ son H o -Alk; preferiblemente R_a es -Alk, preferiblemente metilo y $R_{a'}$ es H ;

R_{17} es alquilo sustituido opcionalmente con OR, CN, NRR', perfluoroalquilo; preferiblemente, R_{17} es alquilo, más preferiblemente metilo o etilo;

10 R_9 es alquilo sustituido opcionalmente con OR, CN, NRR', perfluoroalquilo; preferiblemente, R_9 es alquilo, más preferiblemente metilo;

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

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

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

15 en la que U se elige entre -Alk- lineal o ramificado, -Alk(OCH₂CH₂)_m-, -(OCH₂CH₂)_m- Alk-, -Alk(OCH₂CH₂)_m-Alk-, -(OCH₂CH₂)_m-, -Cicloalquilo-, -Heterocíclico-, -Cicloalquil-Alk-, -Alk-Cicloalquilo-, -Heterocíclico-Alk-, -Alk-Heterocíclico-;

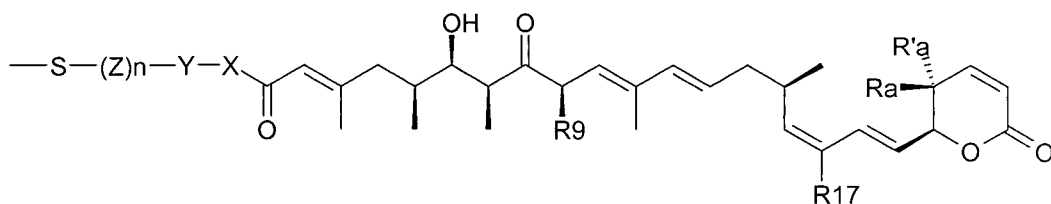
en la que m es un número entero elegido entre 1 a 2.000;

preferiblemente, U es -Alk- lineal o ramificado,

Z es -Alk-;

20 n es 0 ó 1; preferiblemente n es 0;

T representa H, un grupo protector de tiol tal como Ac, R_1 o SR_1 , en el que R_1 representa H, metilo, Alk, Cicloalquilo, arilo o grupo heterocíclico sustituido opcionalmente, o T representa



25 en la que:

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

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

R, R' idénticos o diferentes son H o alquilo;

- 5 Alk representa un alquilo lineal o ramificado; preferiblemente Alk representa $-(CH_2)_q(CH_3)_p-$ en el que p representa un número entero de 1 a 10; y q representa un número entero de 0 a 2; preferiblemente, Alk representa $-(CH_2)-$ o $-C(CH_3)_2-$.

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

Los compuestos preferidos pueden elegirse de:

- (2-Metilsulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-Hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
- 15 • Bis-[(2-mercaptoetil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico]
- (2-Mercapto-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
- 20 • (2-Metildisulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
- (2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
- 25 • (2-Mercapto-2-metil-propil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
- 30 o sus sales, hidratos o sales hidratadas aceptables farmacéuticamente, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

Con el fin de unir el derivado a un agente de unión a células, el derivado debe incluir un resto (grupo conector) que permita a los derivados unirse a un agente de unión a células a través de un enlace tal como un enlace disulfuro, un enlace sulfuro (o llamado en la presente memoria tioéter), un grupo ácido lábil, un grupo fotolábil, un grupo peptidasa lábil, o un grupo esterasa lábil. Los derivados se preparan de manera que contienen un resto necesario para unir el derivado de leptomicina a un agente de unión a células, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un grupo ácido lábil, un grupo fotolábil, un grupo peptidasa lábil, o un grupo esterasa lábil. Con el fin de aumentar más la solubilidad en disoluciones acuosas, el grupo conector puede contener un espaciador de polietilenglicol. Preferiblemente, se utiliza una unión sulfuro o disulfuro porque el entorno reducido de la célula diana resulta en la degradación del sulfuro o disulfuro y en la liberación de los derivados con un incremento asociado de la citotoxicidad.

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

Análogos de CC-1065

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

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

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

dos subunidades de pirroloindol.

- Aunque CC-1065 tiene ciertas características atractivas como agente citotóxico, tiene limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones produjo una hepatotoxicidad retardada que dio lugar a mortalidad en el día 50 después de una
- 5 única dosis intravenosa de 12,5 $\mu\text{g/kg}$ (V. L. Reynolds *et al.*, 1986, *J. Antibiotics*, **XXIX**: 319-334). Esto ha estimulado los esfuerzos para desarrollar análogos que no produzcan una toxicidad retardada, y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados sobre CC-1065 (M.A. Warpehoski *et al.*, 1988, *J. Med. Chem.*, **31**: 590-603).
- 10 En otra serie de análogos, el resto CPI se reemplazó por un resto ciclopropabenzindol (CBI) (D.L. Boger *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.*, **55**: 5823-5833; D.L. Boger *et al.*, 1991, *BioOrg. Med. Chem. Lett.*, **1**: 115-120). Estos compuestos mantienen *in vitro* la elevada potencia del fármaco parental sin causar toxicidad retardada en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen al surco
- 15 menor del ADN de un modo covalente para causar la muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más prometedores, Adozelesin y Carzelesin, ha producido resultados decepcionantes (B.F. Foster *et al.*, 1996, *Investigational New Drugs*, **13**: 321-326; I. Wolff *et al.*, 1996, *Clin. Cancer Res.*, **2**: 1717-1723). Estos fármacos manifiestan efectos terapéuticos débiles a causa de su elevada toxicidad
- 20 sistémica.
- La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 se puede mejorar mucho cambiando la distribución *in vivo* mediante liberación dirigida en el sitio del tumor, lo que resulta en una toxicidad menor en tejidos no diana y, por lo tanto, menor toxicidad sistémica. Con el fin de lograr este objetivo, se han descrito conjugados de análogos y
- 25 derivados de CC-1065 con agentes de unión a células que se dirigen específicamente a células tumorales (Patentes de EEUU; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545). Estos conjugados presentan típicamente una alta citotoxicidad específica para la diana *in vitro*, y una actividad anti-tumoral excepcional en modelos de xenoinjertos de tumores humanos en ratones (R.V. J. Chari *et al.*, 1995, *Cancer Res.*, **55**: 4079-4084).
- 30 Recientemente, se han descrito profármacos de análogos de CC-1065 con solubilidad incrementada en medio acuoso (Solicitud de Patente Europea No. 06290379.4). En estos profármacos, el grupo fenólico de la parte alquilante de la molécula está protegido con una funcionalidad que convierte al fármaco en estable después de almacenarlo en una disolución acuosa ácida, y confiere al fármaco una solubilidad en

- agua incrementada comparada con el análogo sin proteger. El grupo protector se escinde fácilmente *in vivo* a pH fisiológico para proporcionar el correspondiente fármaco activo. En los profármacos descritos en EP 06290379.4, el sustituyente fenólico está protegido como un ácido sulfónico que contiene carbamato de fenilo que
- 5 posee una carga a pH fisiológico y así tiene una solubilidad en agua incrementada. Con el fin de aumentar más la solubilidad en agua se puede introducir un espaciador opcional de polietilenglicol en el conector entre la subunidad de indolilo y el enlace escindible tal como un grupo disulfuro. La introducción de este espaciador no altera la potencia del fármaco.
- 10 Los métodos para sintetizar los análogos de CC-1065 que pueden utilizarse en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar los análogos con agentes de unión a células tales como anticuerpos, están descritos con detalle en EP 06290379.4 (cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia) y en las Patentes de EEUU Nos. 5.475.092, 5.846.545, 5.585.499,
- 15 6.534.660 y 6.586.618 y en las Solicitudes de EEUU Nos. 10/116.053 y 10/265.452.

Otros Fármacos

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

Composición Terapéutica

- La invención también se refiere a una composición terapéutica para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención y un vehículo aceptable
- 30 farmacéuticamente. En una realización, dicha composición farmacéutica es para el tratamiento del cáncer, incluyendo (pero sin limitarse a) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroide y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de la línea linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica

aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de la línea mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomiocarcinoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomiocarcinoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactinoma, seminoma, cáncer folicular tiroide y teratocarcinoma, y otros cánceres todavía por determinar en los que se EphA se expresa de manera predominante. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención se utilizan para el tratamiento de cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario, cuello del útero y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, sarcoma, cabeza y cuello, glioma, gástrico, hígado y otros carcinomas en los que se expresa EphA. En particular, el cáncer es un cáncer metastásico. En otra realización, dicha composición farmacéutica se refiere a otros trastornos tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple; rechazos de injertos tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra anfitrión; infecciones virales tales como infección por mV, infección por VIH, SIDA etc.; e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras determinadas por un experto en la técnica.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden:

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

Tal y como se utiliza en la presente memoria, "vehículos aceptables farmacéuticamente" incluye todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y semejantes que son compatibles fisiológicamente. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y semejantes, así como una

combinación de éstos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, o cloruro sódico. En particular, los ejemplos relevantes de vehículo adecuado incluyen: (1) disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH ~ 7,4, conteniendo o no aproximadamente
5 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) disolución salina al 0,9% (cloruro sódico al 0,9% p/v (NaCl)), y (3) dextrosa al 5% (p/v); y también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizante tal como Tween 20.

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

Las composiciones de la invención pueden estar en diferentes formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas, y sólidas, aunque la forma preferida depende del modo de administración pretendido y de la aplicación
20 terapéutica. Las composiciones típicamente preferidas están en la forma de disoluciones inyectables o para infusión. El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo). En una realización preferida, las composiciones de la invención se administran por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo.
25 En otra realización preferida, se inyectan por vía intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos.

Las composiciones estériles para la administración parenteral pueden prepararse incorporando el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la
30 presente invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, seguido de esterilización mediante microfiltración. Como disolvente o vehículo, puede utilizarse agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y semejantes, así como una combinación de éstos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, tales como azúcares,
35 polialcoholes, o cloruro sódico. Estas composiciones también pueden contener

adyuvantes, en particular agentes humectantes, isotonzantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. Las composiciones estériles para la administración parenteral también pueden prepararse en la forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en el momento de su utilización en agua estéril o en cualquier otro medio inyectable estéril.

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

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

Las dosis dependen del efecto deseado, la duración del tratamiento y la vía de administración utilizada; generalmente son entre 5 mg y 1.000 mg por día oralmente para un adulto con dosis unitarias en el intervalo de 1 mg a 250 mg de la sustancia activa.

En general, el médico determinará la dosis adecuada dependiendo de la edad, peso y cualquier otro factor específico del sujeto que se va a tratar.

Métodos terapéuticos de utilización

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

- En una realización preferida, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados citotóxicos de la invención se utilizan para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una realización más preferida, una de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, y que contiene un anticuerpo,
- 5 fragmento de anticuerpo o conjugado citotóxico de la invención, se utiliza para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una realización, el trastorno es un cáncer. En particular, el cáncer es un cáncer metastásico. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y conjugados citotóxicos de la invención también pueden utilizarse para tratar la neovascularización de dicho tumor canceroso.
- 10 Según esto, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento o prevención de diferentes cánceres, incluyendo (pero sin limitarse a) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroide y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de la línea linfoide, incluyendo
- 15 leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de la línea mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma,
- 20 neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactinoma, seminoma, cáncer folicular tiroide y teratocarcinoma, y otros cánceres todavía por
- 25 determinar en los que se EphA se expresa de manera predominante. En una realización preferida, el cáncer es un cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, útero, ovario, cuello del útero y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, sarcoma, cabeza y cuello, glioma, gástrico, hígado y otros carcinomas en los que se expresa EphA. En otra realización, dicha composición farmacéutica se refiere a
- 30 otros trastornos tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple; rechazos de injertos tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra anfitrión; infecciones virales tales como
- 35 infección por mV, infección por VIH, SIDA etc.; e infecciones parasitarias tales como

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

- De manera similar, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto
- 5 las células diana, o tejido que contiene las células diana, con una cantidad eficaz de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente terapéutico que comprende un conjugado citotóxico, bien solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos.
- 10 El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede ponerse en práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Tal y como se utiliza en la presente memoria, "inhibir el crecimiento" significa ralentizar el crecimiento de una célula, disminuir la viabilidad celular, producir la muerte de una célula, lisar una célula e inducir la muerte celular, en un periodo de tiempo corto o largo.
- 15 Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para destruir células enfermas o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD); tratamientos de cultivos celulares para matar todas las células excepto las variantes deseadas que
- 20 no expresan el antígeno diana; o para destruir variantes que expresan un antígeno indeseado.

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

- Los ejemplos de utilización clínica *ex vivo* son para eliminar células tumorales o
- 25 células linfoides de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, o para eliminar células T y otras células linfoides de médula ósea autóloga o alogénica o de tejidos antes del trasplante para prevenir la enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD). El tratamiento puede realizarse como sigue. Se recoge la médula ósea del paciente o de
- 30 otro individuo y se incuba en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían de aproximadamente 10 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, las determinará fácilmente un experto en la técnica.

Después de la incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por infusión i.v. según métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de todo el cuerpo entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula ósea tratadas se conservan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico convencional.

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

Diagnóstico

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

El método descrito anteriormente puede utilizarse para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o sospecha que tiene un cáncer, en el que el nivel de EphA2 determinado en dicho paciente se compara con el de un sujeto o estándar de referencia normal. Dicho método puede utilizarse para determinar si un tumor expresa

5 EphA2, lo que puede sugerir que el tumor responderá bien al tratamiento con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el tumor es un cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, útero, ovario, cuello del útero y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, sarcoma, glioma, gástrico, hígado, cabeza y cuello u otros

10 carcinomas en los que se expresa EphA2, y otros cánceres todavía por determinar en los que EphA2 se expresa de manera predominante.

La presente invención proporciona además anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de éstos que se unen al epítipo que se marcan además para utilizarse en aplicaciones de investigación o diagnósticas. En realizaciones

15 preferidas, el marcaje es un marcaje radiactivo, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de imagen o un ion metálico.

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

20 el cuerpo del sujeto.

Kit

La presente invención también incluye kits que comprenden, por ejemplo, un conjugado citotóxico descrito e instrucciones para la utilización del conjugado citotóxico para matar tipos celulares particulares. Las instrucciones pueden incluir

25 directrices para utilizar los conjugados citotóxicos *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Típicamente, el kit tendrá un compartimento que contiene el conjugado citotóxico. El conjugado citotóxico puede estar en forma liofilizada, forma líquida, o en otra forma adecuada para incluirse en un kit. El kit también puede contener elementos adicionales necesarios para llevar a la práctica el método descrito en las instrucciones del kit, tal

30 como disolución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinarse con el conjugado citotóxico antes de administrarlo a un paciente, y medios que faciliten la administración del conjugado a un paciente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Generación de Hibridomas de Anticuerpo Monoclonal Anti-EphA2

- Se inmunizaron cuatro ratones BALB/c VAF con células 300-19 transfectadas con EphA2 humano, una línea celular pre-B obtenida de un ratón BALB/c. Las células transfectadas de manera estable que sobreexpresan el antígeno se generaron mediante transfección de células 300-19 con el ADNc de longitud completa de EphA2 humano y se seleccionaron los clones con una alta expresión mediante citometría de flujo. El clon 4-6, un clon que expresa fuertemente el receptor EphA2 humano en la superficie celular, se seleccionó como inmunógeno para la inmunización de ratones y para el cribado de anticuerpos en los hibridomas. Las células transfectadas con EphA2 se mantuvieron en el medio de selección que contiene G418 a una concentración final de 1mg/mL y se ensayaron regularmente para detectar la expresión de EphA2 utilizando un anticuerpo disponible comercialmente.
- Se inyectaron subcutáneamente a los ratones Balb/c aproximadamente 5×10^6 células 300-19 transfectadas con EphA2 en 200 μ L de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) por ratón. Las inyecciones se realizan cada 2-3 semanas mediante protocolos de inmunización estándar utilizados en ImmunoGen, Inc. Tres días antes de la fusión celular, los ratones se reforzaron intraperitonealmente una vez más con la misma dosis de antígeno, y se sacrificaron para la preparación de células de bazo según los protocolos estándar para los procedimientos de utilización de animales en el día de la fusión celular.
- Se recogió el bazo del ratón inmunizado en condiciones quirúrgicas estériles y se trituró entre dos portaobjetos microscópicos estériles y fríos para obtener una suspensión de células separadas en medio RPMI-1640. Los esplenocitos se sedimentaron y se lavaron dos veces con medio RPMI-1640 antes de la fusión celular. Las células del bazo se mezclaron y se fusionaron con células de mieloma murino P3X63Ag8.653 (Kearney, J.F. *et al.*, 1979. *J. Immunol.*, 123: 1548-1550) utilizando polietilen glicol-1500 como fusógeno (Roche 783 641). Después de la fusión celular y centrifugación, las células se suspendieron en medio RPMI-1640 completo (200 mL) que contiene suplemento hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma H-0262), y se plaquearon en diez placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning-Costar 3596, 200 μ L de suspensión celular por pocillo). Después de incubar a 37°C, 5% CO₂ durante 5 días, se eliminaron 100 μ L del sobrenadante del cultivo de cada pocillo de las placas y

se reemplazaron por un volumen igual de medio RPMI-1640 completo que contiene suplemento hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). La incubación (en una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C) se continuó hasta que los clones de hibridoma hubieron formado colonias lo suficientemente grandes para cribar el anticuerpo.

- 5 En el día 10 después de la fusión cuando las células de hibridoma hubieron crecido hasta la mitad de la confluencia en los pocillos y el sobrenadante hubo cambiado a un color naranja, los sobrenadantes de los hibridomas se muestrearon de las placas de fusión para el cribado de anticuerpos mediante inmunoensayos. Para el cribado preliminar, los sobrenadantes de hibridomas se ensayaron en células transfectadas
- 10 con EphA2 frente a las células 300-19 parentales mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron con 50 µL de sobrenadante de hibridoma, seguido de incubación con conjugado de IgG de cabra anti-ratón-fluoresceína (H+L), y se analizaron mediante citometría de flujo con un equipo Becton Dickinson FACSCalibur o FACSArray. Los clones de hibridoma que resultaron positivos para las células
- 15 transfectadas con EphA2 pero negativos para las células 300-19 se seleccionaron, expandieron, congelaron para almacenarlos, o subclonaron mediante diluciones limitantes para obtener una población monoclonal. Los anticuerpos específicos secretados por las células de hibridoma se isotiparon utilizando reactivos de isotipado disponibles comercialmente (Roche 1493027).
- 20 En base a los datos de citometría de flujo, se identificaron y seleccionaron 29 clones de hibridoma, que fueron reactivos específicamente con células transfectadas con EphA2 humano pero no con las células 300-19 parentales, de la inmunización de ratones con antígenos EphA2 humanos.

Ejemplo 2

- 25 **Caracterización de la Unión de los Anticuerpos Anti-EphA2, 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2.**

- 30 La unión específica de cada uno de los anticuerpos anti-EphA2 purificados, 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 se demostró mediante separación de células activada por fluorescencia (FACS) utilizando células que sobreexpresan EphA2 humano y mediante la utilización de células que no expresan EphA2 (FIG. 1A, B, y C). La incubación del anticuerpo 37.3D7, o del anticuerpo 37.1F5 o del anticuerpo 53.2H11 (60 nM) en 100 µl de tampón FACS frío (1mg/mL BSA en medio MEM de Dulbecco) se realizó utilizando células que sobreexpresan EphA2 y células que no expresan EphA2 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo en hielo. Después de 1 h, las células se

sedimentaron mediante centrifugación y se lavaron con tampón FACS frío y se incubaron con el conjugado anticuerpo IgG de cabra anti-ratón-FITC (100 µL, 6 µg/ml en tampón FACS) en hielo durante 1 h. Las células se sedimentaron, se lavaron y se resuspendieron en 200 µL de disolución de formaldehído al 1% en PBS. Las muestras
5 de células se analizaron utilizando un lector FACSCalibur (BD Biosciences).

Se obtuvo un fuerte desplazamiento de la fluorescencia después de la incubación de células que sobreexpresan EphA2 humano con el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H11, en contraste con un desplazamiento insignificante después de la incubación de las células que no expresan EphA2 humano con el anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o
10 53.2H11 (FIG. 1A, 1B, y 1C), lo que demuestra que los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 se unían selectivamente a EphA2 humano. El anticuerpo anti-EphA2 utilizado como control positivo, B2D6 (Upstate), mostró un desplazamiento de la fluorescencia similar después de incubaciones con células que sobreexpresaban EphA2 humano (FIG. 1A). También se observó un fuerte desplazamiento de la fluorescencia mediante
15 el ensayo FACS utilizando 37.3D7 y células de cáncer humano, tal como células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, células de cáncer de colon humano HT-29, células de cáncer pancreático humano BxPC3, lo que muestra que el anticuerpo 37.3D7 se une a EphA2 humano en la superficie de células tumorales humanas (FIG. 2). También se obtuvieron datos similares utilizando los anticuerpos 37.1F5 y 53.2H11
20 con líneas celulares tumorales humanas.

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

Utilizando el mismo protocolo experimental, se determinaron los valores aparentes de K_D de 0,18 nM y 0,05 nM para EphA2-N1 y EphA2-N2, respectivamente.
30

Se obtuvo un fuerte desplazamiento de la fluorescencia después de la incubación de células que sobreexpresan EphA2 murino o EphA2 de rata con el anticuerpo 37.3D7 o el anticuerpo 53.2H11, en contraste con un desplazamiento insignificante después de la incubación de células que no expresan EphA2 murino o EphA2 de rata con el

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

10 **Ejemplo 3**

Inhibición de la Unión de EfrinaA1 a células MDA-MB-231 por los Anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2

La unión de efrinaA1 a células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se inhibió por los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 (FIG. 6). Las células MDA-MB-231 se incubaron con o sin 5 µg/mL del anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H11 durante 2 h, seguido de incubación con 100 ng/mL de efrinaA1 biotinilada durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con medio sin suero para eliminar la efrinaA1 biotinilada sin unir, y se lisaron en tampón 50 mM HEPES, pH 7,4, que contiene NP-40 al 1% e inhibidores de proteasas. Se recubrieron placas de ELISA Immulon-2HB con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-EphA2 (D7, Upstate) y se utilizaron para capturar el EphA2 y la biotina-efrinaA1 unida del lisado. La unión del anticuerpo recubierto al dominio citoplásmico C terminal de EphA2 no interfirió con la unión de biotina-efrinaA1 al dominio extracelular de EphA2. Los pocillos se lavaron, se incubaron con conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano, se lavaron de nuevo, y se revelaron con el sustrato ABTS/H₂O₂. La inhibición de la unión de efrinaA1 a las células MDA-MB-231 por 5 µg/mL del anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, o 53.2H1 fue esencialmente cuantitativa; la señal fue prácticamente equivalente a la de la señal de fondo del ELISA obtenida utilizando un control que carecía de biotina-efrinaA1 (Fig 6A, 6B y 6C).

30 Tanto EphA2-N1 como EphA2-N2 fueron capaces de inhibir la unión de efrinaA1 humana a células MDA-MB-231 igual que 37.3D7.

Ejemplo 4

Inhibición de la Señalización Celular Mediada por EphA2 por los Anticuerpos 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 y EphA2-N2

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

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

Los anticuerpos 37.3D7 y 53.2H11 no estimularon por sí mismos la autofosforilación de EphA2 en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, en contraste con el efecto estimulador de efrinaA1 sobre la autofosforilación de EphA2 en células MDA-

MB-231 (FIG. 8A y 8B). Se obtuvieron datos similares con el anticuerpo 37.1F5 utilizando células MDA-MB-231. En la FIG. 8, las células MDA-MB-231 se crecieron en medio regular con suero durante 3 días, y se cultivaron en medio sin suero durante 12-14 h. Las células desprovistas de suero se trataron con 1 µg/mL de efrinaA1-Fc ó 15 µg/mL de anticuerpo 37.3D7 o 53.2H11 durante 10 min. Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-EphA2, D7 (Upstate). Después de separar en un gel de poliacrilamida con SDS, la transferencia se ensayó con el anticuerpo anti-fosfotirosina, 4G10 (Cell Signaling Technology) y con el anticuerpo anti-EphA2 D7 (Upstate). Se obtuvieron resultados similares tanto con EphA2-N1 como con EphA2-N2 en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, ya que ningún anticuerpo estimula la autofosforilación de EphA2 por sí mismo, mientras que cada uno de ellos impide la fosforilación del receptor EphA2 dependiente de efrinaA1.

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

Ejemplo 5

Inhibición del Crecimiento y Supervivencia Estimulados por Suero de Células TumORAles Humanas por los Anticuerpos 37.3D7 y 53.2H11

Se ensayaron diferentes líneas celulares tumorales humanas en condiciones sin suero para determinar su respuesta de crecimiento y supervivencia al suero en presencia del anticuerpo 37.3D7 o 53.2H11. Se plaquearon aproximadamente 3.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio regular (como sugiere la ATCC para cada línea celular) con suero, que se reemplazó por medio sin suero al día siguiente. Después de un día de crecimiento en medio sin suero, las células se incubaron con 15 µg/mL del anticuerpo 37.3D7 o el anticuerpo 53.2H11 o IgG₁ control seguido de la adición de suero para obtener una concentración final de 1% ó 1,5% de suero. Se dejó que las células crecieran durante 3 días más. Se añadió una disolución de MTT [bromuro de 3-(4, 5)-dimetiltiazol-2-il-2,3-difeniltetrazolio; 25 µL de una disolución 5 mg/mL en PBS] y las células se volvieron a poner en el incubador durante 2-3 h. El medio se eliminó y se reemplazó por 100 µL de DMSO, se mezcló y se determinó la absorbancia de la placa a 545 nm. Diferentes líneas celulares tumorales humanas mostraron una respuesta de crecimiento y supervivencia después de la adición de suero que fue inhibida significativamente por el anticuerpo 37.3D7 o 53.2H11. Como ejemplos, se muestran

los descubrimientos con las líneas celulares tumorales de colon, HT-29, LoVo; la línea celular tumoral pancreática, CFPAC-2, BxPC3; y de melanoma UACC-257.

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

Ejemplo 6

Inhibición de la Señalización Celular Mediada por VEGF y del Crecimiento y Supervivencia Estimados por VEGF de Células Endoteliales de Vena de Cordon Umbilical Humano (HUVEC) por el Anticuerpo 37.3D7, 37.1F5, y 53.2H11

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

obtuvo un valor de $K_D = 0,01$ nM para el anticuerpo 37.1F5 y un valor de $K_D = 0,06$ nM para el anticuerpo 53.2H11. Esto indica que los anticuerpos 37.3D7, 37.1F5 y 53.2H11 se unen específicamente a las células HUVEC a través del receptor EphA2.

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

El hecho de que el tratamiento de las células HUVEC con el anticuerpo 37.3D7 inhibe la señalización intracelular del receptor EphA2 se mostró determinando la inhibición de la fosforilación de sus efectores tal como Akt.

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

Ejemplo 7

30 Supresión del Crecimiento del Xenoinjerto de Cáncer de Colon Humano HT-29 en Ratones por el Anticuerpo 37.3D7 (FIG. 14)

Se establecieron xenoinjertos de cáncer de colon humano HT-29 en ratones SCID mediante la inyección subcutánea de 2×10^6 células HT-29. Cuando los ratones mostraron xenoinjertos de tumores HT-29 palpables (50 mm^3), se trataron con el

- anticuerpo 37.3D7 o con un anticuerpo control (IgG₁) (1 mg/ratón, i. v., dos veces por semana) o con PBS solo (100 µL/ratón, i. v., dos veces por semana). El crecimiento de los tumores se ralentizó significativamente mediante el tratamiento con el anticuerpo 37.3D7 comparado con un tratamiento con el anticuerpo control o PBS solo. No se observó toxicidad del anticuerpo 37.3D7, en base a determinaciones de los pesos de los ratones.

Ejemplo 8

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

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

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

En un estudio paralelo, los animales se trataron como se ha descrito anteriormente, y en el día 28 después del implante del tumor todos los ratones se sacrificaron y se recogieron los nódulos linfáticos axilares e inguinales (tamaño medio del tumor en el

grupo control = 1.558 mg). Se utilizó el anticuerpo humano Ki67 para identificar específicamente las células tumorales MDA-MB-231 en los nódulos linfáticos mediante inmunotinción. El área superficial de las metástasis de los nódulos linfáticos se calculó (media de 2 secciones) como $S = \text{área superficial de Ki67 humano} \times 100 / \text{área superficial del nódulo linfático}$.

- Eficacia en tumor primario:

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

- Actividad anti-metastásica:

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

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

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

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

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

- Peso de las metástasis (hígado): el peso del hígado de los ratones control implantados es significativamente mayor que el peso del hígado de NTBA; por otra parte, es significativamente menor en los ratones tratados con anti-EphA2 que en los ratones control implantados.
- 5 • Número de metástasis hepáticas: no se observa una diferencia significativa entre los ratones control implantados y los ratones tratados con anti-EphA2.

En conclusión, el implante intraesplénico de adenocarcinoma de colon humano HT-29 induce significativamente un incremento del peso del hígado debido a la carga metastásica tumoral. El tratamiento con anti-EphA2 es capaz de disminuir significativamente la carga metastásica tumoral como se observa por la reducción del peso del hígado de los ratones implantados sin verse afectado el número de metástasis contadas en el hígado.

10

Ejemplo 9

Clonación y Secuenciación de las Cadenas Ligera y Pesada del Anticuerpo 37.1F5.

15

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

Las preparaciones de ARN total se obtuvieron a partir de 5×10^6 células de hibridoma, que producen anticuerpo 37.1F5, utilizando el kit RNeasy miniprep de Qiagen. Brevemente, 5×10^6 células se sedimentaron y se resuspendieron en 350 μ L de tampón RLT (que contiene 1% de β -mercaptoetanol). La suspensión se homogeneizó pasándola a través de una aguja y jeringa de 21,5 G aproximadamente 10 – 20 veces o hasta que dejó de ser viscosa. Se añadió etanol (350 μ L de etanol acuoso al 70%) al homogenado, que se mezcló bien. La disolución se transfirió a una columna de centrifugado, situada en un tubo de recogida de 2 mL y se centrifugó a $>8.000 \times g$ durante 15 segundos. La columna se lavó dos veces con 500 μ L de tampón RPE, se transfirió a un tubo nuevo y se eluyó con 30 μ L de agua sin ARNasa y una centrifugación de 1 minuto. El eluato (30 μ L) se puso de nuevo en la columna para una segunda elución de centrifugado de 1 minuto. Una alícuota del eluato de 30 μ L se diluyó con agua y se utilizó para determinar la absorción UV a 260 nm para la cuantificación del ARN.

20

25

30

Preparación de ADNc con la reacción de la Transcriptasa Inversa (RT)

El ADNc de la región variable del anticuerpo 37.1F5 se generó a partir del ARN total

utilizando el kit SuperscriptII de Invitrogen. Se siguieron exactamente los protocolos del kit, utilizando hasta 5 µg de ARN total de las mini prep de Qianeasy. Brevemente, el ARN, 1 µL de cebadores aleatorios, y 1 µL de mezcla de dNTP se llevaron hasta 12 µL con agua destilada estéril sin ARNasa y se incubó a 65 °C durante 5 minutos. La
5 mezcla se puso en hielo durante al menos 1 minuto. Después, se añadieron 4 µL de tampón de reacción 5 x, 2 µL de 0,1 M DTT, y 1 µL de RNasaOUT y la mezcla se incubó a 25 °C durante 2 minutos en un ciclador térmico MJ Research. El ciclador térmico se detuvo de manera que se pudo añadir 1 µL de enzima SuperscriptII y se volvió a poner en marcha durante 10 minutos adicionales a 25 °C antes de cambiar a
10 55 °C durante 50 minutos. La reacción se inactivó con calor calentando hasta 70 °C durante 15 min y el ARN se eliminó mediante la adición de 1 µL ARNasa H e incubando a 37 °C durante 20 minutos.

Reacciones de PCR degenerada

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

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

Nombre: Wang45

- 1) 94°C 3:00 min
- 25 2) 94°C 0:15 seg
- 3) 45°C 1:00 min
- 4) 72°C 2:00 min
- 5) Ir a 2 29 veces
- 6) 72°C 6:00 min
- 30 7) 4°C hasta el final
- 8) final

Las mezclas de la reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, se escindieron las bandas de 300 a 400 pb, se purificaron utilizando mini columnas de ADN de Zymo, y se mandaron a Agencourt biosciences para la secuenciación. Los cebadores de PCR 5' y 3' respectivos se utilizaron como
5 cebadores de secuenciación para generar los ADNc de la región variable de 37.1F5 a partir de ambas direcciones.

Clonación de la secuencia del extremo 5'

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

Análisis peptídico para la confirmación de la secuencia

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

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

Se utilizó esencialmente el mismo método para clonar las cadenas ligera y pesada de 37.3D7 y 53.2H11. Los números de registro de Genbank de las secuencias de la línea germinal de las que probablemente derivan la cadena ligera y la cadena pesada de

37.3D7, son respectivamente MMU231217 y AF303868. Para 53.2H11, son respectivamente MMU231196 y AF303833; para EphA2-N1, K02161 y J00488 respectivamente; y para EphA2-N2, AJ231222 y J00488 respectivamente.

Ejemplo 10

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

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

Los efectos de hu37.3D7-SPDB-DM4 y hu53.2H11-SPDB-DM4 en el crecimiento de células tumorales que expresan EphA2 se ensayó en primer lugar utilizando el ensayo de proliferación celular *in vitro* WST-8 ((2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) (Catálogo# CK04-11, Dojindo Molecular Technologies, Inc). Se ensayaron numerosas líneas celulares tumorales. Se plaquearon aproximadamente 2.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio regular (como sugiere la ATCC para cada línea celular) con 10% de suero en presencia de diferentes concentraciones de hu37.3D7-SPDB-DM4 o hu53.2H11-SPDB-DM4. Se dejó que las células crecieran durante 5 días. Se añadió una disolución de WST-8 [20µL de disolución] y las células se volvieron a poner en el incubador durante 2-3 h. Se determinó la absorbancia de la placa a 450 nm y 650 nm. En los experimentos se utilizaron dos grupos control. 0% de supervivencia es el control sólo con el medio. 100% de supervivencia es el control sólo con las células. Para el análisis de los datos, los valores de A650 nm (longitud de onda de referencia) se restaron en primer lugar de

los valores A450 nm correspondientes. Después, los valores A450 nm de cada muestra se normalizaron restando a los valores A450 nm el control de fondo (sólo medio). Las fracciones supervivientes se calcularon mediante los valores A450 normalizados de las muestras divididos por los valores A450 normalizados de los controles sólo con células (100% de supervivencia-0% de supervivencia). Los valores log [Ab-DM4] se representaron en el eje de las x y las fracciones supervivientes se representaron en el eje de las y.

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

Se ensayaron los efectos de hu37.3D7-SPDB-DM4 y hu53.2H11-SPDB-DM4 en el crecimiento de xenoinjertos tumorales que expresan EphA2. Se muestra como ejemplo un estudio utilizando el modelo de xenoinjerto de tumor de mama MDA-MB-231. Los xenoinjertos de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se establecieron en ratones hembra CB17 SCID de 5 semanas de edad mediante la inyección subcutánea de 1×10^7 células MDA-MB-231. Cuando los xenoinjertos de tumores MDA-MB-231 estaban establecidos (tamaño medio de 83 mm³), los ratones se trataron con una única inyección i. v. de hu3D7-SPDB-DM4 o hu2H11-SPDB-DM4 o PBS. Las dosis de los anticuerpos fueron 15mg/kg de peso corporal del ratón, 7,5mg/kg de peso corporal del ratón y 3,25 mg/kg de peso corporal del ratón. Los crecimientos de los tumores MDA-MB-231 se inhibieron completamente por los conjugados de anticuerpo hu3D7-SPDB-DM4 o hu2H11-SPDB-DM4 a todas las concentraciones ensayadas excepto a 3,25

mg/kg de hu2H11-SPDB-DM4, lo que muestra el retraso marcado del crecimiento de las células tumorales respecto al control de PBS (FIG.16A y 16B). Los volúmenes medios de los tumores en cada grupo (6 ratones por grupo) se muestran en las FIG. 16A y B. En resumen, tanto hu3D7-SPDB-DM4 como hu2H11-SPDB-DM4 tienen potentes actividades inhibitoras del crecimiento de tumores que expresan EphA2 *in vivo*. No se observaron toxicidades de ninguno de los conjugados de anticuerpo, en base a las determinaciones del peso corporal.

TABLAS

Tabla 1A:

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

Restos Superficiales del Marco De La Cadena Ligera De mu37.3D7 Y Restos Correspondientes En El Anticuerpo Humano 28E4		
Posición Kabat	mu37.3D7	28E4
1	Q	E
3	V	V
5	T	T
9	A	A
10	I	T
15	L	P
18	R	R
40	P	P
41	G	G
57	G	G
60	A	A
67	S	S

80	S	S
81	E	E
100	S	G
107	K	K
108	R	R

Tabla 1B:

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

Restos Superficiales del Marco De La Cadena Pesada De mu37.3D7 Y Restos Correspondientes En El Anticuerpo Humano 28E4		
Posición Kabat	mu37.3D7	28 ^E 4
1	Q	Q
3	Q	Q
5	Q	V
9	S	A
11	L	V
13	R	K
14	P	P
15	G	G
19	Q	K
23	K	K
28*	S*	N*

41	P	P
42	G	G
43	Q	Q
61	E	Q
62	K	K
64	M	Q
65	N	G
73	T	T
74*	Y*	S*
75	S	T
82B	S	S
84	S	S
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

Tabla 2:

Los cebadores utilizados para las reacciones de PCR degenerada se basan en los que aparecen en Wang *et al.*, 2000 excepto HindKL (SEQ ID NO: 58) que se basa en Co *et al.* 1992. Las bases mixtas se definen como sigue: H=A+T+C, S=g+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+g, W=A+T, V = A+C+G.

cebador	secuencia
BamIlgG1 (SEQ ID NO: 53)	GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
IgG2Abam (SEQ ID NO: 54)	GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
EcoMH1 (SEQ ID NO: 55)	CTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC

EcoMH2 (SEQ ID CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG NO: 56)
SacIMK (SEQ ID GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA NO: 57)
HindKL (SEQ ID TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTG NO: 58) GTGC

Tabla 3:

Las mezclas de la reacción de PCR de la cadena ligera y pesada para la clonación de las secuencias de ADNc de la región variable de 37.1F5.

Mezcla de Reacción de la Cadena Ligera	Mezcla de Reacción de la Cadena Pesada
5 µl de tampón de reacción de PCR 10 X (Roche)	5 µl de tampón de reacción de PCR 10 X (Roche)
4 µl de mezcla de dNTP 10mM (2,5mM cada uno)	4 µl de mezcla de dNTP 10mM (2,5mM cada uno)
2 µl de Molde (reacción de RT)	2 µl de Molde (reacción de RT)
5 µl de cebador izquierdo Sac1MK 10 µM	2,5 µl de cebador izquierdo EcoMH1 10 µM
5 µl de cebador derecho HindKL 10 µM	2,5 µl de cebador izquierdo EcoMH2 10 µM
5 µl de DMSO	5 µl de cebador derecho BamIG1 10 µM
0,5 µl de Polimerasa Taq (Roche)	5 µl de DMSO
<u>23,5 µl</u> de H ₂ O destilada estéril	0,5 µl de Polimerasa Taq (Roche)
	<u>23,5 µl</u> de H ₂ O destilada estéril
50 µl Total	50 µl Total

Tabla 4:

Los cebadores de la secuencia líder del extremo 5' murino utilizados para la segunda ronda de reacciones de PCR de 37.1F5. Los cebadores del extremo 3' son idénticos a los utilizados en las reacciones de la primera ronda ya que ceban las secuencias respectivas de la región constante.

Cebador	Secuencia
Cadena Ligera	
Líder 38SB13 LC (SEQ ID NO: 59)	GACAGACACACTCCTGCTATGGG
Cadena Pesada	
Líder 5F85 HC (SEQ ID NO: 60)	GCAGAATTCATGGGATGGAGCYGGATCTTTCT

Tabla 5:

Los pesos moleculares del ADNc calculados y determinados por LC/MS de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo murino 37.1F5.

	Cadena Ligera			Cadena Pesada		
	ADNc	LC/MS	Diferencia	ADNc	LC/MS	Diferencia
37.1F5	24.031 Da	24.029 Da	2 Da	49.316 Da	49.333 Da	17 Da

REIVINDICACIONES

- 1) Un anticuerpo o un fragmento de éste que se une al epítopo que se une específicamente a un receptor EphA2 y que es un antagonista de dicho receptor.
- 5 2) El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es un anticuerpo monoclonal.
- 3) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o F_v.
- 10 4) El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es capaz de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa.
- 15 5) El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es capaz de inhibir la migración de una célula cancerosa.
- 20 6) El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado porque dicha célula cancerosa es una célula de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial y cáncer pancreático, sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas.
- 25 7) El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es capaz de inhibir la angiogénesis.
- 30 8) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo carece de actividad agonista.
- 9) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al

epítopo no estimula la fosforilación en tirosina de EphA2.

- 5 10) El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es capaz de inhibir la unión de un ligando a dicho receptor.
- 11) El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo de la reivindicación 10, caracterizado porque dicho ligando es efrinaA1.
- 10 12) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es capaz de inhibir la fosforilación en tirosina de EphA2.
- 15 13) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según la reivindicación 12, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es capaz de inhibir la fosforilación en tirosina de EphA2 en presencia de efrinaA1.
- 14) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo es capaz de inhibir la señalización mediada por EphA2.
- 20 15) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según la reivindicación 14, caracterizado porque la señalización mediada por EphA2 es un incremento de la fosforilación de Akt.
- 25 16) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo se une a EphA2 con una K_D de 3×10^{-10} M o menor.
- 17) El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho receptor EphA2 es humano.
- 30 18) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada

del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, y 72.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 19) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 26, 28, 30, 78, y 80.
 - 20) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 20, 22, 24, 74, y 76.
 - 21) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 1, 2, y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 4, 5, y 6.
 - 22) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según la reivindicación 21, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 26.
 - 23) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según la reivindicación 21, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO:20.
 - 24) Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias

de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 7, 8, y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 10, 11, y 12.

- 5 **25)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 24, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 28.
- 10 **26)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 24, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 22.
- 15 **27)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 13, 14, y 15, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 16, 17, y 18.
- 20 **28)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 27, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 30.
- 25 **29)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 27, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 24.
- 30 **30)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias

de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 61, 62, y 63, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 64, 65, y 66.

- 5 **31)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 30, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 78.
- 10 **32)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 30, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 74.
- 15 **33)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 67, 68, y 69, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 70, 71, y 72.
- 20 **34)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 33, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 80.
- 25 **35)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 33, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 76.
- 30 **36)** Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es un anticuerpo murino o fragmento de éste que se une al epítipo y es producido por un hibridoma denominado 37.3D7, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el

- número de registro PTA-7660; un hibridoma denominado 37.1F5, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7661; un hibridoma denominado 53.2H11, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7662; un hibridoma denominado EphA2-N1, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTM-8407; o un hibridoma denominado EphA2-N2, en el que dicho hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con el número de registro PTM-8408.
- 10 **37)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o un fragmento de éste que se une al epítipo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 15 **38)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 20 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, y 72.
- 25 **39)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 47, 48, 49, 50, y 52.
- 30 **40)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, y 45.
- 41)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado

- porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 1, 2, y 3, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 4, 5, y 6.
- 5
- 10 **42)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 41, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 47.
- 15 **43)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 41, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 32, 34, y 36.
- 20 **44)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-40, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 7, 8, y 9, y en el que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 10, 11, y 12.
- 25
- 30 **45)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 44, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID

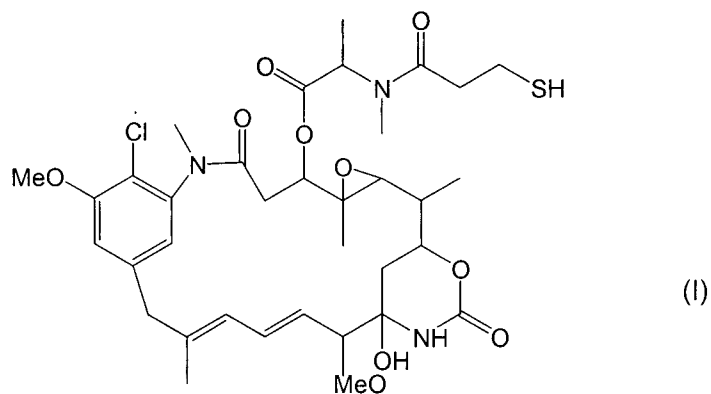
NOS: 48, 49, y 50.

- 5 **46)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 44, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 37, y 38.
- 10 **47)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-40, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 13, 14, y 15, y en el que
- 15 dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 16, 17 y 18.
- 20 **48)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 47, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 52.
- 25 **49)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 47, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende una o más de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 40, 42, 43, y 45.
- 30 **50)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-40, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen secuencias de

aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 61, 62, y 63, y dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 64, 65, y 66.

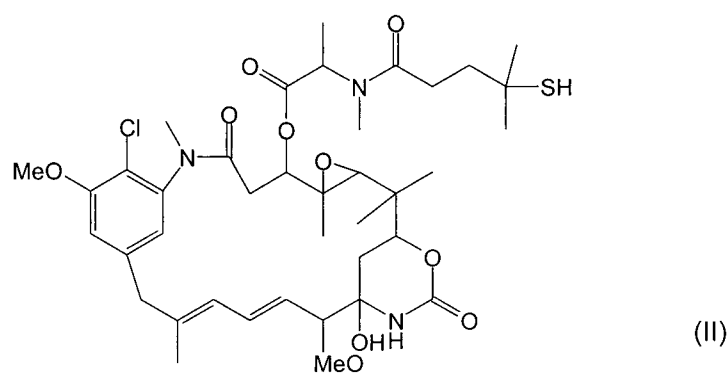
- 5 **51)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-40, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 67, 68, y 69, y dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuencial que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 70, 71, y 72.
- 10
- 15 **52)** Un anticuerpo humanizado o modificado en superficie o un fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o modificado en superficie o fragmento de éste que se une al epítipo se selecciona de un grupo que consiste en hu37.3D7, hu37.1F5, hu53.2H11, huEphA2-N1, y huEphA2-N2.
- 20 **53)** Un conjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-52 unido a un agente citotóxico.
- 25 **54)** El conjugado de la reivindicación 53, caracterizado porque dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide, un fármaco pequeño, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina, un profármaco, un taxoide, CC-1065 y un análogo de CC-1065.
- 55)** El conjugado de la reivindicación 53, caracterizado porque dicho agente citotóxico es la maitansina DM1 de fórmula:

5



56) El conjugado de la reivindicación 53, caracterizado porque dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de fórmula:

10



15

57) El conjugado de la reivindicación 53, caracterizado porque dicho agente citotóxico es un derivado de tomamicina seleccionado del grupo que consiste en:

20

- 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[2,6-piridindiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-

25

- 5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropilo)-2,6-piridindilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5
- 8,8'-[5-(3-aminopropilo)-1,3-bencenodilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10
- 8,8'-[5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propilo]-1,3-bencenodilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15
- éster terc-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metilen-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico
 - 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20
- 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25
- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30
- 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-

- bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 • 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 10 • 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 15 • 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[(4-(2-[2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 20 • 8,8'-[(1-(2-[2-(2-(2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[(1-(2-[2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 25 • 8,8'-[(4-(2-[2-(2-(2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 30 • 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 - 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona].
- 10 **58)** El conjugado de la reivindicación 53, caracterizado porque el agente citotóxico es un derivado de leptomicina seleccionado del grupo que consiste en:
- (2-Metilsulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-Hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico (2-metilsulfanil-etil)-amida
 - 15 • Bis-[(2-mercaptoetil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9, 11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico]
 - (2-Mercapto-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11, 15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
 - 20 • (2-Metildisulfanil-etil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
 - (2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
 - 25 • (2-Mercapto-2-metil-propil)-amida del ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico.
- 30 **59)** Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 1-52, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 53-58, y un vehículo o

excipiente aceptable farmacéuticamente.

- 60)
- Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones 1-52, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 53-58, para utilizarse como medicamento.
- 5
- 61)
- La utilización de un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo según cualquiera de las reivindicaciones 1-52, o de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 53-58, para fabricar un medicamento para tratar cáncer.
- 62)
- La utilización de la reivindicación 61, caracterizada porque dicho cáncer es un cáncer metastásico.
- 10
- 63)
- La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 61-62, caracterizada porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo, o dicho conjugado inhibe la neovascularización tumoral.
- 64)
- La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 61-63, caracterizada porque dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas.
- 15
- 65)
- La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 61-64, que comprende además la utilización de un agente terapéutico adicional en la fabricación de la misma composición o de una composición diferente.
- 20
- 66)
- La utilización según la reivindicación 65, caracterizada porque el agente terapéutico adicional es un antagonista del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o receptor HER2.
- 25
- 67)
- Un método para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o se sospecha que tiene un cáncer, comprendiendo dicho método:
- a)
- Poner en contacto células de dicho paciente con un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo,
- 30
- b)
- Determinar la unión de dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítopo a dichas células, y

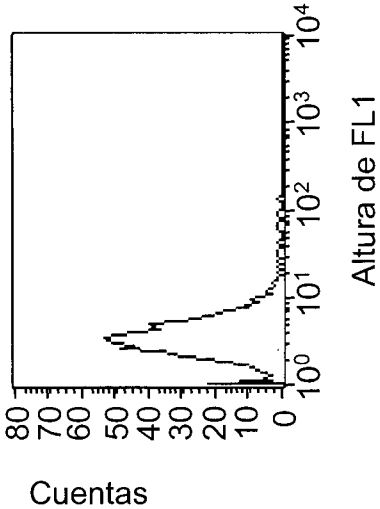
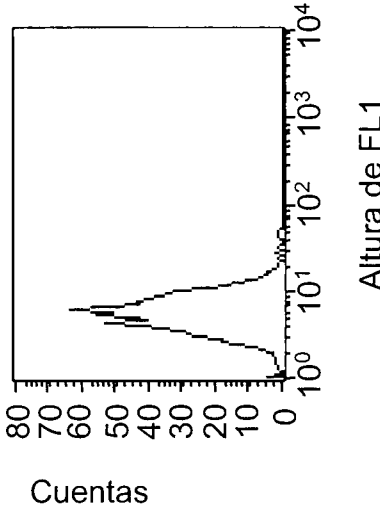
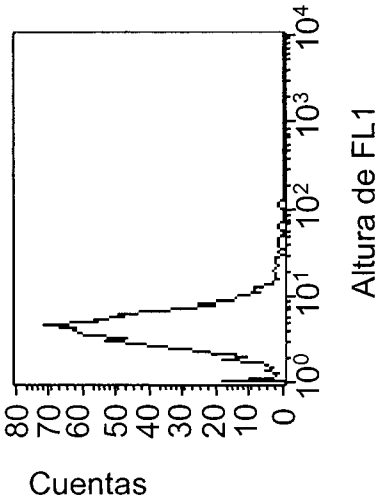
- c) Comparar la expresión de la parte (b) con la de un sujeto o estándar de referencia normal.
- 5 **68)** El método de la reivindicación 67, en el que dicho cáncer es una célula de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial y cáncer pancreático, sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas.
- 10 **69)** El método de la reivindicación 68, caracterizado porque dichas células están en tejido congelado o fijado o células de dicho paciente.
- 70)** Un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 76, 78 y 80.
- 15 **71)** Un polinucleótido según la reivindicación 70, caracterizado porque dicho polinucleótido tiene una secuencia que presenta una homología de al menos el 80 % con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 39, 41, 44, 46, 51, 73, 75, 77, y 79.
- 72)** Un vector recombinante que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 70 y 71.
- 20 **73)** Una célula anfitriona que comprende un vector de la reivindicación 72.
- 74)** Una línea celular de hibridoma caracterizada porque se selecciona del grupo que consiste en la línea celular de hibridoma denominada 37.3D7 en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture
- 25 Collection con el número de registro PTA-7660; la línea celular de hibridoma denominada 37.1F5, en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture Collection con el número de registro PTA-7661; la línea celular de hibridoma denominada 53.2H11, en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture Collection con el número
- 30 de registro PTA-7662; la línea celular de hibridoma denominada EphA2-N1, en la que dicha línea celular de hibridoma está depositada en la American Type Culture Collection con el número de registro PTM-8407; o la línea celular de hibridoma denominada EphA2-N2, en la que dicha línea celular de hibridoma está

RESUMEN

Anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos modificados en superficie, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos derivatizados, y conjugados de éstos con agentes citotóxicos, que se unen específicamente a, e inhiben la clase A de los receptores Eph, antagonizan los efectos de factores de crecimiento en el crecimiento y supervivencia de células tumorales, y que tienen una actividad agonista mínima o que preferiblemente carecen de actividad agonista. Dichos anticuerpos y fragmentos de éstos pueden utilizarse en el tratamiento de tumores que expresan niveles elevados de la clase A de receptores Eph, tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, carcinoma de ovario, sarcoma sinovial y cáncer pancreático, y dichos anticuerpos derivatizados pueden utilizarse en el diagnóstico y en la obtención de imágenes de tumores que expresan niveles elevados de la clase A de receptores Eph. También se proporcionan conjugados citotóxicos que comprenden un agente de unión a células y un agente citotóxico, se describen composiciones terapéuticas que comprenden el conjugado, métodos para utilizar los conjugados en la inhibición del crecimiento celular y en el tratamiento de la enfermedad, y un kit que comprende el conjugado citotóxico, siendo todas realizaciones de la invención. En particular, el agente de unión a células es un anticuerpo monoclonal, y fragmentos de éste que se unen al epítipo, que reconoce y se une a la clase A de receptores Eph.

Fig. 1A

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



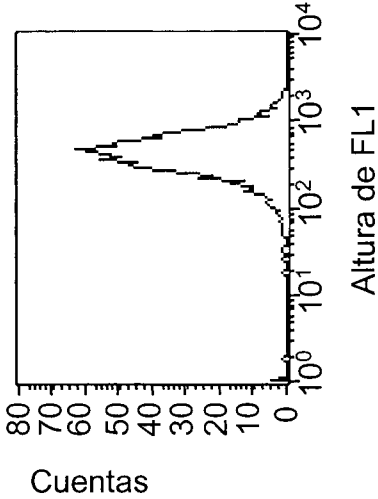
Altura de FL1

Altura de FL1

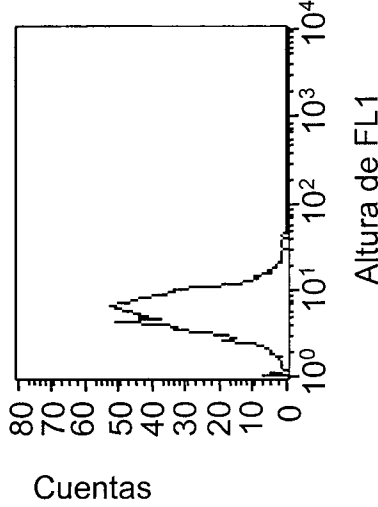
Altura de FL1

1/23

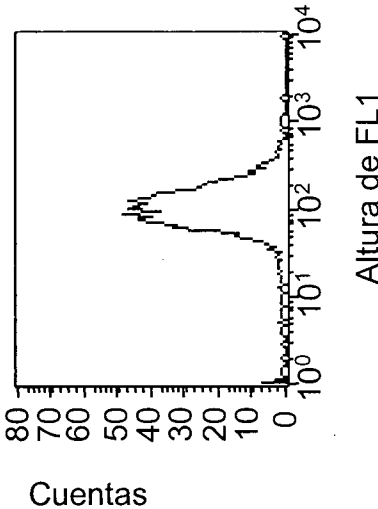
60nM 37.3D7



60nM 37.3D7



60nM B2D6



Altura de FL1

Altura de FL1

Altura de FL1

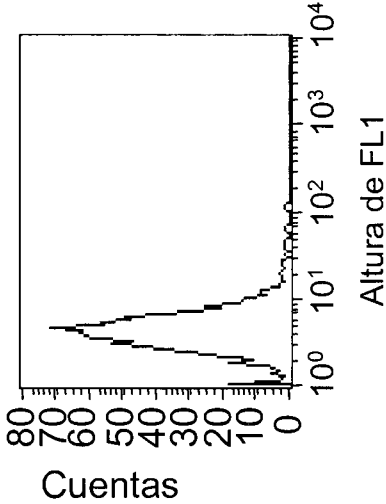
300-19/hu-EphA2

Células 300-19

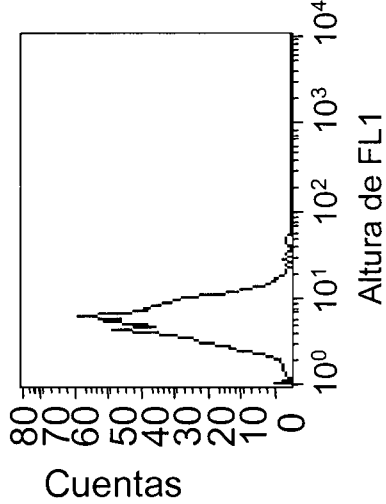
300-19/hu-EphA2

Fig. 1B

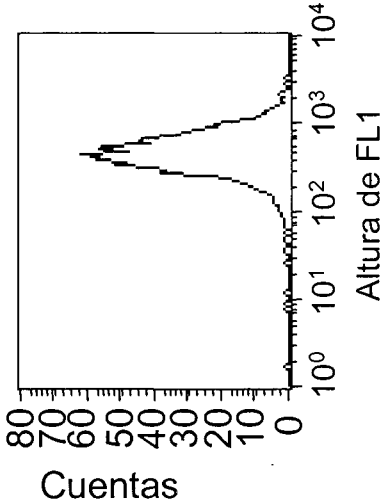
IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo



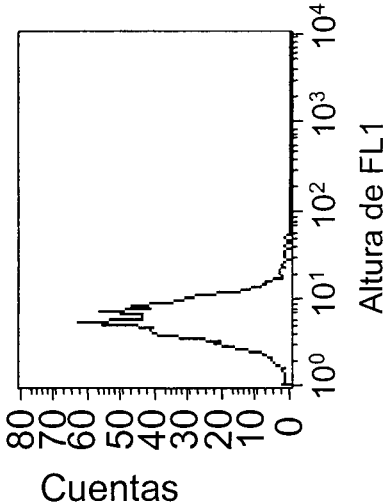
IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo



60nM 37.1F5



60nM 37.1F5



300-19/hu-EphA2

Células 300-19

Fig. 1C

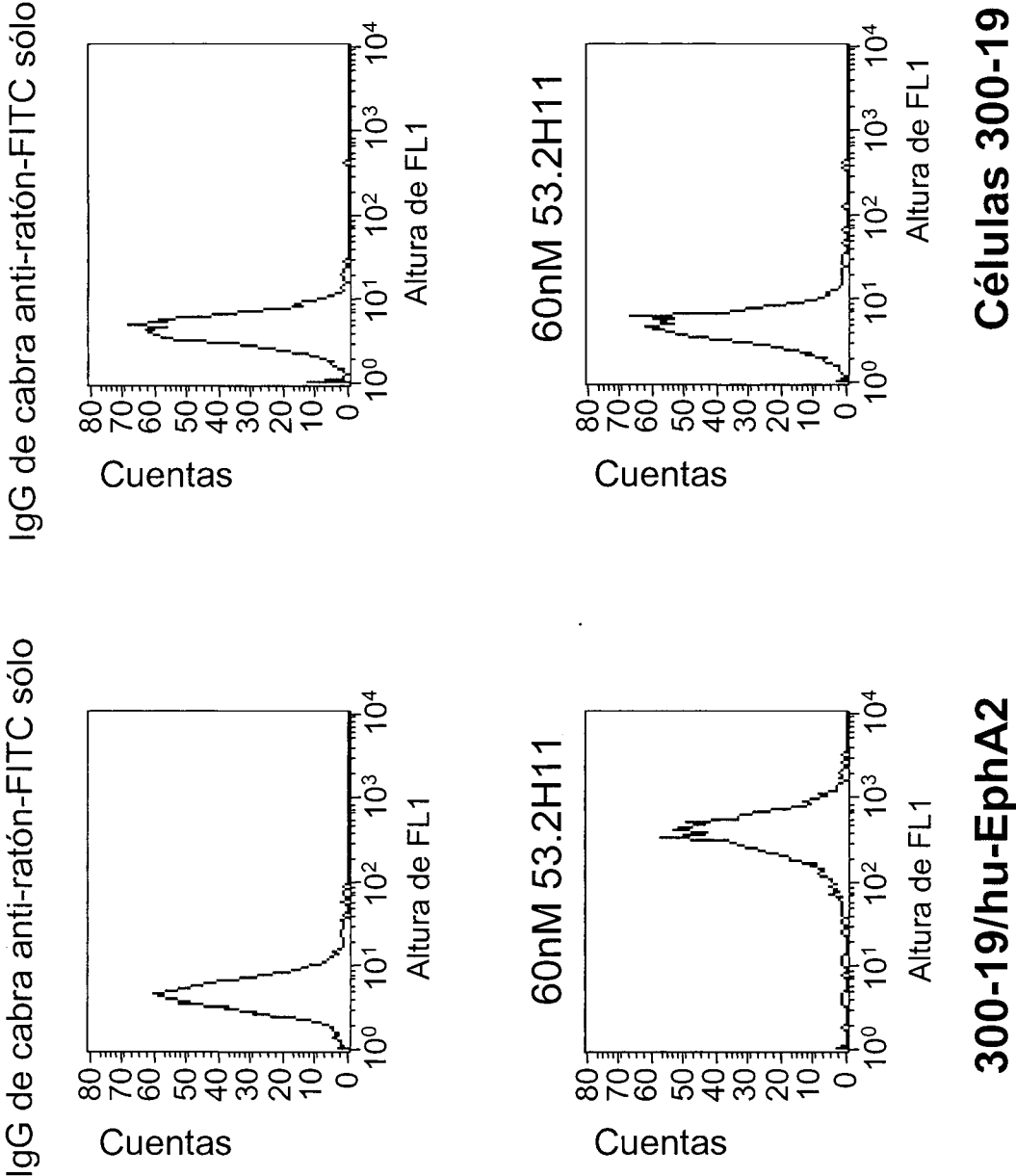
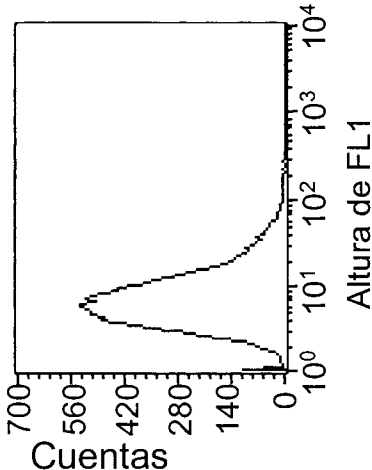
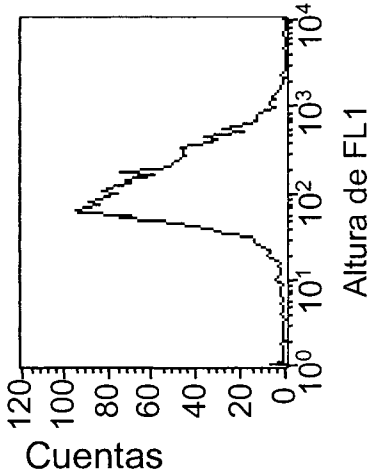


Fig. 2

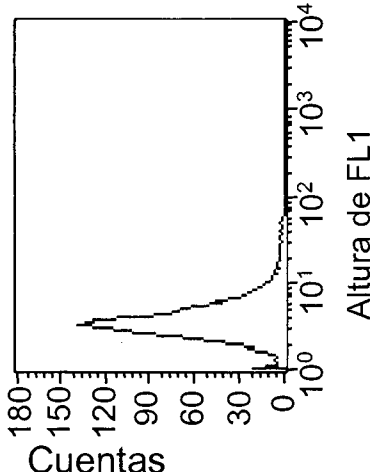
IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo



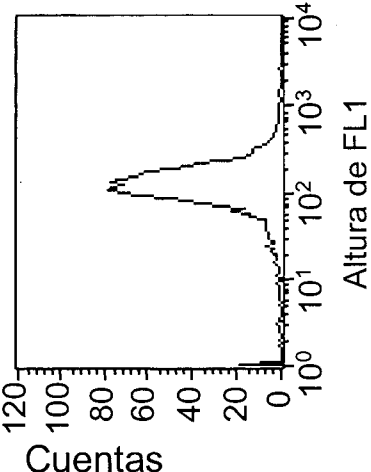
60nM 37.3D7



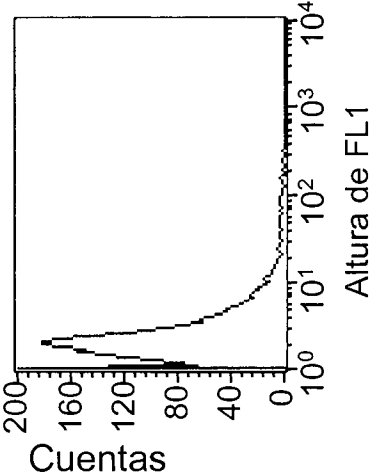
BXPC-3



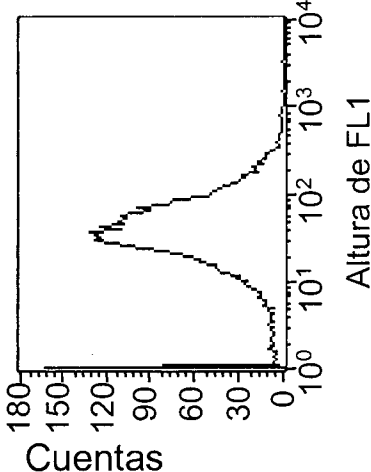
60nM 37.3D7



MDA-MB-231



60nM 37.3D7



HT-29

Fig. 3A

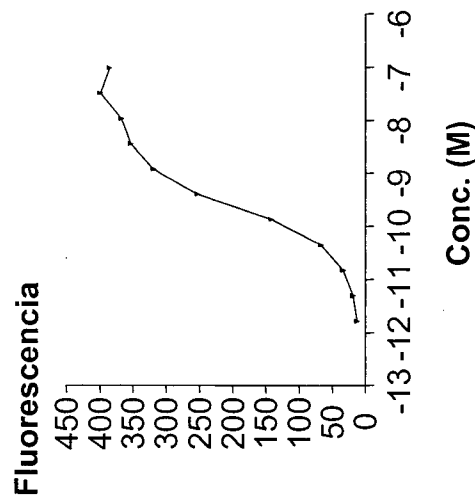


Fig. 3B

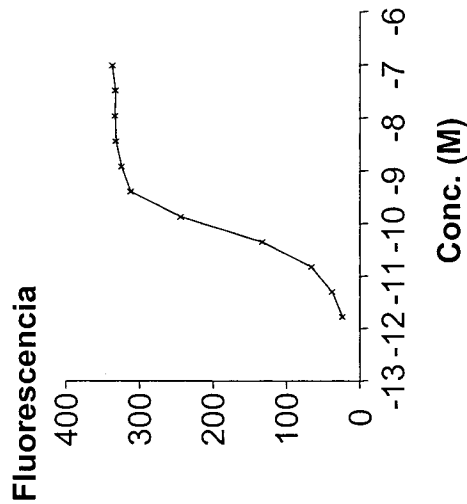
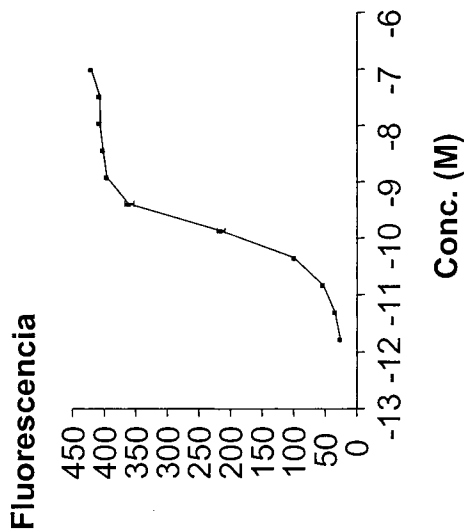


Fig. 3C



37.3D7

37.1F5

53.2H11

Fig. 4A

300-19/mu-EphA2

IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo

60nM 37.3D7

60nM 53.2H11

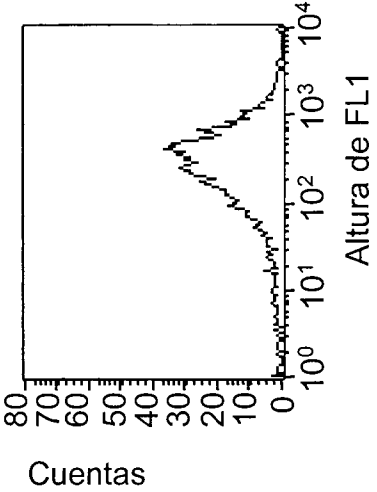
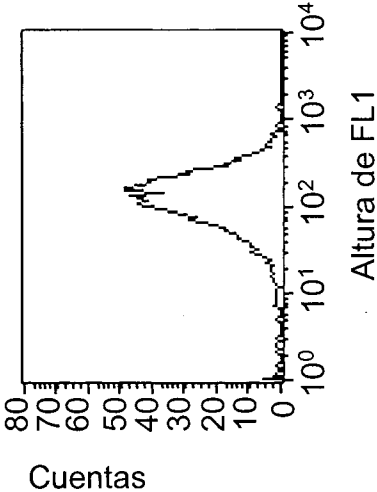
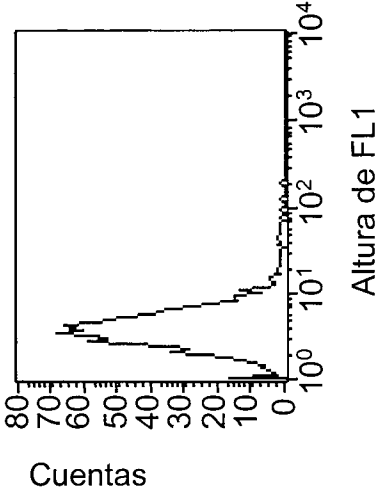
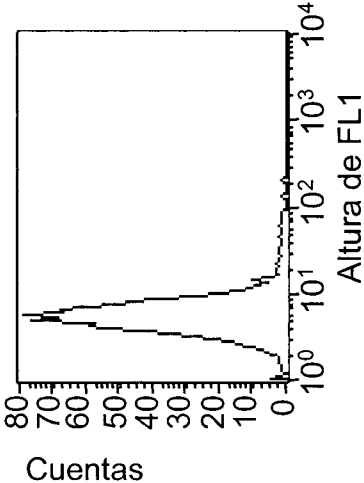


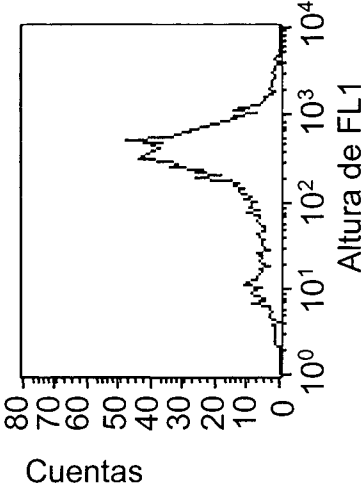
Fig. 4B

300-19/Rat-EphA2

IgG de cabra anti-ratón-FITC sólo



60nM 37.3D7



60nM 53.2H11

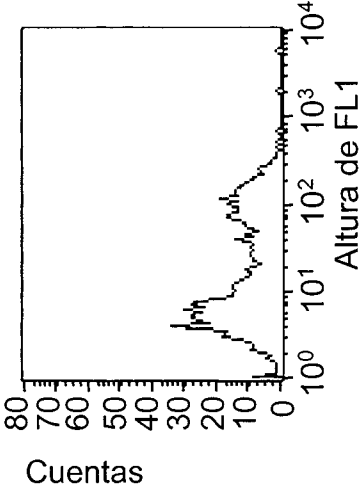


Fig. 5 A

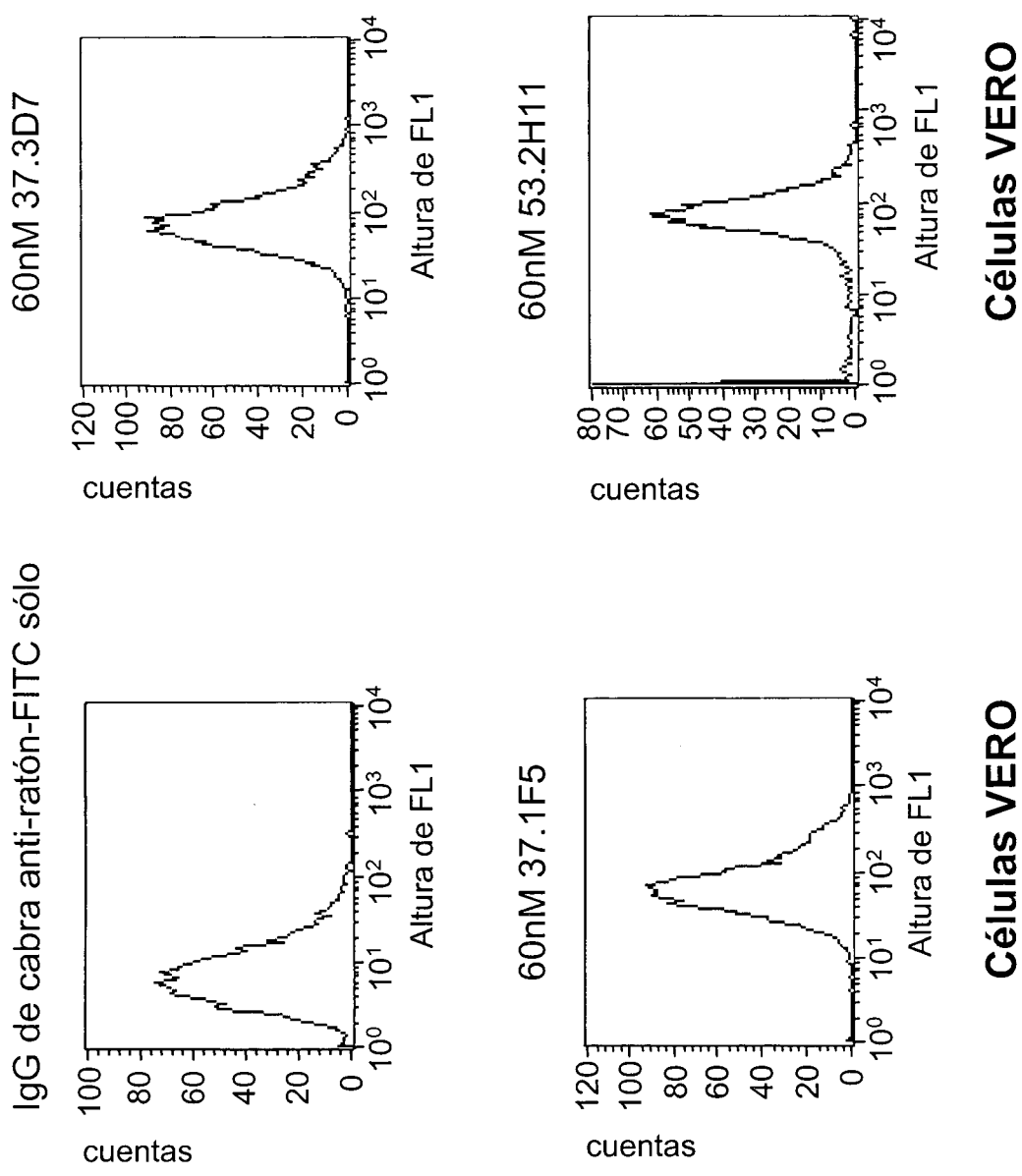
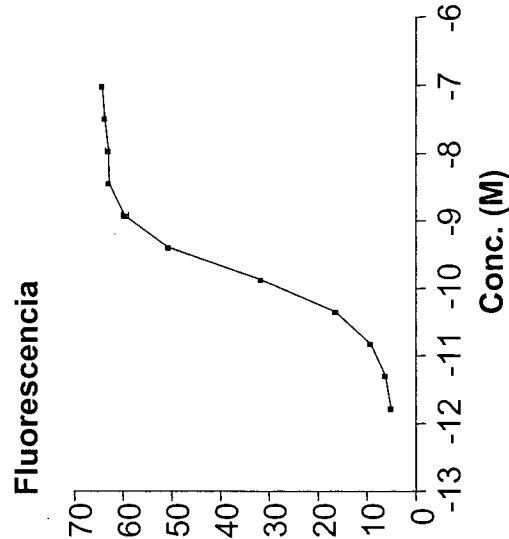


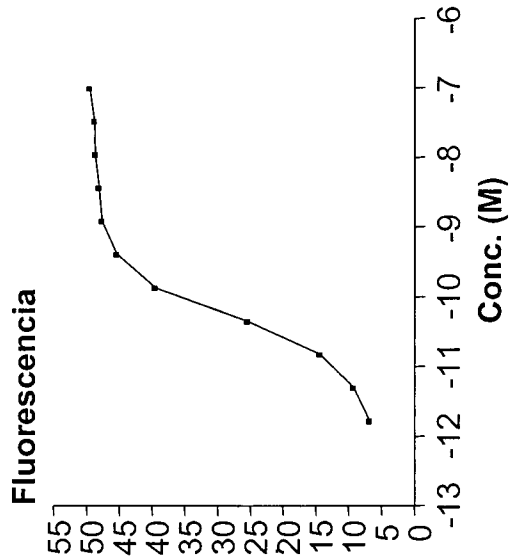
Fig. 5 B

37.3D7



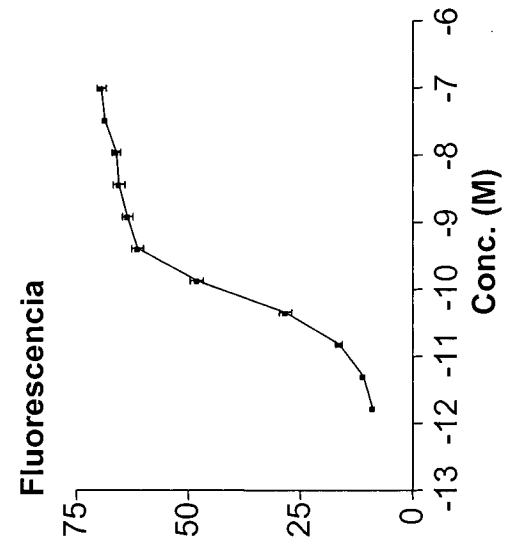
Células VERO

37.1F5



Células VERO

53.2H11



Células VERO

10/23

Fig. 6

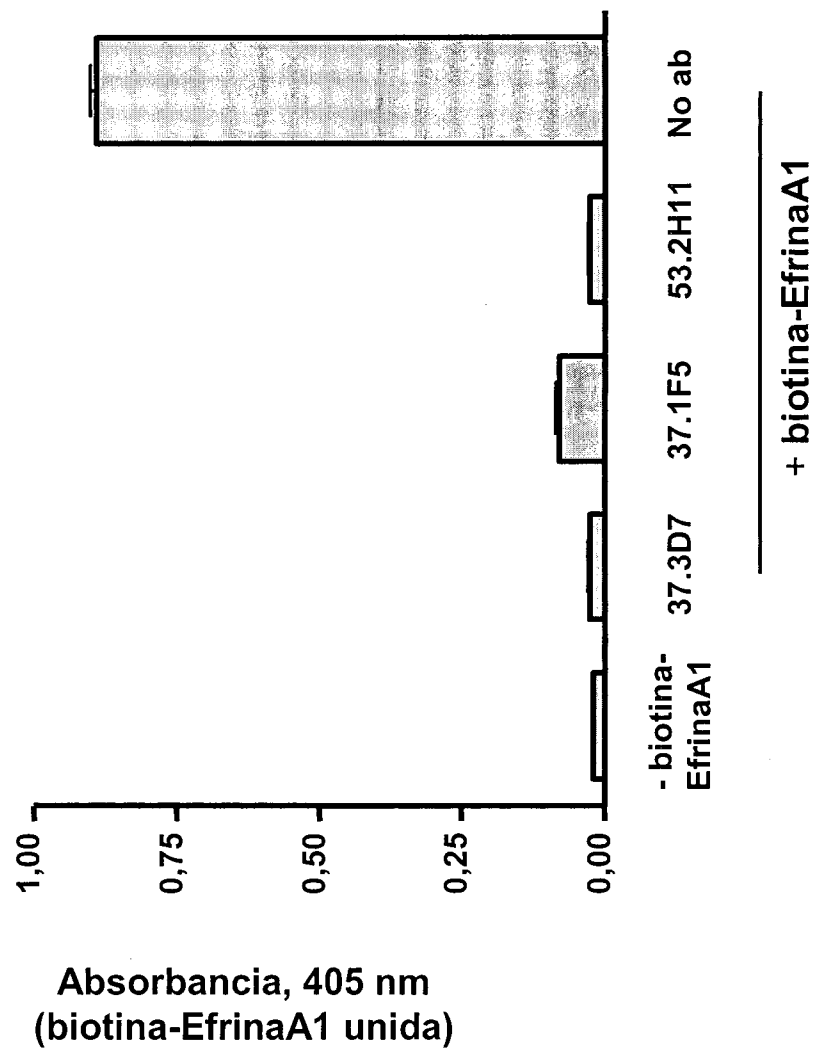


Fig. 7A

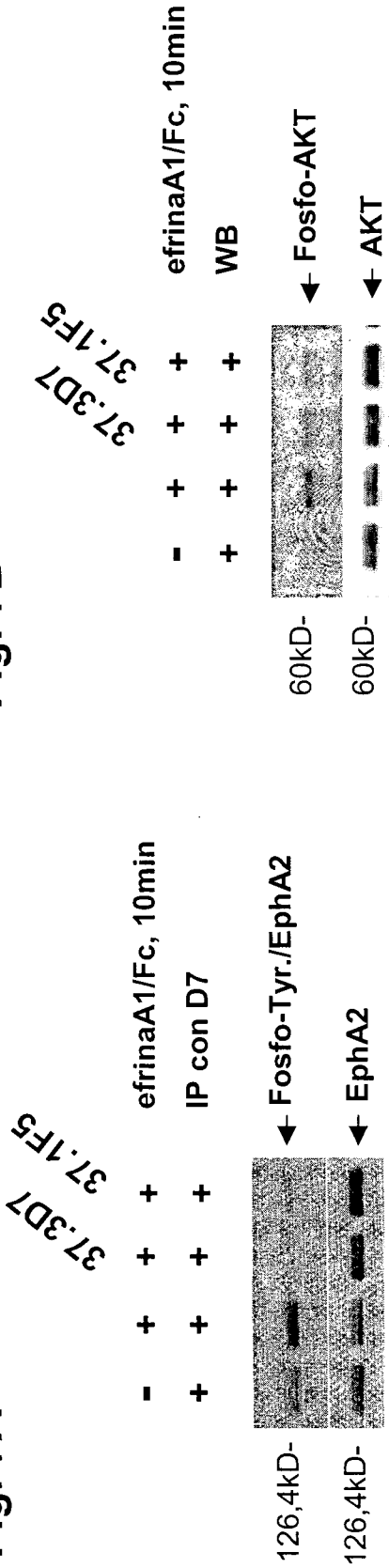


Fig. 7B

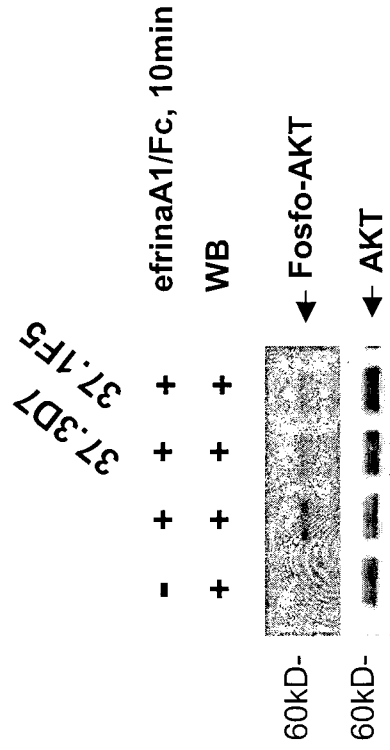


Fig. 7C

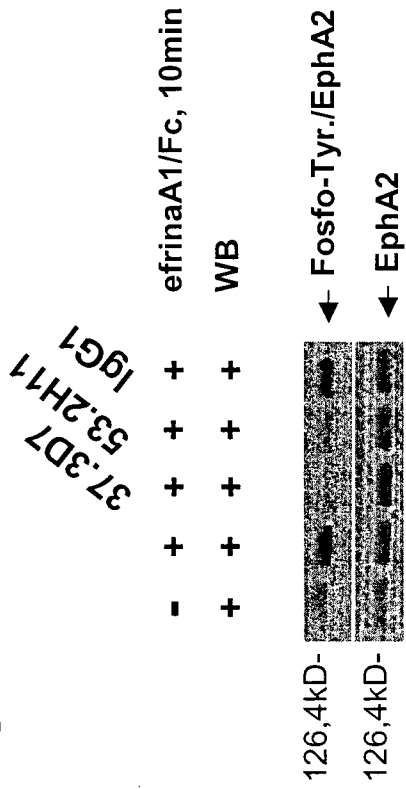


Fig. 9A

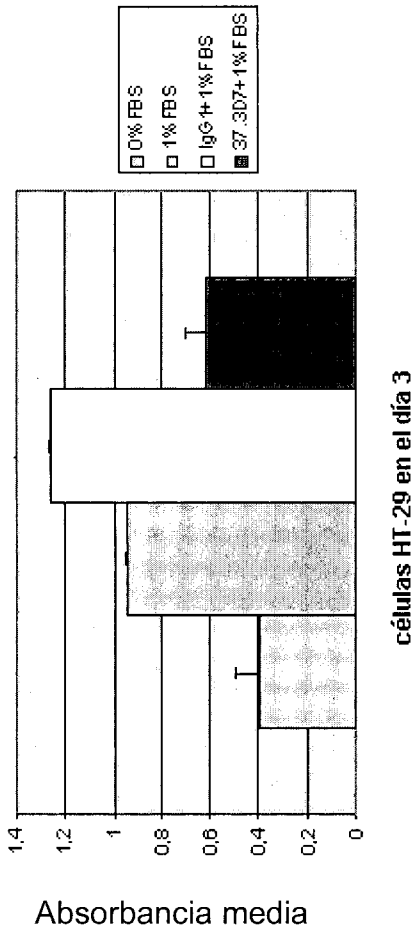
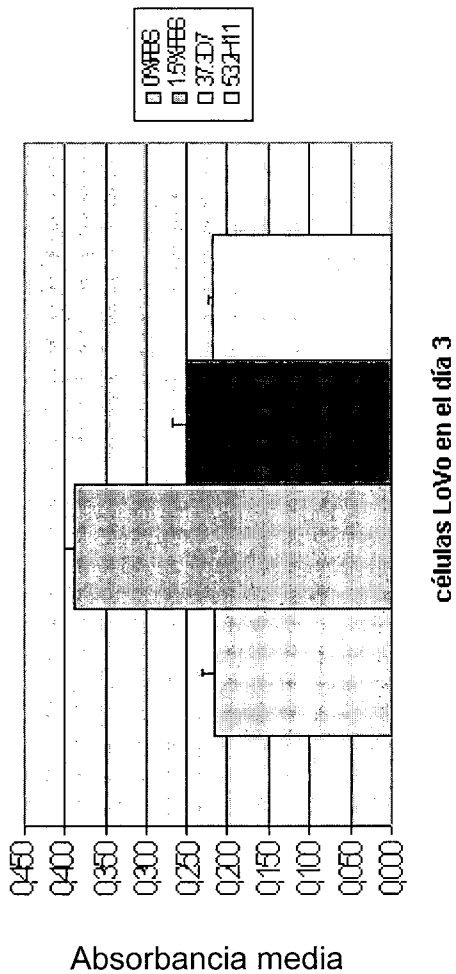


Fig. 9B



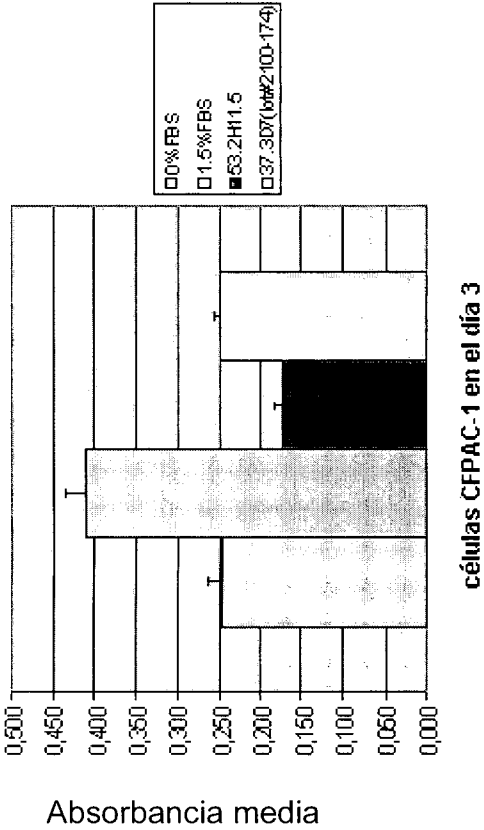


Fig. 9C

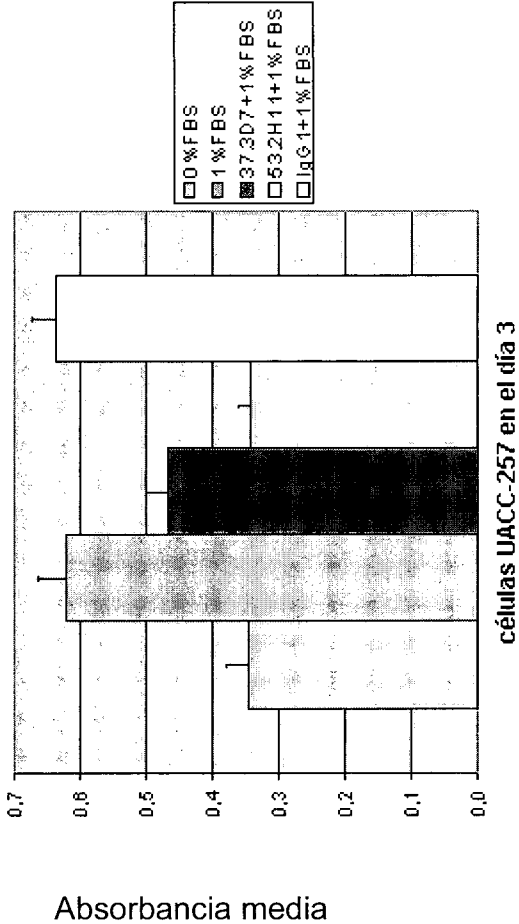


Fig. 9D

Fig. 10A

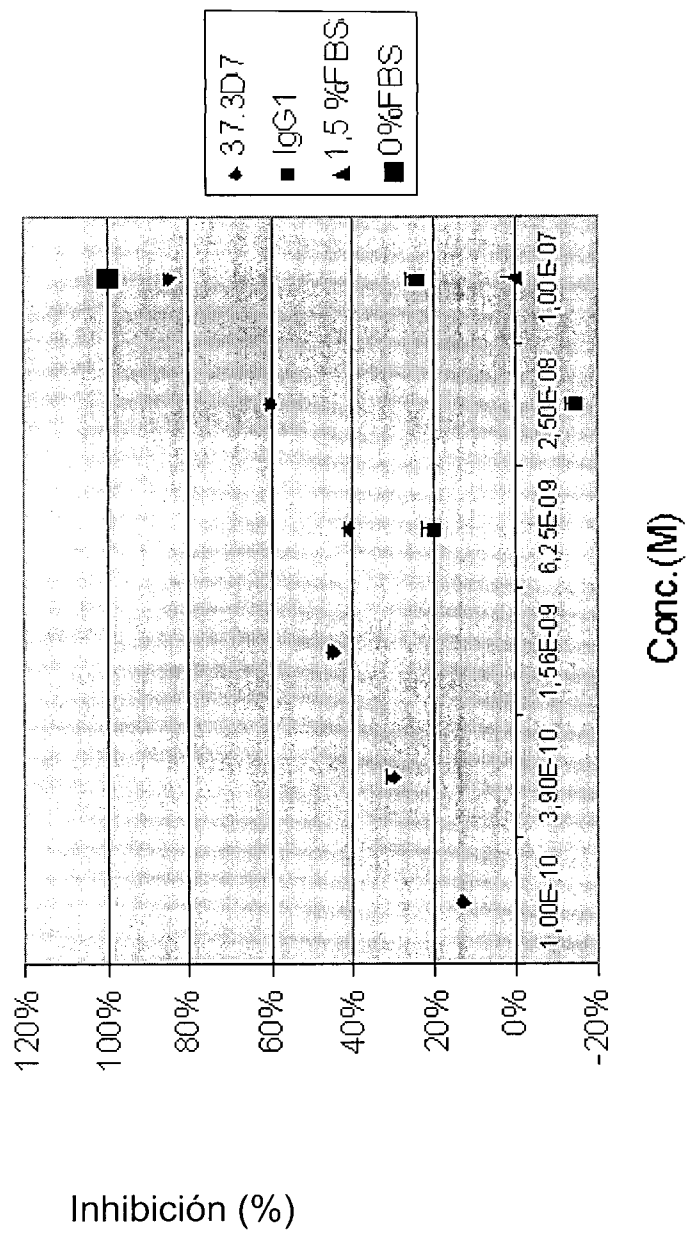


Fig. 10B

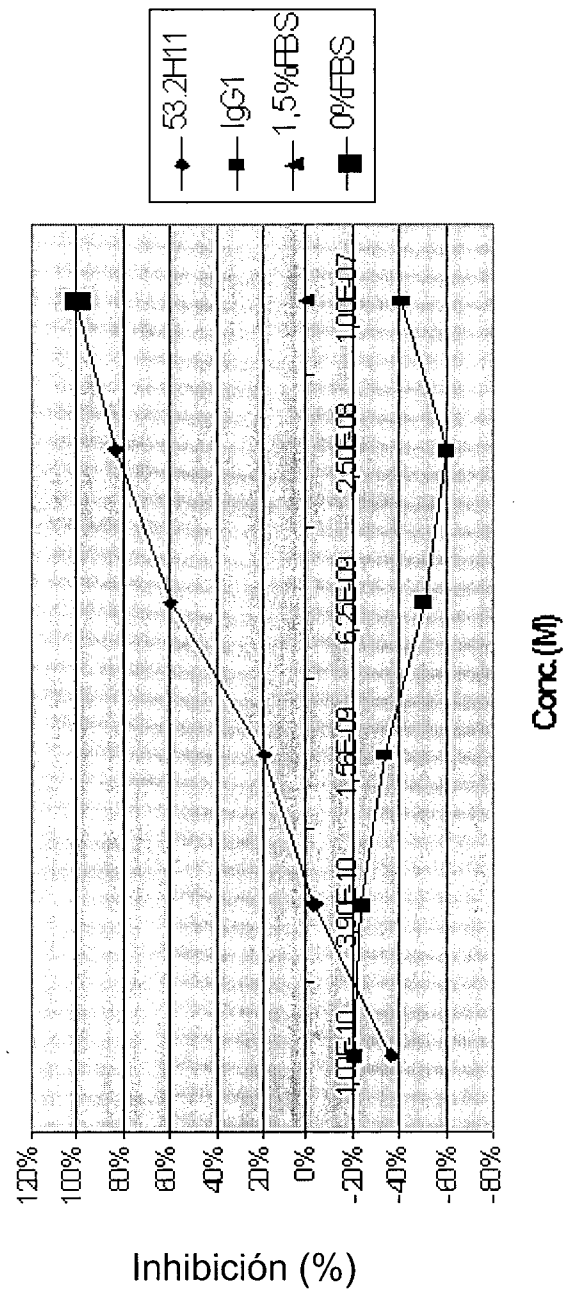
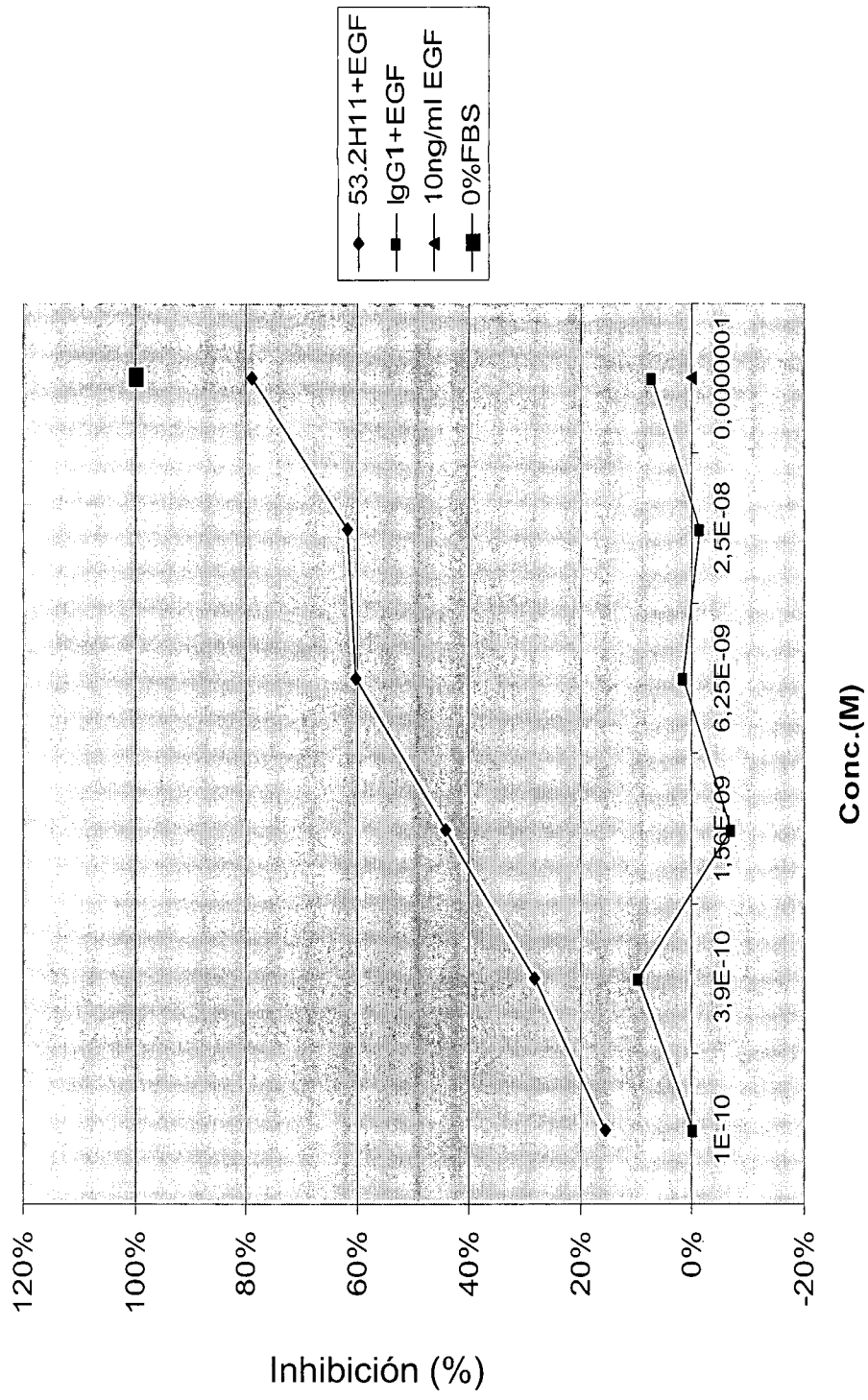


Fig. 10C



17/23

300

392

Fig. 11A

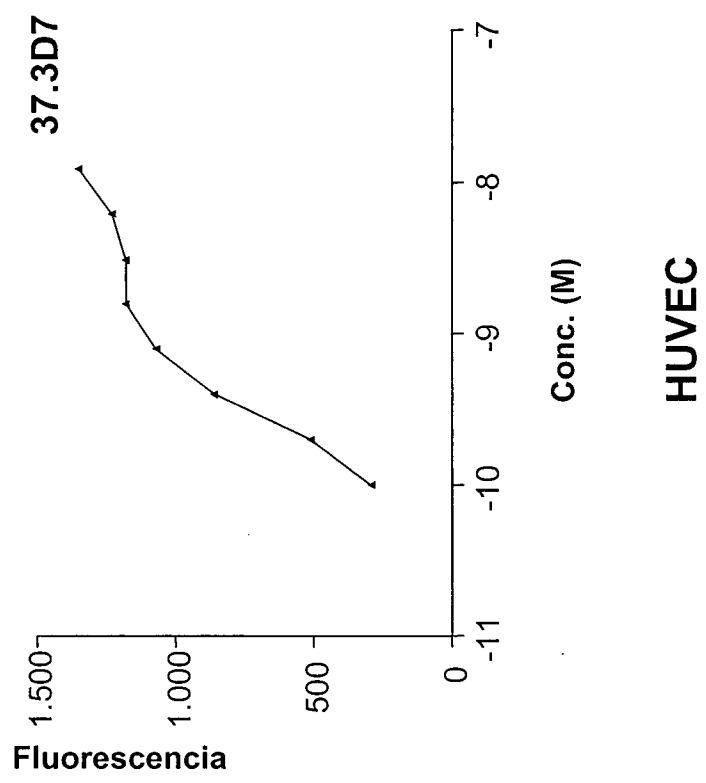


Fig. 11B

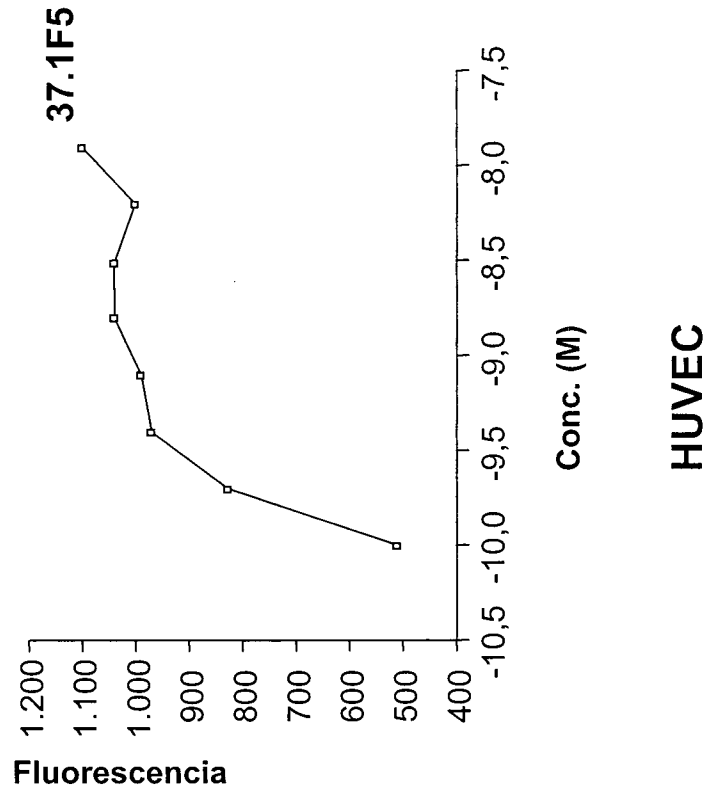


Fig. 12

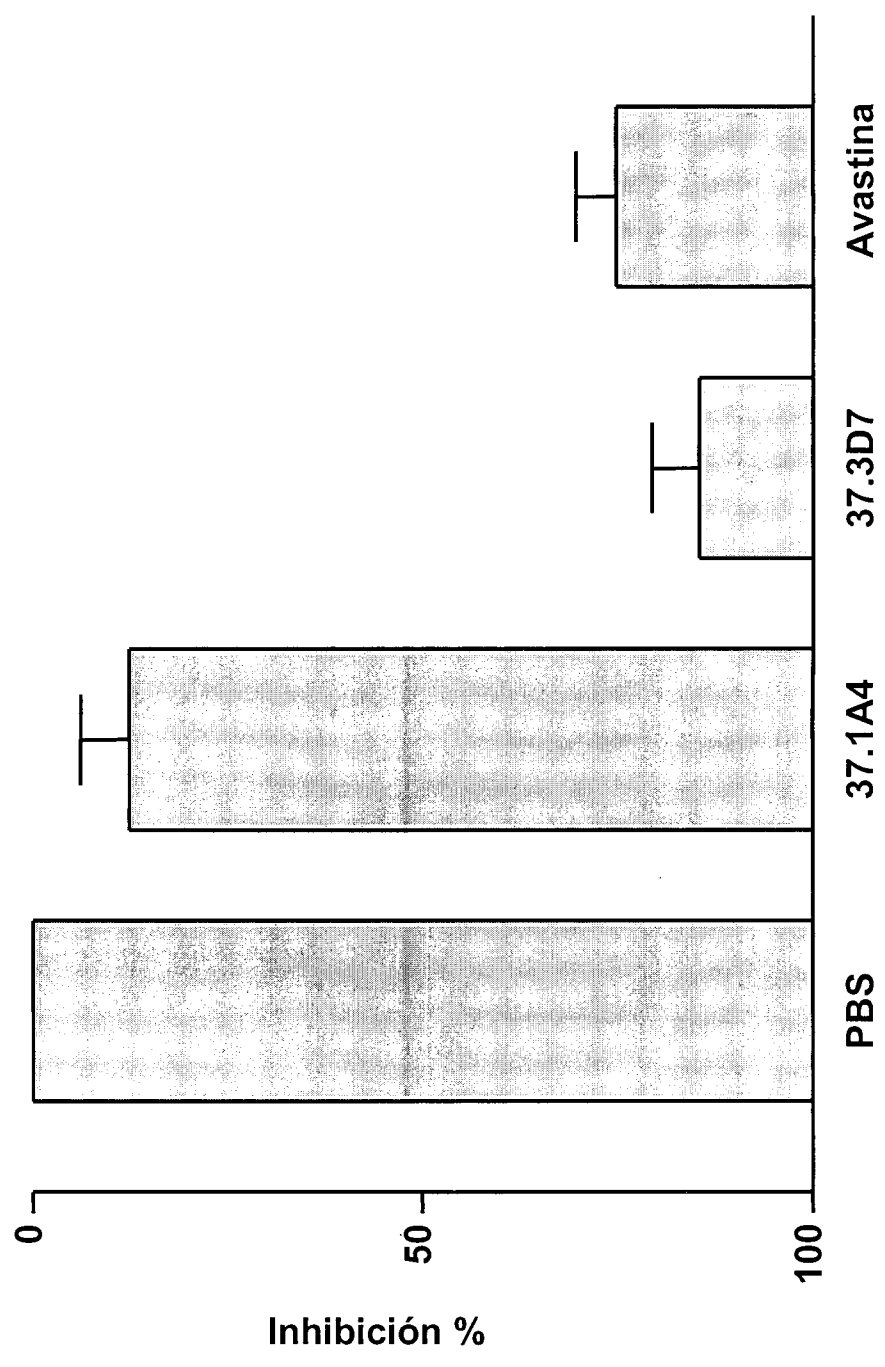


Fig. 13

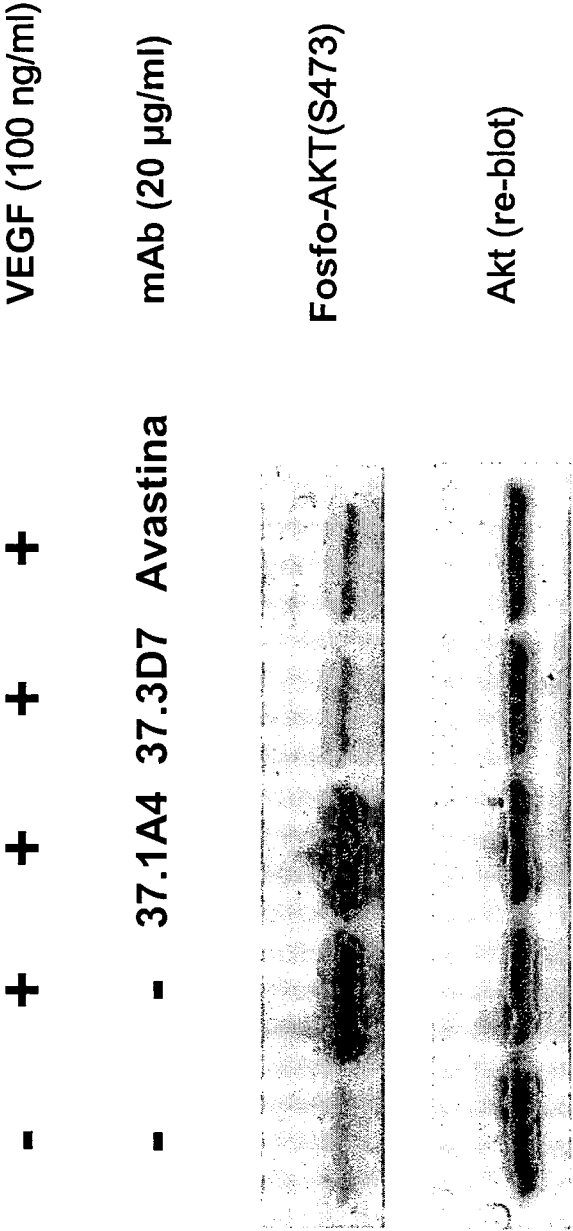


Fig. 14

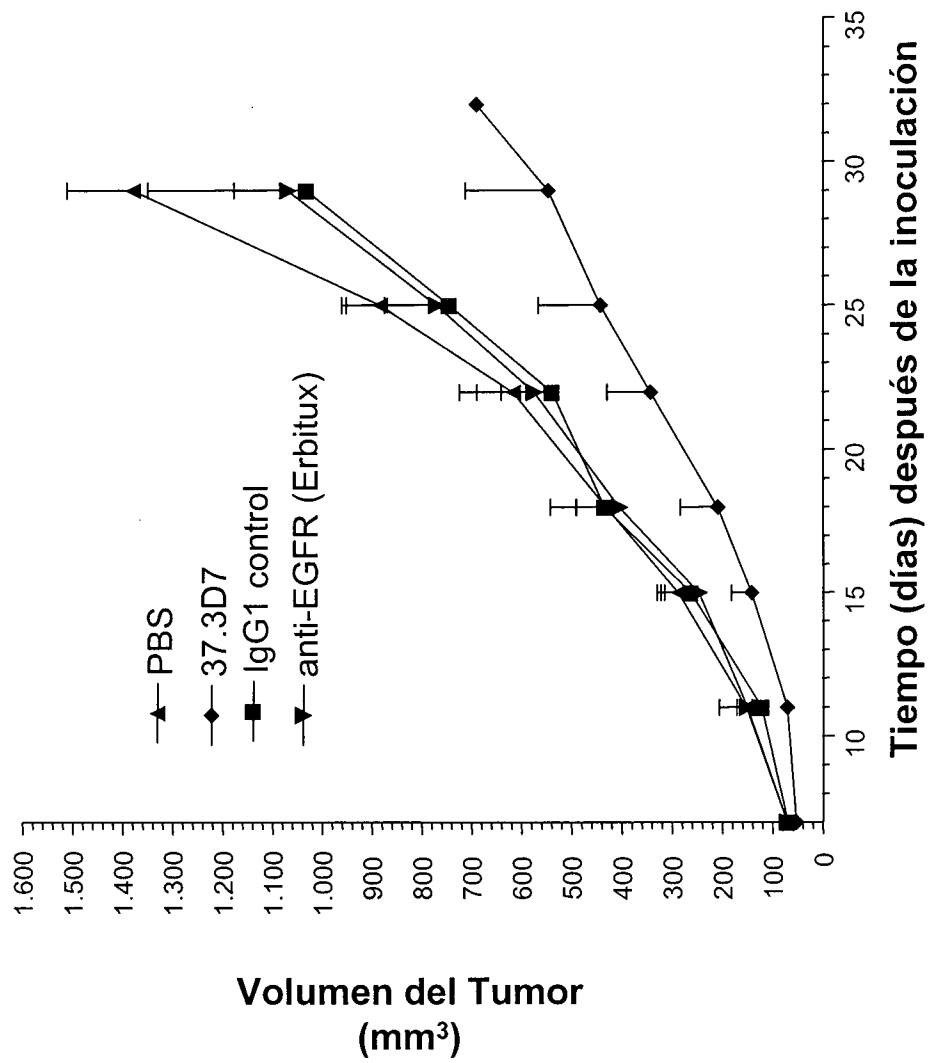


Fig. 15A

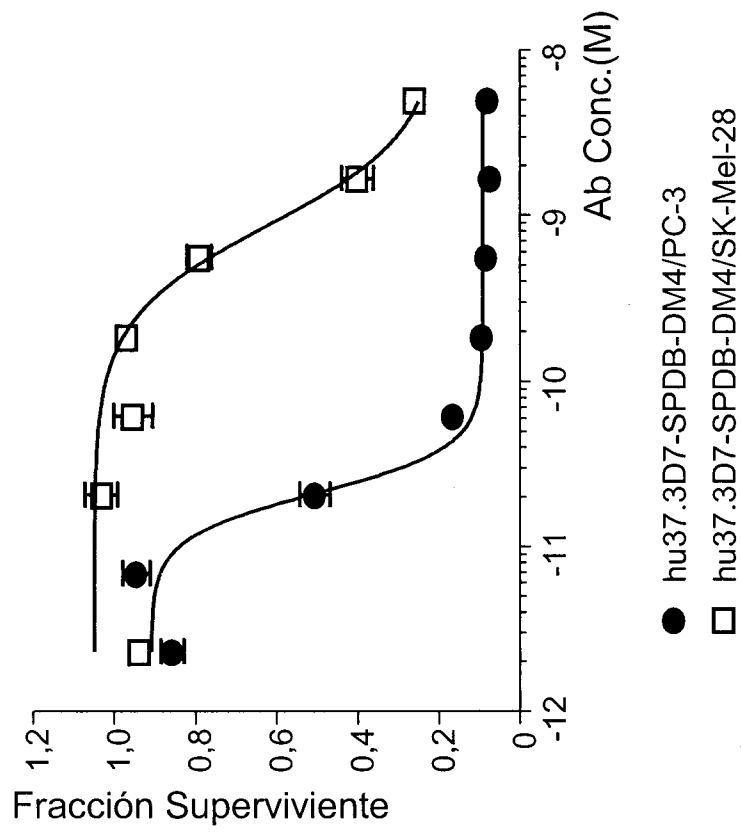


Fig. 15B

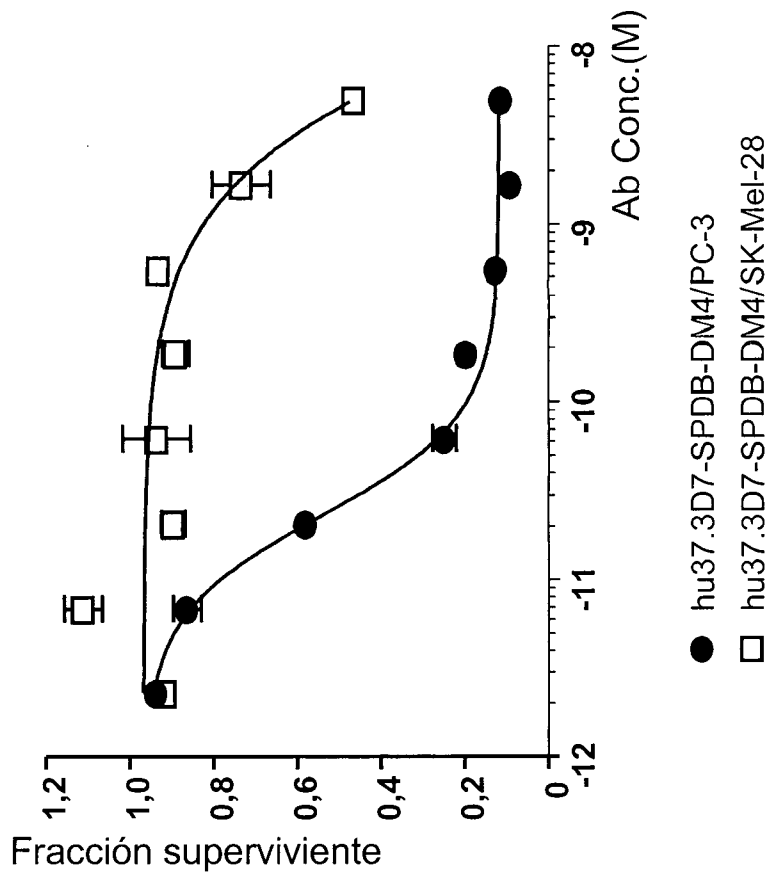


Fig. 16A

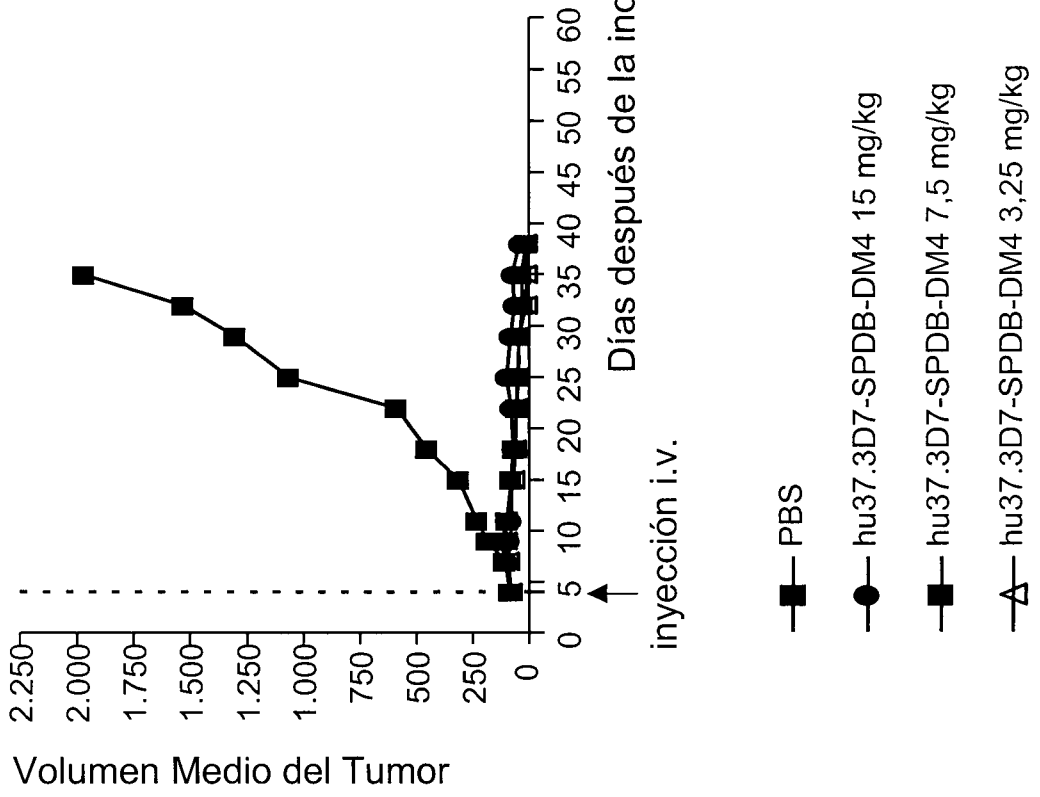
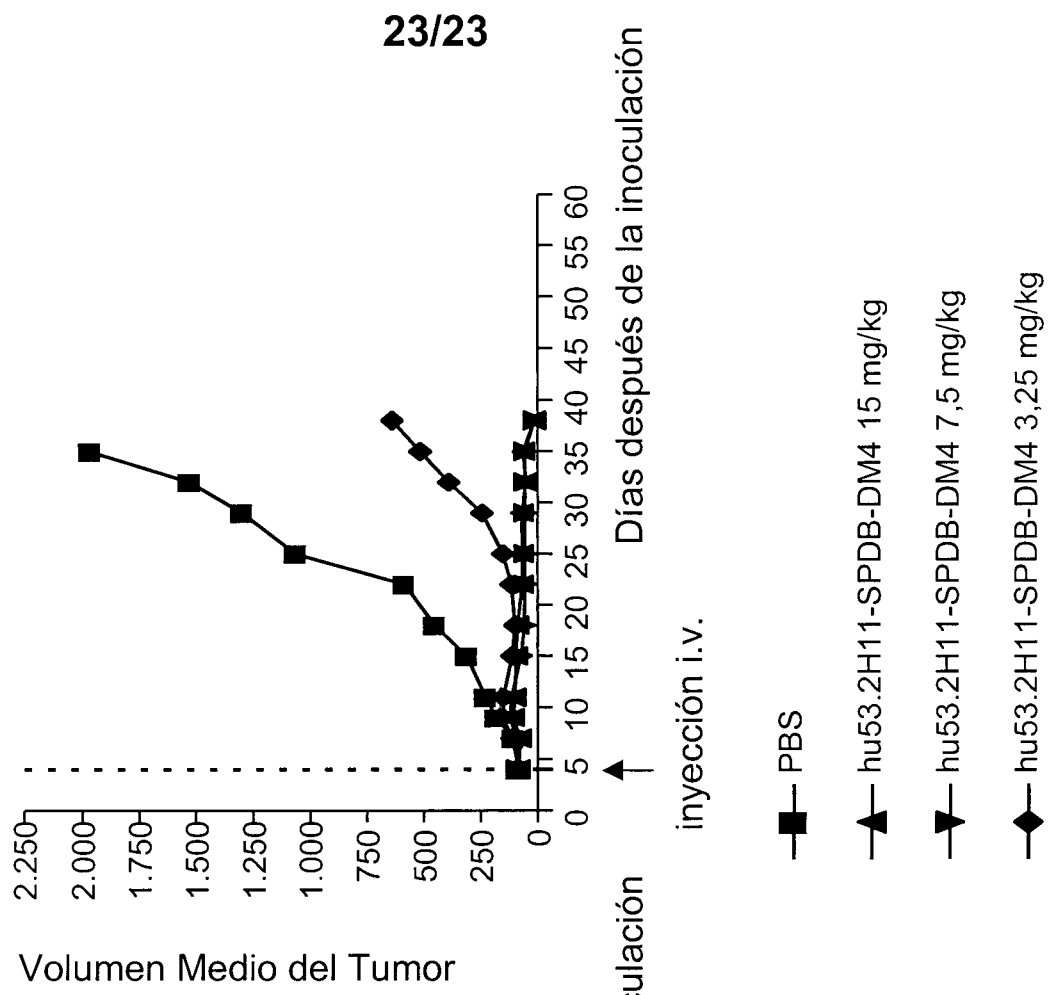


Fig. 16B



ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Teléfono: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES**FORMULARIO INTERNACIONAL****RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EXPEDIDO CONFORME A LA REGLA 7.3 Y DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EXPEDIDA CONFORME A LA REGLA 10.**

A: (Nombre y Dirección del Depositante o Abogado)

Sanofi-Aventis
Atn: Jiawen Han
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139

Depositado de Parte de: Sanofi-Aventis, 174 Avenue de France, 75013 París, Francia

Referencia de Identificación por el Depositante: Denominación del Depósito de Patente

Híbrido de Ratón: 37.3D7
Híbrido de Ratón: 37.1F5

PTA-7660
PTA-7661

Los depósitos se acompañaron de: ☒ una descripción científica_ una descripción taxonómica propuesta indicada anteriormente. Los depósitos fueron recibidos el 16 de junio, 2006 por esta Autoridad Internacional de Depósito y han sido aceptados.

SI LO SOLICITA: ☒ Le informaremos de solicitudes de las cepas durante 30 años.

Las cepas estarán disponibles si una oficina de patentes firmante del Tratado de Budapest certifica el derecho de alguien para recibirlas, o si se expide una Patente de EEUU citando las cepas, y la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos o el depositante autoriza a la ATCC para entregar dichas cepas.

Si los cultivos mueren o se destruyen durante el plazo efectivo del depósito, será su responsabilidad reemplazarlos por cultivos vivos de lo mismo.

Las cepas se mantendrán durante un periodo de al menos 30 años a partir de la fecha del depósito, o de cinco años después de la solicitud más reciente de una muestra, lo que sea más prolongado. Los Estados Unidos y otros muchos países son firmantes del Tratado de Budapest.

La viabilidad de los cultivos citados anteriormente se ensayó el 21 de julio, 2006. En esa fecha, los cultivos eran viables.

Autoridad Internacional de Depósito: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 EEUU.

Firma de la persona con autoridad para representar a la ATCC:

Fecha: 29 de julio, 2006

Marie Harris, Especialista en Patentes, Depositaria de Patentes de la ATCC
cc: Philippe Bouvet
No de Expediente o Caso: FR2006/030

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Teléfono: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EXPEDIDO CONFORME A LA REGLA 7.3 Y DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EXPEDIDA CONFORME A LA REGLA 10.

A: (Nombre y Dirección del Depositante o Abogado)

Sanofi-Aventis
Atn: Jiawen Han
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139

Depositado de Parte de: Sanofi-Aventis, 174 Avenue de France, 75013 París, Francia

Referencia de Identificación por el Depositante: Denominación del Depósito de Patente

Hibridoma de Ratón: 53.2H11 PTA-7662

El depósito se acompañó de: ☒ una descripción científica_ una descripción taxonómica propuesta indicada anteriormente.

El depósito fue recibido el 16 de junio, 2006 por esta Autoridad Internacional de Depósito y ha sido aceptado.

SI LO SOLICITA: ☒ Le informaremos de solicitudes de la cepa durante 30 años.

La cepa estará disponible si una oficina de patentes firmante del Tratado de Budapest certifica el derecho de alguien para recibirla, o si se expide una Patente de EEUU citando la cepa, y la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos o el depositante autoriza a la ATCC para entregar dicha cepa.

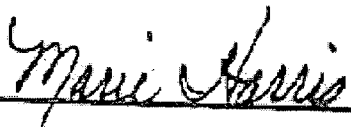
Si el cultivo muere o se destruye durante el plazo efectivo del depósito, será su responsabilidad reemplazarlo por un cultivo vivo de lo mismo.

La cepa se mantendrá durante un periodo de al menos 30 años a partir de la fecha del depósito, o de cinco años después de la solicitud más reciente de una muestra, lo que sea más prolongado. Los Estados Unidos y otros muchos países son firmantes del Tratado de Budapest.

La viabilidad del cultivo citado anteriormente se ensayó el 26 de julio, 2006. En esa fecha, el cultivo era viable.

Autoridad Internacional de Depósito: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 EEUU.

Firma de la persona con autoridad para representar a la ATCC:



Fecha: 29 de julio, 2006

Marie Harris, Especialista en Patentes, Depositaria de Patentes de la ATCC

cc: Philippe Bouvet

No de Expediente o Caso: FR2006/030

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Teléfono: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EXPEDIDO CONFORME A LA REGLA 7.3 Y DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EXPEDIDA CONFORME A LA REGLA 10.

A: (Nombre y Dirección del Depositante o Abogado)

Immunogen, Inc.
ATN: Jiawen Han Ph. D.
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139

Depositado de Parte de: Sanofi-Aventis, París, Francia

Referencia de Identificación por el Depositante:

Denominación del Depósito de Patente

Línea celular de hibridoma de ratón: EphA2-N1

PTA-8407

Línea celular de hibridoma de ratón: EphA2-N2

PTA-8408

Los depósitos se acompañaron de: ☒ una descripción científica_ una descripción taxonómica propuesta indicada anteriormente.

Los depósitos fueron recibidos el 3 de mayo, 2007 por esta Autoridad Internacional de Depósito y han sido aceptados.

SI LO SOLICITA: ☒ Le informaremos de solicitudes de las cepas durante 30 años.

Las cepas estarán disponibles si una oficina de patentes firmante del Tratado de Budapest certifica el derecho de alguien para recibirlas, o si se expide una Patente de EEUU citando las cepas, y la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos o el depositante autoriza a la ATCC para entregar dichas cepas.

Si los cultivos mueren o se destruyen durante el plazo efectivo del depósito, será su responsabilidad reemplazarlos por cultivos vivos de lo mismo.

Las cepas se mantendrán durante un periodo de al menos 30 años a partir de la fecha del depósito, o de cinco años después de la solicitud más reciente de una muestra, lo que sea más prolongado. Los Estados Unidos y otros muchos países son firmantes del Tratado de Budapest.

La viabilidad de los cultivos citados anteriormente se ensayó el 25 de mayo, 2007. En esa fecha, los cultivos eran viables.

Autoridad Internacional de Depósito: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 EEUU.

Firma de la persona con autoridad para representar a la ATCC:



Dee Bishop, Depositario de Patentes de ATCC

Fecha: 30 de mayo, 2007

cc: Philippe Bouvet

Ref: Expediente o Caso #: FR2006/030

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario FR2006/030	Solicitud internacional N°
---	----------------------------

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO
O DE OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página 4 , línea 28 A 33	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en una hoja adicional. ☐	
Nombre de la institución de depósito American Type Culture Collection	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, EE.UU.	
Fecha de depósito: 16 Junio 2006	n° de acceso PTA7660
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario) Esta información continua en una hoja adicional ☐	
Los solicitantes piden que la disponibilidad de los materiales biológicos depositados a los que se refiere la presente solicitud se efectúe solo proporcionando una muestra a un experto bajo la Regla 13bis.3 de los reglamentos bajo el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)	
Para todos los Estados designados	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora ☐ Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional Funcionario autorizado	Reservado a la Oficina Internacional ☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el: Funcionario autorizado
---	--

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario FR2006/030	Solicitud internacional N°
---	----------------------------

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO
O DE OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página 4 , línea 28 A 33	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en una hoja adicional. ☐	
Nombre de la institución de depósito American Type Culture Collection	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, EE.UU.	
Fecha de depósito: 16 Junio 2006	n° de acceso PTA7661
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario) Esta información continua en una hoja adicional ☐	
Los solicitantes piden que la disponibilidad de los materiales biológicos depositados a los que se refiere la presente solicitud se efectúe solo proporcionando una muestra a un experto bajo la Regla 13bis.3 de los reglamentos bajo el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)	
Para todos los Estados designados	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora ☐ Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional Funcionario autorizado	Reservado a la Oficina Internacional ☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el: Funcionario autorizado
---	--

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario FR2006/030	Solicitud internacional N°
--	----------------------------

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO
O DE OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página 4, línea 28 A 33	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO	
Se identifican otros depósitos en una hoja adicional. ☐	
Nombre de la institución de depósito American Type Culture Collection	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, EE.UU.	
Fecha de depósito: 16 Junio 2006	n° de acceso PTA7662
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario) Esta información continua en una hoja adicional ☐	
Los solicitantes piden que la disponibilidad de los materiales biológicos depositados a los que se refiere la presente solicitud se efectúe solo proporcionando una muestra a un experto bajo la Regla 13bis.3 de los reglamentos bajo el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)	
Para todos los Estados designados	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora	Reservado a la Oficina Internacional
☐ Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional	☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

405

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario FR2006/030	Solicitud internacional N°
--	----------------------------

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO
O DE OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página 4 . línea 28 A 33	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en una hoja adicional. ☐	
Nombre de la institución de depósito American Type Culture Collection	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, EE.UU.	
Fecha de depósito: 3 Mayo 2007	n° de acceso PTA8407
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario) Esta información continua en una hoja adicional ☐	
Los solicitantes piden que la disponibilidad de los materiales biológicos depositados a los que se refiere la presente solicitud se efectúe solo proporcionando una muestra a un experto bajo la Regla 13bis.3 de los reglamentos bajo el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)	
Para todos los Estados designados	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones. por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora
☐ Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional
Funcionario autorizado

Reservado a la Oficina Internacional
☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el:
Funcionario autorizado

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario FR2006/030	Solicitud internacional N°
---	----------------------------

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO
O DE OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página 4 , línea 28 A 33	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en una hoja adicional. ☐	
Nombre de la institución de depósito American Type Culture Collection	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 2209, EE.UU.	
Fecha de depósito: 3 Mayo 2007	n° de acceso PTA8408
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario) Esta información continua en una hoja adicional ☐	
Los solicitantes piden que la disponibilidad de los materiales biológicos depositados a los que se refiere la presente solicitud se efectúe solo proporcionando una muestra a un experto bajo la Regla 13bis.3 de los reglamentos bajo el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)	
Para todos los Estados designados	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora ☐ Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional Funcionario autorizado	Reservado a la Oficina Internacional ☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el: Funcionario autorizado
---	--

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANOFI-AVENTIS

<120> Anticuerpo antagonista para el tratamiento de cáncer.

<130> FR2006030 PCT

<150> EP 06291160.7

<151> 2006-07-18

<160> 80

<170> Versión PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Met
1 5 10 15

Asn

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 3

Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 5

Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 6

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Gln Phe Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 7

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 8

Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 9

Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
1 5

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 11

Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 12

Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Pro	Thr
1				5				

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 13

Ala	Tyr	Tyr	Met	His
1				5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 14

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

Asp

<210> 15
 <211> 10

<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 15

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

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 16

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

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 17

Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 18

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 19
<211> 363
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 19
cag gtc caa ctg caa caa cct ggg tct gaa ctg gtg agg cct gga gct 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 354
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)

<400> 21
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct gga gct 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca atg aag att tcc tgc agg gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96
Ser Met Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

gga ctt att aat cct cac aat ggt ggt tct agc tac aac ctg aag ttc 192
Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

gta aga tgg ggt gac tac ggc tct ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336
Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

ctg gtc act gtc tct gca 354
Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 22
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 22
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 23
<211> 357
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 23	
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct	48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act gcc tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr	
20 25 30	
tac atg cac tgg gtg aag caa agt cat gta aag agt ctt gag tgg att	144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga ctt gtt aat cct tac aat ggt ttt agt agc tac aac cag aat ttc	192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe	
50 55 60	
gag gac aag gcc agc ttg act gta gat aag ttc tcc agc acc gcc tac	240
Glu Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Phe Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gaa ctc cac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt	288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	

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

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

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (333)

<400> 25
caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cta ggg 48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly

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

<210> 26
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 26

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

<210> 27
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

<400> 27
gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 28
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

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

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

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

<210>	29
<211>	339
<212>	ADN
<213>	Mus sp.

```
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)
```

```
<400> 29
gat gtt gtg atg tcc cag att cca ctc act ttg tcg gtc acc att gga      48
Asp Val Val Met Ser Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1           5           10          15
```

caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc ata cat agt 96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30

gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct 144
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cga aag cgc cta att tat ctg gtg tct aga ctg gac tct gga gtc cct 192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

tca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 336
Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

cgg	339
Arg	

$\langle 210 \rangle$	30
$\langle 211 \rangle$	113

<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 30

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Arg

<210> 31
<211> 363
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<220>
<221> fuente
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>

```
<221>  fuente
<222>  (106)..(147)
<223>  homo sapiens

<220>
<221>  fuente
<222>  (148)..(192)
<223>  Mus sp.

<220>
<221>  fuente
<222>  (193)..(294)
<223>  homo sapiens

<220>
<221>  fuente
<222>  (295)..(330)
<223>  Mus sp.

<220>
<221>  fuente
<222>  (331)..(363)
<223>  homo sapiens

<400>  31
cag gtt cag ctt gtc cag cct gga gct gaa gtg gta aag cca gga gcc      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15

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

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

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

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

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

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

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

<210>  32
<211>  121
<212>  PRT
```

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33

<211> 363

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<220>

<221> fuente

<222> (1)..(90)

<223> homo sapiens

<220>

<221> fuente

<222> (91)..(105)

<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (148)..(192)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (193)..(294)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (295)..(330)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (331)..(363)
<223> homo sapiens

<400> 33
cag gtg cag ctc gtc cag ccc ggt gcc gaa gtg gtg aaa ccc ggt gct 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Anticuerpo humanizado

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(90)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> fuente

```

<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (148)..(192)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (193)..(294)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (295)..(330)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (331)..(363)
<223> homo sapiens

<400> 35
cag gtg cag ctg gtg cag ccc ggg gct gag gtg gta aag cca gga gcc      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 36
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```
<210> 39
<211> 357
<212> ADN
<213> Artificial
```

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

```
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (357)
```

```
<220>
<221> fuente
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens
```

```
<220>
<221> fuente
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.
```

```
<220>
<221> fuente
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens
```

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

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

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

```
<220>
<221> fuente
<222> (325)..(357)
<223> homo sapiens
```

<400> 39
cag gtg caa ctg gtg caa tcc ggt gcc gag gtc gtc aaa ccc gga gca 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tct gtg aag ata tcc tgt aag gcc tcc ggc tac act ttt aca gcc tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

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

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

<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 40

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 357
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> fuente
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (91)..(105)

<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

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

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

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

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

<400> 41
cag gtc cag ttg gtg cag tct gga gca gag gtt gtg aaa cca ggc gca
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 42

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

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 357
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> fuente
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

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

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

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

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

<400>	44	
cag gtt caa ctg gtt cag agt ggg gca gaa gtc gta aag ccc gga gct		48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
tcc gtt aag att agc tgt aaa gcc tcc ggc tat agc ttt aca gct tac		96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr		
	20	30
tat atg cac tgg gtc aag caa tct cct ggg cag agc ctg gag tgg atc		144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile		
	35	40
ggc ctg gtc aat cca tac aat ggc ttc tct agt tac aac caa aaa ttt		192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
	50	60
cag gga aaa gcc tcc ctt aca gta gac aag tca tct tcc act gcc tac		240
Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75

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

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

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

<210> 45
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 46
<211> 330
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(330)

<220>
<221> fuente
<222> (1)..(71)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (72)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (106)..(150)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (151)..(171)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (172)..(269)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (270)..(299)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (300)..(330)
<223> homo sapiens

<400> 46		
gag atc gtt ctc aca cag tca cca gcc acc atg agc gcc tct ccc ggg		48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
gaa cga gtg acc atg act tgt aca gta tcc tcc tct gtg aac tct tct		96
Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser		
20 25 30		
tac ctg cat tgg tac cag cag aag cct ggt tcc agc ccc aaa ctc tgg		144
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp		
35 40 45		
atc tac agt aca agc aat ctg ccc tca ggc gtt ccc gct agg ttc tcc		192
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser		
50 55 60		
ggg tca ggt tct ggc act agt tac tct ctg acc atc agc acc atc gaa		240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu		

65		70		75		80	
tcc gaa gat gct gca aca tac tac tgt cac cag tat cac agg tcc ccc							288
Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro							
	85			90		95	

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

<210> 47
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

<210> 48
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Anticuerpo humanizado

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

<400> 49

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

110

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<400> 50

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe

20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 51

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<220>

<221> fuente

<222> (1)..(69)

<223> homo sapiens

<220>

<221> fuente

<222> (70)..(117)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (118)..(162)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (163)..(183)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (184)..(279)
<223> homo sapiens

<220>
<221> fuente
<222> (280)..(306)
<223> Mus sp.

<220>
<221> fuente
<222> (307)..(339)
<223> homo sapiens

<400> 51
gac gtc gtg atg aca caa acc cct ctg tcc ctg agc gtc act ctg gga 48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

caa ccc gct tcc att agc tgc aaa tca tca caa tct ctc atc cac tca 96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30

gac ggc aaa aca tac ctc aat tgg ctg ctg cag aga cca gga cag tcc 144
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cct aaa agg ctt atc tac ctg gtc tct cgt ttg gac tct ggt gta cca 192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac cgg ttt act ggt tcc ggg gcc gga acc gat ttc act ctg aag att 240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

tcc agg gtg gaa gct gaa gat ctc gga gtg tat tat tgc tgg cag ggc 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

agc cat ttc ccc cgt act ttt ggt ggg ggt acc aaa ttg gaa att aag 336
Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

cgt 339
Arg

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

<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 52
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Arg

<210> 53
<211> 36
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 53
ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt tttggc 36

<210> 54
<211> 32
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 54
ggaggatccc ttgaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 55
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(32)
 <223> las bases mixtas se definen como sigue: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 55
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 56
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 56
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 57
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)
 <223> las bases mixtas se definen como sigue: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 57
 ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a 31

<210> 58
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 58
 tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc 46

<210> 59
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 59
gacagacaca ctcttgctat ggg 23

<210> 60
<211> 32
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> las bases mixtas se definen como sigue: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 60
gcagaattca tgggatggag cyggatcttt ct 32

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 61
Glu Tyr Asn Met His
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 62
Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 63
Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr
1 5 10

<210> 64
<211> 15
<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 64

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

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 65

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 66

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 67

Asp Tyr Asn Met His
1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 68

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

Asn

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 69

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

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 70

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 71

Ile Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 72

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 73
<211> 360
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 73
gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gac ctg gtg aaa cct ggg gcc 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct gga tac aga ttc act gaa tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

aat atg cac tgg atg aag cag agc cat gga gag agc ctt gag tgg att 144
Asn Met His Trp Met Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile

35	40	45	
gga tat att tat cct tac aat ggt gat act ggc tac agg cag aaa ttc			192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe			
50	55	60	
aag aac atg gcc aca ttg act gca gac att tcc tcc aat aca gcc tac			240
Lys Asn Met Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
atg gaa ctc cgc agc ctg aca tct gac gac tct gca gtc tat ttc tgt			288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
gca aga tgg ggc tac ggt agt ggc ggg ggg ttt act tac tgg ggc caa			336
Ala Arg Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
ggg act ctg gtc act gtc tct gca			360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
	115	120	
<210> 74			
<211> 120			
<212> PRT			
<213> Mus sp.			
<400> 74			
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Glu Tyr			
	20	25	30
Asn Met His Trp Met Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe			
50	55	60	
Lys Asn Met Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Arg Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			

115

120

<210> 75
<211> 357
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 75
gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gag ctg gtg aaa cct ggg gcc 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 76
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 76
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

<400> 77	
gac att gtg ctg acc caa tct cca ggt tct ttg gct gtg tct cta ggg	48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gac act tat	96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr	
20 25 30	
ggc aat agt ttc atg cac tgg tac cag cag aaa gca gga cag ccg ccc	144
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro	
35 40 45	
aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc	192
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala	
50 55 60	
agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gac ttc acc ctc acc att aat	240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn	
65 70 75 80	
cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa agt aat	288
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn	
85 90 95	

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

<210> 78
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

<210> 79
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 79
caa att gtt ctc acc cag tct cca gca ctc atg tct gca tct cca ggg 48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt gtg agt tac atg 96
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

tac tgg tac cag cag aag cca aga tcc tcc ccc aaa ccc tgg att tat 144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

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

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 80

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/003074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 C12N15/63 C12N15/13 C12N5/20 G01N33/53 A61P35/00		
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) C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; April 2006 (2006-04), BURKHARDT M ET AL: "Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer." XP002415898 Database accession no. NLM16484444 abstract	67-69
X	WO 2006/047637 A (MEDIMMUNE INC [US]; KINCH MICHAEL S [US]; CARLES-KINCH KELLY [US]) 4 May 2006 (2006-05-04) paragraph [0178]	1-60
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* 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 *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 *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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 April 2008		Date of mailing of the international search report 28/05/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, René

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/003074

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/092343 A2 (MEDIMMUNE INC [US]; KIENER PETER A [US]; KINCH MICHAEL S [US]; LANGERM) 28 October 2004 (2004-10-28) page 27 -----	1-60
X	WO 2004/101764 A2 (CHIRON CORP [US]; ZIMMERMAN DEBORAH LEE [US]; HANSEN RHONDA [US]; WINT) 25 November 2004 (2004-11-25) page 35, paragraph 1 -----	1-60
X	DOBRZANSKI PAWEL ET AL: "Antiangiogenic and antitumor efficacy of EphA2 receptor antagonist." CANCER RESEARCH 1 FEB 2004, vol. 64, no. 3, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 910-919, XP002415896 ISSN: 0008-5472 abstract -----	61-68
P, X	WO 2006/084226 A2 (RAVEN BIOTECHNOLOGIES INC [US]; MATHER JENNIE P [US]; ROBERTS PENELOPE) 10 August 2006 (2006-08-10) page 35, paragraph 1 -----	1-15
A	CARLES-KINCH KELLY ET AL: "Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 62, no. 10, 15 May 2002 (2002-05-15), pages 2840-2847, XP002309753 ISSN: 0008-5472 the whole document -----	1-74
A	LANDEN C N ET AL: "EPHA2 AS A TARGET FOR OVARIAN CANCER THERAPY" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, ASHLEY PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 9, no. 6, December 2005 (2005-12), pages 1179-1187, XP008072982 ISSN: 1472-8222 the whole document -----	1-74

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2007/003074

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006047637	A	04-05-2006	AU 2005299353 A1 CA 2585671 A1 EP 1814567 A1	04-05-2006 04-05-2006 08-08-2007
WO 2004092343	A2	28-10-2004	AU 2004230539 A1 CA 2522082 A1 EP 1618184 A2 JP 2006523240 T	28-10-2004 28-10-2004 25-01-2006 12-10-2006
WO 2004101764	A2	25-11-2004	CA 2525929 A1 EP 1628992 A2 JP 2007520446 T JP 2007217423 A	25-11-2004 01-03-2006 26-07-2007 30-08-2007
WO 2006084226	A2	10-08-2006	AU 2006210460 A1 CA 2597198 A1 CN 101155830 A EP 1846450 A2 KR 20070107721 A US 2006177453 A1	10-08-2006 10-08-2006 02-04-2008 24-10-2007 07-11-2007 10-08-2006



(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 06291160.7 18/07/2006 EP	(51) Int Cl: C07K 016/028 (71) Solicitante(s) SANOFI-AVENTIS (72) Inventor(es) VÉRONIQUE BLANC Y OTROS (74) Apoderado: EMILIO FERRERO
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 18/02/2009 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 13/07/2007 No. de solicitud PCT/IB2007/003074	(87) Publicación internacional Fecha: 24/01/2008 N° publicación: WO 2008/010101 A3
(54) Título: ANTICUERPO ANTAGONISTA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	

Reivindicación(es):

1. Un anticuerpo o un fragmento de éste que se une al epitopo que se une específicamente a un receptor EphA2 y que es un antagonista de dicho receptor.
2. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo es un anticuerpo monoclonal.
3. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.
4. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo es capaz de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa.
5. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo es capaz de inhibir la migración de una célula cancerosa.
6. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado porque dicha célula cancerosa es una célula de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial y cáncer pancreático, sarcoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de hígado, y otros carcinomas.
7. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo es capaz de inhibir la angiogénesis.
8. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epitopo carece de actividad agonista.

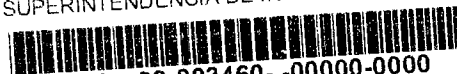
9. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo no estimula la fosforilación en tirosina de EphA2.
10. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es capaz de inhibir la unión de un ligando a dicho receptor.
11. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo de la reivindicación 10, caracterizado porque dicho ligando es efrinaA1.
12. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es capaz de inhibir la fosforilación en tirosina de EphA2.
13. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 12, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es capaz de inhibir la fosforilación en tirosina de EphA2 en presencia de efrinaA1.
14. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo es capaz de inhibir la señalización mediada por EphA2.
15. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según la reivindicación 14, caracterizado porque la señalización mediada por EphA2 es un incremento de la fosforilación de Akt.
16. Un anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo se une a EphA2 con una K_D de 3×10^{-10} M o menor.
17. El anticuerpo o fragmento de éste que se une al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho receptor EphA2 es humano.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 3,065
FECHA : ENERO 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003460- -00000-0000

Fecha: 2009-01-16 16:33:18 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

***** CONSIGNACI

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102218922	13/01/2009	61,689,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Oblo 14775-841083-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 3,129
FECHA : ENERO 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003460- -00000-0000

Fecha: 2009-01-16 16:33:18 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102218922	13/01/2009	61,689,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR
		TOTAL :	\$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cob 14775-841-083-0

454

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 2,943
FECHA : ENERO 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003460- -00000-0000

Fecha: 2009-01-16 16:33:18 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102218922	13/01/2009	61,689,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	111,000.00
		TOTAL :	\$ 111,000.00

SON: CIENTO ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010 14775-841-083-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 554
 FECHA : ENERO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 No. 09-003460-00000-0000
 Fecha: 2009-01-16 16:33:18 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	RECIBO DE CAJA			536	06/01/2009	3,643,000.00

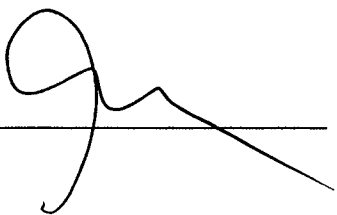
***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR	20,000.00
		TOTAL :	\$ 20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

REVISABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



Colo 14775-841-083-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 99,412
FECHA : DICIEMBRE 23 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003460-00000-0000

Fecha: 2009-01-16 16:33:18 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102218911	22/12/2008	43,775,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06	REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	
13		NOMBRES Y ENSENAS COMERCIALES, MAR	253,000.00
		TOTAL :	\$ 253,000.00

SON: DOSCIENTOS CINCUENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 14775-841083-0

427.
157

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 9 - 526
FECHA : ENERO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003460- -00000-0000

Fecha: 2009-01-16 18:33:18 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	RECIBO DE CAJA			470	06/01/2009	35,596,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL C.RECARGO A#DS 17 a 30	1,090,000.00
		TOTAL :	\$ 1,090,000.00

SDN: UN MILLON NOVENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

0 14775- 841-083-0



No. 09-003460- -00000-0000

Fecha: 2009-01-16 16:33:18 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tira. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

SUPERINTENDENCIA

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 ☐

SANDRA RODRIGUEZ
Firma Responsable

Fecha Dic 16/09

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

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
SANOFI AVENTIS

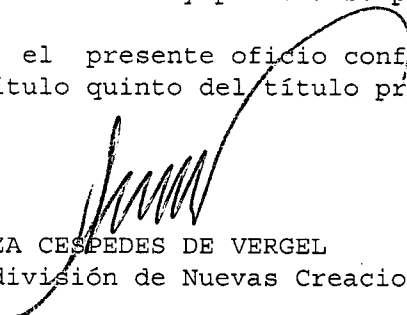
REFERENCIA	Radicación No.	09 3460
	Solicitud internacional	PCT/IB2007/003074
	Fecha inicio fase nacional	18/02/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6190

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior, requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 05 JUN. 2009
jfernand