

NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-MFI2 Y METODOS DE USO

SOLICITUDES CON REFERENCIA CRUZADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. No. 62/046.610 presentada el 5 de Septiembre de 2014, y la Solicitud Provisional U.S. No. 62/203.836 presentada el 11 de Agosto de 2015, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIA

La solicitud contiene un listado de secuencia que ha sido entregado en formato ASCII a través de EFS-Web y se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, fue creada el 20 de **Agosto 20, de 2015** se denomina **S69697_1230WO_Sequence_Listing_08202015** y tiene un tamaño de **129.495 bytes**.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta solicitud generalmente se refiere a nuevos anticuerpos anti-MFI2 o fragmentos inmunoreactivos de los mismos y a composiciones, incluyendo conjugados de droga anticuerpo, que comprenden al mismo para el tratamiento, diagnóstico o profilaxis de cáncer y cualquier recurrencia o metástasis del mismo. Las modalidades seleccionadas de la invención proporcionan el uso de tales anticuerpos anti-MFI2 o conjugados de droga anticuerpo para el tratamiento de cáncer que comprende una reducción en la frecuencia de células tumorigénicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La diferenciación y proliferación de células madre y de células progenitoras son procesos continuos normales, que actúan en conjunto para apoyar el crecimiento del tejido durante la organogénesis, la reparación celular y el reemplazo celular. El sistema está estrechamente regulado para garantizar que sólo las señales apropiadas se generan en base a las necesidades del organismo. La proliferación y la diferenciación celular normalmente se producen sólo según sea necesario para la sustitución de células dañadas o células que están muriendo o para el crecimiento. Sin embargo, la alteración de estos procesos, puede ser provocada por muchos factores, incluyendo la baja o sobre abundancia de diversos productos químicos de señalización, la presencia de microambientes alterados, de mutaciones genéticas o una combinación de los mismos. La interrupción de la proliferación y/o la diferenciación celular normal puede dar lugar a diversos trastornos, que incluyen enfermedades proliferativas tales como el cáncer.

Los tratamientos terapéuticos convencionales para el cáncer, incluyen, quimioterapia,

radioterapia e inmunoterapia. A menudo, estos tratamientos son ineficaces y la resección quirúrgica podría no proporcionar una alternativa clínica viable. Las limitaciones en el estándar de atención actual, son particularmente evidentes en los casos en que los pacientes se someten a tratamientos de primera línea y, posteriormente, recaen. En tales casos frecuentemente aparecen tumores refractarios, a menudo agresivos e incurables. Las tasas generales de supervivencia para muchos tumores sólidos se han mantenido prácticamente sin cambios en los últimos años debido, al menos en parte, al fracaso de las terapias existentes para prevenir la recaída, la recurrencia tumoral y la metástasis. Por tanto, queda una gran necesidad de desarrollar terapias más específicas y potentes para los trastornos proliferativos. La presente invención aborda esta necesidad.

Resumen de la invención

En modalidades seleccionadas la invención comprende un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo aislado que se une a una célula que expresa MFI2 humano que tiene la SEQ ID NO: 3, donde el anticuerpo aislado comprende: (1) una región variable de cadena liviana (VL) de la SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 23; o (2) una VL de la SEQ ID NO: 25 y una VH de la SEQ ID NO: 27; o (3) una VL de la SEQ ID NO: 29 y una VH de la SEQ ID NO: 31; o (4) una VL de la SEQ ID NO: 33 y una VH de la SEQ ID NO: 35; o (5) una VL de la SEQ ID NO: 37 y una VH de la SEQ ID NO: 39; o (6) una VL de la SEQ ID NO: 41 y una VH de la SEQ ID NO: 43; o (7) una VL de la SEQ ID NO: 45 y una VH de la SEQ ID NO: 47; o (8) una VL de la SEQ ID NO: 49 y una VH de la SEQ ID NO: 51; o (9) una VL de la SEQ ID NO: 53 y una VH de la SEQ ID NO: 55; o (10) una VL de la SEQ ID NO: 57 y una VH de la SEQ ID NO: 59; o (11) una VL de la SEQ ID NO: 61 y una VH de la SEQ ID NO: 63; o (12) una VL de la SEQ ID NO: 65 y una VH de la SEQ ID NO: 67; o (13) una VL de la SEQ ID NO: 69 y una VH de la SEQ ID NO: 71; o (14) una VL de la SEQ ID NO: 73 y una VH de la SEQ ID NO: 75; o (15) una VL de la SEQ ID NO: 77 y una VH de la SEQ ID NO: 79; o (16) una VL de la SEQ ID NO: 81 y una VH de la SEQ ID NO: 83; o (17) una VL de la SEQ ID NO: 85 y una VH de la SEQ ID NO: 87; o (18) una VL de la SEQ ID NO: 89 y una VH de la SEQ ID NO: 91.

En otra modalidad, la invención comprende un anticuerpo que se une al dominio TFLD2 de MFI2. En algunas modalidades los anticuerpos anti-MFI2 de la invención se unen a un epítipo en una proteína MFI2, donde el epítipo comprende aminoácidos D460, H463 y N566. En otra modalidad, los anticuerpos anti-MFI2 de la invención se unen a células iniciadoras de tumor que expresan MFI2 que tiene la SEQ ID NO: 3. En otro aspecto la invención comprende un anticuerpo anti-MFI2 de aquel que es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con CDR injertada, un anticuerpo humano o humanizado, o un fragmento del mismo. En otra modalidad, el anticuerpo anti-MFI2 de la

invención es un anticuerpo que se internaliza. En un aspecto el anticuerpo anti-MFI2 de la invención no se une a la proteína transferrina humana.

En un aspecto adicional, la invención comprende un anticuerpo de ratón que se une a MFI2 que comprende una región variable de cadena liviana y una región variable de cadena pesada, donde la región variable de cadena liviana posee tres CDR de una región variable de cadena liviana que se define como la SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, o la SEQ ID NO: 89; y la región variable de cadena pesada posee tres CDR de una región variable de cadena pesada que se define como la SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87 o la SEQ ID NO: 91.

En una modalidad adicional, la invención comprende un anticuerpo humanizado que se une a MFI2 que comprende una región variable de cadena liviana y una región variable de cadena pesada, donde la región variable de cadena liviana posee tres CDR de una región variable de cadena liviana que se define como la SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 99, o la SEQ ID NO: 105; y la región variable de cadena pesada posee tres CDR de una región variable de cadena pesada que se define como la SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103 o la SEQ ID NO: 107.

En un aspecto la invención comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-MFI2 de la invención. En otra modalidad, la invención comprende un vector que comprende uno o más de los ácidos nucleicos arriba descritos o una célula huésped que comprende a dicho vector.

En una modalidad la invención comprende un conjugado de droga anticuerpo (ADC) de la fórmula Ab-[L-D] n o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo donde: Ab comprende un anticuerpo anti-MFI2; L comprende un agente de unión opcional; D comprende un fármaco o droga; y n es un número entero de 1 a 20. En un aspecto el ADC de la invención comprende un anticuerpo anti-MFI2 tal como aquellos descritos arriba o un fragmento inmunoreactivo del mismo. En otras modalidades los ADC de la invención comprenden un compuesto citotóxico seleccionado de caliqueamicinas, pirrolobenzodiazepinas, auristatinas, duocarmicinas, maitansinoides o un residuo terapéutico adicional que se describe aquí.

En una modalidad la invención comprende una composición farmacéutica que comprende un ADC descrito arriba. Otro aspecto de la invención es un método para tratar cáncer que comprende administrar una composición farmacéutica tal como aquellas que se describen aquí a un individuo que lo necesita. En un aspecto, el cáncer es seleccionado de cáncer mamario (por ejemplo cáncer

mamario triple negativo), cáncer pulmonar, cáncer colorectal o cáncer de piel tal como melanoma (por ejemplo cáncer de piel que expresa BRAF de silvestre o mutado). En una modalidad el método de tratar el cáncer descrito arriba comprende administrar al individuo al menos un residuo terapéutico adicional además de la composición farmacéutica arriba descrita.

5 En una modalidad la invención comprende un método para reducir células iniciadoras de tumor en una población de células tumorales, donde el método comprende poner en contacto (por ejemplo *in vitro* o *in vivo*) una población de células iniciadoras de tumor con los ADC como se describe aquí mediante lo cual la frecuencia de las células iniciadoras de tumor se ve reducida.

10 En un aspecto, la invención comprende un método para entregar una citotoxina a una célula que comprende poner en contacto la célula con cualquiera de los ADC arriba descritos.

 En otro aspecto, la invención comprende un método para detectar, diagnosticar o monitorear cáncer (por ejemplo cáncer mamario, cáncer pulmonar, cáncer colorectal o cáncer de piel) en un individuo, el método comprende las etapas de poner en contacto (por ejemplo *in vitro* o *in vivo*) las células del tumor con un agente de detección MFI2 y detectar el agente de detección asociado con
15 las células tumorales. En modalidades seleccionadas el agente de detección deberá comprender un anticuerpo anti-MFI2 o una sonda de ácido nucleico que se asocia con un determinante genotípico de MFI2.

 Lo anterior es un resumen y por lo tanto contiene, por necesidad, simplificaciones, generalizaciones y omisiones de detalles; en consecuencia, los expertos en el arte apreciarán que
20 el resumen es sólo ilustrativo y no pretende limitar en modo alguno. Otros aspectos, características y ventajas de los métodos, composiciones y/o dispositivos y/u otros temas descritos en este documento se harán evidentes en las enseñanzas expuestas aquí. El resumen se proporciona para introducir una selección de conceptos en una forma simplificada que se describe más adelante en la descripción detallada. Este resumen no tiene por objeto identificar las características clave o
25 características esenciales de la materia reivindicada, ni está pensado para ser utilizado como ayuda para determinar el alcance de la materia reivindicada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1A refleja los niveles de expresión de MFI2 medido usando el transcriptoma completo (SOLiD) secuenciado del ARN derivado del paciente derivado de la célula madre de cáncer (CSC)
30 jenoinjertada (PDX) y células tumorales no-tumorigénica (NTG).

FIGURA 1B muestra los niveles de expresión de MFI2 medido usando el transcriptoma completo (Illumina) secuenciado del ARN derivado de células PDX CSC y células tumorales NTG.

FIGURA 2A presenta un esquema de MFI2 humano, mostrando ambas isoformas larga (hMFI2) y corta (hΔMFI2).

FIGURA 2B refleja los niveles de expresión relativa de transcritos de MFI2 medido por medio de qRT-PCR en muestras de ARN aislado de tejido normal y de una variedad de tumores PDX.

FIGURA 2C refleja los niveles de expresión relativa de transcritos de MFI2 medido por medio de qRT-PCR en muestras de ARN aislado de diversos tejidos normales y de células CSC y NTG
5 aisladas de una diversidad de tumores de PDX.

FIGURA 3 muestra el valor de intensidad normalizado del transcrito de expresión MFI2 medido por hibridación en micro arreglo en tejidos normales y una variedad de líneas celulares PDX.

FIGURA 4A muestra la expresión de transcritos de MFI2 en tejidos normales y de tumores primarios del Cancer Genome Atlas (TCGA), un conjunto de datos públicamente.

FIGURA 4B refleja las curvas de sobrevivencia Kaplan-Meier basadas en la alta y baja expresión de transcritos de MFI2 en tumores de melanoma primarios del conjunto de datos TCGA donde el valor de índice umbral se determina usando la media aritmética de los valores RPKM.

FIGURA 5 muestra las características de binning, unión a dominio, isotipo, y reactividad cruzada con ratas de anticuerpos anti-MFI2 ejemplares.

FIGURAS. 6A-6J proporciona las secuencias de aminoácido anotadas y las secuencias de ácido nucleico anotadas de anticuerpos anti-MFI2 murino y humanizado. Más particularmente las FIGURAS 6A y 6B muestran secuencias contiguas de aminoácidos de regiones variables de la cadena liviana (FIGURA 6A) y la cadena pesada (FIGURA 6B) (SEQ ID NO: 21-107, números impares) de anticuerpos anti-MFI2 murino y humanizado ejemplares. FIGURA 6C muestra las
20 secuencias de ácido nucleico de la región variable de cadenas pesada y liviana (SEQ ID NO: 20-106, números pares) de anticuerpos anti-MFI2 murinos y humanizados ejemplares. FIGURA 6D muestra las secuencias de aminoácido de largo completo de las cadenas liviana y pesada anticuerpos anti-MFI2 humanizados (SEQ ID NO: 108-117). FIGURAS 6E – 6G presentan a las CDR de la región variable de las cadenas liviana y pesada de los anticuerpos murinos SC57.5 (FIGURA 6E), SC57.32 (FIGURA 6F) y SC57.43 (FIGURA 6G), enumerados de acuerdo a Kabat,
25 como se determina usando Kabat, Chothia, ABM y metodología de Contacto. Finalmente, FIGURAS 6H – 6J proporcionan las secuencias de aminoácido alineadas para las regiones variables de cadena pesada y liviana murinas y derivadas humanizadas para SC57.5 (FIG. 6H), SC57.32 (FIG. 6I) y SC57.43 (FIG. 6J).

FIGURA 7 muestra la expresión relativa de proteína de MFI2 humano in varias líneas celulares PDX medida usando un ensayo sandwich de ELISA quimioluminiscente.

FIGURA 8A muestra el puntaje-H de la expresión de proteína hMFI2 membranosa in varias muestras de tumor PDX usando inmunohistoquímica.

FIGURA 8B refleja el puntaje-H de la expresión de proteína hMFI2 en la membrana de células

en muestras de melanoma, cáncer mamario y cáncer pulmonar usando inmunohistoquímica.

FIGURAS 9A y 9B muestran la expresión de proteína de superficie de MFI2 determinada por citometría de flujo en líneas celulares de melanoma (FIGURA 9A), de pulmón y mamario (FIGURA 9B) PDX (línea negra) comparado con una población control de isotipo teñida (color gris sólido).

5 FIGURAS 10A – 10D muestran la capacidad de los anticuerpos murinos anti-MFI2 seleccionados (asociado con anticuerpos de cabra antiratón directamente conjugado a saporina) para internalizarse en células HEK293T que sobreexpresan la proteína MFI2 (FIGURA 10A) o células de melanoma PDX (FIGURA 10B) y eliminar a tales células. De manera similar la FIGURA 10C es una curva dependiente de concentración que muestra la capacidad de anticuerpos
10 humanizados anti-MFI2 seleccionados indirectamente unidos a saponinas para internalizar en células HEK293T que sobreexpresan la proteína MFI2 y eliminar a tales células. Finalmente, la FIGURA 10D compara la capacidad de anticuerpos murinos anti-MFI2 ejemplares en los Bin A-E para internalizar y eliminar a las células HEK293T que sobreexpresan la proteína MFI2.

FIGURAS 11A y 11B reflejan la capacidad de los ADC anti-MFI2 para internalizar y eliminar a
15 las células HEK293T que sobreexpresan la proteína MFI2 y las células de melanoma SK-MEL-28 (FIGURA 11A) o líneas celulares de cáncer mamario y melanoma PDX (FIGURA 11B) que sobreexpresan de manera endógena MFI2 *in vitro*.

FIGURAS 12A y 12B muestran que los ADC anti-MFI2 son capaces de internalizarse en tumores BR (FIGURA 12A) y LU y MEL (FIGURA 12B) *in vivo* y provocar una reducción importante
20 y prolongada en el volumen del tumor.

FIGURA 13 muestra que MFI2 se asocia con células iniciadoras de tumor; células tumorales que expresan MFI2 son capaces de reconstituir funcionalmente tumores *in vivo*, mientras que las células tumorales que no expresan MFI2 no son capaces de reconstituir tumores *in vivo*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La invención puede ser realizada en muchas formas diferentes. Descritas en este documento están las modalidades ilustrativas no limitantes de la invención que ejemplifican los principios de la misma. Cualquiera de los encabezados de las secciones que aparecen aquí se indican para propósitos de organización y no deben interpretarse como limitantes de la materia descrita. Para los fines de la presente descripción se pueden encontrar todos los números de acceso a la identificación
30 de Secuencia en la base de datos de Referencia de Secuencia NCBI (RefSeq) y/o en el archive de la base de datos de secuencia NCBI GenBank® salvo indicación en contrario.

Sorprendentemente se ha encontrado que MFI2 expresión se correlaciona con un número de tipos de tumores y, como un factor determinante, que puede ser explotado en el tratamiento de tales tumores. También ha encontrado inesperadamente que la expresión de MFI2 está asociada con

células tumorigénicas y, como tal, se puede explotar de manera efectiva para inhibir o eliminar a tales células. Las células tumorigénicas, que se describirá en más detalle a continuación, se sabe que presentan resistencia a muchos tratamientos convencionales. En contraste con las enseñanzas del estado de la técnica anterior, los compuestos y los métodos descritos superan efectivamente esta resistencia inherente.

La invención proporciona anticuerpos anti-MFI2 (incluyendo conjugados de droga anticuerpo) y su uso en el pronóstico, el diagnóstico, teragnosis, tratamiento y / o prevención de una variedad de cánceres asociados a MFI2, independientemente de cualquier mecanismo de acción particular o componente celular o molecular específicamente dirigido.

I. Fisiología de MFI2

La melanotransferrina (MFI2; también conocida como MTF1, CD228, MAP97, y antígeno p97 asociado a melanoma) es una glicoproteína de superficie celular anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que comparte similitud de secuencia con miembros de la familia de la transferrina de las proteínas no-heme que se unen a hierro (Suryo Rahmanto et al., 2007; PMID: 17452986). Ortólogos representativos de la proteína MFI2 incluyen, pero no se limitan a, humano (NP_005920), chimpancé (XP_003310242), mono rhesus (XP_001096034), rata (NP_001099342), y ratón (NP_038928). En humanos, el gen MFI2 consta de 16 exones que abarcan aproximadamente 28 kBp en el cromosoma 3q28-q29. La transcripción del locus MFI2 en humanos entrega al menos dos transcritos de ARN conocidos, uno más largo de 3,96 kBp (NM_005929) que codifica una pre-proteína de 738 aminoácidos (NP_005920; hMFI2 en la FIGURA 3A), y un transcripto alternativamente dividido más corto de 1,67 kBp (NM_033316) que se piensa que codifica una pre-proteína de 302 aminoácidos (NM_201573; hΔMFI2 en FIGURA 3A). Tanto para la isoforma de la proteína, se ha predicho que el procesamiento de la pre-proteína involucra la remoción de los primeros 19 aminoácidos que comprenden al péptido señal secretor. En el caso de la isoforma de la proteína más larga de 738 aminoácidos, los últimos 29 aminoácidos se retiran como parte del procesamiento para unir la proteína madura a la membrana celular a través de un ancla GPI. No está claro como la isoforma de aminoácido de la proteína más corta de 302 es preparada, aunque se prevé que se secretan. Estructuralmente, se prevé que la isoforma más larga contiene dominios de transferrina como en tándem (marcada TFLD1 y TFLD2, FIGURA 3A), aunque sólo el primer dominio es capaz de unirse a hierro. Se han mapeado tres sitios de glicosilación ligados a N, dos para el primer dominio tipo transferrina, y un segundo para el segundo dominio tipo transferrina. Se ha identificado una forma soluble de melanotransferrina, en sobrenadantes de cultivos celulares y en el suero, aunque el origen biológico de esta forma sigue siendo poco clara.

El antígeno p97 asociado a melanoma fue uno de los primeros marcadores de superficie celular descubiertos para melanoma, y basado en esta similitud de secuencia con las proteínas transferrina, se denominó melanotransferrina. Pero a pesar de la conservación de la secuencia con otros miembros de la familia de proteínas transferrina y su aparente capacidad para unirse a hierro, una variedad de cultivos celulares y de experimentos *in vivo* han demostrado que la melanotransferrina no juega un papel esencial en el transporte o en el metabolismo de hierro en células normales o de melanoma (revisado en Suryo Rahmanto et al., 2012; PMID: 21933697). Es posible que la proteína se una al hierro por razones estructurales en lugar de mediar funciones de transporte. Se ha sugerido que otros iones, incluyendo Zn(II), también se unen a la melanotransferrina. Funciones adicionales sugeridas para melanotransferrina incluyen la estimulación de la angiogénesis, la activación del plasminógeno, y la proliferación y la migración celular. Recientemente, se ha relacionado la melanotransferrina con el ensamblaje de las uniones septales epiteliales en *Drosophila*, estructuras que proporcionan barreras de difusión entre las células epiteliales en los insectos, análogas a las uniones estrechas formadas en láminas epiteliales que se encuentran en los vertebrados. Sin embargo, la(s) función(es) biológica(s) precisa(s) de la melanotransferrina siguen siendo desconocidas.

II. Células Madres Cancerosas

De acuerdo con los modelos actuales, un tumor comprende células no tumorigénicas y células tumorigénicas. Las células no tumorigénicas no tienen la capacidad de auto-renovarse y son incapaces de formar tumores de manera reproducible, incluso cuando se trasplantan en ratones inmunodeprimidos en un número de células en exceso. Las células tumorigénicas, también denominadas aquí como "células iniciadoras de tumor" (TIC), las cuales forman de 0,1-40% (más típicamente de 0,1-10%) de la población de células de un tumor, tienen la capacidad para formar tumores. Las células tumorigénicas abarcan tanto las células tumorales que perpetúan el tumor (TPC), denominadas indistintamente como células troncales o células madre de cáncer (CSC) y células progenitoras de tumor (TProg).

Las CSC, son como células madre normales, que sustentan las jerarquías celulares en el tejido normal, son capaces de auto-replicarse indefinidamente mientras mantienen la capacidad de diferenciación multilínea. Las CSC, son capaces de generar tanto las progenies tumorigénicas y las progenies no tumorigénicas y son capaces de recapitular completamente la composición celular heterogénea del tumor parental como se demuestra a través del aislamiento seriado y el trasplante de un bajo número de células CSC aisladas en ratones inmunodeprimidos..

Las células TProg, tal como las células CSC tienen la capacidad de estimular el crecimiento

del tumor en un trasplante primario. Sin embargo, a diferencia de las CSC, no son capaces de recapitular la heterogeneidad celular del tumor parental y son menos eficientes en reiniciar la tumorigénesis en los trasplantes posteriores debido a que las células son típicamente solo de un número finito de divisiones celulares como se demuestra a través del trasplante en serie de un bajo número de células tProg altamente purificadas en ratones inmunocomprometidos. Las células TProg pueden además dividirse en células TProg tempranas y células TProg tardía, pueden ser distinguidas por su fenotipo (por ejemplo, marcadores de superficie celular), por y sus diferentes capacidades para recapitular la arquitectura de las células tumorales. Mientras que ninguno de ellas puede recapitular un tumor en la misma medida que las células CSC, las células TProg tempranas tienen una mayor capacidad para recapitular características del tumor parental que las células TProg tardías. A pesar de las diferencias anteriores, se ha demostrado que algunas poblaciones de células tProg pueden, en raras ocasiones, alcanzar capacidades de auto-renovación, que normalmente son atribuidas a las células CAC y ellas mismas pueden convertirse en células CSC.

Las células CSC exhiben mayor tumorigenicidad y son relativamente más inactivas que: (i) las células TProg (ambas las células TProg tempranas y tardías); y (ii) células no tumorigénicas tales como células infiltrantes de tumor, por ejemplo, fibroblastos/estroma, células endoteliales y células hematopoyéticas que pueden derivarse de células madre cancerosas y que típicamente componen la mayor parte de un tumor. Dado que las terapias y tratamientos convencionales, en gran parte, se han diseñado para reducir el volumen de los tumores y atacar a las células que proliferan rápidamente, las células CSC son más resistentes a las terapias y regímenes convencionales de las células TProg proliferantes rápidas y otra mayor población de células tumorales, tal como las células no tumorigénicas. Otras características que pueden hacer que las células CSC sean relativamente quimio-resistentes a las terapias convencionales, son el aumento de expresión de los transportadores de resistencia a múltiples fármacos, el aumento de los mecanismos de reparación del ADN y la expresión génica anti-apoptótica. Tales propiedades de las células CSC se han visto implicadas en el fracaso de los regímenes de tratamiento estándar, para proporcionar una respuesta duradera en pacientes con neoplasias en etapa avanzada, ya que la quimioterapia estándar no se dirige efectivamente a las células CSC que realmente son el combustible continuo del crecimiento y la recurrencia del tumor.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la expresión de MFI2 se asocia con diversas subpoblaciones de células tumorigénicas. La invención proporciona anticuerpos anti-MFI2, que puede ser particularmente útil para dirigirse a las células tumorigénicas y puede ser utilizado para silenciar, sensibilizar, neutralizar, reducir la frecuencia, bloquear, anular, interferir, disminuir, obstaculizar, restringir, controlar, agotar, moderar, mediar, disminuir, reprogramar, eliminar, o de

otra manera inhibir (colectivamente, "inhibir") a las células tumorigénicas, facilitando de este modo el tratamiento, manejo y / o la prevención de trastornos proliferativos (por ejemplo cáncer). Ventajosamente, los nuevos anticuerpos anti-MFI2 de la invención, pueden ser seleccionados para que preferentemente ellos reduzcan la frecuencia o la tumorigenicidad de las células tumorigénicas, tras la administración a un sujeto independientemente de la forma del MFI2 determinante (por ejemplo, la forma fenotípica o genotípica). La reducción de la frecuencia de las células tumorigénicas puede ocurrir como resultado de (i) la inhibición o la erradicación de las células tumorigénicas; (ii) el control del crecimiento, la expansión o la recurrencia de las células tumorigénicas; (iii) la interrupción de la iniciación, propagación, el mantenimiento, o la proliferación de las células tumorigénicas; o (iv) por lo contrario obstaculizar la supervivencia, la regeneración y / o metástasis de las células tumorigénicas. En algunas modalidades, la inhibición de las células tumorigénicas puede ocurrir como resultado de un cambio en una o más rutas fisiológicas. El cambio en la ruta, ya sea por inhibición de las células tumorigénicas, la modificación de su potencial (por ejemplo, mediante la diferenciación inducida o interrupción del nicho) o de otra manera la interferencia con la capacidad de las células tumorigénicas para influir en el ambiente del tumor o de otras células, permitir el tratamiento más eficaz de los trastornos asociados MFI2 a través de la inhibición de la tumorigénesis, el mantenimiento y / o la metástasis y la recurrencia del tumor. Se apreciará además que las mismas características de los anticuerpos descritos los hacen especialmente eficaces en el tratamiento de tumores recurrentes que han demostrado ser resistentes o refractarios a regímenes de tratamiento estándar.

Los métodos que pueden ser utilizados para evaluar la reducción en la frecuencia de las células tumorigénicas, incluyen, pero no se limitan a, análisis por citometría o análisis inmunohistoquímico, preferiblemente mediante análisis de dilución limitante *in vitro* o *in vivo* (Dylla *et al.* 2008, PMID: PMC2413402 y Hoey *et al.* 2009, PMID: 19664991).

El análisis de dilución limitante *in vitro* puede llevarse a cabo mediante el cultivo de células tumorales fraccionadas o no fraccionadas (por ejemplo, a partir de tumores tratados y sin tratar, respectivamente) en medio sólido que fomenta la formación de colonias y el recuento y caracterización de las colonias que crecen. Alternativamente, las células tumorales pueden ser diluidas en serie en placas con pocillos que contienen medio líquido y donde cada pocillo se puede calificar como positivo o negativo en cuanto a la formación de colonias en cualquier momento después de la inoculación, pero preferentemente en un tiempo superior a 10 días después de la inoculación.

El análisis de dilución limitante *in vivo* es realizado trasplantando células tumorales, de cualquiera de los controles no tratados o de los tumores expuestos a agentes terapéuticos

seleccionados, en ratones inmunocomprometidos en diluciones en serie y, posteriormente, calificando a cada ratón, ya sea positivo o negativo para la formación de tumores. La puntuación puede ocurrir en cualquier momento después de que los tumores implantados son detectables, pero se realiza preferentemente de 60 o más días luego del trasplante. El análisis de los resultados de experimentos de dilución limitante para determinar la frecuencia de las células tumorigénicas se hace preferiblemente usando estadísticas de distribución de Poisson o evaluando la frecuencia de eventos definitivos predefinidos tales como la capacidad de generar tumores in vivo o no (Fazekas et al., 1982, PMID: 7040548).

También se pueden usar citometría de flujo e inmunohistoquímica para determinar frecuencia de células tumorigénicas. Ambas técnicas emplean uno o más anticuerpos o reactivos que se unen a proteínas de superficie celular o marcadores reconocidos en el estado del arte, que se sabe se enriquecen en las células tumorigénicas (véase WO 2012/031280). Como es conocido en el estado de la técnica, también se puede utilizar citometría de flujo (por ejemplo de células activadas por fluorescencia (FACS)), para caracterizar, aislar, purificar, enriquecer o clasificar varias poblaciones de células incluyendo, células tumorigénicas. La citometría de flujo mide niveles de células oncogénicas, al hacer pasar una corriente de fluido, en el que se suspende una población mixta de células a través de un aparato de detección electrónico que es capaz de medir las características físicas y / o químicas de hasta miles de partículas por segundo. La inmunohistoquímica proporciona información adicional en que permite la visualización *in situ* de las células tumorigénicas (por ejemplo en una sección de tejido) tiñendo la muestra de tejido con anticuerpos o reactivos marcados, los que se unen a los marcadores de las células oncogénicas.

Como tal, los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para identificar, caracterizar, monitorear, aislar, seccionar o enriquecer poblaciones o subpoblaciones de células tumorigénicas a través de métodos tales como, por ejemplo, citometría de flujo, clasificación magnética de células activadas (MACS), corte por medio de láser o FACS. FACS es un método fiable para aislar subpoblaciones de células con más de 99,5% de pureza, basado en marcadores específicos de la superficie celular. Otras técnicas compatibles, para la caracterización y la manipulación de células tumorigénicas incluyendo células CSC, se puede ver, por ejemplo, en las patentes US 12/686.359, 12/669.136 y 12/757.649.

A continuación se enumeran los marcadores que han sido asociados con las poblaciones de células CSC y han sido usados para aislar o caracterizar las células CAC: ABCA1, ABCA3, ABCG2, ADAM9, ADCY9, ADORA2A, AFP, AXIN1, B7H3, BCL9, Bmi-1, BMP-4, C20orf52, C4.4A, carboxipeptidasa M, CAV1, CAV2, CD105, CD133, CD14, CD16, CD166, CD16a, CD16b, CD2, CD20, CD24, CD29, CD3, CD31, CD324, CD325, CD34, CD38, CD44, CD45, CD46, CD49b, CD49f,

CD56, CD64, CD74, CD9, CD90, CEACAM6, CELSR1, CPD, CRIM1, CX3CL1, CXCR4, DAF, decorin, easyh1, easyh2, EDG3, eed, EGFR, ENPP1, EPCAM, EPHA1, EPHA2, FLJ10052, FLVCR, FZD1, FZD10, FZD2, FZD3, FZD4, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, GD2, GJA1, GLI1, GLI2, GPNMB, GPR54, GPRC5B, IL1R1, IL1RAP, JAM3, Lgr5, Lgr6, LRP3, LY6E, MCP, mf2, mlt3, MPZL1, MUC1, MUC16, MYC, N33, Nanog, NB84, nestin, NID2, NMA, NPC1, oncostatin M, OCT4, OPN3, PCDH7, PCDHA10, PCDHB2, PPAP2C, PTPN3, PTS, RARRES1, SEMA4B, SLC19A2, SLC1A1, SLC39A1, SLC4A11, SLC6A14, SLC7A8, smarcA3, smarcD3, smarcE1, smarcA5, Sox1, STAT3, STEAP, TCF4, TEM8, TGFB3, TMEPAI, TMPRSS4, receptor de transferrina, TrkA, WNT10B, WNT16, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, YY1 y β -catenina. Véase, por ejemplo, Schulenburg *et al.*, 2010, PMID: 20185329, PATENTE US 7,632,678 y las patentes US 2007/0292414, 2008/0175870, 2010/0275280, 2010/0162416 y 2011/0020221.

Del mismo modo, en los ejemplos no limitantes de los fenotipos de la superficie celular asociados con células madre cancerosas de ciertos tipos de tumores, se incluyen $CD44^{hi}CD24^{low}$, $ALDH^{+}$, $CD133^{+}$, $CD123^{+}$, $CD34^{+}CD38^{-}$, $CD44^{+}CD24^{-}$, $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}$, $CD133^{+}CD34^{+}CD10^{-}CD19^{-}$, $CD138^{-}CD34^{-}CD19^{+}$, $CD133^{+}RC2^{+}$, $CD44^{+}\alpha_2\beta_1^{hi}CD133^{+}$, $CD44^{+}CD24^{+}ESA^{+}$, $CD271^{+}$, $ABCB5^{+}$ así como otros fenotipos de superficie de células CSC que se conocen en el estado de la técnica. Véase, por ejemplo, Schulenburg *et al.*, 2010, *supra*, Visvader *et al.*, 2008, PMID: 18784658 y la patente US. 2008/0138313. De particular interés con respecto a la presente invención son las preparaciones que comprenden células CSC con fenotipos $CD46^{hi}CD324^{+}$.

Los niveles de expresión "positivo", "bajo" y "negativo" que se aplican a los marcadores o fenotipos marcadores se definen de la siguiente manera. Las células con expresión negativa (es decir "-") se define aquí como aquellas células que expresan menor que, o igual a, el percentil 95 de expresión observado con un anticuerpo de control de isotipo en el canal de fluorescencia en presencia del cóctel completo para tinción de anticuerpo, que marca a otras proteínas de interés en los otros canales de emisión de fluorescencia. Los expertos en la técnica apreciarán que este procedimiento para definir los acontecimientos negativos se conoce como la tinción "fluorescencia menos uno", o "FMO". Las células con expresión mayor que el percentil 95 de la expresión observada con un anticuerpo control de isotipo usando el procedimiento de tinción FMO descrita más arriba en este documento definido como "positivo" (es decir "+"). Como se define en este documento existen varias poblaciones de células definidas ampliamente como "positivas." Una célula se define como positiva si la expresión media observada del antígeno está por encima del percentil 95 determinado mediante tinción FMO con un anticuerpo de control de isotipo como se describe anteriormente. Las células positivas pueden denominarse células con expresión baja (es

decir “lo”) si la expresión media observada está por encima del percentil 95 determinada por medio de tinción FMO y se encuentra de una desviación estándar del percentil 95th. Alternativamente, las células positivas pueden ser denominadas células con expresión elevada (es decir “hi”) si la expresión media observada está por encima del percentil 95 determinada por medio de tinción FMO and mayor que una desviación estándar por sobre el percentil 95th. En otras modalidades el percentil 99th puede preferentemente ser usado como un punto de demarcación entre la tinción FMO negativa y positiva y en algunas modalidades el percentil puede ser superior que el 99%.

El fenotipo marcador CD46^{hi}CD324⁺ y aquellos ejemplificados inmediatamente arriba se pueden usar junto con el análisis de citometría de flujo estándar y técnicas de clasificación de células para caracterizar, aislar, purificar o enriquecer células o poblaciones celulares TIC y/o TPC para su posterior análisis.

Por lo tanto la capacidad de los anticuerpos de la presente invención, para reducir la frecuencia de las células tumorigénicas, se puede determinar usando las técnicas y los marcadores descritos anteriormente. En algunos casos, los anticuerpos anti-MFI2 pueden reducir la frecuencia de células tumorigénicas en 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o incluso en 35%. En otras modalidades, la reducción en la frecuencia de las células tumorigénicas puede estar en el orden de 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o 65%. En determinadas modalidades, los compuestos descritos pueden reducir la frecuencia de las células tumorigénicas en 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o incluso en 95%. Se apreciará que cualquier reducción de la frecuencia de las células tumorigénicas es probable que resulte en una correspondiente reducción en la tumorigenicidad, la persistencia, la recidiva y la agresividad de la neoplasia.

III. Anticuerpos

A. Estructura del anticuerpo

Los anticuerpos y sus variantes y derivados, incluyendo la nomenclatura aceptada y los sistemas de numeración, se han descrito ampliamente, por ejemplo, en Abbas *et al.* (2010), *Cellular and Molecular Immunology* (6th Ed.), W.B. Saunders Company; o Murphey *et al.* (2011), *Janeway's Immunobiology* (8th Ed.), Garland Science.

Un “anticuerpo” o “anticuerpo intacto” por lo general se refiere a una proteína tetramérica con forma de Y que comprende dos cadenas de polipéptido pesada (H) y dos cadenas de polipéptido livianas (L) sostenidas juntas a través de enlaces covalentes disulfuro e interacciones no covalentes. Cada cadena liviana está compuesta de un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). Cada cadena pesada comprende un dominio variable (VH) y una región constante, las que en el caso de los anticuerpos IgG, IgA, e IgD, comprende tres dominios denominados CH1, CH2, y CH3 (la IgM e

IgE poseen un cuarto dominio, CH4). En la IgG, IgA, e IgD las clases de los dominios CH1 y CH2 están separados por una región de bisagra flexible, que es un segmento rico en prolina y cisteína de largo variable (desde alrededor de 10 hasta alrededor de 60 aminoácidos en varias subclases de IgG). Los dominios variables en ambas las cadenas liviana y pesada están unidos a los dominios constantes por una región "J" de alrededor de 12 o más aminoácidos y la cadena pesada también posee una región "D" de alrededor de 10 aminoácidos adicionales. Cada clase de anticuerpo además comprende enlaces disulfuro inter-cadena e intra-cadena formados por residuos de cisteína apareados.

Como se utiliza aquí el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos multiclones, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y primatizados, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos humanos, anticuerpos producidos vía recombinante, intracuerpos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos anti-idiotípicos, anticuerpos sintéticos, incluyendo muteínas y variantes de los mismos, fragmentos de anticuerpo inmunoespecíficos tal como Fd, Fab, F(ab')₂, fragmentos F(ab'), fragmentos de cadena única (por ejemplo ScFv and ScFvFc); y derivados de los mismos incluyendo fusiones de Fc y otras modificaciones, y cualquier otra Molécula inmunorreactiva con tal de que exhibe asociación preferencial o unión con un determinante. Por otra parte, a menos que imponga otra cosa, por restricciones contextuales el término comprende, además, todas las clases de anticuerpos (es decir IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM) y todas las subclases (es decir, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2). Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos generalmente se denotan por la correspondiente letra griega minúscula α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las cadenas livianas de los anticuerpos provenientes de cualquier especie de vertebrado pueden ser asignadas a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basada en las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes.

Los dominios variables de anticuerpos muestran una variación considerable en la composición de aminoácido desde un anticuerpo a otro y son principalmente responsables del reconocimiento y unión a antígeno. Las regiones variables de cada par de cadena liviana/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo de tal modo que un anticuerpo IgG intacto posee dos sitios de unión (es decir es bivalente). Los dominios VH y VL comprenden tres regiones de variabilidad extrema, los que se denominan regiones hipervariables, o más comúnmente, regiones determinantes de complementariedad (CDR), enmarcadas y separadas por cuatro regiones menos variables conocidas como regiones marco (FR). La asociación no covalente entre la región VH y la VL forma el fragmento Fv (por "fragmento variable") el cual contiene uno de los dos sitios de unión a antígeno

del anticuerpo. Los fragmentos ScFv (por fragmento variable de cadena única), el cual se puede obtener por medio de ingeniería genética, se asocia en una única cadena polipeptídica, la región VH y la VL de un anticuerpo, separada por un agente de unión peptídico.

Como se utiliza aquí, la asignación de aminoácidos a cada dominio, región marco y CDR puede estar de acuerdo con uno de los esquemas de numeración proporcionados por Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th Ed.), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publicación no. 91-3242; Chothia *et al.*, 1987, PMID: 3681981; Chothia *et al.*, 1989, PMID: 2687698; MacCallum *et al.*, 1996, PMID: 8876650; o Dubel, Ed. (2007) *Handbook of Therapeutic Anticuerpos*, 3rd Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH and Co o AbM (Oxford Molecular/MSI Pharmacopia) a menos que se indique lo contrario. Los residuos de aminoácidos que comprenden las CDR como se define por Kabat, Chothia, MacCallum (también conocido como Contact) y Abm según se obtiene a partir de la base de datos del sitio web Abysis (infra.) se establecen a continuación.

TABLA 1

	Kabat	Chothia	MacCallum	Abm
VH CDR1	31-35	26-32	30-35	26-35
VH CDR2	50-65	52-56	47-58	50-58

VH CDR3	95-102	95-102	93-101	95-102
VL CDR1	24-34	24-34	30-36	24-34
VL CDR2	50-56	50-56	46-55	50-56
VL CDR3	89-97	89-97	89-96	89-97

Las regiones variables y las CDR en una secuencia de anticuerpo se pueden identificar de acuerdo a reglas generales que se han desarrollado en la técnica (como se indica arriba, tal como, por ejemplo, el sistema de numeración Kabat) o mediante el alineamiento de las secuencias contra una base de datos de regiones variables conocidas. Los métodos para identificar estas regiones se describen en Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001

and Dinarello *et al.*, Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Bases de datos ejemplares de secuencias de anticuerpo se describen en, y pueden ser accedidas a través del, sitio web "Abysis" en www.bioinf.org.uk/abs (mantenido por A.C. Martin in the Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London, London, Inglaterra) y el sitio web VBASE2 en www.vbase2.org, como se describe en Retter *et al.*, Nucl. Acids Res., 33 (Volumen de la Base de datos): D671 -D674 (2005). Preferentemente las secuencias se analizan utilizando la base de datos Abysis, que integra datos de secuencia de Kabat, IMGT y el Banco de Datos de Proteína (PDB) con datos estructurales provenientes de PDB. Véase el libro de Dr. Andrew C. R. Martin's capítulo *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. en: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547, también disponible en el sitio web bioinforg.uk/abs). La base de datos en el sitio web Abysis incluye además las reglas generales que han sido desarrolladas para la identificación de las CDR que pueden utilizarse de conformidad con las enseñanzas aquí descritas. Las FIGURAS 6E a 6G anexas aquí muestran los resultados de dicho análisis en la anotación de regiones variables de cadena pesada y liviana ejemplares. Al menos que se indique de otra forma, todas las CDR definidas aquí se derivan de acuerdo al sitio web de la base de datos Abysis de acuerdo a Kabat *et al.*

Para las posiciones de aminoácido de la región constante de la cadena pesada que se discute en la invención, la numeración es de acuerdo al índice Eu descrito primero en Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1): 78-85 que describir la secuencia de aminoácido de la proteína Eu de mieloma, que al parecer fue la primera IgG1 humana secuenciada. El índice Eu de Edelman también se define en Kabat *et al.*, 1991 (*supra.*). Por lo cual, los términos "índice Eu como se establece en Kabat" o "índice Eu de Kabat" o "índice Eu" o "numeración Eu" en el contexto de la cadena pesada se refiere al Sistema de numeración de residuo basado en el anticuerpo IgG1 Eu humano de Edelman *et al.* como se establece en Kabat *et al.*, 1991 (*supra.*) El sistema de numeración usado para la cadena liviana región constante aminoácido secuencia se establece de manera similar en Kabat *et al.*, (*supra.*) Una secuencia de aminoácido de la región constante de cadena liviana kappa ejemplar compatible con la presente invención se define inmediatamente a continuación:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 1).

Similarmente, una secuencia de aminoácido de región constante de cadena pesada IgG1 ejemplar

compatible con la presente invención se establece inmediatamente a continuación:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
5 DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO: 2).

- 10 Las secuencias de región constante descritas, o variaciones o derivadas de las mismas, pueden asociarse funcionalmente con las regiones variables de cadena pesada y liviana descritas usando técnicas de biología molecular estándar para proporcionar anticuerpos de largo completo que pueden ser usados como tal o incorporados en los ADC anti-MFI2 de la invención.

- Los anticuerpos o inmunoglobulinas de la invención se pueden generar a partir de un
15 anticuerpo que reconoce o se asocia específicamente con cualquier determinante relevante. Como se utiliza aquí los términos “determinante” o “blanco” se refieren a cualquier rasgo, marcador, propiedad o factor detectable que es identificable asociado con, o específicamente encontrado en o en una célula particular, población celular o tejido. Los determinantes o blancos pueden ser morfológicos, funcionales o bioquímicos en naturaleza y preferentemente son fenotípicos. En
20 algunas modalidades un determinante es una proteína que es expresada de manera diferencial (sobre- o bajo-expresada) por tipos celulares específicos o por células bajo ciertas condiciones (por ejemplo durante puntos específicos del ciclo celular o por células en un nicho particular). Para los propósitos de la presente invención un determinante es preferentemente diferencialmente expresado en células cancerosas aberrantes y puede comprender una proteína MFI2, o cualquiera
25 de sus variantes de empalme, isoformas, homólogas o miembros de familia, o dominios, regiones o epítopes específicos del mismo. Un “antígeno”, “determinante inmunogénico”, “determinante antigénico” o “inmunógeno” representa a cualquier proteína o cualquier fragmento, región o dominio de la misma que puede estimular una respuesta inmune cuando se introduce en un animal inmunocompetente y es reconocida por los anticuerpos producidos por la respuesta inmune. La
30 presencia o ausencia de los determinantes MFI2 contemplados aquí se puede utilizar para identificar una célula, subpoblación celular o tejido (por ejemplo tumores, células tumorigénicas o CSC).

Existen dos tipos de puentes o enlaces disulfuro en las moléculas de inmunoglobulina: los enlaces disulfuro intercadena e intracadena. Tal como es bien sabido en el estado del arte la ubicación y número de los enlaces disulfuro intercadena variará de acuerdo a la clase y especie de

inmunoglobulina. Mientras que la invención no está limitada a cualquier clase o subclase de anticuerpo particular, la inmunoglobulina IgG1 deberá ser usada a lo largo de la presente descripción para propósitos ilustrativos. En las moléculas IgG1 tipo silvestre existen doce enlaces disulfuro intracadena (cuatro en cada cadena pesada y dos en cada cadena liviana) y cuatro enlaces disulfuro intercadena. Los enlaces disulfuro intracadena generalmente están en algún grado protegidos y relativamente menos susceptible de reducción que los enlaces intercadena. Por el contrario, los enlaces disulfuro intercadena están ubicados en la superficie de la inmunoglobulina, son accesibles a solventes y generalmente son relativamente fáciles de reducir. Existen dos enlaces disulfuro de intercadena entre las cadenas pesadas y una de cada cadena pesada a su respectiva cadena liviana. Se ha demostrado que los enlaces disulfuro de intercadena no son esenciales para la asociación de las cadenas. La región de bisagra IgG1 contiene las cisteínas en la cadena pesada que forman los enlaces disulfuro de intercadena, lo cual le proporciona soporte estructural junto con la flexibilidad que facilita el movimiento de Fab. Los enlaces disulfuro intercadena pesada/pesada de IgG1 están ubicados en los residuos C226 y C229 (numeración Eu) mientras que el enlace disulfuro intercadena de IgG1 entre la cadena liviana y la cadena pesada de la IgG1 (pesada/liviana) están formados entre los residuos C214 de la cadena liviana kappa o la cadena liviana lambda y C220 en la región superior de la bisagra de la cadena pesada.

B. Generación y producción de anticuerpo

Los anticuerpos de la invención se pueden producir usando una variedad de métodos conocidos en el estado del arte.

1. Generación de anticuerpos policlonales en animales huéspedes

La producción de anticuerpos policlonales en diversos animales huésped se conoce bien en el estado del arte (véase por ejemplo, Harlow and Lane (Eds.) (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; and Harlow *et al.* (1989) *Antibodies*, NY, Cold Spring Harbor Press). Con el fin de generar anticuerpos policlonales, un animal inmunocompetente (por ejemplo ratón, rata, conejo, cabra, primate no humano, etc.) se inmuniza con una proteína antigénica o con células o preparaciones que comprenden una proteína antigénica. Después de un período de tiempo, se obtiene el suero que contiene al anticuerpo policlonal por sangrado o sacrificio del animal. El suero puede usarse en la forma obtenida a partir del animal o los anticuerpos pueden purificarse parcial o totalmente para proporcionar fracciones de inmunoglobulina o preparaciones de anticuerpo aislado.

Cualquier forma de antígeno, o células o preparaciones que contienen al antígeno, se pueden utilizar para generar un anticuerpo que es específico para un determinante. El término "antígeno" se

utiliza en un sentido amplio y puede comprender cualquier fragmento inmunogénico o determinante del blanco seleccionado que incluye un único epítope, múltiples epítopes, dominios individuales o múltiples o el dominio extracelular completo (ECD). El antígeno puede ser una proteína de largo complete aislada, una proteína de superficie celular (por ejemplo inmunizando con células que expresan al menos una porción del antígeno en su superficie), o a soluble proteína (por ejemplo inmunizando solo con la porción ECD de la proteína). El antígeno puede ser producido en una célula genéticamente modificada. Cualquiera de los antígenos mencionados arriba pueden ser usados solos o en combinación con uno o más adyuvantes que aumentan la inmunogenicidad conocidos en el arte. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no-genómico (por ejemplo ADNc) y puede codificar al menos una porción de ECD, suficiente para producir una respuesta inmunogénica. Cualquier vector puede ser empleado para transformar las células en las cuales el antígeno es expresado, incluyendo pero que no está limitado a vectores adenovirales, vectores lentivirales, plasmidios, y vectores no-virales, tal como lípidos catiónicos.

2. Anticuerpos monoclonales

En modalidades seleccionadas, la invención contempla el uso de anticuerpos monoclonales. Como se sabe en el estado del arte, el término "monoclonal anticuerpo" o "mAb" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos con la excepción de algunas posibles mutaciones (por ejemplo mutaciones que ocurren naturalmente), que pueden estar presentes en menores cantidades.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el estado del arte, incluyendo técnicas de hibridoma, técnicas recombinantes, tecnologías de presentación de fagos, animales transgénicos (por ejemplo un XenoMouse®) o alguna combinación de los mismos. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma y de ingeniería bioquímica y genética tal como se describe con más detalle en An, Zhigiang (ed.) *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley and Sons, 1st ed. 2009; Shire et. al. (eds.) *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, Springer Science + Business Media LLC, 1st ed. 2010; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988; Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Luego de la producción de anticuerpos monoclonales múltiples que se unen de manera específica a un determinante, se pueden seleccionar anticuerpos particularmente efectivos a través de varios procesos de evaluación, basados en, por ejemplo, su afinidad por el determinante o la tasa de

internalización. Los anticuerpos producidos como se describe aquí se pueden usar como “fuente” de anticuerpos y además ser modificados para, por ejemplo, mejorar la afinidad por el blanco, mejorar su producción en el cultivo celular, reducir la inmunogenicidad *in vivo*, crear construcciones multiespecíficas, etc. Una descripción más detallada de la producción y evaluación de anticuerpos monoclonales se indica a continuación y en los Ejemplos anexos.

3. Anticuerpos humanos

En otra modalidad, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos completamente humanos. El término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácido que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o ha sido preparado utilizando algunas de las técnicas para preparar anticuerpos humanos descritas más adelante.

Se pueden preparar anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas en el estado del arte. En una modalidad, se pueden aislar anticuerpos humanos recombinantes seleccionando una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes preparada usando presentación de fagos. En una modalidad, la biblioteca es un fago scFv o una biblioteca de presentación de levaduras, generada usando ADNc de VL y VH humanas preparadas a partir de mRNA aislado de células B.

Los anticuerpos humanos también se pueden preparar mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo en ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados y se han introducido genes humanos de inmunoglobulina. Tras el desafío, se observa la producción anticuerpos humanos, la cual se asemeja de manera cercana, a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación, el ensamblaje génico, y el repertorio de anticuerpos completamente humanos. Esta metodología se describe, por ejemplo, en las patentes US 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las patentes US 6.075.181 y 6.150.584 respecto de la tecnología XenoMouse®; y en Lonberg y Huszar, 1995, PMID: 7494109). Alternativamente, un anticuerpo humano se puede preparar mediante inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno blanco (tales linfocitos B se pueden recuperar de un individuo que padece un trastorno neoplásico o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véase, por ejemplo Cole *et al.*, patentes *Monoclonal Antibodies and Cancer Terapia*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, 1991, PMID: 2051030; y la patente US 5.750.373. Como con otros anticuerpos monoclonales se pueden usar tales anticuerpos humanos como la fuente de anticuerpos.

4. Anticuerpos derivados:

Se han generado seleccionados y aislados once fuentes de anticuerpos, como se describe arriba estas pueden ser además alteradas para proporcionar anticuerpos anti-MFI2 que tienen características farmacéuticas mejoradas. Preferentemente la fuentes de anticuerpos son modificadas o alteradas utilizando técnicas de ingeniería molecular conocidas para proporcionar anticuerpos derivados que tienen las propiedades terapéuticas deseadas.

4.1. Anticuerpos quiméricos y humanizados

Las modalidades seleccionadas de la invención comprenden anticuerpos monoclonales murinos que se unen inmuno específicamente a MFI2 y los cuales pueden ser considerados anticuerpos "fuente". En modalidades seleccionadas, los anticuerpos de la invención pueden ser derivados de estos anticuerpos "fuente" a través de una modificación opcional de la región constante y/o de las secuencias de aminoácido de unión a epítipo del anticuerpo fuente. En determinadas modalidades un anticuerpo es "derivado" de un anticuerpo fuente si los aminoácidos seleccionados en el anticuerpo fuente son alterados a través de delección, mutación, sustitución, integración o combinación. En otra modalidad, un anticuerpo "derivados uno en el cual los fragmentos del anticuerpo fuente (por ejemplo uno o más CDR o regiones variables de cadena pesada y liviana completas) se combinan con o se incorporan en una secuencia de anticuerpo aceptor para proporcionar el anticuerpo derivado (por ejemplo anticuerpos quiméricos o humanizados). Estos anticuerpos "derivados" pueden ser generados utilizando técnicas de biología molecular estándar cono se describe a continuación, tales como, por ejemplo, para mejorar la afinidad por el determinante; para mejorar la estabilidad del anticuerpo; para mejorar la producción y el rendimiento en el cultivo celular; para reducir la inmunogenicidad *in vivo*; para reducir la toxicidad; para facilitar la conjugación de un residuo activo; o para crear un anticuerpo multiespecífico. Tales anticuerpos también pueden ser derivados de una fuente de anticuerpos por medio de la modificación de la molécula madura (por ejemplo patrones de glicosilación o regulación) mediante medios químicos o por modificación pos-traducciona.

En una modalidad, los anticuerpos de la invención comprenden anticuerpos quiméricos que se derivan de segmentos de proteína provenientes de al menos dos especies diferentes o clase de anticuerpos que han sido unidos covalentemente. El término anticuerpo "quimérico" está dirigido a construcciones en los cuales una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos de otras especies o que pertenecen

a otras clases o subclases de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos (patente US 4.816.567; Morrison *et al.*, 1984, PMID: 6436822). En algunas modalidades los anticuerpos quiméricos de la presente invención pueden comprender todo o la mayoría de las regiones variables de cadena pesada y liviana murinas seleccionadas funcionalmente unidas a regiones constantes de cadena liviana y pesada humanas. En otras modalidades seleccionadas, anticuerpos anti-MF12 pueden ser “derivados” de los anticuerpos de ratón aquí descritos.

En otras modalidades, los anticuerpos quiméricos de la invención son anticuerpos “injertados CDR”, donde las CDR (como se define utilizando Kabat, Chothia, McCallum, etc.) se derivan de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras los restos del anticuerpo es largamente derivad de un anticuerpo de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. Para ser usados en humanos, una o más CDR seleccionadas de roedores (por ejemplo CDR de ratón) puede ser injertada en un anticuerpo aceptor humano, reemplazando una o más de las CDR que existen naturalmente del anticuerpo humano. Estas construcciones generalmente tienen las ventajas de proporcionar funciones de anticuerpo humano de intensidad completa, por ejemplo citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y citotoxicidad dependiente de anticuerpo mediada por célula (ADCC) mientras que se reduce las respuestas inmune indeseadas al anticuerpo por parte del individuo. En una modalidad los anticuerpos injertados con CDR comprenderán una o más CDR obtenidas de un ratón incorporadas in una secuencia marco humana.

Similar al anticuerpo injertado CDR es un anticuerpo “humanizado”. Como se utiliza aquí, un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo humano (anticuerpo aceptor) que comprende una o más secuencias de aminoácido (por ejemplo secuencias de CDR) derivadas de uno o más anticuerpos no humanos (anticuerpo donante o fuente). En determinadas modalidades, se pueden introducir “retro mutaciones” en el anticuerpo humanizado, en el que los residuos en uno o más FR de la región variable del anticuerpo humano receptor se sustituyen por los correspondientes residuos de la especies de anticuerpo donante no humano. Tales retro mutaciones pueden ayudar a mantener la configuración tridimensional apropiada de la(s) CDR(s) injertada(s) y de ese modo mejorar la afinidad y estabilidad del anticuerpo. Se pueden usar anticuerpos de diversas especies donantes incluyendo, sin limitación, ratón, rata, conejo, o primate no humano. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender nuevos residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante, por ejemplo, para refinar además el desempeño del anticuerpo. Se proveen las CDR injertadas y los anticuerpos humanizados compatibles con la presente invención que comprenden componentes murinos de los anticuerpos fuente y componentes humanos de los anticuerpos aceptores como se establece en los Ejemplos más adelante.

Se pueden usar diversas técnicas reconocidas en el estado del arte para determinar cuáles secuencias humanas usar como anticuerpos aceptores para proporcionar construcciones humanizadas de acuerdo con la presente invención. Las compilaciones de las secuencias de línea germinal humana compatible y los métodos para determinar su idoneidad como secuencias
5 aceptoras se describen, por ejemplo, en Dubel and Reichert (Eds.) (2014) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 2nd Edition, Wiley-Blackwell GmbH; Tomlinson, I. A. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. et al. (1995) *Immunol. Today* 16: 237-242; Chothia, D. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J* 14:4628-4638). El directorio V-BASE (VBASE2 – Retter et al., *Nucleic Acid Res.* 33; 671-674, 2005) que proporciona un amplio directorio de
10 secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I. A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) también se puede usar para identificar secuencias aceptoras compatibles. Además, las secuencias marco humanas de consenso descritas, por ejemplo, en la patente US 6.300.064 también pueden probar ser secuencias aceptoras compatibles que pueden ser usadas de acuerdo con las enseñanzas aquí presentes. En general,
15 las secuencias marco aceptoras humanas son seleccionadas en base a la homología con las secuencias marco de fuente murina, junto con un análisis de las estructuras canónicas de CDR de los anticuerpos fuente y aceptores. Las secuencias derivadas de las regiones variables de cadena pesada y liviana del anticuerpo derivado pueden luego ser sintetizadas usando técnicas reconocidas en el arte.

20 A modo de ejemplo los anticuerpos injertados con CDR y humanizados, y los métodos asociados, se describen en las patentes US 6.180.370 y 5.693.762. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo Jones et al., 1986, (PMID: 3713831); y las patentes US 6.982.321 y 7.087.409.

La identidad de secuencia o homología de secuencia de la región variable del anticuerpo con CDR injertada o humanizado respecto de la región variable del anticuerpo humano aceptor se puede
25 determinar cómo se discute aquí y, cuando se mide como tal, preferentemente compartirá al menos 60% o 65% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos 70%, 75%, 80%, 85%, o 90% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 93%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los residuos que no son idénticos difieren por sustituciones de aminoácido conservados. Una “sustitución conservada de aminoácido”
30 es aquella en la cual un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que posee una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo de carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservado no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos donde dos o más secuencias de aminoácido difieren una de la otra por sustituciones conservadas, el porcentaje de

identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservada de la sustitución.

Se apreciará que las secuencias de las CDR y marcos anotadas, tal como se han proporcionado en las FIGURA 6A y 6B anexas se definen de acuerdo a Kabat et al. usando la base de datos propietaria Abysis. De manera similar, las CDR mostradas en las secuencias alineadas anotadas de las FIGURAS 6H – 6J también se definen según Kabat et al. Sin embargo, tal como se discute en este documento y como se muestra en las FIGURAS 6E – 6G un experto en el arte podría identificar fácilmente las CDR de acuerdo con las definiciones proporcionadas por Chothia et al., ABM o MacCallum et al así como por Kabat et al. Como tal, los anticuerpos anti-MFI2 humanizados que comprenden una o más CDR derivadas de acuerdo a cualquiera de los sistemas antes mencionados de forma explícita están contenidas dentro del alcance de la presente invención.

4.2 Anticuerpos sitio específicos

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser modificados por ingeniería genética para facilitar la conjugación a una citotoxina u otro agente anticancerígeno (como se describe en más detalle más adelante). Es ventajoso para la preparación del conjugado de droga anticuerpo (ADC) comprender una población homogénea de moléculas ADC en términos de la posición de la citotoxina en el anticuerpo y la proporción de la droga al anticuerpo (DAR). Basada en la presente descripción un experto en el arte podría fácilmente fabricar construcciones sitio específicas modificados por ingeniería genética como se describe aquí. Como se utiliza aquí un “anticuerpo sitio específico” o “construcción sitio específica” representa a un anticuerpo, o fragmento inmunoreactivo del mismo, donde al menos un aminoácido ya sea en la cadena pesada o liviana ha sido eliminado, alterado o sustituido (preferentemente con otro aminoácido) para proporcionar al menos una cisteína libre. De manera similar, un “conjugado sitio específico” podrá considerarse en el sentido de un ADC que comprende un anticuerpo sitio específico y al menos una citotoxina u otros compuestos conjugados a la(s) cisteína(s) no apareada(s) o libre(s). En determinadas modalidades el residuo de cisteína no apareada comprenderá un residuo intracadena no apareado. En otras modalidades el residuo de cisteína libre comprenderá un residuo intercadena no apareado. Incluso en otras modalidades la cisteína libre puede ser modificada por ingeniería genética en la secuencia de aminoácido del anticuerpo (por ejemplo en el dominio CH3). En cualquier evento el anticuerpo sitio específico puede ser de varios isotipos, por ejemplo, IgG, IgE, IgA o IgD; y dentro de estas clases el anticuerpo puede ser de varias subclases, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Para las construcciones de IgG la cadena liviana del anticuerpo puede comprender el isotipo ya sea uno

kappa o lambda donde cada uno incorpora un C214 que, en modalidades seleccionadas, puede no estar apareado debido a la falta del residuo C220 en la cadena pesada de IgG1.

Por lo cual, como se utiliza aquí, los términos “cisteína libre” o “cisteína no apareada” se pueden utilizar de manera intercambiable a menos que se defina de otro modo por el contexto y significará que cualquier constituyente cisteína (o que contiene tiol) de un anticuerpo, ya sea naturalmente presente o específicamente incorporado en una posición de residuo seleccionado usando técnicas de ingeniería molecular. En determinadas modalidades seleccionadas la cisteína libre puede comprender una cisteína que existe naturalmente cuyo asociado de puente de disulfuro de intercadena o intracadena nativa ha sido sustituido, eliminado o de otra forma alterado para alterar el puente disulfuro que existe naturalmente bajo condiciones fisiológicas transformando así a la cisteína no apareada adecuada para la conjugación sitio específica. En otras modalidades preferidas la cisteína libre o no apareada comprenderá un residuo de cisteína que está colocado selectivamente en un lugar predeterminado dentro de las secuencias de aminoácido de cadena pesada o liviana del anticuerpo. Se apreciará que, antes de la conjugación, las cisteínas libres o no apareadas pueden estar presentes como un tiol (cisteína reducida), como una cisteína capsulada (oxidado) o como un enlace de disulfuro intramolecular no natural (oxidado) con otra cisteína libre en el mismo anticuerpo dependiendo del estado oxidación del sistema. Como se describe en más detalle a continuación, una leve reducción de esta construcción de anticuerpo proporcionará tioles disponibles para la conjugación sitio específica. En modalidades particularmente preferidas las cisteínas libres o no apareadas (ya sea que existen de manera natural o que están incorporadas) estarán sujetas a la reducción selectiva y a la posterior conjugación para proporcionar composiciones DAR homogéneas.

Se apreciará que se predice que las propiedades favorables exhibidas por las preparaciones de conjugado modificado por ingeniería genética descrito, al menos en parte, en cuanto a la capacidad de dirigir específicamente la conjugación y en gran medida limitar los conjugados fabricados en términos de la posición de la conjugación y el DAR absoluto de la composición. A diferencia de la mayoría de las preparaciones ADC convencionales, la presente invención no se basa exclusivamente en la reducción parcial o total del anticuerpo para proporcionar sitios de conjugación al azar y la generación relativamente no controlada de especies DAR. Más bien, la presente invención provee uno o más sitios de cisteína no apareados (o libres) predeterminados modificando por ingeniería genética el anticuerpo dirigido para alterar uno o más de los puentes de disulfuro que existen de manera natural (es decir, “nativos”) intercadena o intracadena o para introducir un residuo cisteína en cualquier posición. Con este fin, se apreciará que, en modalidades seleccionadas, un residuo de cisteína se puede incorporar en cualquier lugar a lo largo de la cadena

pesada o liviana del anticuerpo (o fragmento inmunoreactivo del mismo) o anejarlo al mismo mediante técnicas de ingeniería molecular estándar. En otras modalidades preferidas la interrupción de enlaces disulfuro nativos puede ser realizada en combinación con la introducción de una cisteína no nativa (la cual entonces comprenderá la cisteína libre) que puede entonces ser usada como un sitio de conjugación.

En una modalidad el anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende al menos una eliminación o sustitución de aminoácido de un residuo de cisteína intracadena o intercadena. Como se utiliza aquí la expresión “residuo de cisteína intercadena” representa a un residuo de cisteína que está involucrado en un enlace de disulfuro nativo ya sea la cadena liviana y pesada de un anticuerpo o entre las dos cadenas pesadas de un anticuerpo mientras que un “residuo de cisteína intracadena” es uno que está apareado de manera natural con otra cisteína en la misma cadena pesada o liviana. En una modalidad el residuo de cisteína intercadena eliminado o sustituido está involucrado en la formación de un enlace de disulfuro entre la cadena liviana y pesada. En otra modalidad el residuo de cisteína eliminado o sustituido está involucrado en un enlace de disulfuro entre las dos cadenas pesadas. En una modalidad típica, debido a la estructura complementaria de un anticuerpo, en donde la cadena liviana está apareada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada y donde los dominios CH2 y CH3 de una cadena pesada están apareados con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada complementaria, Una mutación o eliminación de una cisteína única ya sea en la cadena liviana o en la cadena pesada podría resultar en dos residuos de cisteína no apareados en el anticuerpo modificado por ingeniería genética.

En algunas modalidades un residuo de cisteína intercadena es eliminado. En otras modalidades una cisteína intercadena está sustituida por otro aminoácido (por ejemplo un aminoácido que existe de manera natural). Por ejemplo, la sustitución de aminoácido puede resultar en el reemplazo de una cisteína intercadena con un residuo neutro (por ejemplo serina, treonina o glicina) o hidrofílico (por ejemplo metionina, alanina, valina, leucina o isoleucina). En una modalidad una cisteína intercadena se reemplaza con una serina.

En algunas modalidades contempladas por la invención el residuo de cisteína eliminado o sustituido está en la cadena liviana (ya sea kappa o lambda) dejando así una cisteína libre en la cadena pesada. En otras modalidades el residuo de cisteína eliminado o sustituido está en la cadena pesada dejando la cisteína libre en la región constante de la cadena liviana. Con el ensamblaje se apreciará que la delección o sustitución de una cisteína única ya sea en la cadena liviana o pesada de un anticuerpo intacto resulta en un anticuerpo sitio específico que tiene dos residuos de cisteína no apareada.

En una modalidad la cisteína en la posición 214 (C214) de la cadena liviana de IgG (kappa o lambda) está eliminado o sustituido. En otra modalidad la cisteína en la posición 220 (C220) en la cadena pesada de IgG es eliminado o sustituido. En modalidades adicionales la cisteína en la posición 226 o posición 229 en la cadena pesada está eliminado o sustituido. En una modalidad C220 en la cadena pesada está sustituido con serina (C220S) para proporcionar la cisteína libre deseada en la cadena liviana. En otra modalidad C214 en la cadena liviana está sustituido con serina (C214S) para proporcionar la cisteína libre deseada en la cadena pesada. Tales construcciones sitio específicas se proporcionan en el Ejemplo 15. Un resumen de estas construcciones se muestran en la Tabla 2 inmediatamente a continuación donde la numeración está generalmente de acuerdo al índice Eu como se establece en Kabat, y WT da cuenta del “tipo silvestre” o secuencias de región constante nativa sin alteraciones y delta (Δ) denomina la eliminación de un residuo de aminoácido (por ejemplo C214 Δ indica que la cisteína en la posición 214 ha sido eliminada).

Tabla 2

Denominación	Componente de Anticuerpo	Alteración
ss1	Cadena pesada Cadena liviana	C220S WT
ss2	Cadena pesada Cadena liviana	C220 Δ WT
ss3	Cadena pesada Cadena liviana	WT C214 Δ
ss4	Cadena pesada Cadena liviana	WT C214S

Con respecto a la introducción o adición de un residuo de cisteína o residuos de cisteína para proporcionar una cisteína libre (opuesto a alterar un enlace de disulfuro nativo) la(s) posición(es) compatible(s) en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden ser fácilmente discernidas por una persona experta en el arte. De acuerdo con ello, en modalidades seleccionadas la(s) cisteína(s) puede(n) ser introducida(s) en el dominio CH1, el dominio CH2 o el dominio CH3 o cualquier combinación de los mismos dependiendo del DAR deseado, la construcción de anticuerpo, la carga útil seleccionada y el anticuerpo blanco. En otras modalidades preferidas las cisteínas pueden ser introducidas en un dominio CL kappa o lambda y, en modalidades particularmente preferidas, en la región c-terminal del dominio CL. En cada caso otros residuos de aminoácido proximal al sitio de

inserción de cisteína pueden estar alterados, retirados o sustituidos para facilitar la estabilidad molecular, la eficiencia de conjugación o para proporcionar un entorno protector para la carga útil una vez que se une. En modalidades particulares, los residuos sustituidos existen en cualquiera de los sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo dichos residuos de la superficie celular con cisteína, se posicionan entonces los grupos tiol reactivos en sitios fácilmente accesibles en el anticuerpo y pueden ser selectivamente reducidos como se describe adicionalmente aquí. En modalidades particulares, los residuos sustituidos existen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir aquellos residuos con cisteína, se posicionan de ese modo los grupos tiol reactivos en sitios accesible del anticuerpo y pueden ser usados para conjugar selectivamente el anticuerpo. En determinadas modalidades, cualquiera de uno o más de los siguientes residuos se pueden sustituir con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración Eu) de la cadena pesada; y S400 (numeración Eu) de la región Fc de la cadena pesada. Posiciones de sustitución adicionales y métodos de fabricar anticuerpos sitio específicos compatibles se describen en la patente US 7.521.541 la cual es incorporada aquí en su totalidad.

La estrategia para generar conjugados de droga anticuerpo con sitios definidos y estequiometría de carga de droga, como se describe aquí, es ampliamente aplicable a todos los anticuerpos anti-MFI2 ya que principalmente involucra la modificación por ingeniería genética de los dominios constantes conservados del anticuerpo. Ya que la de secuencias de aminoácido y puentes de disulfuro nativos de cada clase y subclase de anticuerpos se encuentran bien documentados, como un experto en el arte podría fácilmente fabricar construcciones modificadas por ingeniería genética de diversos anticuerpos sin experimentación indebida y, de acuerdo con ello, tales construcciones se contemplan expresamente como contenidas dentro del espectro de la presente invención.

4.3 Modificaciones de región constante y glicosilación alterada

Las modalidades seleccionadas de la presente invención también pueden comprender sustituciones o modificaciones de la región constante (es decir la región Fc), incluyendo sin limitación, sustituciones, mutaciones y/o modificaciones de residuos de aminoácido, las cuales resultan en un compuesto con características que incluyen, pero que no están limitadas a: farmacocinética alterada, vida media sérica aumentada, aumento de la afinidad de unión, inmunogenicidad reducida, producción aumentada, unión del ligando Fc alterada a un receptor Fc (FcR), ADCC o CDC aumentada o reducida, glicosilación alterada y/o enlaces disulfuro y especificidad de unión modificados.

Los compuestos con funciones efectoras Fc mejoradas pueden ser generados, por ejemplo, a través de cambios en los residuos de aminoácido involucrados en la interacción entre el dominio Fc y un receptor de Fc (por ejemplo FcγRI, FcγRIIA y B, FcγRIII y FcRn), lo que puede conducir a citotoxicidad aumentada y/o farmacocinética alterada, tal como vida media sérica aumentada (véase, por ejemplo, Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4:25-34 (1994); and de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995).

En modalidades seleccionadas, anticuerpos con vidas medias *in vivo* aumentadas pueden ser generados modificando (por ejemplo sustituyendo, eliminando o agregando) residuos de aminoácido identificados como involucrados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo las Publicaciones internacionales WO 97/34631; WO 04/029207; la patente US 6.737.056 y la patente US 2003/0190311). En relación a tales modalidades, las variantes de Fc pueden proporcionar vidas medias en un mamífero, preferentemente un humano, de más de 5 días, mayor que 10 días, mayor que 15 días, preferentemente mayor que 20 días, mayor que 25 días, mayor que 30 días, mayor que 35 días, mayor que 40 días, mayor que 45 días, mayor que 2 meses, mayor que 3 meses, mayor que 4 meses, o mayor que 5 meses. La vida media aumentada resulta en un mayor título sérico que permite reducir la frecuencia de la administración de los anticuerpos y/o reduce la concentración de los anticuerpos a ser administrados. Se puede ensayar la unión a FcRn humano *in vivo* y la vida media sérica de los polipéptidos de alta afinidad de unión a FcRn humano, por ejemplo en ratones transgénicos o en líneas celulares transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los cuales los polipéptidos con una variante de la región Fc han sido administrados. La publicación WO 2000/42072 describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcRn. Véase también, por ejemplo Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

En otras modalidades, las alteraciones Fc pueden conducir a actividad ADCC o CDC aumentada o reducida. Como es conocido en el estado del arte, la CDC se refiere a la lisis de una célula blanco en la presencia de complemento, y ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada se une sobre los FcR presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo células Natural Killer, neutrófilos, y macrófagos) habilita a estas células citotóxicas efectoras a unirse específicamente a una célula blanco que porta un antígeno y posteriormente elimina a la célula blanco con citotoxinas. En el contexto de la presente invención las variantes de anticuerpo se proporcionan con una afinidad de unión FcR "alterada", lo cual es ya sea la unión aumentada o disminuida comparada con un anticuerpo parental o no modificado o con un anticuerpo que comprende una secuencia FcR nativa. Tales variantes que exhiben una unión disminuida pueden poseer una unión muy baja o no apreciable, por ejemplo de 0-20% de unión al FcR comparado con

una secuencia nativa, por ejemplo tal como se determina por técnicas bien conocidas en el estado del arte. En otras modalidades la variante exhibirá una unión aumentada según se compara con el dominio Fc de inmunoglobulina nativa. Se apreciará que estos tipos de variantes Fc pueden ser usadas ventajosamente para aumentar las propiedades anti-neoplásicas efectivas de los anticuerpos descritos. Incluso en otras modalidades, tales alteraciones conducen a afinidad de unión aumentada, inmunogenicidad reducida, producción aumentada, glicosilación alterada y/o enlaces disulfuro (por ejemplo para sitios de conjugación), especificidad de unión modificada, fagocitosis aumentada; y/o regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo receptor de células B; BCR), etc.

Incluso otras modalidades comprenden una o más glicoformas modificadas por ingeniería genética, por ejemplo un anticuerpo sitio específico que comprende un patrón de glicosilación alterada o una composición de carbohidrato alterada que está unida covalentemente a la proteína (por ejemplo en el dominio Fc). Véase, por ejemplo, Shields, R. L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740. Las glicoformas modificadas por ingeniería genética pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitado a aumentar o reducir la función efectora, aumentando la afinidad del anticuerpo por un blanco o facilitando la producción del anticuerpo. En determinadas modalidades donde la función efectora reducida es deseada, la molécula puede ser modificada por ingeniería genética para expresar una forma aglicosilada. Son bien conocidas las sustituciones que pueden resultar en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable marco para así eliminar la glicosilación en ese sitio (véase por ejemplo las patentes US 5.714.350 y 6.350.861). Por el contrario, las funciones efectoras aumentadas o la unión mejorada puede ser impartida a la molécula que contiene Fc mediante ingeniería genética en uno o más sitios de glicosilación adicionales.

Otras modalidades incluyen una variante Fc que tiene una composición de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene un aumento en las estructuras GlcNAc bisectantes. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterada aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Las glicoformas modificadas por ingeniería genética se pueden generar por cualquier método conocido para un experto en el arte, por ejemplo usando cepas de expresión modificadas por ingeniería genética o variantes, por co-expresión con una o más enzimas (por ejemplo N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), expresando una molécula que comprende una región Fc en diversos organismos o líneas celulares provenientes de diversos organismos o modificando el/los carbohidrato(s) después que la molécula que comprende la región Fc ha sido expresada (véase, por ejemplo, WO 2012/117002).

4.4 Fragmentos

Sin importar que forma de anticuerpo (por ejemplo quimérico, humanizado, etc.) se selecciones para practicar la invención se apreciará que los fragmentos inmunoreactivos, ya sea por si mismos o como parte de un conjugado de droga anticuerpo, del mismo se puede usar de acuerdo con las enseñanzas aquí descritas. Un "fragmento de anticuerpo" comprende al menos una porción de un anticuerpo intacto. Como se utiliza aquí, el término "fragmento" de una molécula de anticuerpo incluye fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos, y el término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une o reacciona inmuno específicamente con un antígeno seleccionado o determinante inmunogénico del mismo o que compite con el anticuerpo intacto a partir del cual se derivan los fragmentos para la unión específica antígeno.

Fragmentos sitio específicos ejemplares incluyen: fragmentos variables de cadena liviana (VL), un fragmento variable de cadena pesada fragmentos (VH), fragmento scFv, fragmento F(ab')₂, fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento de dominio único de anticuerpos, diacuerpos, anticuerpos lineares, moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Además, un fragmento sitio específico activo comprende una porción del anticuerpo que retiene su capacidad para interactuar con el antígeno/substratos o receptores y modificarlos de una manera similar a aquella de un anticuerpo intacto (aunque quizás con algo menos de eficiencia). Tales fragmentos de anticuerpos pueden además ser modificados por ingeniería genética para comprender una o más cisteínas libres como se describe aquí.

En otras modalidades, un fragmento de anticuerpo es uno que comprende la región Fc y que retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociada con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la vida media del anticuerpo, función ADCC y unión a complemento. En una modalidad, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo como tal puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia Fc que comprende al menos una cisteína libre capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

Tal como hubiera sido reconocido por aquellos expertos en el arte, los fragmentos se pueden obtener por ingeniería molecular o a través de un tratamiento químico o enzimático (tal como papaína o pepsina) de un anticuerpo intacto o completo o cadena de anticuerpo o mediante medios recombinantes. Véase, por ejemplo Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1999), para una descripción más detallada de fragmento de anticuerpos.

En modalidades seleccionadas los fragmentos de anticuerpos de la invención comprenderán construcciones ScFv que pueden ser usadas en diversas configuraciones. Por ejemplo tales construcciones ScFv anti-MFI2 pueden ser usadas en terapia génica de inmunidad adoptiva para tratar tumores. En determinadas modalidades los anticuerpos de la invención (por ejemplo 5 fragmentos ScFv) se pueden usar para generar receptores de antígeno quimérico (CAR) que reaccionan inmunoselectivamente con MFI2. De acuerdo con la presente descripción un CAR anti-MFI2 es una proteína fusionada que comprende los anticuerpos anti-MFI2 de la invención o fragmentos inmunoreactivos de los mismos (por ejemplo fragmentos ScFv), un dominio de transmembrana, y al menos un dominio intracelular. En determinadas modalidades, se pueden 10 introducir células-T, células natural killer o células dendríticas que han sido modificadas genéticamente para expresar un CAR anti-MFI2 en un individuo que sufre de cáncer para poder estimular el sistema inmune del individuo para dirigirse específicamente a células tumorales que expresan MFI2. En algunas modalidades los CAR de la invención comprenderán un dominio intracelular que inicia una secuencia primaria de señalización citoplásmica, que es, una secuencia 15 para iniciar la activación primaria dependiente de antígeno a través de un complejo de receptor células T, por ejemplo, dominios intracelulares derivados de CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, y CD66d. En otras modalidades, los CAR de la invención comprenderán un dominio intracelular que inicia una señal secundaria o co-estimulante, por ejemplo, dominios intracelulares derivados de CD2, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD28, CD134, CD137, 20 ICOS, CD154, 4-1BB y el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoide (véase la patente US US/2014/0242701).

4.5 Construcciones multivalentes

En otras modalidades, los anticuerpos y conjugados de la invención pueden ser monovalentes 25 o multivalentes (por ejemplo bivalentes, trivalentes, etc.). Como se utiliza aquí, el término "valencia" se refiere al número de sitios de unión blanco potenciales asociados con un anticuerpo. Cada sitio de unión blanco se une específicamente a una molécula blanco o posición o locus específico en una molécula blanco. Cuando un anticuerpo es monovalente, cada sitio de unión de la molécula se unirá específicamente a una única posición de antígeno o epítipo. Cuando un anticuerpo comprende más 30 de un sitio de unión blanco (multivalente), cada sitio de unión blanco puede unirse específicamente a la misma o diferentes moléculas (por ejemplo puede unirse a diferentes ligandos o diferentes antígenos, o diferentes epítopos o posiciones en un mismo antígeno). Véase, por ejemplo, la patente US 2009/0130105.

En una modalidad, los anticuerpos son anticuerpos biespecíficos en los cuales las dos cadenas tienen especificidades diferentes, como se describe en Millstein *et al.*, 1983, *Nature*, 305:537-539. Otras modalidades incluyen anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos. Otras construcciones multiespecíficas compatibles más sofisticadas y métodos para su fabricación se describen en la patente US 2009/0155255, así como WO 94/04690; Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymology*, 121:210; y WO96/27011.

Los anticuerpos multivalentes se pueden unir inmuno-específicamente a distintos epítopes de la molécula blanco deseada o se pueden unir inmuno-específicamente a ambas a la molécula blanco así como a un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Mientras que modalidades seleccionadas solo pueden unirse a dos antígenos (es decir anticuerpos biespecíficos), los anticuerpos con especificidades adicionales tal como anticuerpos triespecíficos también están abarcados por la presente invención. Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos han, por ejemplo, sido propuestos para dirigir células del sistema inmune contra células no deseadas (patente US 4.676.980), y para el tratamiento de una infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en el arte, y se describen en la patente US 4.676.980, junto con un número de técnicas de entrecruzamiento.

5. Producción de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos se pueden producir o modificar usando el material genético obtenido de las células que producen anticuerpo y tecnología recombinante (véase, por ejemplo; Dubel and Reichert (Eds.) (2014) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 2nd Edition, Wiley-Blackwell GmbH; Sambrook and Russell (Eds.) (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed.), NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel *et al.* (2002) *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc.; y la patente US 7.709.611).

Otro aspecto de la invención pertenece a las moléculas de ácido nucleico que codifica los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma pura parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es "aislado" o se hace sustancialmente puro cuando se separa de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por medio

de técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, el bandeo CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en el arte. Un ácido nucleico de la invención por ejemplo, puede ser, ADN (por ejemplo ADN, ADNc genómico), ARN y variantes artificiales de los mismos (por ejemplo, péptido ácidos nucleicos), ya sea ARN de una hebra o de doble hebra, ARN y puede o no puede contener intrones. En modalidades seleccionadas el ácido nucleico es una molécula ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener usando técnicas de biología molecular estándar. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo hibridomas preparados como se describe en los Ejemplos a continuación), se pueden obtener los ADNc que codifican las cadenas liviana y pesada del anticuerpo mediante amplificación PCR estándar o por técnicas de clonación ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una biblioteca génica de inmunoglobulina (por ejemplo usando técnicas de exhibición de fago), se puede recuperar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo desde la biblioteca.

Los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL además pueden ser manipulados mediante técnicas de ADN estándar recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de largo completo del anticuerpo, los genes de fragmento Fab o un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une funcionalmente a otro fragmento ADN que codifica a otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un agente de unión flexible. El término “funcionalmente unido”, como se usa en este contexto, significa que los dos fragmentos de ADN se unen de tal modo que las secuencias de aminoácido codificadas por los dos fragmentos de ADN se mantienen enmarcadas.

El ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de cadena pesada de largo completo uniendo funcionalmente el ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3 en el caso de IgG1). Las secuencias de los genes de región constante de cadena pesada humana, son conocidos en el arte (véase por ejemplo, Kabat, et al. (1991) (*supra*)) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero mucho más preferentemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Una región constante ejemplar de IgG1 se define en la SEQ ID NO: 2. Para un gen de fragmento Fab de cadena pesada, el ADN que codifica al VH puede estar unido funcionalmente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de cadena liviana de largo completo (así como un gen Fab de cadena liviana) uniendo funcionalmente el ADN que

codifica a VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena liviana, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena liviana humana son bien conocidas en el arte (véase por ejemplo Kabat, et al. (1991) (*supra*)) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena liviana puede ser una región constante kappa o lambda, pero mucho más preferentemente es una región constante kappa. Una región constante de cadena liviana kappa compatible ejemplar se define en la SEQ ID NO: 1.

Aquí se contempla ciertos polipéptidos (por ejemplo antígenos o anticuerpos) que exhiben “identidad de secuencia”, similaridad de secuencia” u “homología de secuencia” con los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, un dominio VH o VL derivado de anticuerpo humanizado puede exhibir una similitud de secuencia con el dominio VH o VL de la fuente (por ejemplo murino) o el aceptor (por ejemplo humano). Un polipéptido “homólogo” puede exhibir 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o 90% de identidad de secuencia. En otras modalidades los polipéptidos “homólogos” pueden exhibir 93%, 95% o 98% de identidad de secuencia. Como se utiliza aquí, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácido es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. EL porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = número de posiciones idénticas/total número de posiciones×100), tomando en cuenta el número de gaps, y la longitud de cada gap, que necesita ser introducido para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de peso de residuo PAM120, una penalidad de longitud de gap de 12 y una penalidad de gap de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso gap de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un largo de peso de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Además o alternativamente, además se pueden usar las secuencias de proteína de la presente invención para una “secuencia de consulta” para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas, se pueden llevar a cabo usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas BLAST de proteína se pueden llevar a cabo usando el programa

XBLAST, score=50 (puntaje), wordlength=3 (largo de palabra) para obtener secuencias de aminoácido homólogas a las moléculas del anticuerpo de la invención. Para obtener alineamientos “gapped” para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST según se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acid Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo XBLAST y NBLAST).

Las posiciones de los residuos que no son idénticos pueden diferir por sustituciones de aminoácido conservados o por sustituciones de aminoácido no conservados. Una “sustitución de aminoácido conservado” es aquella en la cual un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservado no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos donde dos o más secuencias de aminoácido difieren una de la otra por las sustituciones conservadas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar positivamente para corregir la naturaleza conservada de la sustitución. En casos donde existe una sustitución con un aminoácido no-conservado, en modalidades el polipéptido que exhibe identidad de secuencia retendrá la función o actividad deseada del polipéptido de la invención (por ejemplo anticuerpo.)

También se contemplan aquí los ácidos nucleicos que exhiben “identidad de secuencia”, similaridad de secuencia” o “homología de secuencia” con los ácidos nucleicos de la invención. Una secuencia “homóloga” representa a una secuencia de moléculas de ácido nucleico que exhiben al menos alrededor de 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o 90% de identidad de secuencia. En otras modalidades, una secuencia “homóloga” de ácidos nucleicos puede exhibir 93%, 95% o 98% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de referencia.

La presente invención también proporciona vectores que comprenden a tales ácidos nucleicos descritos arriba, los cuales pueden estar funcionalmente unidos a un promotor (véase, por ejemplo WO 86/05807; WO 89/01036; y la patente US 5.122.464); y otros elementos de control transcripcionales reguladores y de procesamiento de la ruta secretora eucariótica. La invención también proporciona células huésped que portan a aquellos vectores y sistemas de expresión de huésped.

Como se utiliza aquí, el término “sistemas de expresión de huésped” incluye a cualquier tipo de sistema celular que puede ser modificado por ingeniería genética para generar ya sea los ácidos nucleicos o los polipéptidos y anticuerpos de la invención. Tales sistemas de expresión del huésped incluyen, pero no están limitados a microorganismos (por ejemplo *E. coli* o *B. subtilis*) transformados o transfectados con AND de bacteriófago recombinante o ADN plasmidial; levaduras (por ejemplo

Saccharomyces) transfectadas con vectores de expresión de levadura recombinantes; o células de mamífero (por ejemplo células COS, CHO-S, HEK293T, 3T3) que portan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero o de virus (por ejemplo el promotor tardío de adenovirus). La célula huésped puede ser co-

5 transfectada con dos vectores de expresión, por ejemplo, si el primer vector codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de cadena liviana.

Los métodos para transformar las células de mamífero se conocen bien en el arte. Véase, por ejemplo, las patentes US 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455. La célula huésped también puede ser modificada por ingeniería genética para permitir la producción de una molécula

10 de unión a antígeno con diversas características (por ejemplo glicoformas modificadas o proteínas que tienen actividad GnTIII).

Para largo plazo, se prefiere la producción con alto rendimiento de proteínas recombinantes con expresión estable. De acuerdo con ello, se pueden modificar con ingeniería genética líneas celulares que expresan de manera estable al anticuerpo seleccionado, utilizando técnicas estándar

15 reconocidas en el arte y forma parte de la invención. Más bien el uso de vectores de expresión que contienen orígenes de replicación viral, las células huésped pueden ser transformadas con ADN controlado por elementos de control de expresión adecuados (por ejemplo secuencias de promotor o potenciador, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Cualquiera de los sistemas de selección bien conocidos en el arte pueden ser

20 usados, incluyendo el sistema de expresión de gen de la glutamina sintasa (el sistema GS) que proporciona una metodología eficiente para aumentar la expresión bajo condiciones seleccionadas. El sistema GS se discute de manera completa o parcial con relación a EP 0 216 846, EP 0 256 055, EP 0 323 997 y EP 0 338 841 y las patentes US 5.591.639 y 5.879.936. Otro sistema de expresión compatible para el desarrollo de líneas celulares estables es el kit Freedom™ CHO-S (Life

25 Technologies).

Una vez que un anticuerpo de la invención ha sido producido por la expresión recombinante o cualquier otra de las técnicas dadas a conocer, este puede ser purificado o aislado por métodos conocidos en el arte con lo que es identificado y separado y/o recuperado de su ambiente natural y separado de contaminantes que pudiesen interferir con los usos diagnóstico o terapéutico para el

30 anticuerpo. Los anticuerpos aislados incluyen anticuerpos que se encuentran *in situ* en células recombinantes.

Estas preparaciones aisladas pueden ser purificadas utilizando diversas técnicas reconocidas en el arte, tales como, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y de exclusión de tamaño, diálisis, diafiltración, y cromatografía de afinidad, particularmente cromatografía de afinidad con

Proteína A o Proteína G. Se discuten los métodos compatibles más detalladamente en los Ejemplos a continuación.

6. Selección pos-producción

5 Sin importar como fueron obtenidas, las células productoras de anticuerpo (por ejemplo hibridomas, colonias de levadura, etc.) se pueden seleccionar, clonar y posteriormente clasificar en cuanto a sus características deseables incluyendo, por ejemplo, un crecimiento robusto, una alta producción de anticuerpo y características de anticuerpo deseable tales como alta afinidad por el antígeno de interés. Los hibridomas se pueden expandir *in vitro* en un cultivo celular o *in vivo* en animales singeneicos inmunocomprometidos. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir los
10 hibridomas y/o las colonias son bien conocidos para aquellos de entrenamiento común en el arte. Una vez que los anticuerpos deseados se identifican, se puede aislar manipular y expresar el material genético importante, utilizando técnicas comunes de biología molecular y bioquímica reconocidas en el arte.

Los anticuerpos producidos por bibliotecas naive (ya sea natural o sintético) pueden ser de
15 afinidad moderada (K_a de alrededor de 10^6 a 10^7 M^{-1}). Para aumentar la afinidad, la maduración de afinidad puede ser imitada *in vitro* construyendo bibliotecas de anticuerpo (por ejemplo, introduciendo mutaciones *in vitro* al azar utilizando polimerasa propensa a error) y volviendo a seleccionar los anticuerpos con una alta afinidad por el antígeno desde aquellos de bibliotecas secundarias (por ejemplo, utilizando el sistema de presentación de fago o levadura). La publicación
20 WO 9607754 describe un método para inducir mutagénesis en una CDR de una cadena liviana de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena liviana.

Se pueden usar diversas técnicas para seleccionar anticuerpos, incluyendo pero que no están limitadas a, presentación de fago o levadura en donde una biblioteca de anticuerpos combinatoriales humanos o fragmentos scFv se sintetizan en fagos o levaduras, se selecciona la biblioteca con el
25 antígeno de interés o una porción de unión a anticuerpo del mismo, y el fago o levadura que une el antígeno es aislado, a partir del cual se pueden obtener los anticuerpos o los fragmentos inmunoreactivos (Vaughan *et al.*, 1996, PMID: 9630891; Sheets *et al.*, 1998, PMID: 9600934; Boder *et al.*, 1997, PMID: 9181578; Pepper *et al.*, 2008, PMID: 18336206). Los kits para generar bibliotecas de presentación de fago o levadura se encuentran comercialmente disponibles. También existen
30 otros métodos y reactivos que se pueden usar para generar y para seleccionar bibliotecas de presentación de anticuerpo (véase la patente US 5.223.409; WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; y Barbas *et al.*, 1991, PMID: 1896445). Tales técnicas permiten ventajosamente la selección de grandes números de anticuerpos

candidatos y proporcionan una manipulación de secuencias relativamente fácil (por ejemplo, mediante shuffling o desplazamiento recombinante).

IV. Características de los anticuerpos

5 En determinadas modalidades, las células productoras de anticuerpo (por ejemplo hibridomas o colonias de levadura) se pueden seleccionar, clonar y posteriormente monitorear las propiedades favorables incluyendo, por ejemplo, un crecimiento robusto, una alta producción de anticuerpo y, como se discute en más detalle a continuación, características de anticuerpo sitio específico deseables. En otros casos las características del anticuerpo se pueden impartir seleccionando un antígeno particular (por ejemplo una isoforma específica de MFI2) o un fragmento inmunoreactivo
10 del antígeno blanco para la inoculación del animal. Incluso en otras modalidades los anticuerpos seleccionados se pueden modificar por ingeniería genética como se describe arriba para aumentar o refinar las características inmunoquímicas tales como afinidad o farmacocinética.

A. Anticuerpos neutralizantes

15 En modalidades seleccionadas los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos “antagonistas” o “neutralizantes”, significando esto que el anticuerpo puede asociarse con un determinante y bloquear o inhibir las actividades de dicho determinante ya sea directamente o previniendo la asociación del determinante con una molécula de unión asociada tal como un ligando o un receptor, interrumpiendo de este modo la respuesta biológica que de otra forma resultaría de la interacción de las moléculas. Un anticuerpo neutralizante o antagonista inhibirá sustancialmente
20 la unión del determinante a su ligando o sustrato cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de la molécula de unión asociada unida al determinante en al menos alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más según se mida, por ejemplo, mediante actividad de molécula blanco o en un ensayo de unión competitivo *in vitro*. Se apreciará que la actividad modificada puede ser medida directamente usando técnicas reconocidas en el arte o
25 puede ser medida a través del impacto de la actividad alterada que tiene río abajo (por ejemplo, oncogénesis o sobrevida celular).

B. Anticuerpos Internalizantes

En determinadas modalidades los anticuerpos pueden comprender anticuerpos internalizantes tales que el anticuerpo se unirá a un determinante y este será internalizado (junto
30 con cualquier residuo activo farmacéuticamente conjugado) en una célula blanco seleccionada incluyendo células tumorigénicas. El número de moléculas de anticuerpo internalizadas puede ser

suficiente para eliminar una célula que expresa antígeno, especialmente una célula tumorigénica que expresa antígeno. Dependiendo de la potencia del anticuerpo o, en algunos casos, conjugado de droga anticuerpo, la captación de una única molécula de anticuerpo hacia dentro de la célula puede ser suficiente para eliminar la célula blanco a la cual el anticuerpo se une. Con respecto a la presente invención existe evidencia que una porción sustancial de proteína MFI2 expresada se mantiene asociada con la superficie celular tumorigénica, permitiendo de este modo la localización e internalización de los anticuerpos descritos o de las ADC. En modalidades seleccionadas estos anticuerpos se asociarán con, o se conjugarán con, una o más drogas para eliminar a la célula cuando ocurre la internalización. En algunas modalidades las ADC de la presente invención comprenderán un sitio específico ADC para internalización.

Como se utiliza aquí, un anticuerpo que “internaliza” es aquel que es tomado (junto con cualquier citotoxina conjugada) por una célula blanco frente a la unión a un determinante asociado. El número de estas ADC internalizadas preferentemente será suficiente para eliminar la célula que expresa el determinante, especialmente una célula madre cancerosa que expresa el determinante.

Dependiendo de la potencia de la citotoxina o ADC como un todo, en algunos casos la captación de unas pocas moléculas de anticuerpo en la célula es suficiente para eliminar a la célula blanco a la cual se une el anticuerpo. Por ejemplo, ciertas drogas tales como las PBD o caliqueamicina son tan potentes que la internalización de unas pocas moléculas de la toxina conjugada al anticuerpo es suficiente para eliminar a la célula blanco. Si un anticuerpo internaliza frente a la unión a una célula mamífera se puede determinar por diversos ensayos reconocidos en el arte incluyendo aquellos descritos en los Ejemplos que se entregan más adelante. Los métodos para detectar si un anticuerpo se internaliza en una célula también se describen en la patente en la patente US 7.619.068.

C. Anticuerpos que depletan

En otras modalidades los anticuerpos de la invención son anticuerpos que depletan. El término anticuerpo “que depleta” se refiere a un anticuerpo que preferentemente se une a un antígeno cerca o sobre la superficie celular y que induce, promueve o provoca la muerte de la célula (por ejemplo, a través de CDC, ADCC o por introducción de un agente citotóxico). En modalidades, los anticuerpos que depletan seleccionados se conjugaran a una citotoxina.

Preferentemente un anticuerpo que depleta será capaz de eliminar al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% de las células que expresan MFI2 en una población de células definidas. En algunas modalidades la población celular puede comprender células tumorigénicas, enriquecidas, seccionadas, purificadas o aisladas, incluyendo células madre

cancerosas. En otras modalidades la población celular puede comprender muestras de tumor completas o extractos de tumor heterogéneos que comprenden células madre cancerosas. Las técnicas bioquímicas estándar se pueden usar para monitorear y cuantificar la depleción de células tumorigénicas de acuerdo con las enseñanzas aquí descritas.

5 D. Afinidad de unión

Aquí se describen anticuerpos que tienen una elevada afinidad de unión para un determinante específico, por ejemplo MFI2. El término " K_D " se refiere a la constante de disociación o afinidad aparente de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Un anticuerpo de la invención puede unirse inmuno-específicamente a su antígeno blanco cuando la constante de disociación K_D (k_{off}/k_{on}) es $\leq 10^{-7}$ M. El anticuerpo se une específicamente al antígeno con alta afinidad cuando la K_D es $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, y con muy alta afinidad cuando la K_D es $\leq 5 \times 10^{-10}$ M. En una modalidad de la invención, el anticuerpo tiene una K_D de $\leq 10^{-9}$ M y una velocidad "off-rate" de alrededor de 1×10^{-4} /s. En una modalidad de la invención, la velocidad "off-rate" es $< 1 \times 10^{-5}$ /s. En otras modalidades de la invención, los anticuerpos se unirán a un determinante con una K_D de entre alrededor de 10^{-7} M y 10^{-10} M, e incluso en otra modalidad se unirán con una $K_D \leq 2 \times 10^{-10}$ M. Incluso otras modalidades seleccionadas de la invención comprenden anticuerpos que tienen una K_D (k_{off}/k_{on}) de menos de 10^{-6} M, menos de 5×10^{-6} M, menos de 10^{-7} M, menos de 5×10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 5×10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 5×10^{-10} M, menos de 10^{-11} M, menos de 5×10^{-11} M, menos de 10^{-12} M, menos de 5×10^{-12} M, menos de 10^{-13} M, menos de 5×10^{-13} M, menos de 10^{-14} M, menos de 5×10^{-14} M, menos de 10^{-15} M o menos de 5×10^{-15} M.

En determinadas modalidades, un anticuerpo de la invención que se une inmuno-específicamente a un determinante por ejemplo MFI2 puede tener una tasa constante de asociación o tasa k_{on} (o k_a) (anticuerpo + antígeno (Ag) $\xrightarrow{k_{on}}$ anticuerpo-Ag) de al menos $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o al menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En otra modalidad, un anticuerpo de la invención que se une inmuno-específicamente a un determinante por ejemplo MFI2 puede tener una tasa constante de disociación o tasa k_{off} (o k_d) (anticuerpo + antígeno (Ag) $\xleftarrow{k_{off}}$ anticuerpo-Ag) de menos de 10^{-1} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-2} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-7} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-9} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ o menos de 10^{-10} s^{-1} .

La afinidad de unión se puede determinar usando diversas técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, resonancia de plasma superficial, interferometría de bio-capa, interferometría de polarización dual, dispersión de luz estática, dispersión de luz dinámica, calorimetría de titulación isotérmica, ELISA, ultracentrifugación analítica, y citometría de flujo.

5 E. Binning y mapeo de epítope

Los anticuerpos declarados aquí se pueden caracterizar en términos del epítope discreto con el cual estos se asocian. Un “epítope” es la(s) porción(es) de un determinante al cual el anticuerpo o fragmento inmunoreactivo se une específicamente. La unión inmuno-específica se puede confirmar y determinar basada en la afinidad de unión, como se ha descrito arriba, o mediante el reconocimiento preferencial por el anticuerpo de su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas (por ejemplo en ensayos de competencia). Un “epítope lineal”, se forma por aminoácidos contiguos en el antígeno que permiten la unión inmuno-específica del anticuerpo. La capacidad de unir preferencialmente epítopes lineales es típicamente mantenida incluso cuando el antígeno se desnatura. Por el contrario, un “epítope conformacional”, generalmente comprende aminoácidos no-contiguos en la secuencia de aminoácido del antígeno pero, en el contexto de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del antígeno, están lo suficientemente próximos para ser unidos concomitantemente por un único anticuerpo. Cuando los antígenos con epítopes conformacionales son desnaturalizados, el anticuerpo generalmente ya no reconoce al antígeno. Un epítope (contiguo o no-contiguo) por lo general incluye al menos 3, y más generalmente, al menos 5 o 8-10 o 12-20 aminoácidos en una única conformación espacial.

También es posible caracterizar los anticuerpos de la invención en términos del grupo o “bin” al cual estos pertenecen. La clasificación “Binning” se refiere al uso de ensayos de unión de anticuerpos competitivos para identificar pares de anticuerpos que son incapaces de unirse a un determinante inmunogénico de manera simultánea, identificando de este modo anticuerpos que “compiten” por la unión. Los anticuerpos que compiten se pueden determinar a través de un ensayo en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional que se está probando, previene o inhibe la unión específica del anticuerpo de referencia a un antígeno común. Por lo general, estos ensayos involucran el uso de antígeno purificado (por ejemplo MFI2 o un dominio o fragmento del mismo) unido a una superficie sólida o a las células, un anticuerpo de ensayo no marcado y un anticuerpo de referencia marcado. La inhibición competitiva es medida determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o a las células en presencia del anticuerpo de ensayo. Detalles adicionales respecto de los métodos para determinar la unión competitiva se proporciona en los Ejemplos aquí contenidos. Por lo general, cuando un anticuerpo que compite está presente en

exceso, este inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común al menos en 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algún caso, la unión se inhibe por al menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 97% o más. Por el contrario, cuando el anticuerpo de referencia se une este preferentemente inhibirá la unión de un anticuerpo de ensayo posteriormente agregado (es decir, un anticuerpo MFI2) en al menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algunos casos, la unión del anticuerpo de ensayo se inhibe en al menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 97% o más.

Generalmente el binning o unión competitiva se puede determinar usando varias técnicas reconocidas en el arte, tales como, por ejemplo, inmunoensayos tales como los western blots, radioinmunoensayos, ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA), inmunoensayos tipo “sandwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina en difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Estos inmunoensayos son de rutina y son bien conocidos en el arte (véase, Ausubel et al, eds, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Además, ensayos de bloqueo cruzado pueden ser utilizados (véase, por ejemplo, WO 2003/48731; y Harlow et al. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane).

Otras tecnologías utilizadas para determinar la inhibición competitiva (y por lo tanto “bins”), incluyen: resonancia de plasma superficial que usa, por ejemplo, el sistema BIAcore™ 2000 (GE Healthcare); interferometría de bio-capa que usa, por ejemplo, un ForteBio® Octet RED (ForteBio); o arreglos de perla de citometría de flujo usando, por ejemplo, un FACSCanto II (BD Biosciences) o un ensayo de detección multiplex LUMINEX™ (Luminex).

Luminex es una plataforma de inmunoensayo basado en perlas que permiten apareamiento de anticuerpos multiplexado a gran escala. El ensayo compara los patrones de unión simultáneos de los pares de anticuerpo para el antígeno blanco. Un anticuerpo del par (Abm de captura) se une a las perlas Luminex, donde cada Abm de captura se une a una perla de color diferente. El otro anticuerpo (Abm detector) se une a una señal fluorescente (por ejemplo ficoeritrina (PE)). El ensayo analiza la unión simultánea (apareamiento) de los anticuerpos a un antígeno y agrupa junto a los anticuerpos con perfiles de apareamiento similares. Los perfiles similares de un Abm detector y un Abm de captura indican que los dos anticuerpos se unen a los mismos epítopes o epítopes cercanamente relacionados. En una modalidad, los perfiles de apareamiento se pueden determinar usando coeficientes de correlación de Pearson para identificar los anticuerpos que se correlacionan más cercanamente con cualquier anticuerpo particular sobre el panel de anticuerpos que se ensaya.

En modalidades un Abm de ensayo/detector se determinará que se encuentre en el mismo bin que un Abm de referencia/captura si el coeficiente de correlación de Pearson del par anticuerpo es al menos de 0,9. En otras modalidades el coeficiente de correlación de Pearson es de al menos 0,8, 0,85, 0,87 o 0,89. En modalidades adicionales, el coeficiente de correlación de Pearson es de al menos 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99 o 1. Otros métodos para analizar los datos obtenidos a partir del ensayo Luminex se describen en la patente US 8.568.992. La capacidad de Luminex para analizar 100 tipos diferentes de perlas (o más) de manera simultánea proporciona prácticamente superficies no limitadas de antígeno y/o anticuerpo, que resulta en un rendimiento y resolución mejorados en el perfilamiento del epítipo de anticuerpo en un ensayo biosensor (Miller, et al., 2011, PMID: 21223970).

De manera similar las técnicas binning comprenden resonancia de plasma superficial que es compatible con la presente invención. Como se utiliza aquí “resonancia de plasma superficial,” se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones específicas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de la matriz biosensora. Usando un equipo comercialmente disponible tal como el sistema BIAcore™ 2000 puede ser fácilmente determinado si los anticuerpos seleccionados compiten uno con el otro para la unión a un antígeno definido.

En otras modalidades, una técnica que se puede usar para determinar si un de anticuerpo de ensayo “compite” por la unión con un anticuerpo de referencia es la “interferometría de bio-capa”, una técnica analítica óptica que analiza al patrón de interferencia de la luz blanca reflejada a partir de dos superficies: una capa de proteína inmovilizada sobre una punta biosensora, y una capa de referencia interna. Cualquier cambio en el número de moléculas unidas a la punta biosensora provoca un corrimiento en el patrón de interferencia que puede ser medido en tiempo real. Estos ensayos de interferometría de biocapa se pueden realizar usando una máquina ForteBio® Octet RED como sigue. Un anticuerpo de referencia (Ab1) se captura sobre un chip de captura anti-ratón, luego se utiliza un anticuerpo que no se une a alta concentración para bloquear el chip y se recopila la línea basal., La proteína blanco recombinante monomérica entonces es capturada por el anticuerpo específico (Ab1) y la punta se sumerge en un pocillo ya sea con el mismo anticuerpo (Ab1) como un control o en un pocillo con un ensayo de anticuerpo distinto (Ab2). Si no ocurre la unión adicional, según se determina comparando los niveles de unión con el Ab1 control, entonces Ab1 y Ab2 se dice que son anticuerpos “que compiten”. Pero si se observa unión adicional con Ab2, entonces se dice que Ab1 y Ab2 no compiten uno con el otro. Este proceso se puede expandir para monitorear grandes bibliotecas de anticuerpos únicos utilizando una corrida única de anticuerpos en una placa de 96 pocillos que representan los bin únicos. En modalidades un anticuerpo de ensayo

competirá con un anticuerpo de referencia si el anticuerpo de referencia inhibe la unión específica del anticuerpo de ensayo a un antígeno común por al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En otras modalidades, la unión se inhibe por al menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 97% o más.

Una vez que un bin, que abarca un grupo de anticuerpos que compiten, se ha definido se puede realizar la caracterización adicional para determinar el dominio o epítoto específico en el antígeno al cual ese grupo de anticuerpos se une. El mapeo de epítoto a nivel de dominio se puede realizar usando una modificación del protocolo descrito por Cochran *et al.*, 2004, PMID: 15099763. El mapeo fino de epítoto es el proceso para determinar los aminoácidos específicos sobre el antígeno que comprende al epítoto de un determinante el cual se une el anticuerpo.

En determinadas modalidades el mapeo fino de epítoto se puede realizar usando representación de fago o levadura. Otras técnicas de mapeo de epítoto compatibles incluyen el escaneo de alanina mutantes, blots de péptido (Reineke, 2004, PMID: 14970513), o análisis de degradación de péptido. Además, los métodos tales como corte de epítoto, extracción de epítoto y modificación química de antígenos se pueden utilizar (Tomer, 2000, PMID: 10752610) usando enzimas tales como enzimas proteolíticas (por ejemplo tripsina, endoproteínasa Glu-C, endoproteínasa Asp-N, quimotripsina, etc.); agentes químicos tales como ésteres de succinimidilo y sus derivados, compuestos que contienen aminas primarias, hidrazinas y carbohidrazinas, aminoácidos libres, etc. En otra modalidad el Perfilamiento Asistido por Modificación, también conocido como Perfilamiento de Anticuerpo Estructura basada en Antígeno (ASAP) se pueden usar para categorizar un gran número de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo a similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo a superficies de antígeno químicamente o enzimáticamente modificadas (patente US 2004/0101920).

Una vez que el epítoto deseado sobre un antígeno es determinado, es posible generar anticuerpos adicionales a ese epítoto, por ejemplo inmunizando con un péptido que comprende al epítoto seleccionado usando técnicas que se describen aquí.

V. Anticuerpo conjugados

En algunas modalidades los anticuerpos de la invención se pueden conjugar con residuos farmacéuticamente activos o de diagnóstico para formar un “conjugado de droga anticuerpo” (ADC) o “anticuerpo conjugado”. El término “conjugado” se utiliza ampliamente y representa la asociación covalente o no-covalente de cualquier residuo farmacéuticamente activo o de diagnóstico con un anticuerpo de la presente invención sin importar el método de asociación. En determinadas modalidades la asociación se realiza a través de un residuo de lisina o cisteína del anticuerpo. En algunas modalidades los residuos farmacéuticamente activos o de diagnóstico se pueden conjugar

al anticuerpo a través de una o más cisteína(s) libre(s) sitio específica(s). Los ADC descritos se pueden usar para propósitos terapéuticos y de diagnóstico.

Los ADC de la presente invención se pueden usar para entregar citotoxinas u otras cargas útiles a la ubicación blanco (por ejemplo células tumorigénicas y/o células que expresan MFI2).

5 Como se utiliza aquí los términos “fármaco o droga” o “cabezas activas” se pueden utilizar de manera intercambiable y representarán a la molécula biológicamente activa o detectable o el fármaco, incluyendo agentes anticancerígenos como se describen a continuación. Una “carga útil” puede comprender una droga o “cabeza activa” en combinación con un compuesto de agente de unión opcional. La “cabeza activa” sobre el conjugado puede comprender péptidos, proteínas o
10 profármacos que son metabolizados en un agente activo *in vivo*, polímeros, moléculas de ácido nucleico, pequeñas moléculas, agentes de unión, agentes miméticos, drogas sintéticas, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas y radioisótopos. En una modalidad ventajosa, Los ADC descritos dirigirán cargas útiles unidas al sitio blanco en un estado no tóxico, relativamente no reactivo antes de liberar y activar la cabeza activa. Esta liberación dirigida de la cabeza activa preferentemente se
15 logra a través de la conjugación estable de las cargas útiles (por ejemplo a través de una o más cisteínas sobre el anticuerpo) y la composición relativamente homogénea de las preparaciones ADC que minimizan las especies tóxicas sobre conjugadas. Acoplado con los agentes de unión de fármaco que se diseñan para liberar en gran cantidad la cabeza activa una vez que ha sido entregada al sitio del tumor, los conjugados de la presente invención pueden reducir
20 sustancialmente la toxicidad no específica indeseada. Esto proporciona ventajosamente niveles relativamente altos de la citotoxina activa en el sitio del tumor mientras que minimiza la exposición de células no objetivo y de tejido no objetivo proporcionando de este modo índice terapéutico aumentado.

Se apreciará que, que mientras algunas modalidades de la invención comprenden cargas
25 útiles que incorporan residuos terapéuticos (por ejemplo citotoxinas), otras cargas útiles que incorporan agentes de diagnóstico y modificadores biocompatibles pueden beneficiarse de la liberación dirigida proporcionada por los conjugados descritos. De acuerdo con ello, cualquier divulgación dirigida a cargas terapéuticas útiles ejemplares también es aplicable a las cargas útiles que comprenden agentes de diagnóstico o modificadores biocompatibles como se explica en este
30 documento a menos que el contexto dicte lo contrario. La carga útil puede estar unida de forma covalente o no covalentemente al anticuerpo y exhibe diversas proporciones molares estequiométricas dependiendo, al menos en parte, del método usado para realizar la conjugación. Los conjugados de la presente invención pueden estar generalmente representados por la fórmula:

Ab-[L-D]_n o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo donde:

- a) Ab comprende un anticuerpo anti-MFI2;
- b) L comprende un agente de unión opcional;
- c) D comprende un fármaco; y
- d) n es un número entero desde alrededor de 1 hasta alrededor de 20.

Aquellos expertos en el arte apreciarán que los conjugados de acuerdo a la fórmula arriba mencionada se pueden preparar usando un número de diferentes agentes de unión y fármacos y que la metodología de conjugación variará dependiendo de la selección de los componentes. Como tal, cualquier fármaco o compuesto fármaco agente de unión que se asocia con un residuo reactivo (por ejemplo cisteína o lisina) de los anticuerpos descritos son compatibles con las enseñanzas aquí descritas. De manera similar, cualquier tipo de condiciones de reacción que permite la conjugación (incluyendo la conjugación sitio específica) del fármaco seleccionado a un anticuerpo se encuentra dentro del espectro de la presente invención. Independiente de lo anterior, algunas modalidades de la presente invención comprenden la conjugación selectiva del fármaco o fármaco agente de unión a cisteínas libres usando agentes de estabilización en combinación con agentes reductores suaves como se describe aquí. Dichas condiciones de reacción tienden a proporcionar preparaciones más homogéneas con menos conjugación no-específica y menos contaminantes y consecuentemente con menos toxicidad.

A. Cargas útiles y Cabezas activas

1. Agentes terapéuticos

Los anticuerpos de la invención pueden ser conjugados, unidos o fusionados o de otra forma asociados con un residuo farmacéuticamente activo el cual es un residuo terapéutico o un fármaco tal como un agente anticancerígeno incluyendo, pero que no está limitado a, agentes citotóxicos, agentes citostáticos, agentes anti-angiogénicos, agentes cito-reductores, agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, agente anticancerígenos dirigidos, modificadores de la respuesta biológica, vacunas para cáncer, citoquinas, terapias hormonales, agentes anti-metastásicos y agentes inmunoterapéuticos.

Agentes anticancerígenos Ejemplares (incluyendo homólogos y derivados de los mismos) comprende 1-dehidrotestosterona, antramycinas, actinomicina D, bleomicina, caliqueamicina, colchicina, ciclofosfamida, citochalasina B, dactinomicina (antes actinomicina), dihidroxi antracina, diona, duocarmicina, emetina, epirubicina, bromuro de etidio, etopósido, glucocorticoides, gramicidina D, lidocaína, maitansinoides tal como DM-1 and DM-4 (Inmunógeno), mitramicina,

mitomicina, mitoxantrona, paclitaxel, procaína, propranolol, puromicina, tenoposido, tetracaína y las sales o solvatos, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Las citotoxinas adicionales compatibles comprenden dolastatinas y auristatinas, incluyendo monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF) (Seattle Genetics), amanitinas tal como amanitina, beta-amanitina, gama-amanitina o épsilon-amanitina (Heidelberg Pharma), agentes de unión al surco menor de ADN tal como derivados de duocarmicina (Syntarga), agentes alquilantes tal como pirrolobenzodiazepinas modificadas o diméricas (PBD), mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, inhibidores de corte tal como análogos o derivados de meayamicina (por ejemplo FR901464 como se establece en la patente US 7.825.267), agentes de unión tubular tal como análogos de epotilona y tubulisinas, paclitaxel y agentes que dañan el ADN tal como caliqueamicinas y esperamicinas, antimetabolitos tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, and 5-fluorouracilo decarbazina, agentes anti-mitóticos tal como vinblastina y vincristina y antraciclinas tal como daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina y las sales o solvatos, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En una modalidad los anticuerpos de la presente invención pueden estar asociados con moléculas de unión anti-CD3 para reclutar células T citotóxica y tenerlas como células tumorigénicas blanco (tecnología BiTE; véase por ejemplo Fuhrmann *et. al.* (2010) Annual Meeting of AACR Abstract No. 5625).

En modalidades adicionales los ADC de la invención pueden comprender radioisótopos terapéuticos conjugados usando agentes de unión adecuados. Los radioisótopos ejemplares pueden ser compatibles con estas modalidades e incluyen, pero no se limitan a, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), cobre (^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), bismuto (^{212}Bi , ^{213}Bi), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , ^{117}Sn , ^{225}Ac , ^{76}Br , y ^{211}At . Otros radionuclidos están también disponibles como agentes de diagnóstico y terapéuticos, especialmente aquellos en el rango de energía de 60 a 4000 keV.

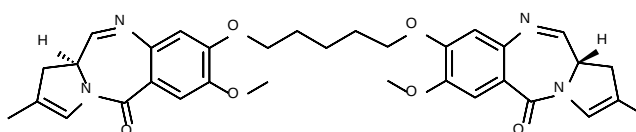
En algunas determinadas modalidades, los ADC de la invención pueden comprender compuestos PBD, y las sales o solvatos, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, con cabezas activas. Los PBD son agentes alquilantes que ejercen actividad antitumoral uniéndose covalentemente al ADN en el surco menor e inhibiendo la síntesis del ácido nucleico. Los PBD han demostrado tener propiedades antitumorales potentes mientras que exhiben una mínima

depresión de la médula ósea. Los PBD compatibles con la invención pueden unir a un anticuerpo usando varios tipos de agentes de unión (por ejemplo un agente de unión peptídico que comprenden un residuo maleimida con un sulfidril libre), y en determinadas modalidades son de forma dimérica (es decir, dímeros PBD). Los PBD compatibles (y agentes de unión opcionales) que se pueden

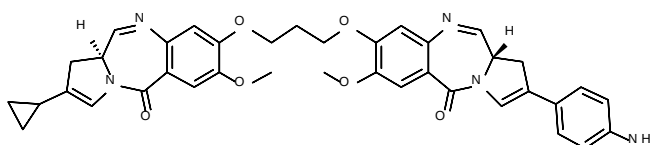
5 conjugarse a los anticuerpos descritos se describen, por ejemplo, en las patentes US 6.362.331, 7.049.311, 7.189.710, 7.429.658, 7.407.951, 7.741.319, 7.557.099, 8.034.808, 8.163.736, 2011/0256157 y las presentaciones PCT WO2011/130613, WO2011/128650, WO2011/130616, WO2014/057073 y WO2014/057074. Ejemplos de compuestos PBD compatibles con la presente invención se muestran a continuación.

Más específicamente, en modalidades seleccionadas la presente invención provee dímeros de PBD que comprenden un agente de unión (como se describe más adelante) unido a una posición en uno de los residuos PBD y conjugado con un anticuerpo MFI2. A través de configuraciones cuidadosamente modificadas por ingeniería genética el conjugado permite liberar un compuesto PBD activo que preferentemente no retiene ninguna parte del agente de unión. Es decir, ya no hay

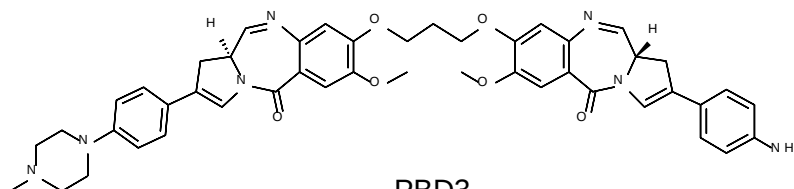
15 un “stub” o residuo del agente de unión presente que pudiera impactar adversamente la reactividad de la carga útil del PBD. De acuerdo con ello los conjugados MFI2 seleccionados liberan los siguientes compuestos PBD diméricos frente a la degradación del agente de unión:



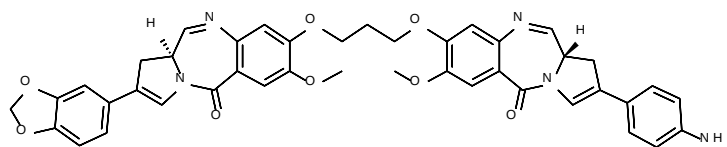
PBD1



PBD2



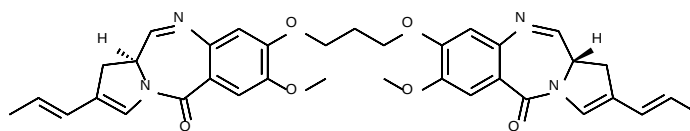
PBD3



PBD4

y

5



PBD5

Se apreciará que cada una de las cabezas activas de los PBD diméricos antes mencionados pueden ser preferentemente liberados frente la internalización por parte de la célula blanco y la destrucción del agente de unión. Como se describe en más detalle adelante, los agentes de unión preferibles comprenderán agentes de unión de degradación que incorporan un residuo de auto-destrucción que permite la liberación de la cabeza activa del PBD activo sin retención de ninguna parte del agente de unión. Cuando ocurre la liberación de la cabeza activa de PBD esta entonces se unirá y se entrecrujará con el ADN de las células blanco. Dicha unión bloquea aparentemente la división de la célula cancerosa blanco sin distorsionar su hélice de ADN, por tanto, evita potencialmente el fenómeno común de la emergente resistencia a los medicamentos.

Además de los agentes antes mencionados, los anticuerpos de la presente invención también pueden ser conjugados a modificadores de la respuesta biológica. Por ejemplo, en algunas modalidades el residuo de fármaco puede ser un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricino A, Onconasa (u otra RNasa citotóxica), exotoxina de *Pseudomonas*, toxina del cólera, toxina de difteria; un agente de apoptosis tal como factor de necrosis tumoral por ejemplo TNF- α o TNF- β , α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, AIM I (WO 97/33899), AIM II (WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi *et al.*, 1994, PMID: 7826947), y VEGI (WO 99/23105), un agente trombótico, un agente anti-angiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina, una linfoquina, por ejemplo, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófago (GM-CSF), y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), o un factor de

crecimiento por ejemplo hormona de crecimiento (GH).

2. Agentes de diagnóstico o detección

En otras modalidades, los anticuerpos de la invención, o fragmentos o derivados de los mismos, se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable, un marcador o un reportero que puede, por ejemplo, ser una molécula biológica (por ejemplo un péptido o nucleótido), una molécula pequeña, fluoróforo, o radioisótopo. Los anticuerpos marcados pueden ser útiles para monitorear el desarrollo o progresión de un desorden hiperproliferativo o como parte de un procedimiento de ensayo clínico para determinar la eficacia de una terapia particular incluyendo los anticuerpos descritos (es decir teragnóstico) o para determinar un curso de tratamiento futuro. Tales marcadores o reporteros también pueden ser útiles para purificar el anticuerpo seleccionado, para ser usado en analítica de anticuerpos (por ejemplo unión a epítipo o binning de anticuerpo), separar o aislar células tumorigénicas o en procedimientos preclínicos o estudios de toxicología.

Tal diagnóstico, análisis y/o la detección se puede lograr mediante el acoplamiento del anticuerpo a sustancias detectables incluyendo, pero no limitado a, diversas enzimas que comprenden peroxidasa de rábano picante por ejemplo, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tal como pero no limitado a estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tal como pero que no está limitado a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminescentes, tal como pero que no está limitado a, luminol; materiales bioluminescentes, tal como pero que no está limitado a, luciferasa, luciferina, y aequorina; materiales radioactivos, tal como pero que no está limitado a yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , y ^{117}Te ; metales emisores de positrones que utilizan varias tomografías de emisión de positrón, iones metálicos paramagnéticos no-radioactivos, y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas a radioisótopos específicos. En tales modalidades metodología de detección adecuada es bien conocida en el arte y está fácilmente disponible a partir de numerosas fuentes comerciales.

En otras modalidades los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden fusionar o conjugar a secuencias marcadoras o compuestos, tal como un péptido o fluoróforo para facilitar purificación o diagnóstico o procedimientos analíticos tal como inmunohistoquímica, interferometría de bio-capa, resonancia de plasma superficial, citometría de flujo, ELISA competitivo, FACs, etc. En algunas modalidades, el marcador comprende una etiqueta de histidina tal como aquella

proporcionada por el vector pQE (Qiagen), entre otros, muchos de los cuales se encuentran comercialmente disponibles. Otras etiquetas de péptido útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., 1984, Cell 37:767) y la etiqueta "flag" (patente US 4,703,004).

3. Modificadores biocompatibles

En modalidades seleccionadas los anticuerpos de la invención se pueden conjugar con modificadores biocompatibles que pueden utilizarse para ajustar, modificar, mejorar o moderar las características del anticuerpo como se desee. Por ejemplo, los anticuerpos o construcciones de fusión con vidas medias *in vivo* aumentadas se pueden generar uniendo moléculas de polímero de peso molecular relativamente alto tal como polietilenglicol (PEG) disponible comercialmente o polímeros biocompatibles similares. Los expertos en la técnica apreciarán que el PEG se puede obtener en muchos pesos moleculares y configuraciones moleculares diferentes que se pueden seleccionar para impartir propiedades específicas al anticuerpo (por ejemplo la vida media puede ser adaptada). El PEG se puede unir a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o derivados con o sin un agente de unión multifuncional ya sea a través de la conjugación del PEG al N- o C-terminal de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o a través de los grupos amino-epsilon presentes en los residuos de lisina. La derivatización del polímero lineal o ramificado que resulta en una pérdida mínima de actividad biológica también se puede usar. El grado de conjugación se puede controlar de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación óptima de las moléculas de PEG a las moléculas de anticuerpo. El PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados de anticuerpo-PEG, por ejemplo mediante exclusión de tamaño o cromatografía de intercambio iónico. De una manera similar, los anticuerpos descritos se pueden conjugar con albúmina para preparar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo *in vivo* más estable o que posee una mayor vida media *in vivo*. Las técnicas son bien conocidas en el estado del arte, véase por ejemplo WO 93/15199, WO 93/15200, y WO 01/77137; y EP 0 413, 622. Otros conjugados biocompatibles son evidentes para los expertos y pueden ser fácilmente identificados de acuerdo con las enseñanzas descritas en el presente documento.

B. Compuestos agentes de unión

Numerosos compuestos agentes de unión se pueden usar para conjugar los anticuerpos de la invención con la cabeza activa relevante. Los agentes de unión simplemente necesitan unirse de forma covalente con el residuo reactivo en el anticuerpo (preferentemente una cisteína o lisina) y el

compuesto fármaco o droga seleccionados. De acuerdo con ello, cualquier agente de unión reacciona con el residuo de anticuerpo seleccionado y puede ser usado para proveer los conjugados relativamente estables (sitio específico o de otro modo) de la presente invención es compatible con las enseñanzas aquí descritas.

- 5 Los agentes de unión compatibles se pueden unir ventajosamente a cisteínas y lisinas reducidas, las cuales son nucleofílicas. Las reacciones de conjugación que involucran cisteínas y lisinas reducidas incluyen, pero no se limitan a, reacciones de tiol-maleimida, tiol-halógeno (haluro de acilo), tiol-eno, tiol-ino, tiol-vinilsulfona, tiol-bisulfona, tiol-tiosulfonato, tiol-piridil disulfuro y tiol-parafluoro. Como además se ha discutido aquí, la bioconjugación con tiol-maleimida es una de las metodologías más ampliamente usadas debido a las rápidas velocidades de reacción y a las condiciones de conjugación leves. Un aspecto importante con esta metodología es la posibilidad de la reacción retro-Michael y la pérdida o transferencia de la carga útil unida a maleimida proveniente del anticuerpo a otras proteínas en el plasma, tales como, por ejemplo, albúmina de suero humano. Sin embargo, en algunas modalidades el uso de reducción selectiva y anticuerpos sitio específicos como se establece aquí en los Ejemplos 18 y 19 pueden ser utilizadas para estabilizar al conjugado y reducir la transferencia no deseada. Las reacciones de tiol-haluro de acilo proporcionan bioconjugados que no pueden sufrir una reacción retro-Michael y por lo tanto son más estables. Sin embargo, las reacciones de tiol-haluro en general tienen velocidades de reacción más lentas comparadas con conjugaciones basadas en maleimida y por lo tanto no son tan eficientes en proveer proporciones de fármaco a anticuerpos no deseadas. La reacción de tiol-piridil disulfuro es otra ruta de bioconjugación popular. El piridil disulfuro sufre un intercambio rápido con tiol libre que resulta en el disulfuro mixto y la liberación de la piridina-2-tiona. Los disulfuros mixtos pueden ser cortados en el ambiente celular reductor liberando la carga útil. Otras metodologías que atraen más atención en la bioconjugación son las reacciones de tiol-vinilsulfona y tiol-bisulfona, cada una de las cuales son compatibles con las enseñanzas aquí descritas y están incluidas expresamente dentro del espectro de la invención.

- En algunas modalidades los agentes de unión compatibles conferirán estabilidad a los ADC en el ambiente extracelular, previene la agregación de las moléculas ADC y mantienen al ADC libremente soluble en un medio acuoso y en un estado monomérico. Antes del transporte o entrega a una célula, el ADC preferentemente es estable y se mantiene intacto, es decir el anticuerpo se mantiene unido al residuo del fármaco. Mientras que los agentes de unión son estables fuera de la célula blanco para la cual han sido diseñados para cortar o degradar a una tasa eficaz dentro de la célula. De acuerdo con ello un agente de unión efectivo será el que: (i) mantiene las propiedades de unión específica del anticuerpo; (ii) permite la entrega intracelular del conjugado o residuo de

fármaco; (iii) se mantiene estable e intacto, es decir no cortado o degradado, hasta que el conjugado ha sido liberado o transportado a su sitio blanco; y (iv) mantiene un efecto citotóxico, eliminador de célula o un efecto citostático del residuo de fármaco (incluyendo, en algunos casos, cualquier efecto testigo). La estabilidad del ADC se puede medir mediante técnicas analíticas estándar tal como HPLC/UPLC, espectroscopia de masa, HPLC, y las técnicas de separación/análisis LC/MS y LC/MS/MS. Como se indicó arriba la unión covalente del anticuerpo y del residuo de fármaco requiere que el agente de unión tenga dos grupos funcionales reactivos, es decir bivalencia en un sentido reactivo. Los reactivos de agente de unión bivalentes que son útiles para unirse a dos o más residuos activos funcionales o biológicamente, tales como MMAE y anticuerpos son conocidos, y se han descritos métodos para proporcionar sus conjugados resultantes.

Los agentes de unión compatibles con la presente invención pueden ampliamente ser clasificados como agentes de unión degradables y no degradables. Los agentes de unión degradables, los cuales pueden incluir agentes de unión ácidos lábiles, agentes de unión degradables por proteasa y agentes de unión disulfuro, son internalizados en la célula blanco y son cortados en la ruta endosomal-lisosomal dentro de la célula. La liberación y activación de la citotoxina ocurre en los compartimentos ácidos endosoma/lisosoma que facilita el corte de las uniones químicas ácido-lábiles tal como hidrazona u oxima. Si una proteasa lisosomal, específica para sitio de corte, es modificada por ingeniería genética en el agente de unión las citotoxinas serán liberadas en la proximidad de sus blancos intracelulares. Alternativamente, los agentes de unión que contienen disulfuros mixtos proporcionan una metodología mediante la cual las cargas útiles citotóxicas son liberadas intracelularmente en la medida que son cortadas selectivamente en el ambiente reductor de la célula, pero no en el ambiente rico en oxígeno que ocurre en el torrente sanguíneo. Esto contrasta con los agentes de unión, no-degradables que son compatibles que contienen amida unida a los espaciadores polietilenglicol o alquilo que liberan cargas útiles tóxicas durante la degradación lisosomal del ADC dentro de la célula blanco. En algunos aspectos la selección del agente de unión dependerá del fármaco particular usado en el conjugado, la indicación particular y el anticuerpo blanco.

De acuerdo con ello, ciertas modalidades de la invención comprenden un agente de unión que es degradable por un agente de degradación que está presente en el ambiente intracelular (por ejemplo dentro de un lisosoma o endosoma o caveolas). El agente de unión puede ser, por ejemplo, un agente de unión peptidilo que es cortado por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero que no está limitado a, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunas modalidades, el agente de unión peptidilo es de al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de corte pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, cada

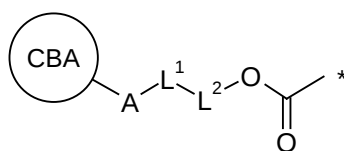
una de los cuales se sabe hidroliza a los derivados de fármaco dipéptido resultando en la liberación del fármaco activo dentro de las célula blanco. Agentes de unión peptidilo ejemplares que son posibles de degradar por la proteasa Catepsina-B dependiente de tiol son péptidos que comprenden Phe-Leu ya que se ha encontrado que la catepsina-B es altamente expresada en tejido canceroso.

5 Otros ejemplos de estos agentes de unión se describen, por ejemplo, en la patente US 6.214.345. En modalidades específicas, el agente de unión peptidilo que es degradable por una proteasa intracelular es un agente de unión Val-Cit, un agente de unión Val-Ala o un agente de unión Phe-Lys. Una ventaja de usar una liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente por lo general es atenuado cuando está conjugado y las estabildades en suero de los
10 conjugados son relativamente altas.

En otras modalidades, el agente de unión degradable es sensible al pH. Por lo general, el agente de unión sensible al pH hidrolizará bajo condiciones ácidas. Por ejemplo, un agente de unión lábil-ácido que es hidrolizable en la lisosoma (por ejemplo una hidrazona, oxima, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal, o similares) pueden ser utilizadas
15 (Véase, por ejemplo las patentes US 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929). Tales agentes de unión son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tal como aquellos que se encuentran en la sangre, pero son inestables (por ejemplo degradables) a pH inferior a 5,5 o 5,0 que es el pH aproximado del lisosoma.

Incluso en otras modalidades, el agente de unión es degradado bajo condiciones reductoras
20 (por ejemplo un agente de unión disulfuro). Una variedad de agentes de unión disulfuro son conocidos en el arte, incluyendo, por ejemplo, aquellos que se pueden formar utilizando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio) butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)tolueno). Incluso en otras modalidades específicas el agente de unión es un agente de unión
25 malonato (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), un agente de unión maleimidabenzoiolo (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

En algunas modalidades (tal como aquellas que se describen en la patente US 2011/0256157) los agentes de unión peptidilo compatibles comprenderán:



Donde los asteriscos indican el punto de unión al fármaco, CBA (es decir un agente de unión a células) comprende al anticuerpo anti-MFI2, L^1 comprende un agente de unión y opcionalmente un agente de unión degradable, A es un grupo de conexión (opcionalmente que comprende un espaciador) que conecta L^1 a un residuo reactivo en el anticuerpo y L^2 es un enlace covalente o junto con $-OC(=O)-$ forma un residuo auto-destructivo.

Se apreciará que la naturaleza de L^1 y L^2 , donde están presentes, pueden variar ampliamente. Estos grupos se seleccionan en base a sus características de degradación, las cuales pueden estar regidas por las condiciones en el sitio en el cual los se entrega el conjugado. Estos agentes de unión que se cortan por la acción de enzimas son los preferidos, a pesar de que los agentes de unión que son degradables por cambios en el pH (por ejemplo ácido o base lábiles), temperatura o frente a la irradiación (por ejemplo foto lábil) también pueden ser utilizados. Los agentes de unión que son degradables bajo condiciones reductoras u oxidantes también pueden encontrar el uso en la presente invención.

En determinadas modalidades L^1 puede comprender una secuencia de aminoácidos contiguos. La secuencia de aminoácido puede ser el sustrato blanco para la degradación enzimática, permitiendo así la liberación del fármaco.

En una modalidad, L^1 es degradable por la acción de una enzima. En una modalidad, la enzima es una esterasa o una peptidasa.

En otra modalidad L^1 es un agente de unión lábil a catepsina.

En una modalidad, L^1 comprende un dipéptido. El dipéptido puede estar representado como $-NH-X_1-X_2-CO-$, donde $-NH-$ y $-CO-$ representa a los N- y C-terminales de los grupos aminoácido X_1 y X_2 respectivamente. Los aminoácidos en el dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales. Cuando el agente de unión es un agente de unión lábil a catepsina, el dipéptido puede ser el sitio de acción para el corte mediado por catepsina.

Además, para aquellos grupos de aminoácidos que tienen una funcionalidad en la cadena lateral carboxilo o amino, por ejemplo Glu y Lys respectivamente, CO y NH pueden representar esa funcionalidad de cadena lateral.

En una modalidad, el grupo $-X_1-X_2-$ en el dipéptido, $-NH-X_1-X_2-CO-$, se selecciona de: -Phe-Lys-, -Val-Ala-, -Val-Lys-, -Ala-Lys-, -Val-Cit-, -Phe-Cit-, -Leu-Cit-, -Ile-Cit-, -Phe-Arg- y -Trp-Cit- donde Cit es citrulina.

Preferentemente, el grupo $-X_1-X_2-$ en el dipéptido, $-NH-X_1-X_2-CO-$, se selecciona de: -Phe-Lys-,
5 , -Val-Ala-, -Val-Lys-, -Ala-Lys-, y -Val-Cit-.

Más preferentemente, el grupo $-X_1-X_2-$ en el dipéptido, $-NH-X_1-X_2-CO-$, es -Phe-Lys- o -Val-Ala- o Val-Cit.

En una modalidad, L^2 está presente y junto con $-C(=O)O-$ formas un agente de unión auto-degradable. En una modalidad, L^2 es un sustrato para actividad enzimática, permitiendo así la
10 liberación de la cabeza activa.

En una modalidad, donde L^1 es degradable por la acción de una enzima y L^2 está presente, la enzima degrada el enlace entre L^1 y L^2 .

L^1 y L^2 , cuando están presentes, pueden estar conectados a través de un enlace seleccionado de: $-C(=O)NH-$, $-C(=O)O-$, $-NHC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-OC(=O)O-$, $-NHC(=O)O-$, $-OC(=O)NH-$, y
15 $-NHC(=O)NH-$.

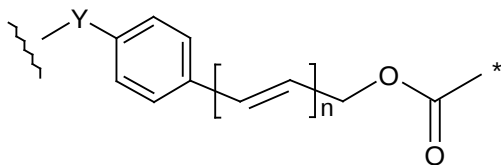
Un grupo amino de L^1 que conecta a L^2 puede ser el N-terminal de un aminoácido o puede ser derivado de un grupo amino de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo una cadena lateral de aminoácido de lisina.

Un grupo carboxilo de L^1 que conecta a L^2 puede ser el C-terminal de un aminoácido o puede
20 ser derivado de un grupo carboxilo de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo una cadena lateral del aminoácido ácido glutámico.

Un grupo hidroxilo de L^1 que conecta a L^2 puede ser derivado de un grupo hidroxilo de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo una cadena lateral de aminoácido serina.

El término "cadena lateral de aminoácido" incluye aquellos grupos que se encuentran en: (i)
25 aminoácidos que existen de manera natural tal como alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina; (ii) aminoácidos menores tales como ornitina y citrulina; (iii) aminoácidos no naturales, beta-aminoácidos, aminoácidos análogos sintéticos y derivados que existen de manera natural; y (iv) todos los enantiómeros, diastereómeros,
30 isoméricamente enriquecidos, isotópicamente marcados (por ejemplo 2H , 3H , ^{14}C , ^{15}N), formas protegidas, y mezclas racémicas de los mismos.

En una modalidad, $-C(=O)O-$ y L^2 juntos forman el grupo:



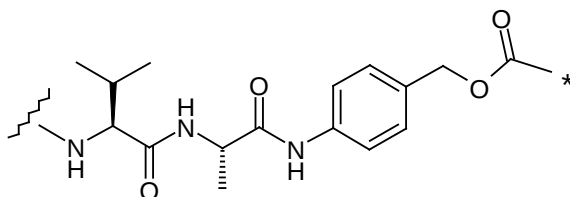
donde el asterisco indica el punto de unión a la posición de la droga o agente citotóxico, la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión L¹, Y es -N(H)-, -O-, -C(=O)N(H)- o -C(=O)O-, y n es 0 a 3. El anillo de fenileno está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes. En una modalidad, el grupo fenileno está opcionalmente sustituido con halo, NO₂, alquilo o hidroxialquilo.

En una modalidad, Y es NH.

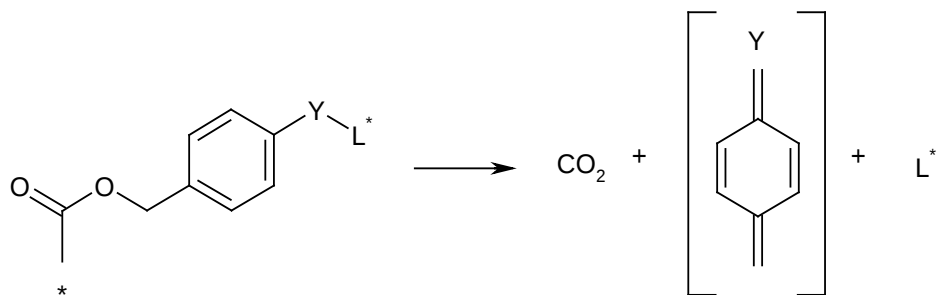
En una modalidad, n es 0 o 1. Preferentemente n es 0.

Donde Y es NH y n es 0, el agente de unión auto-degradable se puede denominar como agente de unión p-aminobencilcarbonilo (PABC).

En otras modalidades el agente de unión puede incluir un agente de unión auto-degradable y junto al dipéptido formar el grupo -NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-. En otras modalidades seleccionadas el agente de unión puede comprender el grupo -NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-, que se ilustra a continuación:



donde el asterisco indica el punto de unión del residuo citotóxico seleccionado, y la línea ondulada indica el punto de unión del resto de la porción del agente de unión (por ejemplo los segmentos espaciador- unión a anticuerpo) que puede estar conjugado al anticuerpo. Frente a la degradación enzimática del dipéptido, el agente de unión auto-degradable permitirá una liberación limpia del compuesto protegido (es decir, la citotoxina) cuando se activa un sitio remoto, que procede a lo largo de las líneas mostradas a continuación:



donde el asterisco indica el punto de unión del residuo citotóxico seleccionado y donde L^* es la forma activada de la porción restante del agente de unión que comprende la ahora unidad de peptidilo degradada. La liberación limpia de la cabeza activa asegura que ésta mantendrá la actividad tóxica deseada.

En una modalidad, A está covalentemente unida. Por lo cual, L^1 y el anticuerpo están directamente conectados. Por ejemplo, donde L^1 comprende una secuencia de aminoácidos contiguos, el N-terminal de la secuencia se puede conectar directamente con el residuo de anticuerpo.

En otra modalidad, A es un grupo espaciador. Por lo cual, L^1 y el anticuerpo están indirectamente conectados.

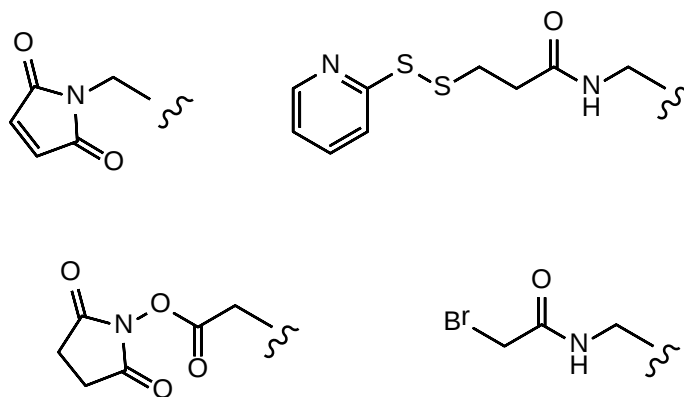
En determinadas modalidades L^1 y A pueden estar conectados a través de un enlace seleccionado de: $-C(=O)NH-$, $-C(=O)O-$, $-NHC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-OC(=O)O-$, $-NHC(=O)O-$, $-OC(=O)NH-$, y $-NHC(=O)NH-$.

Como se discutirá en más detalle a continuación los agentes de unión fármaco de la presente invención preferentemente estarán unidos a nucleófilos tiol reactivos en cisteínas, incluyendo cisteína libres. Para este propósito las cisteínas de los anticuerpos pueden transformarse en reactivas para conjugación con reactivos de agentes de unión mediante tratamiento con diversos agentes reductores tales como DTT o TCEP o agentes reductores suaves como se define aquí. En otras modalidades los agentes de unión fármaco de la presente invención preferentemente estarán unidos a una lisina.

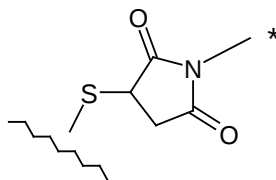
Preferentemente, el agente de unión contiene un grupo funcional electrofílico para reacción con un grupo funcional nucleofílico en el anticuerpo. Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, pero no están limitados a: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos de azúcar hidroxilo o amino cuando el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol, e hidroxilo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los residuos del agente de unión y en los reactivos de agente de unión incluyendo: (i) grupos

maleimida (ii) disulfuros activados, (iii) ésteres activos tal como ésteres NHS (N-hidroxisuccinimida), ésteres HOBt (N-hidroxibenzotriazol), haloformatos, y haluros ácidos; (iv) haluros de alquilo y bencilo tal como haloacetamidas; y (v) aldehídos, cetonas y grupos carboxilo.

Grupos funcionales ejemplares compatibles con la invención se ilustran inmediatamente a continuación:



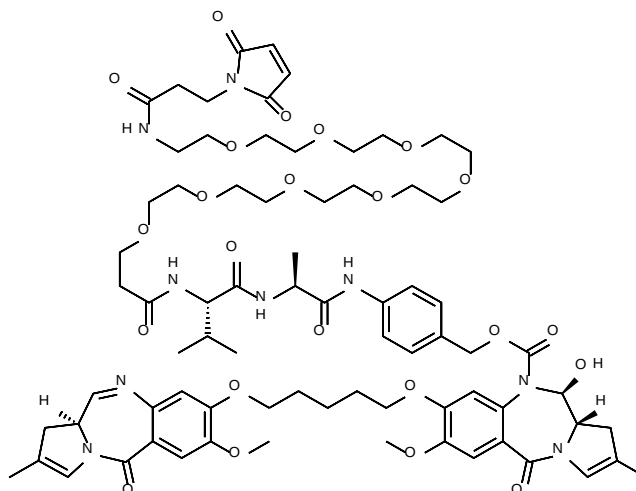
En algunas modalidades la conexión entre una cisteína (incluyendo una cisteína libre de un anticuerpo sitio específico) y el residuo fármaco-agente de unión es a través de un residuo tiol y un grupo terminal maleimida que está presente en el agente de unión. En tales modalidades, la conexión entre el anticuerpo y el fármaco-agente de unión puede ser:



donde el asterisco indica el punto de unión a la porción remanente fármaco-agente de unión y las líneas onduladas indican el punto de unión de la porción remanente del anticuerpo. En esta modalidad, el átomo S preferentemente se deriva de una cisteína libre sitio específica.

Con respecto a otros agentes de unión compatibles el residuo de unión puede comprender una yodoacetamida terminal que puede hacerse reaccionar con residuos activados en el anticuerpo para proporcionar el conjugado deseado. En cualquier caso un experto en el arte podría fácilmente conjugar cada uno de los compuestos fármaco-agente de unión descritos con un anticuerpo anti-MFI2 compatible (incluyendo anticuerpos sitio específicos) en vista de la presente descripción.

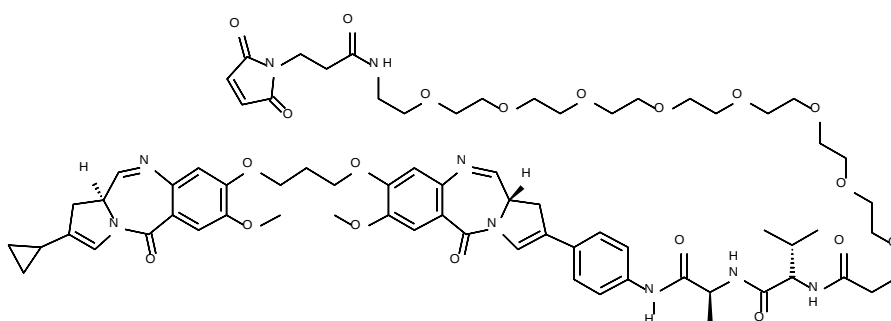
De acuerdo con la presente descripción la invención proporciona métodos para hacer conjugados de droga anticuerpo compatibles que comprende conjugar un anticuerpo anti-MFI2 con un compuesto fármaco-agente de unión seleccionado del grupo que consiste de:



5

DL1

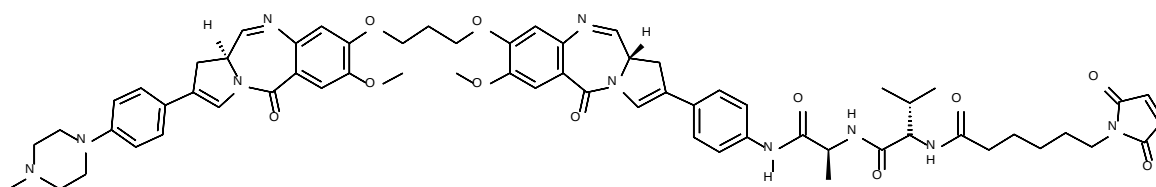
,



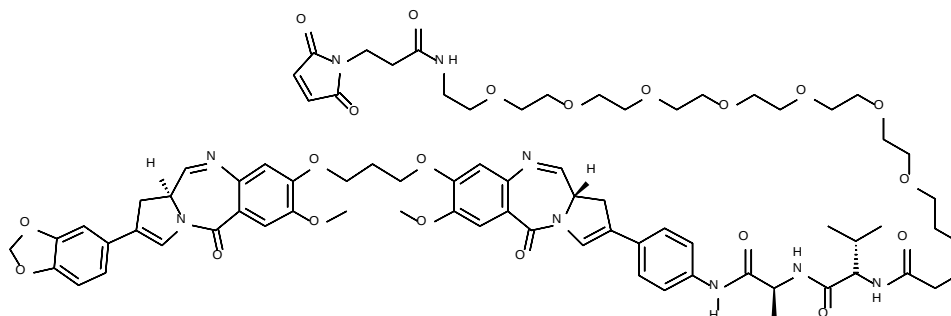
10

DL2

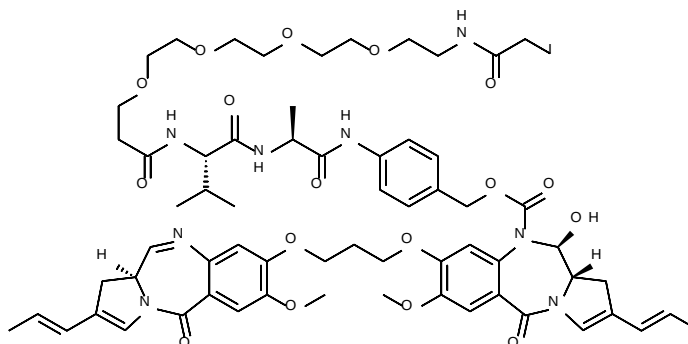
,



,



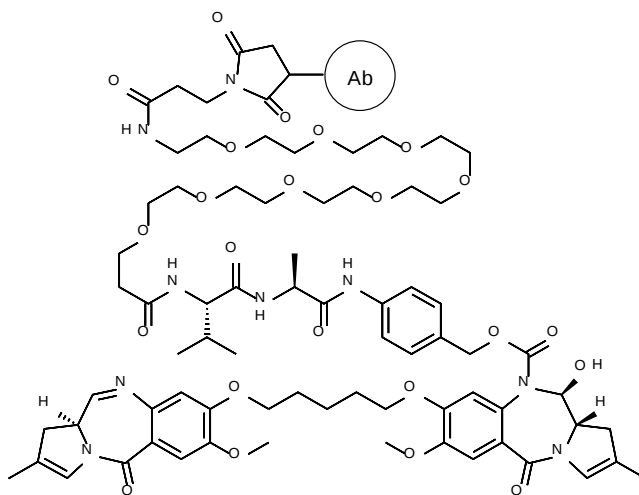
y



10

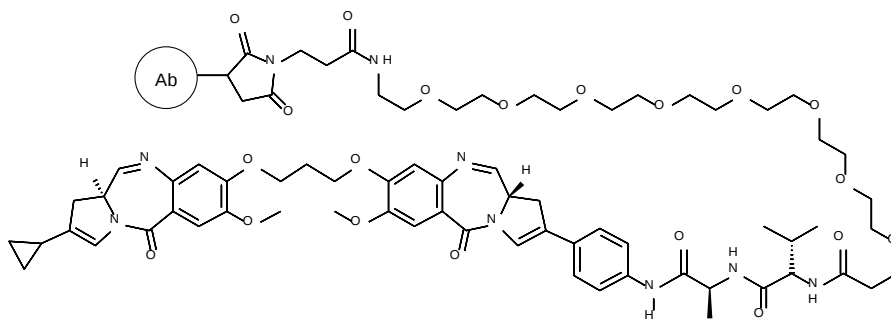
Se apreciará que el agente de unión anexo terminal del residuo maleimida (DL1 – DL4) o residuo yodoacetamida (DL5) puede estar conjugado a sulfhídrico(s) libre(s) en el anticuerpo MFI2 seleccionado utilizando técnicas reconocidas en el arte. Las rutas sintéticas de los compuestos arriba mencionados se definen en la WO2014/130879 que se incorpora aquí como referencia mientras que los métodos específicos para conjugar estos PBD se definen en los Ejemplos a continuación.

5 consiste de

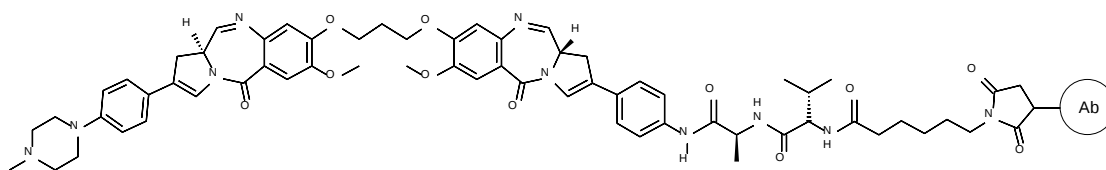


ADC 1

10

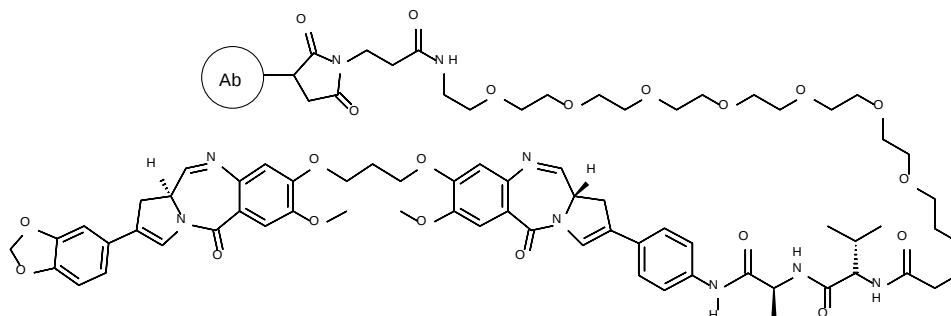


ADC 2



ADC 3

,

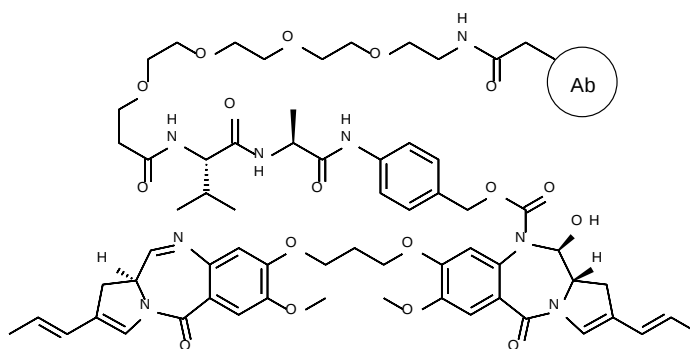


5

ADC 4

,

y



10

ADC 5

donde Ab comprende un anticuerpo anti-MFI2 o fragmento inmunoreactivo del mismo.

C. Conjugación

15

Se apreciará que un número de diferentes reacciones bien conocidas se puede utilizar para unir el residuo de fármaco y/o agente de unión al anticuerpo seleccionado. Por ejemplo, diversas

reacciones que utilizan a los grupos sulfhidrilo de las cisteínas se pueden emplear para conjugar el residuo deseado. Algunas modalidades comprenderán la conjugación de anticuerpos que comprenden una o más cisteína libres como se discute en detalle a continuación. En otras modalidades los ADC de la presente invención se pueden generar a través de la conjugación de fármacos grupo grupos amino de residuos de lisina expuestos a solvente presentes en el anticuerpo seleccionado. Incluso otras modalidades comprenden la activación del N-terminal de los residuos de treonina y serina que entonces se pueden utilizar para unir las cargas útiles descritas al anticuerpo. La metodología de conjugación seleccionada preferentemente se adaptará para optimizar el número de fármacos unidos al anticuerpo y proporcionar un índice terapéutico relativamente alto.

Se conocen varios métodos en el estado del arte para conjugar un compuesto terapéutico a un residuo de cisteína y serán aparentes para el experto en el arte. Bajo condiciones básicas los residuos de cisteína se desprotonarán para generar un nucleófilo o que puede reaccionar con electrófilos blandos tales como maleimidas y yodoacetamidas. Generalmente los reactivos para estas conjugaciones pueden reaccionar directamente con un tiol cisteína para formar la proteína conjugada o con un fármaco-agente de unión para formar un fármaco-agente de unión intermediario. En el caso de un agente de unión, se conocen varias rutas, que utilizan reacciones de química orgánica, condiciones, y reactivos conocidos para el experto en el arte, incluyendo: (1) reacción de un grupo cisteína de la proteína de la invención con un reactivo agente de unión, para formar un intermediario proteína-agente de unión, a través de un enlace covalente, seguido por la reacción con un compuesto activado; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de un compuesto con un reactivo agente de unión, para formar un intermediario fármaco-agente de unión, a través de un enlace covalente, seguido por la reacción con un grupo cisteína de una proteína de la invención. Como será aparente para el experto en el arte a partir de lo anterior, los agentes de unión bifuncionales (o bivalentes) son útiles en la presente invención. Por ejemplo, el agente de unión bifuncional puede comprender un grupo de modificación tiol para la unión covalente al (los) residuo(s) de cisteína y al menos un residuo de unión (por ejemplo un segundo residuo de modificación tiol) para la unión al covalente o no-covalente del compuesto.

Antes de la conjugación, los anticuerpos se pueden llevar a ser reactivos para la conjugación con los reactivos de agentes de unión mediante el tratamiento con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP). En otras modalidades se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con reactivos, incluyendo pero que no está limitado a, 2-iminotiolano (reactivo de Traut), SATA, SATP o SAT(PEG)₄, resultando en una conversión de una amina en un tiol.

Con respecto a estas conjugaciones de tiol cisteína o lisina, los grupos amino son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los reactivos de agente de unión o en los intermediarios compuesto-agente de unión o fármacos incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tal como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo, y maleimida; y (iv) disulfuros, incluyendo disulfuros de piridilo, a través de intercambio de sulfuro. Los grupos nucleofílicos en un compuesto o agente de unión incluyen, pero no están limitados a amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los residuos de agente de unión y en los reactivos de agente de unión.

Los reactivos de conjugación incluyen maleimida, haloacetilo, yodoacetamida, éster de succinimidilo, isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2,6-diclorotriazinilo, éster de pentafluorofenilo, y fosforamidita, a pesar que otros grupos funcionales también se pueden utilizar. En determinadas modalidades los métodos incluyen, por ejemplo, el uso de maleimidas, yodoacetimidas o haloacetilo/haluros de alquilo, aziridina, derivados de acrililo para reaccionar con el tiol de una cisteína para producir un tioéter que es reactivo con un compuesto. El intercambio de disulfuro de un tiol libre con un disulfuro de piridilo activado es también útil para producir un conjugado (por ejemplo, el uso de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB)). Preferentemente, se utiliza una maleimida.

Como se indicó anteriormente, la lisina también puede ser utilizada como un residuo reactivo para realizar la conjugación como se define aquí. El residuo de lisina nucleofílico es generalmente dirigido a través de succinimidil ésteres amino-reactivos. Para obtener un número óptimo de residuos de lisina, el pH de la solución acuosa debe estar por debajo del pKa del grupo lisina amonio, el cual es alrededor de 10,5, de modo que el pH típico de la reacción es alrededor de 8 y 9. El reactivo común para la reacción de acoplamiento es NHS éster el cual reacciona con la lisina nucleofílica a través de un mecanismo de acilación de lisina. Otros reactivos compatibles que sufren reacciones similares comprenden isocianatos e isotiocianatos que también se pueden utilizar en conjunto con las enseñanzas aquí descritas para proporcionar los ADC. Una vez que las lisinas se han activado, muchos de los grupos de unión arriba mencionados se pueden usar para unir covalentemente la cabeza activa al anticuerpo.

También se conocen en el arte métodos para conjugar a compuesto a un residuo de treonina o serina (preferentemente un residuo N-terminal). Por ejemplo se han descrito métodos en que los precursores carbonilo se derivan de los 1,2-aminoalcoholes de serina o treonina, que pueden ser selectivamente y rápidamente convertidos en la forma de aldehído por oxidación con peryodato. La reacción del aldehído con 1,2-aminotiol de cisteína en un compuesto a ser unido a una proteína de

la invención forma un producto de tiazolidina estable. Este método es particularmente útil para marcar proteínas en el N-terminal de los residuos de serina o treonina.

En algunas modalidades los grupos tiol reactivos pueden ser introducidos en el anticuerpo seleccionado (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro, o más residuos de cisteína libre (por ejemplo, preparando anticuerpos que comprenden uno o más residuos de aminoácido cisteína no-nativa libre). Estos anticuerpos sitio específicos o anticuerpos modificados por ingeniería genética, permiten las preparaciones de conjugado que exhiben estabilidad aumentada y homogeneidad sustancial debido, al menos en parte, a la provisión de los sitio(s) libre(s) de cisteína modificados por ingeniería genética y/o a los nuevos procedimientos de conjugación que se establecen aquí. A diferencia de la metodología de conjugación convencional que reduce completamente o parcialmente cada uno de los enlaces disulfuro intracadena o intercadena del anticuerpo para proporcionar sitios de conjugación (y que es totalmente compatible con la presente invención), la presente invención además proporciona una reducción selectiva de ciertos sitios de cisteína libre preparados y de la dirección del fármaco-agente de unión al mismo. La especificidad de la conjugación que se promueve por los sitios modificados por ingeniería genética y la reducción selectiva permite un alto porcentaje de conjugación sitio dirigida en las posiciones deseadas. Significativamente algunos de estos sitios de conjugación, tal como aquellos presentes en la región terminal de la región constante de cadena liviana, generalmente son difíciles de conjugar de manera efectiva ya que ellos tienden a reaccionar de manera cruzada con otras cisteínas libres. Sin embargo, a través de ingeniería molecular y reducción selectiva de las cisteínas libres resultante, se pueden obtener tasas de conjugación eficientes que reducen considerablemente los contaminantes DAR elevados indeseados y la toxicidad no-específica. Más generalmente las construcciones modificadas por ingeniería genética y los métodos novedosos de conjugación descritos comprenden una reducción selectiva y proveen preparaciones ADC que tienen farmacocinética y/o farmacodinamia mejorada y, potencialmente tienen, un índice terapéutico mejorado.

En determinadas modalidades las construcciones sitio específicas presentan cisteína(s) libre(s), las cuales cuando se reducen comprenden grupos tiol que son nucleofílicos capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos sobre los residuos de agente de unión tal como aquellos descritos arriba. Como se describe arriba los anticuerpos de la presente invención pueden tener cisteínas intercadena o intracadena no apareadas reducibles o cisteínas introducidas no-nativas, es decir cisteínas que proporcionan estos grupos nucleofílicos. Por lo cual, en determinadas modalidades la reacción de los grupos sulfhidrilo libres de las cisteína libres reducidas y de los grupos maleimida terminal o haloacetamida terminal de los fármaco-agentes de

unión descritos proporcionará la conjugación deseada. En tales caso las cisteínas libres de los anticuerpos se pueden llegar hacer reactivas para la conjugación con reactivos de agente de unión mediante el tratamiento con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o (*tris* (2-carboxietil)fosfina (TCEP). Cada cisteína libre entonces presentará, teóricamente, un nucleófilo tiol reactivo. Mientras

5 que estos reactivos son compatibles se apreciará que la conjugación de los anticuerpos sitio específicos se puede realizar usando diversas reacciones, condiciones y reactivos generalmente conocidos para aquellos expertos en el arte.

Además se ha encontrado que las cisteínas libres de anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden ser selectivamente reducidas para proporcionar una conjugación sitio-dirigida

10 mejorada y una reducción en los contaminantes no deseados potencialmente tóxicos. Más específicamente los “agentes estabilizantes” tales como arginina se ha encontrado que modulan las interacciones intra- e inter-moleculares en proteínas y pueden ser utilizados, en conjunto con agentes reductores seleccionados (preferentemente relativamente suaves), para reducir selectivamente las cisteína libres y para facilitar la conjugación sitio específica como se establece

15 aquí. Como se utiliza aquí los términos “reducción selectiva” o “reducir selectivamente” se pueden utilizar de manera intercambiable y significará la reducción de la(s) cisteína(s) libre(s) sin alterar sustancialmente los enlaces disulfuro nativos presentes en el anticuerpo modificado por ingeniería genética. En modalidades seleccionadas esto puede verse afectado por ciertos agentes reductores. En otras modalidades la reducción selectiva de una construcción modificada por ingeniería genética

20 comprenderá el uso de agentes de estabilización en combinación con agentes reductores (incluyendo agentes reductores suaves). Se apreciará que el término “conjugación selectiva” debe representar la conjugación de un anticuerpo modificado por ingeniería genética que ha sido selectivamente reducido con una citotoxina como se describe aquí. A este respecto el uso de estos agentes estabilizantes en combinación con agentes reductores seleccionados pueden mejorar

25 marcadamente la eficiencia de la conjugación sitio específica según se determina mediante el grado de conjugación sobre las cadenas pesada y liviana del anticuerpo y la distribución DAR de la preparación. Las construcciones de anticuerpo compatibles y las técnicas de conjugación selectivas y los reactivos son extensamente descritos en WO2015/031698 tanto para la metodología y las construcciones.

30 Mientras que no se desea estar unido por ninguna teoría particular, estos agentes estabilizantes pueden actuar para modular el microambiente electrostático y/o modular los cambios conformacionales en el sitio de conjugación deseado, permitiendo así que los agentes reductores relativamente suaves (los cuales no reducen materialmente los enlaces disulfuro nativos intactos) faciliten la conjugación del/de los sitio(s) de la(s) cisteína(s) libre(s) deseado(s). Estos agentes (por

ejemplo, ciertos aminoácidos) se sabe que forman puentes salinos (a través de enlace de hidrógeno e interacciones electrostáticas) y pueden modular las interacciones proteína-proteína de tal modo que imparten un efecto estabilizador que puede provocar cambios conformacionales favorables y/o reducir las interacciones proteína-proteína desfavorables. Por otra parte, estos agentes pueden actuar inhibiendo la formación de los enlaces intramoleculares indeseados (e intermoleculares) cisteína-cisteína después de la reducción facilitando así la reacción de conjugación deseada donde la cisteína sitio específica modificada por ingeniería genética está unida al fármaco (preferentemente a través de un agente de unión). Debido a que las condiciones de reducción selectivas no proporcionan una reducción importante de los enlaces disulfuro nativos intactos, la posterior reacción de conjugación está dirigida naturalmente a los relativamente pocos tioles reactivos sobre las cisteínas libres (por ejemplo preferentemente 2 tioles libres por anticuerpo). Como se ha aludido previamente a, estas técnicas pueden ser utilizadas para reducir considerablemente los niveles de conjugación no-específica y las correspondientes impurezas en las preparaciones de conjugado fabricadas de acuerdo con la presente descripción.

En modalidades seleccionadas los agentes estabilizantes compatibles con la presente invención generalmente comprenderán compuestos con al menos un residuo que tiene un pKa básico. En determinadas modalidades el residuo comprenderá una amina primaria mientras en otras modalidades el residuo de amina comprenderá una amina secundaria. Incluso en otras modalidades el residuo de amina comprenderá una amina terciaria o un grupo guanidinio. En otras modalidades seleccionadas el residuo de amina comprenderá un aminoácido mientras que en otras modalidades compatibles el residuo de amina comprenderá una cadena lateral de aminoácido. Incluso en otras modalidades el residuo de amina comprenderá un aminoácido proteinogénico. Incluso en otras modalidades el residuo de amina comprende un aminoácido no-proteinogénico. En algunas modalidades, los agentes estabilizantes compatibles pueden comprender arginina, lisina, prolina y cisteína. Además los agentes estabilizantes compatibles pueden incluir guanidina y heterociclos que contienen nitrógeno con pKa básico.

En determinadas modalidades compatibles los agentes estabilizantes comprenden compuestos con al menos un residuo de amina que tiene un pKa mayor que alrededor de 7,5, en otras modalidades el residuo amino objetivo tendrá un pKa de más que alrededor de 8,0, incluso en otras modalidades el residuo de amina tendrá un pKa mayor que alrededor de 8,5 e incluso en otras modalidades el agente estabilizante comprenderá un residuo de amina que tiene un pKa mayor que alrededor de 9,0. Otras modalidades comprenderán agentes estabilizantes donde el residuo de amina tendrá un pKa mayor que alrededor de 9,5 mientras que otras modalidades comprenderán agentes estabilizantes que exhiben al menos un residuo de amina que tiene un pKa mayor que

alrededor de 10,0. Incluso en otras modalidades el agente estabilizante comprenderá un compuesto que tiene el residuo de amina con un pKa mayor que alrededor de 10,5, en otras modalidades el agente estabilizante comprenderá un compuesto que tiene un residuo de amina con un pKa mayor que alrededor de 11,0, mientras incluso otras modalidades el agente estabilizante comprenderá un residuo de amina con un pKa mayor que alrededor de 11,5. Incluso en otras modalidades el agente estabilizante comprenderá un compuesto que tiene un residuo de amina con un pKa mayor que alrededor de 12,0, mientras incluso en otras modalidades el agente estabilizante comprenderá un residuo de amina con un pKa mayor que alrededor de 12,5. Aquellos expertos en el arte entenderán que los pKa relevantes pueden ser fácilmente calculados o determinados utilizando técnicas estándar y ser usados para determinar la aplicabilidad de utilizar un compuesto seleccionado como un agente estabilizante.

Los agentes estabilizantes descritos demuestran ser particularmente efectivos en la conjugación dirigida a cisteínas libres sitio específicas cuando se combinan con ciertos agentes reductores. Para los propósitos de la presente invención, los agentes reductores compatibles pueden incluir cualquier compuesto que produzca una cisteína sitio específica libre reducida para conjugación sin alterar significativamente los enlaces disulfuro nativos del anticuerpo modificado por ingeniería genética. Bajo estas condiciones, preferentemente se provee la combinación de agentes reductores y estabilizadores seleccionados, donde el fármaco-agente de unión activado está fuertemente limitado a unirse en el/los sitio(s) que tiene(n) cisteína sitio específica(s) libre(s) deseado(s). Los agentes reductores relativamente suaves o los agentes reductores usados en concentraciones relativamente bajas para proporcionar condiciones suaves son los particularmente preferidos. Como se utiliza aquí los términos “agente reductor suave” o “condiciones reductoras suaves” se debe considerar que representa a cualquier agente o estado que es desarrollado por un agente reductor (opcionalmente en presencia de agentes estabilizantes) que proporciona tioles en los sitio(s) de cisteína(s) libre(s) sin alterar sustancialmente los enlaces disulfuro nativos presentes en el anticuerpo modificado por ingeniería genética. Es decir, los agentes reductores suaves o condiciones (preferentemente en combinación con un agente estabilizante) son capaces de reducir efectivamente la(s) cisteína(s) libre(s) (proporciona un tiol) sin alterar significativamente los enlaces disulfuro nativos de la proteína. Las condiciones reductoras deseadas pueden ser proporcionadas por un número de compuestos en base a sulfhidrilo que establece el ambiente adecuado para la conjugación selectiva. En modalidades los agentes reductores suaves pueden comprender compuestos que tienen uno o más tioles libres mientras que en algunas modalidades los agentes reductores suaves comprenderán compuestos que tienen un único tiol libre. Ejemplos no limitantes

de agentes reductores compatibles con las técnicas de reducción selectivas de la presente invención comprenden glutatión, n-acetil cisteína, cisteína, 2-aminoetano-1-tiol y 2-hidroxietano-1-tiol.

Se apreciará que el proceso de reducción selectivo como se ha definido arriba es particularmente efectivo en la conjugación dirigida a la cisteína libre. A este respecto el grado de conjugación del sitio blanco deseado (definido aquí como "eficiencia de conjugación") en anticuerpos sitio específicos puede ser determinada por varias técnicas aceptadas en el arte. La eficiencia de la conjugación sitio específica de un fármaco a un anticuerpo se puede determinar mediante la evaluación del porcentaje de conjugación en el/los sitio(s) blanco(s) de conjugación (por ejemplo cisteínas libres en el C terminal de cada cadena liviana) en relación a todos los demás sitios conjugados. En determinadas modalidades, el método descrito aquí provee una conjugación de manera eficiente de un fármaco a un anticuerpo que comprende cisteínas libres. En algunas modalidades, la eficiencia de la conjugación es al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o más según se mide por el porcentaje de la conjugación relativa del blanco a todos los otros sitios de conjugación.

Además se apreciará que los anticuerpos modificados por ingeniería genética capaces de conjugación pueden contener residuos de cisteína libre que comprenden grupos sulfhidrilo que están bloqueados o cubiertos en la medida que se produce o almacena el anticuerpo. Tales cubiertas incluyen pequeñas moléculas, proteínas, péptidos, iones y otros materiales que interactúan con el grupo sulfhidrilo y previenen o inhiben la formación del conjugado. En algunos casos el anticuerpo modificado por ingeniería genética no conjugado puede comprender cisteínas libres que se unen a otras cisteína libres sobre los mismos o diferentes anticuerpos. Como se discute aquí tal reactividad cruzada puede dar lugar a diversos contaminantes durante el procedimiento de fabricación. En algunas modalidades, el anticuerpo modificado por ingeniería genética puede requerir retirar las cubiertas antes de una reacción de conjugación. En modalidades específicas, los anticuerpos aquí descritos se encuentran no cubiertos, y exhiben un grupo sulfhidrilo libre con capacidad de conjugación. En modalidades específicas, los anticuerpos aquí descritos se someten a una reacción para retirar la cubierta que no altera o rearregla los enlaces disulfuro que existen naturalmente. Se apreciará que en muchos casos las reacciones para retirar la cubierta ocurrirán durante las reacciones de reducción normales (reducción o reducción selectiva).

D. Distribución y purificación de DAR

En modalidades seleccionadas la conjugación con anticuerpos sitio específicos de la presente invención ventajosamente proporcionan la capacidad de generar preparaciones de ADC relativamente homogéneas que comprenden una estrecha distribución DAR. A este respecto las construcciones y/o conjugación selectivas descritas proveen de homogeneidad de las especies ADC dentro de una muestra en términos de la relación estequiométrica entre el fármaco y el anticuerpo modificado por ingeniería genética y con respecto de la ubicación de la toxina. Como se ha discutido brevemente con anterioridad el término “relación fármaco a anticuerpo” o “DAR” se refiere a la relación molar de fármaco a anticuerpo. En algunas modalidades una preparación de conjugado puede ser sustancialmente homogénea con respecto de su distribución DAR, lo que significa que dentro de la preparación ADC es una especie predominante de ADC sitio específico con un DAR particular (por ejemplo un DAR de 2 o 4) lo cual también es uniforme con respecto del sitio de la carga (es decir, en las cisteínas libres). En determinadas modalidades de la invención es posible lograr la homogeneidad deseada a través del uso de anticuerpos sitio específicos y/o reducción selectiva y conjugación. En otras modalidades la homogeneidad deseada se puede lograr a través del uso de construcciones sitio específicas en combinación con reducción selectiva. Incluso en otras modalidades las preparaciones pueden además ser purificadas usando técnicas de cromatografía analítica o preparativa. En cada una de estas modalidades la homogeneidad de la muestra ADC se puede analizar usando varias técnicas conocidas en el arte incluyendo pero que no está limitado a espectrometría de masa, HPLC (por ejemplo HPLC de exclusión de tamaño, RP-HPLC, HIC-HPLC etc.) o electroforesis capilar.

Con respecto a la purificación de preparaciones de ADC se apreciará que se pueden usar métodos de preparación farmacéutica estándar para obtener la pureza deseada. Como se discute aquí los métodos de cromatografía líquida tal como fase reversa (RP) y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla por el valor de la carga del fármaco. En algunos casos, también se puede usar cromatografía de intercambio iónico (IEC) o de modo mixto (MMC) para aislar especies con una carga de fármacos específica.

Los ADC descritos y las preparaciones de los mismos pueden comprender fármacos y porciones de anticuerpo en diversas relaciones molares estequiométricas dependiendo de la configuración del anticuerpo y, al menos en parte, del método usado para realizar la conjugación. En determinadas modalidades la carga de fármaco por ADC puede comprender desde 1-20 cabezas activas (es decir, n es 1-20). Otras modalidades seleccionados pueden comprender ADC que tienen una carga de fármaco desde 1 a 15 cabezas activas. Incluso en otras modalidades los ADC pueden

comprender de 1 a 12 cabezas activas o, más preferentemente, de 1 a 10 cabezas activas. En algunas modalidades los ADC comprenderán de 1 a 8 cabezas activas.

Mientras que la carga de droga teórica puede ser relativamente elevada, las prácticas de las limitaciones tal como la reactividad cruzada de cisteína libre y la hidrofobicidad de la cabeza activa tienden a limitar la generación de preparaciones homogéneas que comprenden tales DAR debido a los agregados y a otros contaminantes. Es decir, una mayor carga de fármaco, por ejemplo >6 o 8, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad, o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En vista de estas preocupaciones la carga práctica de fármacos proporcionada por la presente invención preferentemente se encuentra en el rango de 1 a 8 fármacos por conjugado, es decir donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 fármacos se unen covalentemente a cada anticuerpo (por ejemplo para IgG1, otros anticuerpos pueden tener diferente capacidad de carga en función del número de enlaces disulfuro). Preferentemente, la DAR de las composiciones de la presente invención será de aproximadamente 2, 4 o 6, y en algunas modalidades, las DAR comprenderán aproximadamente 2.

A pesar del nivel de homogeneidad relativamente alto proporcionado por la presente invención las composiciones descritas comprenden una mezcla de conjugados con un rango de compuestos fármacos (potencialmente de 1 a 8 en el caso de una IgG1). Como tal, las composiciones ADC descritas incluyen mezclas de conjugados donde la mayor parte de los anticuerpos constituyentes están unidos covalentemente a una o más porciones de fármacos (a pesar de la especificidad de conjugado relativa provista por las construcciones modificadas por ingeniería genética y la reducción selectiva) donde las porciones de fármaco se pueden unir al anticuerpo a través de varios grupos tiol. Es decir, después de la conjugación las composiciones ADC de la invención comprenderán una mezcla de conjugados con cargas diferentes (por ejemplo de 1 a 8 fármacos por anticuerpo IgG1) a varias concentraciones (junto con ciertos contaminantes de la reacción causados principalmente por la reactividad cruzada de la cisteína libre). Sin embargo usando reducción selectiva y purificación pos-fabricación las composiciones de conjugado pueden ser impulsadas hasta el punto donde contienen en gran medida una única especie predominante de ADC deseada (por ejemplo con una carga de fármaco de 2) con niveles relativamente bajos de otras especies de ADC I (por ejemplo con una carga de fármaco de 1, 4, 6, etc.). El valor promedio DAR representa el promedio ponderado de la carga de fármaco para la composición en su conjunto (es decir, todas las especies de ADC tomados juntas). Debido a la incertidumbre inherente de la metodología de cuantificación empleada y la dificultad en la eliminación por completo de las especies ADC no predominantes en un entorno comercial, los valores o especificaciones de DAR aceptables se presentan a menudo como una media, un rango o una distribución (es decir, un DAR

promedio de 2 +/- 0,5). Preferentemente las composiciones que comprenden un DAR promedio medido dentro del rango (es decir, de 1,5 a 2,5) serían utilizados en un entorno farmacéutico.

Por lo cual, en algunas modalidades la presente invención comprenderá composiciones que tienen un DAR promedio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 cada una +/- 0,5. En otras modalidades la presente invención comprenderán un DAR promedio de 2, 4, 6 o 8 +/- 0,5. Finalmente, en modalidades seleccionadas la presente invención comprenderán un DAR promedio de 2 +/- 0,5 o 4 +/- 0,5. Se apreciará que el rango o desviación puede ser inferior a 0,4 en algunas modalidades. Por lo cual, en otras modalidades las composiciones comprenderán un DAR promedio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 cada una +/- 0,3, un DAR promedio de 2, 4, 6 o 8 +/- 0,3, incluso más preferentemente un DAR promedio de 2 o 4 +/- 0,3 o incluso un DAR promedio de 2 +/- 0,3. En otras modalidades las composiciones de IgG1 conjugado preferentemente comprenderán una composición con un DAR promedio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 cada una +/- 0,4 y niveles relativamente bajos (es decir, menos de 30%) de especies ADC no predominantes. En otras modalidades la composición de cada una comprenderá un DAR promedio de 2, 4, 6 o 8 cada una +/- 0,4 con niveles relativamente bajos (< 30%) de especies ADC no predominantes. En algunas modalidades la composición de ADC comprenderá un DAR promedio de 2 +/- 0,4 con niveles relativamente bajos (< 30%) de especies ADC no predominantes. Incluso en otras modalidades las especies ADC predominantes (por ejemplo DAR de 2 o DAR de 4) estarán presentes a una concentración de más de 65%, a una concentración de más de 70%, a una concentración de más de 75%, a una concentración de más de 80%, a una concentración de más de 85%, a una concentración de más de 90%, a una concentración de más de 93%, a una concentración de más de 95% o incluso a una concentración de más de 97% cuando se mide contra otras especies DAR.

Como se detalla en los Ejemplos más adelante la distribución de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC provenientes de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tal como espectrofotometría UV-Vis, HPLC de fase inversa, HIC, espectroscopía de masa, ELISA, y electroforesis. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de fármacos por anticuerpo. Por medio de ELISA, se puede determinar el valor medio de los fármacos por anticuerpo en una preparación particular de ADC. Sin embargo, los valores de la distribución de fármaco por anticuerpo no discernible por unión de anticuerpo-antígeno y detección de la limitación de ELISA. Incluso, el ensayo ELISA para la detección de conjugados anticuerpo-fármaco no determina donde las porciones del fármaco están unidas al anticuerpo, tal como los fragmentos de la cadena pesada o cadena liviana, o los residuos de aminoácido particulares.

IV. Diagnósticos y Monitoreos

A. Diagnósticos

La invención proporciona métodos *in vitro* e *in vivo* para detectar, diagnosticar o monitorear desórdenes proliferativos y métodos de selección de células de un paciente para identificar células tumorales incluyendo células tumorigénicas. Tales métodos incluyen e identifican a un individuo que

5 tiene cáncer para el tratamiento o monitoreo de la progresión de un cáncer, que comprende poner en contacto el paciente o una muestra obtenida de un paciente (ya sea *in vivo* o *in vitro*) con un agente de detección (por ejemplo un anticuerpo o sonda de ácido nucleico) capaz de reconocer específicamente y asociarse con MFI2 y detectar la presencia o ausencia, o nivel de asociación del agente de detección en la muestra. En modalidades seleccionadas el agente de detección

10 comprenderán un anticuerpo asociado con un marcador detectable o molécula reportera como se describe aquí. Incluso en otras modalidades (por ejemplo *In hibridación in situ* o ISH) una sonda de ácido nucleico que reacciona con un determinante MFI2 genómico se utilizará en la detección, diagnóstico o monitorización del desorden proliferativo.

Más en general, la presencia y/o niveles de determinantes MFI2 se pueden medir usando

15 cualquiera de un número de técnicas disponibles para la persona con experiencia común en la técnica análisis para proteína o ácido nucleico, por ejemplo mediciones físicas directas (por ejemplo espectrometría de masa), ensayos de unión (por ejemplo inmunoensayos, ensayos de aglutinación, y ensayos inmunocromatográficos), tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, RT-PCR; RT-qPCR), tecnología de oligonucleótido ramificado, tecnología de Northern blot, tecnología

20 de hibridación de oligonucleótidos y tecnología de *hibridación in situ*. El método también puede comprender medir una señal que resulta a partir de una reacción química, por ejemplo un cambio en la absorbancia óptica, un cambio en la fluorescencia, la generación de quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia, un cambio en la reflectividad, índice de refracción o dispersión de la luz, la liberación o acumulación de marcas detectables desde la superficie, oxidación o reducción o

25 especies redox, una corriente o potencial eléctrico, cambios en los campos magnéticos, etc. Técnicas de detección adecuadas pueden detectar sucesos de unión mediante la medición de la participación de reactivos de unión marcados a través de la medición de las marcas por medio de su fotoluminiscencia (por ejemplo a través de la medición de la fluorescencia, fluorescencia resuelta en el tiempo, fluorescencia de onda evanescente, fósforos de conversión creciente, fluorescencia

30 multi-fotón, etc.), quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, dispersión de la luz, absorbancia óptica, radiactividad, campos magnéticos, actividad enzimática (por ejemplo a través de la medición de la actividad enzimática a través de reacciones enzimáticas que causan cambios en la absorbancia óptica o la fluorescencia o que causan la emisión de quimioluminiscencia). Alternativamente, pueden ser utilizadas técnicas de detección que no requieren el uso de marcas,

por ejemplo técnicas basadas en la medición de masas (por ejemplo mediciones de ondas acústicas de superficie), índice de refracción (mediciones por ejemplo de resonancia de plasma superficial), o la luminiscencia inherente de un analito.

5 En algunas modalidades, la asociación del agente de detección con células o componentes celulares particulares en la muestra indica que la muestra puede contener células tumorigénicas, denotando con ello que el individuo que tiene cáncer puede ser tratado eficazmente con un anticuerpo o ADC como se describe aquí.

10 En ciertas modalidades preferidas los ensayos pueden comprender ensayos de inmunohistoquímica (IHC) o variantes de lo mismo (por ejemplo fluorescente, cromogénica, ABC estándar, LSAB estándar, etc.), inmunocitoquímica o variantes de lo mismo (por ejemplo directa, indirecta, fluorescente, cromogénica, etc.) o *hibridación in situ* (ISH) o variantes de lo mismo (por ejemplo hibridación in situ cromogénica (CISH) o hibridación in situ fluorescente (DNA-FISH o RNA-FISH))

15 A este respecto ciertos aspectos de la presente invención comprenden el uso de MFI2 marcado por inmunohistoquímica (IHC). Más particularmente MFI2 IHC se puede usar como una herramienta de diagnóstico para ayudar en el diagnóstico de diversos desórdenes proliferativos y para controlar la respuesta potencial de los tratamientos que incluye la terapia con anticuerpo MFI2. Como se discute aquí y se muestra en los Ejemplos más adelante se pueden realizar ensayos de diagnóstico compatibles en tejidos que se han fijado químicamente (incluyendo pero que no está

20 limitado a: formaldehído, glutaraldehído, tetróxido de osmio, dicromato de potasio, ácido acético, alcoholes, sales de zinc, cloruro de mercurio, tetróxido de cromo y ácido pícrico) y embebidos (incluyendo pero que no está limitado a: glicol metacrilato, parafina y resinas) o conservados mediante congelamiento. Tales ensayos se pueden usar para guiar las decisiones de tratamiento y determinar los regímenes y los momentos de dosificación.

25 Otros aspectos particularmente compatibles de la invención involucran el uso de hibridación in situ para detectar o monitorear determinantes MFI2. La tecnología de *hibridación in situ* o ISH es bien conocida para aquellos expertos en el arte. Brevemente, se fijan las células y se agregan las sondas detectables que contienen una secuencia de nucleótido específica a las células fijadas. Si las células contienen secuencias nucleotídicas complementarias, las sondas, que se pueden

30 detectar, se hibridarán con ellas. Usando la información de secuencia que se establece aquí, se pueden diseñar sondas para identificar células que expresan determinantes MFI2 genotípicas. Las sondas preferentemente hibridan a una secuencia de nucleótido que corresponde a tales determinantes. Las condiciones de hibridación pueden optimizarse rutinariamente para minimizar la señal de fondo mediante hibridación no totalmente complementaria aunque preferentemente las

sondas son preferentemente totalmente complementarias al determinante MFI2 seleccionado. En modalidades seleccionadas las sondas son marcadas con colorante fluorescente unido a las sondas lo que es fácilmente detectable por metodología fluorescente estándar.

5 Teragnóstica o ensayos de diagnóstico *in vivo* compatibles pueden comprender técnicas de imagen o monitoreo tal como reconocidas en el arte imágenes por resonancia magnética, tomografía computarizada (por ejemplo exploración CAT), tomografía de positrones (por ejemplo exploración PET) radiografía, ecografía, etc., como será conocido por aquellos expertos en el arte.

10 En determinadas modalidades los anticuerpos de la presente invención pueden ser usados para detectar y cuantificar niveles de un determinante particular (por ejemplo, proteína MFI2) en la muestra de un paciente (por ejemplo plasma o sangre) que puede, a su vez, ser usada para detectar, diagnosticar o monitorear desórdenes proliferativos que se asocian con el determinante relevante. En modalidades relacionadas los anticuerpos de la presente invención pueden ser usados para detectar, monitorear y/o cuantificar células tumorales circulantes ya sea *in vivo* o *in vitro* (WO 2012/0128801). Incluso en otras modalidades las células tumorales circulantes pueden comprender
15 células tumorigénicas.

En determinadas modalidades de la invención, las células tumorigénicas en un individuo o una muestra proveniente de un individuo se pueden evaluar o caracterizar usando los anticuerpos descritos antes de la terapia o régimen para establecer una línea basal. En otros ejemplos, las células tumorigénicas pueden ser evaluadas a partir de una muestra que se entrega desde un
20 individuo que ha sido tratado.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para analizar la progresión del cáncer y/o la patogénesis del cáncer *in vivo*. En otra modalidad, el análisis de la progresión y/o patogénesis del cáncer *in vivo* comprende determinar el grado de progresión del tumor. En otra modalidad, el análisis comprende la identificación del tumor. En otra modalidad, el análisis de la progresión del
25 tumor se realiza en el tumor primario. En otra modalidad, el análisis se realiza de forma dependiente del tiempo del tipo de cáncer tal como lo conoce un experto en el arte. En otra modalidad, el análisis adicional de tumores secundarios que se originan de metástasis celulares del tumor primario se analiza *in vivo*. En otra modalidad, el tamaño y forma de los tumores secundarios son analizados. En algunas modalidades, se realiza el análisis *ex vivo* adicional.

30 En otra modalidad, la invención proporciona un método para analizar la progresión del cáncer y/o patogénesis del cáncer *in vivo* incluyendo determinar la metástasis celular o detectar y cuantificar el nivel de células tumorales circulantes. Incluso en otra modalidad, el análisis de la metástasis celular comprende la determinación del crecimiento progresivo de las células en el sitio que está discontinuo del tumor primario. En otra modalidad, el análisis del sitio de la metástasis celular

comprende la ruta de la expansión neoplásica. En alguna modalidad, las células se pueden expandir a través de la vasculatura sanguínea, linfática, dentro de las cavidades del organismo o mediante combinaciones de los mismos. En otra modalidad, el análisis de metástasis celular se realiza en vista de la migración, diseminación, extravasación, proliferación celular o combinaciones de los mismos.

En determinados ejemplos, las células tumorigénicas en un individuo o una muestra provenientes de un individuo se pueden evaluar o caracterizar usando los anticuerpos descritos antes de la terapia para establecer una línea basal. En otros ejemplos la muestra se entrega desde un individuo que ha sido tratado. En algunos ejemplos la muestra se toma del individuo al menos alrededor de 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 30, 60, 90 días, 6 meses, 9 meses, 12 meses, o >12 meses después de que el individuo inicia o termina tratamiento. En ciertos ejemplos, las células tumorigénicas se evalúan o caracterizan después de un cierto número de dosis (por ejemplo, luego de 2, 5, 10, 20, 30 o más dosis de una terapia). En otros ejemplos, las células tumorigénicas se caracterizan o evalúan después de 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o más después de recibir una o más terapias.

B. Monitoreo

En determinadas modalidades, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para monitorear las muestras para poder identificar compuestos o agentes (por ejemplo, anticuerpos o ADC) que alteran una función o actividad de células tumorales interactuando con un determinante.

En una modalidad, las células tumorales se ponen en contacto con un anticuerpo o ADC y el anticuerpo o ADC se puede usar para monitorear el tumor en cuanto a las células que expresan un determinado blanco (por ejemplo MFI2) para poder identificar estas células para ciertos propósitos, incluyendo pero que no está limitado a, propósitos de diagnóstico, para monitorear estas células para determinar la eficacia del tratamiento o para enriquecer una población celular para estas células que expresan el blanco.

Aún en otra modalidad, un método incluye poner en contacto, directa o indirectamente, células tumorales con un agente o compuesto de ensayo y por ejemplo determinar si el agente o compuesto de ensayo modula una actividad o función de las células tumorales asociadas al determinante, cambios en la morfología celular o la viabilidad celular, la expresión de un marcador, la diferenciación o des-diferenciación, la respiración celular, la actividad mitocondrial, integridad de membrana, maduración, proliferación, viabilidad, apoptosis o muerte celular. Un ejemplo de una interacción directa es la interacción física, mientras que una interacción indirecta incluye, por ejemplo, la acción de una composición frente a una molécula intermediaria que, en cambio, actúa

frente a la entidad referenciada (por ejemplo, célula o cultivo celular).

Los métodos de monitoreo incluyen monitoreo de alto rendimiento, lo cual puede incluir arreglo de células (por ejemplo, microarreglos) posicionado o colocado, opcionalmente en ubicaciones pre-determinadas, por ejemplo, en una placa de cultivo, tubo, matraz, botella o placa rotatoria. Los métodos de manipulación robótica o manual de alto rendimiento pueden probar interacciones químicas y determinar niveles de expresión de muchos genes en un período corto de tiempo. Se han desarrollado técnicas que utilizan señales moleculares, por ejemplo vía fluoróforos o microarreglos (Mocellin and Rossi, 2007, PMID: 17265713) y análisis automatizados que procesan la información a una velocidad muy rápida (véase por ejemplo, Pinhasov *et al.*, 2004, PMID: 15032660). Las bibliotecas que pueden ser monitoreadas incluyen, por ejemplo, bibliotecas de moléculas pequeñas, bibliotecas de presentación de fagos, bibliotecas de presentación de levaduras de anticuerpos completamente humanos (Adimab), bibliotecas de ARNsi, y vectores de transfección adenoviral.

VII. Preparaciones farmacéuticas y Usos terapéuticos

15 A. Formulaciones y vías de administración

Los anticuerpos o ADC de la invención se pueden formular de varias formas usando técnicas reconocidas en el arte. En algunas modalidades, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden administrar solas o con un mínimo de componentes adicionales mientras que otras pueden opcionalmente ser formuladas para contener vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables. Como se utiliza aquí, los “vehículos farmacéuticamente aceptables” comprenden excipientes, vehículos, adyuvantes y diluyentes que se conocen bien en el arte y pueden estar disponibles a partir de fuentes comerciales para ser usados en una preparación farmacéutica (véase, por ejemplo Gennaro (2003) *Remington: The Science y Practice of Pharmacy with Facts y Comparisons: Drugfacts Plus*, 20th ed., Mack Publishing; Ansel *et al.* (2004) *Pharmaceutical Dosage Forms y Drug Delivery Systems*, 7th ed., Lippencott Williams y Wilkins; Kibbe *et al.* (2000) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed., Pharmaceutical Press.)

Los vehículos farmacéuticamente aceptables comprenden sustancias que son relativamente inertes y que pueden facilitar la administración del anticuerpo o pueden ayudar a procesar los compuestos activos en preparaciones que son farmacéuticamente optimizadas para la entrega al sitio de acción.

Tales vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agentes que pueden alterar la forma, consistencia, viscosidad, pH, tonicidad, estabilidad, osmolaridad, farmacocinética, agregación de proteína o solubilidad de la formulación e incluir agentes tamponantes, agentes humectantes,

agentes emulsionantes, diluyentes, agentes encapsulantes y mejoradores de la penetración en la piel. Ciertos ejemplos no limitantes de vehículos incluyen suero fisiológico, suero fisiológico tamponado, dextrosa, arginina, sacarosa, agua, glicerol, etanol, sorbitol, dextrano, carboximetil celulosa de sodio y combinaciones de los mismos. Los anticuerpos para la administración sistémica se pueden formular para la administración enteral, parenteral o tópica. Ciertamente, todos los tres tipos de formulación se pueden usar de manera simultánea para alcanzar la administración sistémica del ingrediente activo. Los excipientes así como las formulaciones para la entrega de fármaco parenteral y no parenteral se definen en *Remington: The Science y Practice of Pharmacy* (2000) 20th Ed. Mack Publishing.

Las formulaciones adecuadas para la administración enteral incluyen cápsulas de gelatina duras o blandas, píldoras, tabletas, incluyendo tabletas recubiertas, elíxires, suspensiones, jarabes o inhalaciones y formas de liberación controlada de lo mismo.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo por inyección), incluyen líquidos estériles, acuosos o no acuosos, isotónicos, libres de pirógenos, (por ejemplo soluciones, suspensiones), en los cuales el ingrediente activo se disuelve, suspende, o dispuesto de otra forma (por ejemplo en un liposoma u otro microparticulado). Tales líquidos pueden contener adicionalmente otros vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como anti-oxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes espesantes, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre (u otro fluido corporal relevante) del receptor pretendido. Ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, y similares. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados farmacéuticamente aceptables para ser usados en tales formulaciones incluyen Inyección de Cloruro de Sodio, Solución de Ringer, o Inyección de Lactato.

Las formulaciones compatibles para la administración parenteral (por ejemplo inyección intravenosa) pueden comprender concentraciones de ADC o de anticuerpo desde alrededor de 10 µg/mL hasta alrededor de 100 mg/ mL. En determinadas modalidades seleccionadas las concentraciones de anticuerpo o ADC comprenderán 20 µg/ mL, 40 µg/ mL, 60 µg/ mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300, µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL, 600 µg/mL, 700 µg/mL, 800 µg/mL, 900 µg/mL o 1 mg/mL. En otras modalidades las concentraciones de ADC comprenderán 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL, 10 mg/mL, 12 mg/mL, 14 mg/mL, 16 mg/mL, 18 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL, 35 mg/mL, 40 mg/mL, 45 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL o 100 mg/mL.

Los compuestos y composiciones de la invención se pueden administrar *in vivo*, a un individuo que lo necesita, por varias rutas, incluyendo, pero que no está limitado a, la vía oral, intravenosa,

intra-arterial, subcutánea, parenteral, intranasal, intramuscular, intracardiaca, intraventricular, intratraqueal, bucal, rectal, intraperitoneal, intradérmica, tópica, transdérmica, e intratecal, o de otro modo por implantación o inhalación. Las composiciones objeto pueden ser formuladas en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, líquidas, o gaseosas; incluyendo, pero no limitado a, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, supositorios, soluciones, enemas, inyecciones, inhaladores, y aerosoles. La formulación y la vía de administración adecuada se pueden seleccionar de acuerdo a la aplicación y el régimen terapéutico previsto.

B. Dosificaciones

El régimen de dosis particular, es decir, la dosis, el momento y la repetición, dependerá del individuo particular, así como de las consideraciones empíricas tal como la farmacocinética (por ejemplo la vida media, la tasa de eliminación, etc.). La determinación de la frecuencia de administración puede ser realizada por personas expertas en el arte, tal como un médico de cabecera basado en las consideraciones acerca de la condición y la severidad de la condición que está siendo tratada, la edad y el estado general de salud del individuo que está siendo tratado y consideraciones similares. La frecuencia de administración se puede ajustar a lo largo del curso de la terapia basado en la evaluación de la eficacia de la composición seleccionada y el régimen de dosificación. Tal evaluación se puede realizar en base a marcadores de la enfermedad específica, desorden o condición. En modalidades en las cuales el individuo padece de cáncer, estas incluyen mediciones directas del tamaño del tumor a través de palpación o de observación visual; medición indirecta del tamaño del tumor por rayos X u otras técnicas de imagen; una mejora según la evaluación de biopsia de tumor directa y examen microscópico de una muestra de tumor; la medición indirecta de un marcador de tumor (por ejemplo PSA para cáncer de próstata) o un antígeno identificado de acuerdo a los métodos que se describen aquí; la reducción en el número de células proliferativas o células tumorigénicas, la mantención de la reducción de tales células neoplásicas; la reducción de la proliferación de células neoplásicas; o el retraso en el desarrollo de metástasis.

Los anticuerpos MF12 o ADC de la invención se pueden administrar en varios rangos. Estos incluyen alrededor de 5 µg/kg de peso corporal hasta alrededor de 100 mg/kg de peso corporal por dosis; alrededor de 50 µg/kg de peso corporal hasta alrededor de 5 mg/kg de peso corporal por dosis; alrededor de 100 µg/kg de peso corporal hasta alrededor de 10 mg/kg de peso corporal por dosis. Otros rangos incluyen alrededor de 100 µg/kg de peso corporal hasta alrededor de 20 mg/kg de peso corporal por dosis y alrededor de 0.5 mg/kg de peso corporal hasta alrededor de 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En determinadas modalidades, la dosis es de al menos alrededor de

100 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 250 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 750 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 3 mg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 5 mg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 10 mg/kg de peso corporal.

En modalidades seleccionadas los anticuerpos MFI2 o ADC serán administrados (preferentemente por vía intravenosa) a aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 µg/kg de peso corporal por dosis. Otras modalidades pueden comprender la administración de anticuerpos o ADC a alrededor de 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 µg/kg de peso corporal por dosis. En otras modalidades los conjugados descritos serán administrados at 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 9 o 10 mg/kg. Aún en otras modalidades los conjugados se pueden administrar a 12, 14, 16, 18 o 20 mg/kg de peso corporal por dosis. Incluso en otras modalidades los conjugados se pueden administrar a 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90 o 100 mg/kg de peso corporal por dosis. Con las enseñanzas aquí descritas, una persona experta en el arte podría determinar fácilmente las dosis adecuadas para varios anticuerpos MFI2 o ADC basado en estudios preclínicos en animales, observaciones clínicas y técnicas estándar médicas y bioquímicas y mediciones.

Otros regímenes de dosificación pueden apoyarse en cálculos de la superficie corporal (BSA) como se describe en la patente US 7.744.877. Como es bien sabido, la BSA se calcula utilizando la altura y el peso del paciente y proporciona una medida del tamaño de un sujeto tal como se representa por el área superficial del cuerpo de la o el paciente. En determinadas modalidades, los conjugados se pueden administrar en dosis desde 1 mg/m² hasta 800 mg/m², desde 50 mg/m² hasta 500 mg/m² y a dosis de 100 mg/m², 150 mg/m², 200 mg/m², 250 mg/m², 300 mg/m², 350 mg/m², 400 mg/m² o 450 mg/m². También se apreciará que se pueden usar las técnicas empíricas reconocidas en técnicas para determinar la dosis adecuada.

Los anticuerpos anti-MFI2 o ADC se pueden administrar en un esquema específico. Generalmente, una dosis efectiva del conjugado MFI2 se administra a un individuo una o más veces. Más particularmente, una dosis efectiva del ADC se administra al individuo una vez al mes, más de una vez al mes, o menos de una vez al mes. En determinadas modalidades, la dosis efectiva del anticuerpo MFI2 o ADC se pueden administrar múltiples veces, que incluyendo períodos de al menos un mes, al menos seis meses, al menos un año, al menos dos años o un período de varios años. Incluso en otras modalidades, varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) o varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) o incluyen un año o varios años pueden transcurrir entre la administración de los anticuerpos descritos o ADC.

En algunas modalidades el curso del tratamiento que involucra a los anticuerpos conjugados comprenderá múltiples dosis del producto fármaco seleccionado a lo largo de un período de

semanas o meses. Más específicamente, los anticuerpos o ADC de la presente invención se pueden administrar una vez cada día, cada dos días, cada cuatro días, cada semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada mes, cada seis semanas, cada dos meses, cada diez semanas o cada tres meses. A este respecto se apreciará que es posible alterar las dosificaciones o el intervalo se puede ajustar basado en la respuesta del paciente y de las prácticas clínicas. La invención también contempla la administración discontinua o las dosis diarias divididas en varias administraciones parciales. Las composiciones de la presente invención y el agente anticancerígeno se pueden administrar de manera intercambiable, en días o semanas alternados; o una secuencia de tratamientos de anticuerpo se puede entregar, seguido por uno o más tratamientos de la terapia del agente anticancerígeno. En cualquier caso, como se entenderá por aquellos de experiencia común en el arte, las dosis adecuadas de agentes quimioterapéuticos estarán por lo general alrededor de aquellos que se utilizan en terapias clínicas donde las quimioterapias son administradas solas o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

En otra modalidad los anticuerpos MFI2 o los ADC de la presente invención se pueden usar en terapia de mantenimiento para reducir o eliminar la chance de la recurrencia del tumor luego de la presentación inicial de la enfermedad. Preferentemente el desorden habrá sido tratado y la masa tumoral inicial eliminada, reducida o de otro modo mejorada por lo que el paciente está asintomático o en remisión. En el momento al individuo se pueden administrar candidatos farmacéuticamente efectivos de los anticuerpos descritos una o más veces a pesar de que hay poca o ninguna indicación de la enfermedad utilizando procedimientos de diagnóstico estándar.

En otra modalidad preferida los moduladores de la presente invención se pueden usar para profilácticamente prevenir o reducir o como una terapia adyuvante para prevenir o reducir a posibilidad de metástasis tumoral después de un procedimiento de citorreducción. Tal como se utiliza en la presente descripción un “procedimiento de citorreducción” se refiere a cualquier procedimiento, técnica o método que reduce, o aminora la proliferación del tumor o tumores. Ejemplos de procedimientos de citorreducción incluyen, pero no se limitan a tratamientos de cirugía, de radiación (es decir, radiación de haz), quimioterapia, inmunoterapia o ablación. En los momentos apropiados determinados fácilmente por un experto en el arte en vista de la presente descripción los ADC descritos se pueden administrar según lo sugerido por procedimientos clínicos, de diagnóstico o, terapéuticos, para reducir la metástasis tumoral.

Otras modalidades adicionales de la invención comprenden la administración de los ADC descritos a individuos que son asintomáticos, pero que tienen riesgo de desarrollar cáncer. Es decir, los ADC de la presente invención pueden ser utilizados en un sentido verdaderamente preventivo y se administran a pacientes que han sido examinados o que han probado y tener uno o más de los

factores de riesgo señalados (por ejemplo indicaciones genómicas, antecedentes familiares, resultados de ensayo *in vivo* o *in vitro*, etc.) pero que no han desarrollado neoplasia.

Las dosis y regímenes también se pueden determinar empíricamente para las composiciones terapéuticas descritas a las personas que han recibido una o más administración(es). Por ejemplo, se pueden administrar dosis incrementales, a individuos, de una composición terapéutica producida como se describe aquí. En modalidades seleccionadas la dosis puede aumentarse gradualmente o reducirse o atenuarse respectivamente en base a lo determinado empíricamente o a los efectos secundarios o la toxicidad observados. Para evaluar la eficacia de la composición seleccionada, un marcador de la enfermedad, desorden o condición específico, se puede seguir como está descrito anteriormente. Para el cáncer, estos incluyen mediciones directas de tamaño del tumor a través de la palpación o la observación visual, medida indirecta del tamaño del tumor por rayos X u otras técnicas de imagen; una mejora según la evaluación de la biopsia directa del tumor y el examen microscópico de la muestra de tumor; la medición de un marcador tumoral indirecto (por ejemplo PSA para cáncer de próstata) o un antígeno tumorigénico identificado de acuerdo a los métodos que se describen aquí, una disminución en el dolor o la parálisis; mejora de la dicción, de la visión, la respiración u otra discapacidad asociada con el tumor; aumento del apetito; o un aumento en calidad de vida, medido por pruebas aceptadas o prolongación de la sobrevida. Será evidente para un experto en la técnica que la dosificación variará dependiendo del individuo, el tipo de condición neoplásica, la etapa de la afección neoplásica, si la condición neoplásica ha comenzado a metastatizar en otro lugar en el individuo, y los tratamientos pasado y concurrentes que se están usando.

C. Terapias de Combinación

Las terapias de combinación pueden ser útiles en la prevención o tratamiento del cáncer y en la prevención de la metástasis o recurrencia de cáncer. La expresión “terapia de combinación”, como se utiliza aquí, se refiere a la administración de una combinación que comprende al menos un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y al menos un residuo terapéutico (por ejemplo agente anticancerígeno) donde la combinación tiene preferentemente terapéutica sinergia o mejora de los efectos terapéuticos medibles en el tratamiento de cáncer sobre (i) el anticuerpo anti-MFI2 o ADC usado solo, o (ii) el residuo terapéutico usado solo, o (iii) el uso del residuo terapéutico en combinación con otro residuo terapéutico sin la adición de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC. El término “sinergia terapéutica”, como se utiliza aquí, se refiere a la combinación de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y uno o más residuo(s) terapéutico(es) que tienen un efecto terapéutico mayor que el efecto aditivo de la combinación de el anticuerpo anti-MFI2 o ADC y el uno o más residuo(s) terapéutico(s).

Los resultados deseados de las combinaciones descritas son cuantificados por comparación a una medición control o de línea base. Como se utiliza aquí, los términos relativos tal como "mejora," "aumento," o "reducir" son indicativos de valores relativos a un control, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento que se describe aquí, o una medición en un individuo de control (o varios individuos de control) en la ausencia de los anticuerpos anti-MFI2 o ADC que se describen aquí pero en presencia de otro(s) residuo(s) terapéutico(s) tal como estándar de tratamiento de cuidado. Un individuo de control representativo es un individuo que padece de la misma forma de cáncer que el individuo que está siendo tratado, el cual es de alrededor de la misma edad que el individuo que se está tratando (para garantizar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo de control son comparables.)

Los cambios o mejoras en la respuesta a la terapia son generalmente estadísticamente significativos. Como se utiliza aquí, el término "significancia" o "significante" se refiere a un análisis estadístico de la probabilidad de que hay una asociación no aleatoria entre dos o más entidades. Para determinar si una relación es o no es "significante" o tiene "significancia," se puede calcular un "valor p". Los valores P que caen por debajo de un punto de corte definido por el usuario se consideran significativos. Un valor de p menor que o igual a 0,1, menor de 0,05, menor de 0,01, menor de 0.005, o menor de 0,001 puede ser considerado como significativo.

Un efecto terapéutico sinérgico puede ser un efecto de al menos alrededor de dos veces mayor que el efecto terapéutico provocado por un residuo terapéutico único o un anticuerpo anti-MFI2 o ADC, o la suma de los efectos terapéuticos provocado por el anticuerpo anti-MFI2 o ADC el único residuo terapéutico(s) de una combinación determinada, o al menos alrededor de cinco veces mayor, o al menos alrededor de diez veces mayor, o al menos alrededor de veinte veces mayor, o al menos alrededor de cincuenta veces mayor, o al menos alrededor de cien veces mayor. Un efecto terapéutico sinérgico también puede ser observado como un aumento en efecto terapéutico de al menos 10% comparado con el efecto terapéutico provocado por un único residuo terapéutico o anticuerpo anti-MFI2 o ADC, o la suma de los efectos terapéuticos provocados por el anticuerpo anti-MFI2 o ADC o el único residuo terapéutico(s) de una combinación determinada, o al menos 20%, o al menos 30%, o al menos 40%, o al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 100%, o más. Un efecto sinérgico también es un efecto que permite una dosificación reducida de agentes terapéuticos cuando estos se usan en combinación.

En la práctica de la terapia de combinación, el anticuerpo anti-MFI2 o ADC y el residuo terapéutico(s) se pueden administrar al individuo de manera simultánea, ya sea en una composición única, o como dos o más composiciones diferentes usando la misma o diferentes rutas de

administración. Alternativamente, el tratamiento con el anticuerpo anti-MFI2 o ADC puede preceder o seguir al tratamiento con el residuo terapéutico, por ejemplo por intervalos en el rango de minutos a semanas. En una modalidad, ambos el residuo terapéutico y el anticuerpo o ADC son administrados dentro de alrededor de 5 minutos hasta alrededor de dos semanas de cada uno.

- 5 Incluso en otras modalidades, pueden transcurrir varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) o varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre la administración del anticuerpo y el residuo terapéutico.

- La terapia de combinación se puede administrar hasta que la condición se trata, es paliada o curada en varios esquemas tal como una vez, dos veces o tres veces al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses, o se pueden administrar continuamente. El anticuerpo y el/los residuo(s) terapéutico(s) se pueden administrar en días o semanas alternados; o como una secuencia de tratamientos con anticuerpo anti-MFI2 o ADC pueden ser administrados, seguido por uno o más tratamientos con el residuo terapéutico adicional.
- 15 En una modalidad un anticuerpo anti-MFI2 o ADC es administrado en combinación con uno o más residuo(s) terapéutico(s) por ciclos cortos de tratamiento. En otras modalidades el tratamiento de combinación es administrado por ciclos de tratamiento largos. La terapia de combinación se puede administrar por cualquier ruta.

- En modalidades seleccionadas los compuestos y las composiciones de la presente invención se pueden usar en conjunto con inhibidores de puntos de control tal como inhibidores PD-1 o inhibidores PDL-1. PD-1, junto con su ligando PD-L1, son reguladores negativos de la respuesta antitumoral de linfocitos T. En una modalidad la terapia de combinación puede comprender un anticuerpo anti-MFI2 o ADC junto con un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo lambrolizumab, nivolumab, pidilizumab) y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) adicionales. En otra
- 25 modalidad la terapia de combinación puede comprender un anticuerpo anti-MFI2 o ADC junto con un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C) y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) adicionales. Incluso en otra modalidad, la terapia de combinación puede comprender un anticuerpo anti-MFI2 o ADC junto con un anticuerpo anti PD-1 (por ejemplo pembrolizumab) se administra a pacientes que siguen el progreso del siguiente
- 30 tratamiento con otras terapias de combinación anti-PD-1 y/o dirigidas a BRAF (por ejemplo ipilimumab y vemurafenib o dabrafenib).

En algunas modalidades los anticuerpos anti-MFI2 o ADC se pueden usar en combinación con varios tratamientos de cáncer de primera línea. En una modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y un agente citotóxico tal como ifosfamida,

mitomicina C, vindesina, vinblastina, etoposido, irinotecan, gemcitabina, taxanos, vinorelbina, metotrexato, y pemetrexed) y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s).

En otra modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y de un fármaco en base a platino (por ejemplo carboplatino o cisplatino) y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s) (por ejemplo vinorelbina; gemcitabina; un taxano tal como, por ejemplo, docetaxel o paclitaxel; irinotecan; o pemetrexed).

En una modalidad, por ejemplo, en el tratamiento of cáncer BR-ERPR, BR-ER o BR-PR, la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y uno o más residuos terapéuticos descritos como "terapia de hormona". La expresión "terapia de hormona" como se utiliza aquí, se refiere a, por ejemplo tamoxifeno; gonadotropina o hormona luteinizante liberadora (GnRH o LHRH); everolimus y exemestano; toremifeno; o inhibidores de la aromatasa (por ejemplo anastrozol, letrozol, exemestana o fulvestrant).

En otra modalidad, por ejemplo, en el tratamiento de BR-HER2, la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y trastuzumab o ado-trastuzumab emtansina y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s) (por ejemplo pertuzumab y/o docetaxel).

En algunas modalidades, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer mamario metastásico, la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y un taxano (por ejemplo docetaxel o paclitaxel) y opcionalmente un(os) residuo(s) terapéutico(s) adicional(es), por ejemplo, una antraciclina (por ejemplo doxorubicina o epirubicina) y/o eribulina.

En otra modalidad, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer mamario metastásico o recurrente o cáncer mamario de BRCA mutante, la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y megestrol y opcionalmente un(os) residuo(s) terapéutico(s) adicional(es).

En modalidades adicionales, por ejemplo, en el tratamiento de BR-TNBC, la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y un inhibidor de la poli ADP ribosa polímerasa (PARP) (por ejemplo BMN-673, olaparib, rucaparib y veliparib) y opcionalmente un(os) residuo(s) terapéutico(s) adicional(es).

En otra modalidad, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer mamario, la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y ciclofosfamida y opcionalmente un(os) residuo(s) terapéutico(s) adicional(es) (por ejemplo doxorubicina, un taxano, epirubicina, 5-FU y/o metotrexato).

En otra modalidad la terapia de combinación para el tratamiento de NSCLC positivo para EGFR comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y afatinib y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s) (por ejemplo erlotinib y/o bevacizumab).

En otra modalidad la terapia de combinación para el tratamiento de NSCLC positivo para EGFR comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y erlotinib y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s) (por ejemplo bevacizumab).

5 En otra modalidad la terapia de combinación para el tratamiento de NSCLC positivo para ALK comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y ceritinib y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s).

En otra modalidad la terapia de combinación para el tratamiento de NSCLC positivo para ALK comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y crizotinib y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s).

10 En otra modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y bevacizumab y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s) (por ejemplo un taxano tal como, por ejemplo, docetaxel o paclitaxel; y/o un análogo de platino).

15 En otra modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y bevacizumab y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s) (por ejemplo gemcitabina y/o un análogo de platino).

En una modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y un fármaco en base a platino (por ejemplo carboplatino o cisplatino) análogo y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s) (por ejemplo un taxano tal como, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel).

20 En una modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y un análogo de un fármaco en base a platino (por ejemplo carboplatino o cisplatino) y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s) (por ejemplo un taxano tal como, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel y/o gemcitabina y/o doxorubicina).

25 En una modalidad particular la terapia de combinación para el tratamiento de tumores resistentes a platino comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y doxorubicina y/o etoposido y/o gemcitabina y/o vinorelbina y/o ifosfamida y/o 5-fluorouracilo modulado pro leucovorina y/o bevacizumab y/o tamoxifeno; y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s).

En otra modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y un inhibidor PARP y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s).

30 En otra modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y bevacizumab y opcionalmente ciclofosfamida.

La terapia de combinación puede comprender un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y un residuo quimioterapéutico que es efectivo sobre un tumor (por ejemplo un melanoma) que comprende un gen o proteína mutado o aberrantemente expresado (por ejemplo BRAF V600E).

Los linfocitos T (por ejemplo linfocitos citotóxicos (CTL)) desempeñan un papel importante en la defensa del huésped contra los tumores malignos. Los CTL son activados por la presentación de antígenos asociados a tumor en células presentadoras de antígeno. La inmunoterapia activa específica es un método que se puede usar para aumentar la respuesta del linfocito T al cáncer a través de la vacunación de un paciente con péptidos derivados de antígenos que se sabe están asociados a cáncer. En una modalidad la terapia de combinación puede comprender un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y una vacuna para un antígeno asociado a cáncer (por ejemplo antígeno específico de tirosinasa de linaje de melanocitos, gp100, Melan-A/MART-1 o gp75.) En otras modalidades la terapia de combinación puede comprender la administración de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC junto con la expansión *in vitro*, la activación, la reintroducción adoptiva de los CTL autólogos o células natural killer. La activación de los CTL también se puede promover por estrategias que mejoran la presentación del antígeno tumoral por las células presentadoras de antígeno. El factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) promueve el reclutamiento de células dendríticas y la activación de células dendríticas de cebado cruzado. En una modalidad la terapia de combinación puede comprender el aislamiento de células presentadoras de antígeno, la activación de tales células con citoquinas estimuladoras (por ejemplo GM-CSF), el cebado con antígenos asociados a tumor, y luego la reintroducción adoptiva de las células presentadoras de antígeno a los pacientes en combinación con el uso de anticuerpos anti-MFI2 o ADC y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s).

En algunas modalidades los anticuerpos anti-MFI2 o ADC se pueden usar en combinación con varios tratamientos de melanoma de primera línea. En una modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y dacarbazina y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s). En otras modalidades la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y temozolamida y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s). En otra modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y residuo terapéutico en base a platino (por ejemplo carboplatino o cisplatino) y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s). En algunas modalidades la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y un residuo terapéutico vinca alcaloide (por ejemplo vinblastina, vinorelbina, vincristina, o vindesina) y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s). En una modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC y interleuquina-2 y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s). En otra modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC e interferón-alfa y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s).

En otras modalidades, los anticuerpos anti-MFI2 o ADC se pueden usar en combinación con tratamientos adyuvantes de melanoma y/o un procedimiento quirúrgico (por ejemplo resección del tumor.) En una modalidad la terapia de combinación comprende el uso de un anticuerpo anti-MFI2 o ADC e interferón-alfa y opcionalmente uno o más residuo(s) terapéutico(s) diferente(s).

5 La invención también provee de la combinación de anticuerpos anti-MFI2 o ADC con radioterapia. El término “radioterapia”, como se utiliza aquí, se refiere a, cualquier mecanismo para inducir daño al ADN de manera local dentro de las células tumorales tal como irradiación gama, rayos X, irradiación UV, microondas, emisiones electrónicas y similares. También se contempla la terapia de combinación que usa la entrega dirigida de radioisótopos a las células tumorales, y se
10 puede usar en combinación o como un conjugado de los anticuerpos anti-MFI2 aquí descritos. Por lo general, la terapia de radiación es administrada en pulsos a lo largo de un período de tiempo desde alrededor de 1 hasta alrededor de 2 semanas. Opcionalmente, la terapia de radiación se puede administrar como una sola dosis o como dosis múltiples, secuenciales.

En otras modalidades un anticuerpo anti-MFI2 o ADC se puede usar en combinación con uno
15 o más de los agentes quimioterapéuticos descritos más adelante.

D. Agente anticancerígenos

El término “agente anticancerígeno” o “agente quimioterapéutico” como se utiliza aquí es un subconjunto de “residuos terapéuticos”, lo que a su vez es un subconjunto de los agentes descritos como “residuos farmacéuticamente activos”. Más particularmente la expresión “agente
20 anticancerígeno” se refiere a cualquier agente que se puede usar para tratar un desorden proliferativo celular tal como el cáncer, e incluye, pero no está limitado a, agentes citotóxicos, agentes citostáticos, agentes anti-angiogénicos, agentes citoreductores, agentes quimioterapéuticos, radioterapia y agentes radioterapéuticos, agentes anticancerígenos dirigidos, modificadores de la respuesta biológica, anticuerpos terapéuticos, vacunas para cáncer, citoquinas,
25 terapia hormonal, agentes anti-metastásicos y agentes inmunoterapéuticos. Se apreciará que en modalidades seleccionadas como se ha discutido antes, tales agentes anticancerígenos pueden comprender conjugados y se pueden asociar con anticuerpos antes de la administración. En determinadas modalidades el agente anticancerígeno descrito estará unido a un anticuerpo para proporcionar un ADC como se describe aquí.

30 El término “agente citotóxico”, el cual también puede ser un agente anticancerígeno se refiere a una sustancia que es tóxica para las células y que disminuye o inhibe la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Por lo general, la sustancia es una molécula que existe de manera natural derivada de un organismo vivo (o un producto natural preparado de manera

sintética). Ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, pequeñas moléculas de toxinas o toxinas de bacteria enzimáticamente activas (por ejemplo toxina de Difteria, endotoxina y exotoxina de *Pseudomonas*, enterotoxina A de *Estafilococo*), fúngicas (por ejemplo α -sarcina, restrictocina), de plantas (por ejemplo abrina, ricino, modeccina, viscumina, proteína anti-viral de hierba carmín (pokeweed), saporina, gelonina, momoridina, tricosantina, toxina de cebada, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca mericana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, mitegelina, restrictocina, fenomicina, neomicina, y los tricotecenos) o de animales, (por ejemplo ARNasas citotóxicas, tal como ARNasas pancreáticas extracelulares; DNasa I, incluyendo fragmentos y/o variantes de la misma).

Un agente anticancerígeno puede incluir cualquier agente químico que inhibe, o es diseñado para inhibir, una célula cancerosa o una célula que probablemente se vuelva cancerosa o que genere una progenie tumorigénica (por ejemplo células tumorigénicas). Tales agentes químicos a menudo están dirigidos a procesos intracelulares necesarios para el crecimiento o división de la célula, y son por tanto particularmente efectivos contra las células cancerosas, que por lo general crecen y se dividen rápidamente. Por ejemplo, la vincristina despolimeriza los microtúbulos, y por lo cual inhibe a las células de entrar a la mitosis. Tales agentes se administran a menudo, y son a menudo mucho más efectivos, en combinación, por ejemplo en la formulación CHOP. Nuevamente, en modalidades seleccionadas tales agentes anticancerígenos se pueden conjugar a los anticuerpos descritos para proporcionar los ADC.

Ejemplos de agentes anticancerígenos que se pueden usar en combinación con (o conjugados a) los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, sulfonatos de alquilo, anastrozol, amanitina, aziridinas, etileniminas y metilamelaminas, acetogeninas, camptotecina a, BEZ-235, bortezomib, briostatina, calistatina, CC-1065, ceritinib, crizotinib, criptoficinas, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, erlotinib, pancratistatina, sarcodictina a, esponjistatina, mostazas nitrogenadas, antibióticos, dinemicina enedine, bisfosfonatos, esperamicina, cromoproteína cromoforos de antibiótico enedine, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, canfosfamida, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, ciclosfosfamida, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, exemestano, fluorouracilo, fulvestrant, gefitinib, idarubicina, lapatinib, letrozol, lonafarnib, marcelomicina, acetato de megestrol, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, pazopanib, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rapamicina, rodorubicina, sorafenib, estreptonigrina, estreptozocina, tamoxifeno, citrato de tamoxifeno, temozolomida, tepodina, tipifarnib, tubercidina,

ubenimex, vandetanib, vorozol, XL-147, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, análogos del ácido fólico, análogos de purina, andrógenos, anti-adrenales, relleno de ácido fólico tal como ácido frolinico, aceglatona, aldofosfamida glicosido, ácido aminolevulinico, eniluracil, amsacrina, bestrabucil, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diaziquona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglucid, nitrato de galio, hidroxurea, lentinan, lonidainina, maitansinoides, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, losoxantrona, ácido podofilinico, 2- etilhidrazida, procarbazona, complejo polisacárido, razoxana; rizoxina; SF-1126, sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosido; ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, cloranbucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, vinblastina; platino; etoposido; ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; teniposido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan, inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina; retinoides; capecitabina; combretastatina; leucovorina; oxaliplatino; XL518, inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR y VEGF-A que reducen la proliferación de la célula y las sales o solvatos, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormona en los tumores tal como anti-estrógenos y anticuerpos selectivos de receptor de estrógeno, inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, la cual regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, y anti-andrógenos; así como troxacitabina (un análogo de 1,3- dioxolan nucleosido citosina); oligonucleótidos antisentido, ribozimas tal como un inhibidor de la expresión de VEGF y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® inhibidor de la topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina y Esperamicinas y las sales o solvatos, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los agentes anticancerígenos comprenden a los compuestos comercialmente o clínicamente disponibles tal como erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS No. 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino(II), CAS No. 15663-27-1), carboplatino (CAS No. 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-

N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®, y doxorubicina (ADRIAMICINA®). Agente anticancerígenos adicionales comercialmente o clínicamente disponibles comprenden oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sutent (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (Cremophor-libre), formulaciones de paclitaxel en nanopartícula de albumina modificada (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), cloranmbucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugén), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); vinorelbina (NAVELBINE®); capecitabina (XELODA®, Roche), tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno, FARESTON® (citrato de toremifina) MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestania, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca).

El término “sal farmacéuticamente aceptable” o “sal” se refiere a sales orgánicas o inorgánicas de una molécula o macromolécula. Las sales de adición ácida se pueden formar con grupos amino. Ejemplos de sales incluyen, pero no se limitan a sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, y pamoato (es decir, 1,1' metilen bis-(2-hidroxi 3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraion. El contraión puede ser cualquier residuo orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto parental. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Cuando múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable, la sal puede tener múltiples contraiones. Por lo tanto, la sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraión(es).

La expresión “solvato farmacéuticamente aceptable” o “solvato” se refiere a una asociación de una o más moléculas de solvente y una molécula o macromolécula. Ejemplos de solventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina.

5 En otras modalidades los anticuerpos o ADC de la presente invención se pueden usar en combinación con uno cualquiera de un número de anticuerpos (o agentes inmunoterapéuticos) presentemente en ensayos clínicos o comercialmente disponibles. Los anticuerpos descritos se pueden usar en combinación con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de

10 abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, arcitumomab, atezolizumab, bavituximab, bectumomab, bevacizumab, bivatuzumab, blinatumomab, brentuximab, cantuzumab, catumaxomab, cetuximab, citatuzumab, cixutumumab, clivatuzumab, conatumumab, daratumumab, drozitumab, duligotumab, dusigitumab, detumomab, dacetuzumab, dalotuzumab, ecomeximab, elotuzumab, ensituximab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, futuximab, ganitumab, gemtuzumab, girentuximab,

15 glembatumumab, ibritumomab, igovomab, imgatuzumab, indatuximab, inotuzumab, intetumumab, ipilimumab, iratumumab, labetuzumab, lambrolizumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, mapatumumab, matuzumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, moxetumomab, narnatumab, naptumomab, necitumumab, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomabn, obinutuzumab, ocaratuzumab, ofatumumab, olaratumab, olaparib, onartuzumab,

20 oportuzumab, oregovomab, panitumumab, parsatuzumab, patritumab, pembrolizumab, pentumomab, pertuzumab, pidilizumab, pintumomab, pritumumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, satumomab, selumetinib, sibrotuzumab, siltuximab, simtuzumab, solitomab, tacatuzumab, taplitumomab, tenatumomab, teprotumumab, tigatuzumab, tositumomab, trastuzumab, tucotuzumab, ublituximab, veltuzumab, vorsetuzumab,

25 votumumab, zalutumumab, CC49, 3F8, MDX-1105 y MEDI4736 y combinaciones de los mismos.

Otras modalidades comprenden el uso de anticuerpos aprobados para terapia de cáncer incluyendo, pero que no limitado a, rituximab, gemtuzumab ozogamcin, alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, tositumomab, bevacizumab, cetuximab, patitumumab, ofatumumab, ipilimumab y brentuximab vedotin. Aquellas personas expertas en el arte serán capaces de identificar fácilmente

30 agentes anticancerígenos adicionales que sean compatibles con las enseñanzas aquí descritas.

E. Radioterapia

La presente invención también provee de la combinación de anticuerpos o ADC con radioterapia (es decir, cualquier mecanismo para inducir daño en el ADN que se encuentra

localmente dentro de las células tumorales tal como irradiación gamma, rayos X, irradiación UV, microondas, emisiones electrónicas y similares). También se contempla la terapia de combinación que usa la entrega dirigida de radioisótopos a células tumorales, y los anticuerpos o ADC descritos se pueden usar en conexión con un agente anticancerígeno dirigido u otros medios dirigidos. Por lo general, la terapia de radiación es administrada en pulsos a lo largo de un período de tiempo desde alrededor de 1 hasta alrededor de 2 semanas. La terapia de radiación se puede administrar a individuos que tienen cáncer de cabeza y cuello por alrededor de 6 a 7 semanas. Opcionalmente, la terapia de radiación se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples, secuenciales.

10 VIII. Indicaciones

La invención provee del uso de anticuerpos y ADC de la invención para el diagnóstico, teragnosis, tratamiento y/o profilaxis de varios desórdenes incluyendo desórdenes neoplásicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos y desórdenes causados por patógenos. En determinadas modalidades las enfermedades a ser tratadas comprenden condiciones neoplásicas que comprenden tumores sólidos. En otras modalidades las enfermedades a tratar comprenden neoplasias malignas hematológicas. En determinadas modalidades los anticuerpos o ADC de la invención se utilizarán para tratar tumores o células tumorigénicas que expresan un determinante MFI2. Preferentemente el “individuo” o “paciente” a ser tratado será un humano aunque, como se utiliza aquí, los términos son expresamente entregados para comprender cualquier especie de mamífero.

Las condiciones neoplásicas sometidas a tratamiento de acuerdo con la presente invención pueden ser benignas o malignas; tumores sólidos o malignidades hematológicas; y pueden ser seleccionadas del grupo que incluye, pero que no está limitado a: tumores suprarrenales glándula, los cánceres asociados con SIDA, sarcoma alveolar de partes blandas, tumores astrocíticos, tumores de los ganglios autonómicos, cáncer de vejiga (carcinoma de células escamosas y carcinoma de células transicionales), desórdenes blastocoélicos, cáncer de hueso (adamantinoma, quistes óseos aneurismático, osteocondroma, osteosarcoma), cánceres cerebrales y de la médula espinal, tumores metastásicos cerebrales, cáncer mamario, tumores del cuerpo carotídeo, cáncer cervical, condrosarcoma, cordoma, carcinoma cromóforo de células renales, carcinoma de célula clara, cáncer de colon, cáncer colorectal, histiocitomas fibrosas benignas cutáneas, tumores pequeños de células redondas pequeñas, ependimomas, desórdenes epiteliales, tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extraesquelético, fibrogénesis imperfecta ossium, displasia fibrosa del hueso, cánceres de las vías biliares y la vesícula biliar, cáncer gástrico, intestinal, enfermedad

trofoblástica gestacional, tumores de célula germinal, desórdenes glandulares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hipotálamo, cáncer intestinal, tumores de célula de islote, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (nefroblastoma, carcinoma papilar célula renal), leucemias, lipoma/tumores lipomatosos benignos, liposarcoma/tumores lipomatosos malignos, cáncer de hígado (hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular), linfomas, cáncer pulmonares (carcinoma de célula pequeña, adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula grande etc.), desórdenes macrofagales, meduloblastoma, melanoma, meningiomas, neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinomas papilares de tiroides, tumores de paratiroides, cánceres pediátricos, tumores de la vaina del nervio periférico, feocromocitoma, tumores hipofisarios, cáncer de próstata, melanoma unveal posterior, desórdenes hematológicos raros, cáncer metastásico renal, tumor rabdoide, rabdomsarcoma, sarcomas, cáncer de piel, sarcomas de tejido blando, cáncer de célula escamosa, cáncer de estómago, desórdenes estromales, sarcoma sinovial, cáncer testicular, carcinoma tímico, timoma, cáncer metastásico de tiroides, y cánceres uterinos (carcinoma de cérvix, carcinoma endometrial, y leiomioma).

En determinadas modalidades los compuestos y composiciones de la presente invención se usarán como una terapia de línea frontal y se administrarán a individuos que no han sido previamente tratados para la condición cancerosa. En otras modalidades los compuestos y composiciones de la presente invención se usarán para tratar individuos que han sido previamente tratados (con anticuerpos o ADC de la presente invención o con otros agentes anticancerígenos) y que han recaído o se ha determinado que son refractarios al tratamiento previo. En modalidades seleccionadas los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar individuos que poseen tumores recurrentes.

En determinadas modalidades seleccionadas el desorden proliferativo a ser tratado comprenderá un tumor sólido incluyendo, pero que no limitado a, tumor adrenal, de hígado, de riñón, de vejiga, de mama, gástrico, de ovario, cervical, uterino, de esófago, colorrectal, de próstata, de páncreas, de pulmón (tanto de células pequeñas y de células no pequeñas), de tiroides, carcinomas, sarcomas, glioblastomas y varios tumores de cabeza y cuello.

En otras modalidades seleccionadas, y como se muestra en los Ejemplos más abajo, los conjugados descritos de droga anticuerpo son particularmente efectivos para tratar cáncer mamario, incluyendo cáncer mamario triple negativo. En determinadas modalidades el cáncer mamario comprende BR tipo Basal, BR-HER2, BR-LumA, BR-LumB o tumores indefinidos de BR, En una modalidad, el individuo que sufre de cáncer mamario es refractario, ha recaído o es resistente al tratamiento con un fármaco seleccionado del grupo que consiste de capecitabina (por ejemplo

xeloda), carboplatino (por ejemplo Paraplatin), cisplatino (por ejemplo platinol), ciclofosfamida (por ejemplo neosar), docetaxel (por ejemplo docefrez o taxotere), doxorubicina (por ejemplo adriamicina), doxorubicina liposomal pegilada (ejemplo por doxil), epirubicina (por ejemplo ellence), fluorouracilo (por ejemplo 5-fu o adrucil), gemcitabina (por ejemplo gemzar), metotrexato, paclitaxel (por ejemplo taxol), paclitaxel unido a proteína (por ejemplo abraxane), vinorelbina (por ejemplo navelbina), eribulina (por ejemplo Halaven), y ixabepilona (por ejemplo Ixempra). En otras modalidades el individuo sufre de un tumor mamario recurrente que aparece luego del tratamiento con uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste de capecitabina (por ejemplo xeloda), carboplatino (por ejemplo Paraplatin), cisplatino (por ejemplo platinol), ciclofosfamida (por ejemplo neosar), docetaxel (por ejemplo docefrez o taxotere), doxorubicina (por ejemplo adriamicina), doxorubicina liposomal pegilada (ejemplo por doxil), epirubicina (por ejemplo ellence), fluorouracilo (por ejemplo 5-fu o adrucil), gemcitabina (por ejemplo gemzar), metotrexato, paclitaxel (por ejemplo taxol), paclitaxel unido a proteína (por ejemplo abraxane), vinorelbina (por ejemplo navelbine), eribulina (por ejemplo halaven) y ixabepilona (por ejemplo ixempra).

Aun en otras modalidades preferidas los compuestos o composiciones se administrarán a un sujeto que padece de melanoma. Más generalmente las composiciones y métodos descritos aquí se pueden usar para diagnosticar, monitorear, tratar o prevenir el melanoma. El término “melanoma”, como se utiliza aquí, incluye a todos los tipos de melanoma incluyendo, pero que no está limitado a, melanoma primario, melanoma maligno, melanoma cutáneo, melanoma extracutáneo, melanoma de extensión superficial, melanoma polipoide, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanosarcomas, melanoma in situ, melanoma maligno nodular, lentigo maligno melanoma, melanoma lentiginoso, melanoma maligno lentiginoso, melanoma lentiginoso mucosal, melanoma de mucosa, melanoma lentiginoso acral, melanoma de tejidos blandos, melanoma ocular, melanoma invasivo, síndrome de lunar y melanoma atípico familiar (FAM-M), melanoma desmoplásico maligno o melanoma uveal.

El melanoma metastásico se puede derivar de melanocitos, nevos melanocíticos o nevos displásicos y puede evolucionar a través de diferentes fases de progresión del tumor (por ejemplo fase de crecimiento radial o fase de crecimiento vertical. El melanoma puede ser causado por anormalidades cromosómicas, crecimiento degenerativo y/o desórdenes de desarrollo, agentes mitogénicos, radiación ultravioleta, infecciones virales, agentes carcinogénicos, diversas mutaciones genéticas o la expresión anormal de un gen.

En otras modalidades, los anticuerpos y ADC descritos son especialmente efectivos para tratar cáncer pulmonar, incluyendo los siguientes subtipos: cáncer pulmonar de células pequeñas y cáncer pulmonar de células no pequeñas (por ejemplo cáncer pulmonar de células no pequeñas de

célula escamosa o cáncer pulmonar de células pequeñas de célula escamosa). En modalidades seleccionadas los anticuerpos y los ADC se pueden administrar a pacientes que exhiben una enfermedad de etapa limitada o una enfermedad de etapa extensa. En otras modalidades los anticuerpos conjugados descritos se administrarán a pacientes refractarios (es decir, aquellos cuya enfermedad reaparece durante o poco después de completar un curso de terapia inicial); pacientes sensibles (es decir, aquellos cuya recaída es más de 2 a 3 meses luego de la terapia primaria); o pacientes que exhiben resistencia a un agente basado en platino (por ejemplo carboplatino, cisplatino, oxaliplatino) y/o un taxano (por ejemplo docetaxel, paclitaxel, larotaxel o cabazitaxel).

Con respecto a malignidades hematológicas además, se apreciará que los compuestos y métodos de la presente invención pueden ser particularmente efectivos para tratar una variedad de linfomas de célula B, incluyendo linfoma de célula folicular de bajo grado / NHL (FCC), linfoma de células del manto (MCL), linfoma difuso de células grandes (DLCL), linfocítico pequeño (SL) NHL, NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblastico la grado alto, NHL linfoblástica de alto grado, NHL de células pequeñas no degradadas de alto grado, enfermedad NHL voluminosa, Macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma linfoplasmacitoide (LPL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células grandes (DLCL), linfoma de Burkitt (BL), linfomas relacionados con SIDA, linfoma de célula B monocítica, linfadenopatía angioinmunoblástica, linfocítico pequeño, folicular, difuso de células grandes, difuso de células pequeñas degradadas, linfoblastoma inmunoblástico de células grandes, pequeñas, no degradadas, de Burkitt y de no Burkitt, folicular, de células predominantemente grandes; folicular, de células predominantemente pequeñas no degradadas; y linfoma folicular, de células mixtas pequeñas degradadas y grandes. Véase, Gaidono et al., "Lymphoms", IN CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, Vol. 2: 2131-2145 (DeVita et al., eds., 5.sup.th ed. 1997). Debe ser claro para aquellos expertos en el arte que estos linfomas a menudo tienen diferentes nombres debido a los sistemas de clasificación cambiantes, y que los pacientes que tienen linfomas clasificados bajo nombre diferentes también se pueden beneficiar de los regímenes terapéuticos combinados de la presente invención.

IX. Artículos de Manufactura

La invención incluye envases y kits farmacéuticos que comprenden uno o más envases, donde un envase puede comprender una o más dosis de un anticuerpo o ADC de la invención. En determinadas modalidades, el envase o kit contiene una dosis unitaria, lo que representa una cantidad predeterminada de una composición que comprende, por ejemplo, un anticuerpo o ADC de la invención, con o sin uno o más agentes adicionales y opcionalmente, uno o más agentes

anticancerígenos.

El kit de la invención generalmente contendrá en un envase adecuado una formulación farmacéuticamente aceptable del anticuerpo o ADC de la invención y, opcionalmente, uno o más agente anticancerígenos en el mismo o diferentes envases. Los kit pueden también contener otras formulaciones o dispositivos farmacéuticamente aceptables, ya sea para diagnóstico o terapia de combinación. Ejemplos de dispositivos o instrumentos de diagnóstico incluyen a aquellos que se pueden usar para detectar, monitorear, cuantificar o perfilar células o marcadores asociados con desórdenes proliferativos (para obtener una lista completa de tales marcadores, véase arriba). En algunas modalidades los dispositivos de pueden usar para detectar, monitorear y/o cuantificar las células tumorales circulantes ya sea *in vivo* o *in vitro* (véase, por ejemplo, la WO 2012/0128801). Aún en otras modalidades las células tumorales circulantes pueden comprender células tumorigénicas. Los kit contemplados por la invención pueden también contener reactivos adecuados para combinar el anticuerpo o ADC de la invención con un agente anticancerígeno o un reactivo de diagnóstico (por ejemplo véase la patente US 7.422.739).

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida puede ser no acuosa, sin embargo, se prefiere una solución acuosa, siendo algunos con una solución acuosa estéril. La formulación en el kit también se puede proveer como polvo(s) seco(s) o en forma liofilizada la cual se puede reconstituir con la adición de un líquido adecuado. El líquido que se usa para la reconstitución puede estar contenido en un envase separado. Tales líquidos pueden comprender tampón(es) u otros diluyente(s) estériles, farmacéuticamente aceptables tal como agua bacteriostática para inyección, solución salina de fosfato tamponada, solución de Ringer o solución de dextrosa. Cuando el kit comprende el anticuerpo o ADC de la invención en combinación con agentes o productos terapéuticos adicionales, la solución puede estar premezclada, ya sea en una combinación equivalente molar, o con un componente en exceso del otro. Alternativamente, el anticuerpo o ADC de la invención y cualquier agente anticancerígeno opcional u otro agente se puede mantener de manera separada dentro de envases diferentes antes de la administración a un paciente.

El kit puede comprender uno o varios contenedores y una etiqueta o inserto de kit en, sobre o asociado con el contenedor(es), que indica que la composición adjunta se utiliza para diagnosticar o tratar la condición de la enfermedad de elección. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los contenedores pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor(es) puede comprender un puerto de acceso estéril, por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede ser perforado por una aguja de inyección hipodérmica.

En algunas modalidades el kit puede contener un medio por el cual administrar el anticuerpo y cualquier componente opcional a un paciente, por ejemplo una o más agujas o jeringas (precargadas o vacías), un gotero, pipeta, u otros de tales tipos de aparato, del cual la formulación puede ser inyectada o introducirse en el individuo o se aplica a un área enferma del cuerpo. Los kits de la Invención también incluirán típicamente un medio para contener los viales, o similares, y otros componentes en confinamiento cerrado para la venta comercial, tal como, por ejemplo envases de plástico moldeados por soplado en los que se colocan y retienen los viales deseados y otros aparatos.

X. Misceláneos

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en conexión con la invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos comunes en la técnica. Además, a menos que sea requerido por el contexto, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos plurales incluirán al singular. Además, los intervalos que proporcionado en la descripción y en las cláusulas anexas incluyen a ambos puntos extremos y a todos los puntos entre los puntos extremos. Por lo cual, un rango de 2,0 a 3,0 incluye a 2,0, 3,0, y todos los puntos entre 2,0 y 3,0.

Por lo general, las técnicas de cultivo celular y de tejido, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química que se describen aquí son aquellos bien conocidos y comúnmente usados en el arte. La nomenclatura usada aquí, en asociación con tales técnicas, también es comúnmente usada en el arte. Los métodos y técnicas de la invención son por lo general realizados de acuerdo a métodos convencionales bien conocidos en el arte y como se describe en varias referencias que se citan a lo largo de la presente descripción a menos que se indique lo contrario.

XI. Referencias

La divulgación completa de todas las patentes, solicitudes de patentes, y publicaciones, y el material electrónico disponible (incluyendo, por ejemplo, las presentaciones de secuencias de nucleótido, por ejemplo en GenBank y RefSeq, y las presentaciones de secuencias de aminoácido, por ejemplo en SwissProt, PIR, PRF, PBD, y las traducciones de regiones codificantes anotados en GenBank y RefSeq) citadas aquí se incorporan por referencia, independientemente de si la frase "incorporado por referencia" es o no utilizada con relación a la referencia en particular. La anterior descripción detallada y los ejemplos que la siguen se han dado únicamente para claridad de comprensión. No hay limitaciones innecesarias deban entenderse de la misma. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos. Las variaciones obvias de un experto en el arte

se incluyen en la invención definida por las reivindicaciones. Cualquiera de los encabezados de sección usado aquí es solo para propósitos de organización y no deben interpretarse como limitantes de la materia individual descrita.

5 I. Resumen del Listado de Secuencia

Anexo a la presente solicitud se encuentra un listado de secuencias que comprende un número de secuencias de ácido nucleico y de aminoácido. La siguiente TABLA 3 proporciona un resumen de las secuencias incluidas.

TABLA 3

SEQ ID NO	Descripción
1	proteína de la región constante de la cadena liviana Kapa
2	proteína de la región constante de la cadena pesada de IgG1
3	Secuencia de aminoácido de MFI2 (# de Acceso NP_005920)
4-19	Reservadas
20	AND de SC57.1 VL
21	Proteína SC57.1 VL
22	ADN SC57.1 VH DNA
23	Proteína SC57.1 VH
24-91	Clones murinos adicionales
92-95	clon humanizado hSC57.5 (ADN y proteína)
96-97	clon humanizado hSC57.5v1 VH (ADN y proteína)
98-101	clon humanizado hSC57.32 (ADN y proteína)
102-103	clon humanizado hSC57.32v1 VH (ADN y proteína)
104-107	clon humanizado hSC57.43 (ADN y proteína)
108	proteína hSC57.5 de largo completo de la cadena liviana (lo mismo para hSC57.5v1 y hSC57.5ss1)
109	proteína hSC57.5 de largo completo de la cadena pesada
110	proteína hSC57.5v1ss1 de largo completo de la cadena pesada
111	proteína hSC57.5v1 de largo completo de la cadena pesada
112	proteína hSC57.32 de largo completo de la cadena liviana (lo mismo para

	hSC57.32v1 y hSC57.32ss1)
113	proteína hSC57.32 de largo completo de la cadena pesada
114	proteína hSC57.32ss1 de largo completo de la cadena pesada
115	proteína hSC57.32v1 de largo completo de la cadena pesada
116	proteína hSC57.43 de largo completo de la cadena liviana (lo mismo para hSC57.43ss1)
117	proteína hSC57.43 de largo completo de la cadena pesada
118	proteína hSC57.43ss1 de largo completo de la cadena pesada
119-121	CDRL1, CDRL2, CDRL3 de hSC57.5 (lo mismo para hSC57.5v1 y hSC57.5v1ss1)
122	CDRH1 de hSC57.5 (lo mismo para hSC57.5v1 y hSC57.5v1ss1)
123	CDRH2 de hSC57.5
124	CDRH2 de hSC57.5v1 (lo mismo para hSC57.5v1ss1)
125	CDRH3 de hSC57.5 (lo mismo para hSC57.5v1 y hSC57.5v1ss1)
126-128	CDRL1, CDRL2, CDRL3 de hSC57.32 (lo mismo para hSC57.32ss1 y hSC57.32v1)
129-131	CDRH1, CDRH2, CDRH3 de hSC57.32 (lo mismo para hSC57.32ss1 y hSC57.32v1)
132-134	CDRL1, CDRL2, CDRL3 de hSC57.43 (lo mismo para hSC57.43ss1)
135-137	CDRH1, CDRH2, CDRH3 de hSC57.43 (lo mismo para hSC57.43ss1)

II. Ejemplos

La invención, que en general se ha descrito anteriormente, se comprenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio ponderal, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es atmosférica o cercana a ella.

Los tipos de células tumorales PDX se denotan por una abreviatura seguida de un número, que indica la línea de células de tumor particular. El número de pasadas de la muestra ensayada se indica mediante p0-p# anexo a la denominación de la muestra, donde p0 es indicativo de una muestra no pasada obtenida directamente del tumor de un paciente and p# es indicativo del número

de veces que el tumor ha sido pasado a través de un ratón antes de ser ensayado. Como se utiliza aquí, las abreviaturas de los tipos de tumores y subtipos se muestran en la Tabla 4 de la siguiente manera:

5

TABLA 4

<u>Tipo de Tumor</u>	<u>Abreviación</u>	<u>Subtipo de Tumor</u>	<u>Abreviación</u>
Vejiga	BD		
Mamas	BR		
		Tipo basal	BR tipo Basal

		receptor de estrógeno positivo y/o receptor de progesterona positivo	BR-ERPR
		ERBB2/Neu positivo	BR- ERBB2/Neu
		HER2 positivo	BR-HER2
		triple-negativo	TNBC
		luminal A	BR-LumA
		luminal B	BR-LumB
		subtipo claudin de negativo triple	TNBC-CL
		claudin bajo	BR-CLDN bajo
		tipo normal	BR-NL
Cervical	CER		
Colorectal	CR		
		adenocarcinoma de recto	RE-Ad
Endometrial	EM		
Esofágico	ES		
Gástrico	GA		
		adenocarcinoma difuso	GA-Ad-Dif/Muc
		adenocarcinoma intestinal	GA-Ad-Int
		tumores estromales	GA-GIST
Glioblastoma	GB		
Cabeza y cuello	HN		
Riñón	KDY		
		carcinoma de células renales claras	KDY-CC
		carcinoma de células renales papilares	KDY-PAP
		carcinoma de células transicionales o uroteliales	KDY-URO
		desconocido	KDY-UNK
Hígado	LIV		
		carcinoma hepatocelular	LIV-HCC

		colangiocarcinoma	LIV-CHOL
Linfoma	LN		
Pulmón	LU		
		adenocarcinoma	LU-Ad
		Carcinoide	LU-CAR
		de células neuroendocrinas grandes	LU-LCC
		de células no pequeñas	NSCLC
		de células escamosas	LU-SCC
		de células pequeñas	SCLC
		de células fusiformes	LU-SPC
Ovárico	OV		
		de células claras	OV-CC
		Endometroideo	OV-END
		Suptipo mixto	OV-MIX
		mesodérmico maligno mixto	OV-MMMT
		Mucinoso	OV-MUC
		neuroendocrino	OV-NET
		Seroso papilar	OV-PS
		Seroso	OV-S
		de células pequeñas	OV-SC
		carcinoma de células transicionales	OV-TCC
Pancreático	PA		
		carcinoma de célula en acino	PA-ACC
		carcinoma duodenal	PA-DC
		adenocarcinoma mucinoso	PA-MAD
		Neuroendocrino	PA-NET
		adenocarcinoma	PA-PAC
		adenocarcinoma de tipo exocrino	PA-PACe

		adenocarcinoma ductal	PA-PDAC
		adenocarcinoma ampular	PA-AAC
Próstata	PR		
Piel	SK		
		Melanoma	MEL
		Carcinomas de células escamosas	SK-SCC
		melanoma uveal	UVM
Testicular	TES		
Tiroides	THY		
		carcinoma de tiroides medular	MTC

EJEMPLO 1

IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN MFI2 USANDO SECUENCIAMIENTO DE TRANSCRIPTOMA COMPLETO

Para caracterizar la heterogeneidad celular de los tumores sólidos, tal como existen en pacientes con cáncer e identificar blancos terapéuticos clínicamente relevantes, un gran banco de tumores PDX fue desarrollado y mantenido usando técnicas reconocidas en el arte. El banco de tumores PDX, que comprende un gran número de líneas celulares tumorales discretas, se propagó en ratones inmunocomprometidos a través de múltiples pasajes de las células tumorales originalmente obtenidas de pacientes que padecen de cáncer por una variedad de malignidades de tumor sólido. Los tumores PDX de bajo número de pasos son representativos de los tumores en sus ambientes nativos, lo que proporciona información clínicamente relevante sobre los mecanismos subyacentes que impulsan el crecimiento tumoral y la resistencia a las terapias actuales.

Células tumorales se pueden dividir ampliamente en dos tipos de subpoblaciones de células: células no tumorigénicas (NTG) y células iniciadoras de tumor (TIC). Las TIC tienen la capacidad de formar tumores cuando se implantan en ratones inmunocomprometidos. Las células madres cancerosas (CSC) son un subconjunto de células TIC que son capaces de auto-replicarse indefinidamente mientras mantienen la capacidad de diferenciación multilínea. Las células NTG, mientras que a veces son capaces de crecer in vivo, no formarán tumores que recapitulen la heterogeneidad del tumor original cuando son implantadas.

Para poder realizar el análisis del transcriptoma completo, los tumores PDX fueron resecados de los ratones desde el banco de tumores, después de alcanzar los 800 – 2.000 mm³. Los tumores PDX resectados fueron disociados en suspensiones de células únicas utilizando técnicas de digestión enzimática reconocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la patente US 2007/0292414).

5 La masa de células tumorales disociadas se incubó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para detectar las células muertas, anticuerpos anti-CD45 de ratón y anticuerpos H-2K^d para identificar células de ratón y anticuerpo anti-EPCAM humano para identificar células humanas. Además las células tumorales se incubaron con anticuerpos anti-CD46 y/o CD324 humanos conjugados fluorescentemente para identificar células CSC CD46^{hi}CD324⁺ o células NTG CD46^{lo/-}CD324⁻ y
10 luego fueron ordenadas usando un clasificador de células FACS Aria (BD Biosciences) (véase las patentes U.S. 2013/0260385, 2013/0061340 y 2013/0061342).

Se extrajo el ARN de las células tumorales mediante la lisis de las células en tampón de lisis RLTplus RNA (Qiagen) complementado con 1% de 2-mercaptoetanol, se congelaron los lisados a -80°C y luego se descongelaron los lisados para la extracción de ARN usando un kit de aislamiento
15 RNeasy (Qiagen). El ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) y/o un Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies). El ARN de tejido normal fue adquirido de diversas fuentes (Life Technology, Agilent, ScienCell, BioChain, y Clontech). Las preparaciones de ARN total resultantes fueron evaluadas por secuenciación genética y análisis de expresión de genes.

20 La secuenciación de alta calidad del transcriptoma de ARN completo se realizó con dos sistemas diferentes. Ciertas muestras tumorales BR y SK PDX se analizaron usando un Secuenciamiento Applied Biosystems (ABI) por Ligación/Detección de Oligos (SOLiD) 4.5 o el sistema de secuenciamiento de generación siguiente SOLiD 5500xl (Life Technologies). Se analizaron las muestras de tumor LU PDX usando un sistema de secuenciamiento de generación
25 siguiente Illumina HiSeq 2000 o 2500 (Illumina).

El análisis SOLiD del transcriptoma completo se realizó con ADNc, generado a partir de 1 ng de ARN proveniente de muestras tumorales BR clasificadas o de masa SK ya sea utilizando un protocolo de transcriptoma completo modificado de ABI diseñado para un bajo rendimiento de ARN total, o el sistema Ovation RNA-Seq V2[™] (NuGEN Technologies). La biblioteca de ADNc resultante
30 se fragmentó y se adicionaron adaptadores de código de barras para permitir la combinación de bibliotecas de fragmentos de diferentes muestras durante las corridas de secuenciamiento. Los datos generados por la plataforma SOLiD mapearon 34.609 genes según se anotó por RefSeq versión 47 usando la versión hg19 de NCBI 2 del genoma humano publicado y proporcionó mediciones verificables de los niveles de ARN en la mayoría de las muestras. Los datos de

secuenciación de la plataforma SOLiD están representados nominalmente como un valor de expresión de transcrito usando la métrica RPKM (lectura por kilobase por millón) mapeado como regiones de exón de genes, lo que permite un análisis básico de expresión génica para normalizar y enumerar como RPKM_Transcript. La expresión de ARNm de MFI2 fue superior en células BR
5 CSC comparado con células NTG y tejidos normales en las siguientes líneas PDX: BR31 and BR25. La expresión de ARNm de MFI2 fue superior en masa de células PDX SK comparado con tejidos normales, incluyendo melanocitos en las siguientes líneas PDX: SK3 y SK13 (FIG.1A).

El análisis Illumina de transcriptoma completo se realizó con ADNc que se generó utilizando
5 ng de ARN total extraído de cualquiera de las subpoblaciones tumorales NTG o CSC que se
10 aislaron como se ha descrito anteriormente en este Ejemplo 1. La biblioteca se creó usando el kit de Preparación de Muestra TruSeq RNA Kit v2 (Illumina). La biblioteca de ADNc resultante fue fragmentada y asignada con código de barras. Los datos de secuenciación de la plataforma Illumina están representados nominalmente como un valor de fragmento de expresión usando la métrica FPKM (fragmento por kilobase por millón) mapeado a regiones de exones de genes, lo que permite
15 que un análisis básico de expresión génica sea normalizado y enumerado como FPKM_Transcript. La expresión de ARNm de MFI2 en la subpoblación de células tumorales CSC fue superior que la expresión en ambas células normales y comparada con la población celular NTG en las siguientes líneas celulares tumorales LU y CR PDX: LU120, LU128, LU152, LU244 y CR4 (FIG. 1B).

La identificación de la expresión de ARNm de MFI2 elevada en tumores PDX BR, SK, LU y
20 CR indicó que MFI2 merecía una mayor evaluación como un potencial blanco de diagnóstico e inmunoterapéutico. Por otra parte, el aumento de la expresión de MFI2 en CSC comparado con NTG en tumores PDX BR, CR y LU indica que MFI2 es un buen marcador de células tumorigénicas en este tipo de tumores.

EJEMPLO 2

EXPRESIÓN DE ARNM DE MFI2 EN TUMORES USANDO QRT-PCR

El gen MFI2 humano codifica dos transcritos: una isoforma de 16 exones de longitud de 2377
bp (Genbank Accession: NM_005929) y una isoforma más corta de 7 exones de 1651 bp (Genbank
Accession: NM_033316). Los seis primeros exones de las isoformas corta y larga son idénticos. Sin
embargo, el séptimo y último exón de la isoforma corta comprenden una señal de terminación en
marco, que resulta en la proteína truncada. La isoforma larga de la proteína MFI2 ("hMFI2") es una
30 proteína GPI anclada a membrana de 738 aminoácidos. La isoforma corta ("hΔMFI2") tiene una longitud prevista de 302 aminoácidos y no tiene ningún motivo de anclaje GPI; por lo tanto, se piensa que es una proteína secretada. La FIG. 2A es un esquema de hMFI2, mostrando ambas isoformas.

Los anticuerpos anti-MFI2 de la invención se pueden usar como un tratamiento o método de diagnóstico efectivo de tumores independientemente de si se unen a la isoforma larga o corta, sin embargo, es particularmente ventajoso para los anticuerpos de la invención unirse a la isoforma larga anclada a la membrana con el fin de optimizar la localización del anticuerpo a la localización del tumor y aumentar la internalización del anticuerpo. Para confirmar los resultados de los ejemplos 1 y 2 y para determinar que isoforma de hMFI2 se expresó en varias líneas celulares tumorales PDX.

Para confirmar la expresión ARN MFI2 en células tumorales, se realizó qRT-PCR en varias líneas celulares PDX usando el sistema Fluidigm BioMark™ HD de acuerdo a protocolos estándar de la industria. Se extrajo ARN de la masa de células tumorales PDX o de subpoblaciones de células CSC y NTG clasificadas como se describe en el Ejemplo 1, 1 ng de ARN se convirtió en ADNc utilizando el kit de Alta Capacidad de Archive ADNc (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego se usó el material de ADNc, pre-amplificado usando un ensayo Taqman específico para la isoforma MFI2 larga, para los posteriores experimentos qRT-PCR.

La expresión en tejidos normales (NormTox o Norm) fue comparada con la expresión en las líneas celulares tumorales BR, CR, EM, LU, PA y SK PDX (FIG. 2B; cada punto representa el promedio de expresión relativa de cada tejido o línea celular PDX, con la línea horizontal pequeña que representa la media geométrica). “NormTox” representa muestras de diversos tejidos normales como sigue: adrenal, arteria, colon, ganglio de la raíz dorsal, esófago, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, músculo esquelético, piel, fibroblastos, queratinocitos, intestino delgado, bazo, estómago, tráquea y vena. Otro conjunto de Tejidos normales designado “Norm” representa las siguientes muestras de tejido normal con un menor riesgo de toxicidad presunta comparado con las células “NormTox” con relación a fármacos tipo ADC: células mononucleares de sangre periférica y varias subpoblaciones clasificadas (células B, monocitos, células NK, neutrófilos, células T), cerebro, mamas, melanocitos, médula ósea normal y diversas subpoblaciones clasificadas y testículos. La FIGURA 2B muestra que en promedio la expresión MFI2 fue mayor en mamas (Tipo BR Basal); colorectal, pulmón (LU-Ad, LU-LCC y LU-SCC); tumores pancreático y de piel (SK-MEL), así como un subconjunto de tumores EM, comparado con tejidos Norm y NormTox. Estos datos apoyan el hallazgo anterior de la elevada expresión de MFI2 en BR, LU y SK PDX comparado con tejidos normales.

También se determinó la expresión de MFI2 en varias líneas celulares tumorales PDX que habían sido clasificadas en células CSC y NTG como se describe en el Ejemplo 1 anterior. La expresión de MFI2 fue mayor en las células CSC comparada con la de células NTG en los siguientes subtipos de tumores: BR Tipo Basal (BR22, BR31); BR-CLDN bajo (BR25); CR (CR4); LU-Ad

(LU123); y LU-SCC (LU116, y LU128) (FIGURA 2C). En contraste con las líneas tumorales LU PDX mencionados, LU206 exhibió baja expresión de MFI2 (FIGURA 2B). Este hallazgo se confirmó más tarde al determinar el nivel de la proteína de expresión MFI2 en LU206 (véase Ejemplo 16 más adelante).

- 5 Estos resultados apoyan aún más la asociación observada entre los niveles de expresión de MFI2 y varios subtipos de tumores incluyendo BR, CR y LU.

EJEMPLO 3

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNM EN MFI2 EN TUMORES USANDO MICROARREGLO

Se llevaron a cabo experimentos de microarreglos para GPI de largo completo anclado a la isoforma hMFI2 y se analizaron los datos de la siguiente manera. Se extrajo 1-2 µg de ARN total de tumor sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1, desde las líneas celulares PDX BR, CR, LU, PA y SK. Las muestras se analizaron usando la plataforma de microarreglo Agilent SurePrint GE Human 8x60 v2, que contiene 50.599 sondas biológicas diseñadas contra 27.958 genes y 7.419 lncARN en el genoma humano. Se utilizaron prácticas estándar de la industria para normalizar y transformar los valores de intensidad con el fin de cuantificar la expresión génica para cada muestra. La intensidad normalizada de la expresión de MFI2 en cada muestra se representa en la FIGURA 3 y la media geométrica derivada para cada tipo de tumor se indica a través de la barra horizontal.

La FIGURA 3 muestra que la isoforma larga de MFI2 se expresa en BR (BR tipo Basal, BR-CLDN bajo, BR-HER2, BR-NL), CR, LU (LU-Ad, LU-SCC), PA y SK comparado con tejidos normales. La observación de la expresión de MFI2 elevada en los tipos de tumores mencionados anteriormente confirma los resultados de los Ejemplos 1 y 2. Además, LU206 se demostró no expresar MFI2, confirmando los resultados de la citometría de flujo para esta línea tumoral PDX particular que se describieron en el Ejemplo 16. Específicamente, BR25, BR31 y CR4, que fueron analizados en las tres plataformas, muestran elevada expresión de MFI2 de la isoforma larga cuando se mide por la secuenciación del ARN del transcriptoma completo (Ejemplo 1), qRT-PCR (Ejemplo 2) y por microarreglo (Ejemplo 3). Estos datos demuestran que la isoforma larga de MFI2 se expresa en un número de subtipos tumorales incluyendo BR, CR, LU, PA y SK, y puede ser un buen blanco para el desarrollo de una terapia basada en anticuerpo en estas indicaciones.

EJEMPLO 4

EXPRESIÓN DE MFI2 EN TUMORES QUE USAN EL GENOMA ATLAS DE CÁNCER (THE CANCER GENOME ATLAS)

La sobreexpresión del ARNm de hMFI2 en varios tumores se confirmó usando un gran conjunto de datos, disponibles públicamente de los tumores primarios y de muestras normales conocido como El Genoma de Cáncer Atlas (TCGA). Los datos de la expresión de hMFI2 de la plataforma IlluminaHiSeq_RNASeqV2 fue descargada del Portal de Datos TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaDownload.jsp>) y se analizó para agregar las lecturas de los exones individuales de cada gen para generar un único valor de lectura por kilobase de exon por millón de lecturas mapeadas (RPKM). La FIGURA 4A muestra que la expresión de MFI2 es elevada en las siguientes líneas tumorales PDX comparada con el tejido normal: BD, BR (BR-TNBC); CR; RE-Ad, ES, GA, LU (LU-Ad, LU-SCC); OV; PA; y SK. Estos datos confirman que se pueden encontrar niveles elevados de ARNm de MFI2 en los tipos de tumores mencionados anteriormente, indicando que los anticuerpos anti-MFI2 y los ADC pueden ser agentes terapéuticos útiles para estos tumores.

La FIGURA 4B muestra las curvas de supervivencia de Kaplan Meier para un subconjunto de tumores LU-Ad TCGA donde los datos de supervivencia de los pacientes estaban disponibles. Los pacientes fueron clasificados sobre la base de la alta expresión de ARNm de MFI2, es decir una expresión sobre el valor índice límite o una baja expresión de ARNm de MFI2 es decir expresión bajo el valor índice límite en tumores LU-Ad. El valor índice límite fue calculado como la media aritmética de los valores RPKM, el cual fue calculado como 5,42.

Los “números en riesgo” indicados a continuación del gráfico muestra el número de pacientes sobrevivientes que quedan en el conjunto de datos cada 1000 días después del día en que cada paciente fue diagnosticado por primera vez (día 0). Las dos curvas de supervivencia son significativamente diferentes ($p=0,0002$) por el ensayo Log-rank (Mantel-Cox) de $p=0,0004$ por el ensayo Gehan-Breslow-Wilcoxon. Estos datos muestran que los pacientes con tumores LU-Ad que exhiben alta expresión de MFI2 tienen un tiempo de supervivencia mucho más corto comparado con pacientes con tumores LU-Ad que exhiben baja expresión de MFI2. Esto sugiere la utilidad de anti-MFI2 terapias para tratar LU-Ad, y la utilidad de la expresión de MFI2 como un biomarcador de pronóstico sobre la base de cuales decisiones de tratamiento se pueden hacer.

EJEMPLO 5

CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MFI2 RECOMBINANTES Y MODIFICACIÓN POR INGENIERÍA GENÉTICA DE LÍNEAS CELULARES QUE SOBREENPRESAN PROTEÍNAS MFI2 EN LA SUPERFICIE CELULAR

MFI2 Humano (hMFI2).

Para generar todos los materiales moleculares y celulares de la presente invención que pertenecen a la proteína hMFI2, se adquirió un clon de ADNc de MFI2 humano comercial de Thermo Scientific (IMAGE clon 100016036; acceso BC152832), de los cuales se determinó que el marco de

lectura abierto por análisis BLAST codifica una proteína 100% idéntica a la RefSeq para hMFI2, acceso NP_005920. El clon de ADNc BC152832 se usó para todas las construcciones modificadas por ingeniería genética posteriores que expresan la proteína hMFI2 madura o los fragmentos de la misma.

5 Para producir anticuerpos inmunoreactivos a la proteína hMFI2, se generó un gen de fusión quimérico en el cual el dominio extracelular (ECD) de la proteína hMFI2 se fusionó en marco ya sea con una etiqueta de Histidina o una etiqueta Fc de IgG2 humana. Esto fue realizado como sigue: un fragmento de ADN que codifica el ECD de hMFI2 (residuos G20 – C709) se amplificó por PCR a partir del clon de ADNc BC152832 y se subclonó en un vector de expresión dirigido por CMV en marco y aguas abajo de una secuencia de péptido señal de inmunoglobulina kappa (IgK) y aguas
10 arriba ya sea de una etiqueta de Histidina o de un ADNc de Fc de IgG2 humana, usando técnicas moleculares estándar.

 El vector de expresión dirigido por CMV de hMFI2 permite un alto nivel de expresión transiente de células HEK293T y/o CHO-S. La suspensión o los cultivos adherentes de células
15 HEK293T, o la suspensión de células CHO-S fueron transfectadas con construcciones de expresión que codifican las proteínas hMFI2K-ECD-His o hMFI2 ECD-Fc, usando polímero de polietilenimina como el reactivo de transfección. De tres a cinco días después de la transfección, las proteínas hMFI2-ECD-His o hMFI2-ECD-Fc se purificaron a partir de células-sobrenadantes clarificadas utilizando un explorador AKTA y columnas Nickel-EDTA (Qiagen) o MabSelect SuRe™ de Proteína
20 A (GE Healthcare Life Sciences), respectivamente.

MFI2 de rata (rMFI2).

 Para poder ensamblar las construcciones que codifican el ECD de rMFI2 fusionado en marco ya sea con una etiqueta de Histidina o una etiqueta Fc de IgG2 humana, la secuencia contenida en
25 el acceso NCBI NM_001105872 se usó para diseñar tres trozos de ADN sintético que se sobrelapan (gBlocks, IDT), los que fueron entonces clonados en un vector de expresión dirigido por CMV en marco y aguas abajo de una secuencia de péptido señal de IgK y aguas arriba ya sea de una etiqueta de Histidina o una etiqueta Fc de IgG2 humana, usando una técnica *in vitro* de recombinación (In-Fusion, Clontech) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se produjeron
30 las proteínas recombinantes como se describe para las proteínas hMFI2, arriba.

Línea celular modificada por ingeniería genética

 Las líneas celulares modificadas por ingeniería genética que sobreexpresan hMFI2 se construyeron utilizando vectores lentivirales para transducir líneas celulares HEK293T utilizando

técnicas reconocidas en el arte. En primer lugar, se utilizaron técnicas estándar de clonación molecular para introducir secuencias de nucleótidos que codifican un péptido señal de IgK seguido de una etiqueta de epítipo DDDK aguas arriba del sitio de clonación múltiple de pCDH-EF1-MCS-T2A-GFP (System Biosciences), creando un vector pCEMT. La Secuencia T2A en pCEMT promueve la omisión ribosomal de una condensación de enlace peptídico, resultando en la expresión de dos proteínas independientes: alto nivel de expresión de proteínas de superficie celular etiquetadas con DDDK codificadas aguas arriba del Péptido T2A, con co-expresión de la proteína marcadora GFP codificada aguas abajo del Péptido T2A. Se usó pCEMT para crear diversos vectores MFI2 de la siguiente manera: un fragmento de ADN que codifica la proteína hMFI2 madura (residuos G20- L738) se generó mediante amplificación por PCR, usando el clon de ADNc BC152832 como templado, con el producto resultante de PCR subclonado en marco aguas abajo de la etiqueta péptido señal de IgK - de epítipo DDDK en pCEMT. Esto produjo el vector lentiviral pL120-hMFI2. Este vector lentiviral se utilizó para crear líneas celulares estable basadas en HEK293T que sobreexpresan la proteína hMFI2 utilizando técnicas estándar de transducción lentiviral bien conocidas para aquellos expertos en el arte, seguido por selección celular MFI2 positiva y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de subclones de HEK293T de alta expresión (por ejemplo células que fueron fuertemente positivas para GFP y el epítipo FLAG).

EJEMPLO 6

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MFI2

Para producir anticuerpos de ratón anti-MFI2 se inoculó un ratón Balb/c con 10 µg de proteína hMFI2-His junto con adyuvantes adecuados. Después de la inoculación inicial el ratón se inyectó dos veces por semana por 4 semanas con 10 µg de proteína hMFI2-His junto con adyuvantes adecuados, donde se llevó a cabo la inoculación final utilizando 10 µg de proteína hMFI2-His junto con adyuvantes adecuados.

El ratón fue sacrificado y fueron disecados los ganglios linfáticos que drenan (poplítea, inguinal, ilíaca y medial) y se utilizó como una fuente para células que producen anticuerpo. Una suspensión de células B individuales (430×10^6 células) se fusionó con células de mieloma no secretora P3x63Ag8.653 (ATCC # CRL-1580) en una proporción de 1:1 por electro fusión celular utilizando un modelo inmune BTX HybriSystem (BTX Harvard Apparatus). Las células fueron resuspendidas en medio de selección de hibridoma que consiste de medio DMEM complementado con azaserina, 15% de suero de clon I fetal, 10% de medio acondicionado BM, 1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de HEPES, 100 IU de penicilina-estreptomicina, y 50 µM de 2-mercaptoetanol, y se cultivaron en cuatro matraces T225 de 100 ml de medio de selección por matraz. Los matraces

se colocaron en un incubador humidificado a 37 °C que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire durante seis días.

Seis días después de la fusión la biblioteca de células de hibridoma se recolectó de los matraces y la biblioteca se almacenó en nitrógeno líquido. Los viales congelados se descongelaron en matraces T75 y al día siguiente se plaquearon las células de hibridoma a una célula por pocillo (usando el separador de células FACSAria I) en 90 µL de medio de selección de hibridoma complementado (como se describió antes) en 15 placas Falcon de 384-pocillos.

Los hibridomas fueron cultivados por 10 días y los sobrenadantes se monitorearon para anticuerpos específicos para hMFI2 usando citometría de flujo realizada de la siguiente manera. Se incubaron 1x10⁵ células HEK293T por pocillo transducidas establemente con hMFI2 por 30 minutos con 25 µL de sobrenadante de hibridoma. Se lavaron las células con PBS/2% FCS y luego fueron incubadas con 25 µL por muestra de IgG de cabra anti-ratón marcada con DyeLight 649, fragmento Fc secundario específico diluido 1:300 en eBS/2%FCS por 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS/2%FCS y se re-suspendieron en PBS/FCS 2% con DAPI y analizada por citometría de flujo para la fluorescencia que excede aquella de las células teñidas con un anticuerpo isotipo control. El resto de las células de hibridoma de la biblioteca no usada se congelaron en nitrógeno líquido para futuras pruebas de biblioteca y selección.

La campaña de inmunización con hMFI2-His produjo anticuerpos de ratón que se unen específicamente a la superficie de células HEK293T que expresan hMFI2.

EJEMPLO 7

CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MFI2

Varios métodos se usaron para caracterizar a los anticuerpos anti-MFI2 de ratón generados en el Ejemplo 6 en términos de isotipo, reactividad cruzada con MFI2 de rata, afinidad por MFI2 de rata, cinomolgo, y humano y binning de epítipo. La FIGURA 5 es una tabla que resume las características antes mencionadas, donde la indicación "ND" es "no determinado".

El isotipo de un número representativo de anticuerpos se determinó utilizando el kit Milliplex de isotipificación inmunoglobulina de ratón (Millipore) de acuerdo a los protocolos del fabricante. Los resultados para los anticuerpos MFI2 específicos únicos, se pueden observar en la FIGURA 5.

La afinidad de los anticuerpos anti-hMFI2 de ratón por MFI2-His de rata se determinó cualitativamente a partir de curvas de cinética generadas con un ForteBio RED como sigue. Se inmovilizaron 8 µg/mL de anticuerpos anti-MFI2 purificados en biosensores de captura de Fc anti-ratón con un tiempo de contacto de 3 minutos y una tasa de agitación de 1000 rpm. El anticuerpo capturado que se carga desde la línea base fue constante a las 0,3 a 1 unidades. Luego de la línea

basal de 50 segundos y la captura de anticuerpo, los biosensores se sumergieron en una solución de 300 nM de proteína hMFI2-His o rMFI2-His purificada para una fase de asociación de 60 segundos seguidos por una fase de disociación de 60 segundos a una velocidad de agitación de 1000 rpm. Los biosensores se regeneraron sumergiéndolos en glicina 10 mM, pH 1,7 luego de cada ciclo. Los datos se procesaron restando una respuesta de superficie de IgG de ratón control de la respuesta específica de anticuerpo y los datos se truncaron para la fase de asociación y disociación. Las curvas de asociación y disociación fueron utilizadas para estimar cualitativamente la capacidad de anticuerpos seleccionados para unirse a hMFI2 y rMFI2. De aquellos probados, se determinó que 8 anticuerpos reaccionaron de manera cruzada con rMFI2-His con alta afinidad comparado con los otros anticuerpos que fueron monitoreados (FIGURA 5).

La afinidad de anticuerpos de ratón y humanizados anti-hMFI2 selectos para la proteína MFI2 de humano, cinomolgo, o rata se determinó cuantitativamente mediante resonancia de plasma superficial usando un instrumento BIAcore 2000 (GE Healthcare). Se usó un kit de captura de anticuerpo para inmovilizar los anticuerpos de ratón o humanizados anti-MFI2 en un chip biosensor CM5. Antes de cada ciclo de inyección de antígeno, se capturaron anticuerpos de ratón o humanizados a una concentración de 0,01 - 1 $\mu\text{g/mL}$ en la superficie con un tiempo de contacto de 1 minuto y un caudal de 5 $\mu\text{L/minuto}$. La carga de anticuerpo capturado desde la línea de base fue constante a 80-120 unidades de respuesta. Luego de la captura de anticuerpo y una línea base de 1 minuto, se hizo fluir antígeno hMFI2-His monomérico, antígeno cMFI2-His, o antígeno rMFI2-His sobre la superficie en diferentes concentraciones para una fase de asociación de 1,5 minutos seguido por una fase de disociación de 5 minutos a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{L/minuto}$. Los datos se procesaron restando una respuesta de superficie de anticuerpo de no unión control de la respuesta de superficie de un anticuerpo específico y los datos se truncaron en la fase de asociación y disociación. Las curvas de respuesta resultantes fueron ajustadas con un modelo de unión 1:1 Langmuir para generar la afinidad aparente, las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} que usan BiaEvaluation Software 3.1 (GE Healthcare). Los anticuerpos seleccionados exhibieron afinidades por hMFI2, cMFI2, y rMFI2 en el rango nanomolar (FIGURA 5).

Los anticuerpos fueron agrupados en bin usando un inmunoensayo de competencia multiplexado (Luminex). 100 μL de cada anticuerpo anti-MFI2 único (Abm de captura) en una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ fue incubado por 1 hora con perlas magnéticas (Luminex) que se habían conjugado a un anticuerpo kapa anti-ratón (Miller et al., 2011, PMID: 21223970). Los complejos de perlas de Abm de captura/conjugado se lavaron con tampón PBSTA (1% de BSA en PBS con 0,05% de Tween 20) y luego se combinaron. Luego de la remoción del tampón de lavado residual se incubaron las perlas por 1 hora con 2 $\mu\text{g/mL}$ de proteína hMFI2-His, se lavaron y luego se

resuspendieron en PBSTA. La mezcla de perlas combinadas se distribuyó en una placa de 96 pocillos, donde cada pocillo que contiene un anticuerpo anti-MFI2 único (Abm detector) y se incubaron durante 1 hora con agitación. Después de una etapa de lavado, el anticuerpo anti-ratón kappa (el mismo que el utilizado anteriormente), conjugado a PE, fue agregado en una concentración de 5 µg/ml a los pocillos y se incubaron durante 1 hora. Las perlas se lavaron de nuevo y se resuspendieron en PBSTA. Se midieron los valores de intensidad de fluorescencia media (IMF) con un instrumento Luminex MAGPIX. El apareamiento del anticuerpo se visualizó como un dendrograma de una matriz de distancia calculada a partir de los coeficientes de correlación de Pearson de los pares de anticuerpos. Se determinó el binning sobre la base del dendrograma y el análisis de los valores MFI de los pares de anticuerpo. Los anticuerpos que tenían baja afinidad de unión por MFI2 y no podían ser colocados en un Bin específico se define que están en el Bin X. “ND” significa que no se realizó el experimento binning para el anticuerpo relevante. La FIGURA 5 muestra que los anticuerpos anti-MFI2 que se revisaron pueden agruparse en al menos cinco bin únicos (A-E) en la proteína hMFI2.

EJEMPLO 8

REACTIVIDAD CRUZADA DE ANTICUERPOS ANTI-MFI2 CON TRANSFERRINA

La hMFI2 es una transferrina (Tf) homóloga y comparte 37-39% de homología con la Tf humana. Hay dos formas de Tf humana, Apo-Tf, que es libre de hierro, y Holo-Tf, que es unida a hierro. Para poder determinar los anticuerpos de la invención se utilizó un ensayo ELISA.

Las placas se recubrieron con 5 µg/mL purificado de hMFI2-His, Holo-Tf (RnD cat. # 2914-HT) o Apo-Tf (RnD cat. # 3188-AT) en tampón PBS y se incubaron a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron luego con PBST (PBS más 0,05% de Tween 20) y se bloquearon con 3% de BSA en PBS por 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron y se agregaron 10 µL de anticuerpos anti-MFI2 a 1,4 µg/mL por 1 hora a temperatura ambiente. Un anticuerpo de detección IgG de cabra anti-ratón se sulfo etiquetó utilizando un MSD® SULFO-TAG éster NHS de acuerdo al protocolo del fabricante. MSD SULFO-TAG NHS-éster es una amina reactiva, éster N-hidroxisuccinimida que fácilmente se acopla a grupos de amina primaria de proteínas bajo condiciones levemente básica para formar un enlace amida estable. La placa se lavó y se agregó 10 µL/pocillo de 0,5 µg/mL de IgG de cabra anti-ratón marcada con sulfo por 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó y se agregó Tampón T MSD Read con surfactante fue diluida a 1X en agua y se agregó 35 µL a cada pocillo. Las placas se leyeron en un MSD Sector Imager 2400. Una señal alta indica la unión. De los 60 anticuerpos anti-MFI2 de ratón que se ensayaron, ninguno reaccionó cruzado ya sea con Apo-Tf o

con Holo-Tf. Estos resultados indican que los anticuerpos de la invención no reaccionan de manera cruzada con transferrina libre en plasma o en células normales que expresan Tf.

EJEMPLO 9

SECUENCIAMIENTO DE ANTICUERPOS MFI2

Los anticuerpos anti-MFI2 de ratón que fueron generados (Ejemplo 6) fueron secuenciados como se describe más adelante. El ARN total se purificó a partir células de hibridoma seleccionadas usando el Kit RNeasy Miniprep (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Entre 10^4 y 10^5 células se usaron por muestra. Las muestras de ARN aisladas fueron almacenadas a -80°C hasta que se usaron.

La región variable de la cadena pesada de la Ig de cada hibridoma se amplificó usando dos mezclas de partidor 5' que comprende ochenta y seis secuencias de partidores líder específicos de ratón diseñados para dirigirse al repertorio VH completo de ratón en combinación con un 3' partidor específico Cy de ratón para todos los isotipos de Ig de ratón. De manera similar, se usaron dos mezclas de partidores que contienen sesenta y cuatro secuencias líder 5' Vk diseñadas para amplificar cada una de las familias VK de ratón en combinación con un único partidor reverso específico para la región constante kapa de ratón para poder amplificar y secuenciar la cadena liviana kapa. Los transcritos VH y VL fueron amplificados desde 100 ng de ARN total usando el kit Qiagen One Step RT-PCR como sigue. Un total de cuatro reacciones RT-PCR fueron corridas para cada hibridoma, dos para la cadena liviana Vk y dos para la cadena pesada VH. Las mezclas de reacción PCR incluyeron 1,5 μL de ARN, 0,4 μL de 100 μM de partidores de cadena pesada o de cadena liviana kapa (IDT sintetizado personalizado), 5 μL de tampón 5x RT-PCR, 1 μL de dNTP, y 0,6 μL de mezcla de enzima que contiene transcriptasa inversa y ADN polimerasa. El programa del termociclador fue etapa RT de 50°C por 60 minutos, 95°C por 15 minutos seguido por 35 ciclos de ($94,5^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto). Luego hubo una incubación final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR extraídos fueron secuenciados usando los mismos partidores específicos de región variable como se describió antes para la amplificación de las regiones variables. Los productos de PCR fueron enviados a un proveedor externo de secuenciación (MCLAB) para los servicios de purificación de PCR y secuenciamiento. Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas utilizando la herramienta IMGT para análisis de secuencia (http://www.imgt.org/IMGTmedical/secuencia_analysis.html) para identificar los miembros de genes de línea germinal V, D y J con la más alta homología de secuencia. Las secuencias derivadas fueron comparadas con secuencias de ADN de línea germinal de las regiones V- y J- de Ig por alineamiento

de los genes VH y VL a la base de datos de línea germinal de ratón usando una base de datos propietaria de secuencias de anticuerpo.

La FIGURA 6A refleja las secuencias de aminoácido contiguas de numerosas nuevas regiones variables de cadena liviana de ratón de anticuerpos anti-MFI2 y ejemplares de regiones variables de cadena liviana humanizada derivadas de las cadenas livianas variables de anticuerpos anti-MFI2 de ratón representativos. La FIGURA 6B refleja las secuencias de aminoácido contiguos de nuevas regiones variables de cadenas pesadas de ratón de los mismos anticuerpos anti-MFI2 y de regiones variables de cadenas pesadas humanizadas derivados de los mismos anticuerpos de ratón que proveen las cadenas livianas humanizadas. Las secuencias de aminoácido de la región variable de cadena liviana y pesada de ratón se proporcionan en la SEQ ID NO: 21 – 91, números impares, mientras que las secuencias de aminoácido de la región variable de cadena liviana y pesada humanizadas se proporcionan en la SEQ ID NO: 93-107, números impares.

Tomadas juntas las FIGURAS 6A y 6B proporcionan las secuencias anotadas de varios anticuerpos anti-MFI2 de ratón, denominados SC57.1 (secuencias idénticas a SC57.2, 57.23), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 21 y una VH de la SEQ ID NO: 23; SC57.3 (secuencias idénticas a SC57.52, SC57.55), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 25 y una VH de la SEQ ID NO: 27; SC57.4 (secuencias idénticas a SC57.16, SC57.18, SC57.25, SC57.28, SC57.37), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 29 y una VH de la SEQ ID NO: 31; SC57.5, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 33 y una VH de la SEQ ID NO: 35; SC57.6 (secuencias idénticas a SC57.7, SC57.48), una VL de la SEQ ID NO: 37 y una VH de la SEQ ID NO: 39; SC57.8 que tiene una VL de la SEQ ID NO: 41 y una VH de la SEQ ID NO: 43; SC57.9, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 45 y una VH de la SEQ ID NO: 47; SC57.10 (secuencias idénticas a SC57.29, SC57.30, SC57.32, SC57.35, SC57.38, SC57.40, SC57.45, SC57.47, SC57.51, SC57.54), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 49 y una VH de la SEQ ID NO: 51; SC57.11 (secuencias idénticas a SC57.41, SC57.56), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 53 y una VH de la SEQ ID NO: 55; SC57.12 (secuencias idénticas a SC57.46), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 57 y una VH de la SEQ ID NO: 59; SC57.14, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 61 y una VH de la SEQ ID NO: 63; SC57.15, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 65 y una VH de la SEQ ID NO: 67; SC57.17, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 69 y una VH de la SEQ ID NO: 71; SC57.20, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 73 y una VH de la SEQ ID NO: 75; SC57.27, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 77 y una VH de la SEQ ID NO: 79; SC57.31 (secuencias idénticas a SC57.53, SC57.57), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 81 y una VH de la SEQ ID NO: 83; SC57.43, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 85 y una VH de la SEQ ID NO: 87; and SC57.60, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 89 y una VH de la SEQ ID NO: 91. Además, las FIGURAS 6A y 6B proporcionan las secuencias anotadas de los anticuerpos humanizados, denominados hSC57.5,

que tienen una VL de la SEQ ID NO: 93 y una VH de la SEQ ID NO: 95; hSC57.5v1 (descrito en el Ejemplo 13), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 93 y una VH de la SEQ ID NO: 97; hSC57.32, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 99 y una VH de la SEQ ID NO: 101; hSC57.32v1 (descrito en el Ejemplo 13), que tiene una VL de la SEQ ID NO: 99 y una VH de la SEQ ID NO: 103 y hSC57.43, que tiene una VL de la SEQ ID NO: 105 y una VH de la SEQ ID NO: 107.

Las secuencias de aminoácido son anotadas para identificar las regiones marco (es decir FR1 – FR4) y las regiones determinantes de complementariedad (es decir, CDRL1 – CDRL3 en la FIGURA 6A o CDRH1 – CDRH3 en la FIGURA 6B), definido de acuerdo a Kabat. Las secuencias de la región variable fueron analizadas usando una versión propietaria de la base de datos Abysis para proporcionar las denominaciones de CDR y FR. A pesar que las CDR son definidas de acuerdo a Kabat aquellos expertos en el arte apreciarán que las denominaciones de CDR y FR también pueden ser definidas de acuerdo a Chothia, McCallum o cualquier otro sistema de nomenclatura aceptado. La FIGURA 6C proporciona las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO: 20-106 números pares) que codifican las secuencias de aminoácido que se representan en las FIGURAS 6A y 6B. La FIGURA 6D provee las secuencias de aminoácido (SEQ ID NO: 108 – 118) de cadenas pesadas y livianas de largo completo ejemplares de anticuerpo. Las FIGURAS 6E – 6G muestran las CDR de las regiones variables de cadena liviana y pesada de los anticuerpos murinos SC57.5 (FIGURA 6E), SC57.32 (FIGURA 6F) y SC57.43 (FIGURA 6G) según se determina por métodos de Kabat, Chothia, ABM y Contact y numeradas de acuerdo a Kabat. De manera similar, las FIGURAS 6H – 6J proveen secuencias de aminoácido alineadas para regiones variables de cadena pesada y liviana de anticuerpos fuente de ratón y de construcciones humanizadas derivadas (SC57.5 – FIGURA 6H, SC57.32 – FIGURA 6I y SC57.43 – FIGURA 6J) donde las CDR según Kabat se encuentran encuadradas.

Como se ve en las FIGURAS 6A y 6B la SEQ ID NO. de las secuencias de aminoácido de la región variable de cadena liviana para cada anticuerpo murino particular son números impares secuenciales. Por lo cual el anticuerpo monoclonal anti-MFI2, SC57.1, comprende las secuencias de aminoácido SEQ ID NO: 21 y 23 para las regiones variables de cadena liviana y pesada respectivamente; SC57.3 comprende las SEQ ID NO: 25 y 27; SC57.4 comprende las SEQ ID NO: 29 y 31, etcétera. La correspondiente secuencia de ácido nucleico para cada anticuerpo murino incluye la secuencia de aminoácido en la FIGURA 6C y tiene la SEQ ID NO. precediendo inmediatamente a la correspondiente de aminoácido SEQ ID NO. Por lo cual, por ejemplo, las SEQ ID NO. de las secuencias de ácido nucleico de la VL y VH del anticuerpo SC57.1 son las SEQ ID NO: 20 y 22, respectivamente.

EJEMPLO 10

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS SITIO ESPECÍFICOS

Un anticuerpo sitio específico humano modificado por ingeniería genética IgG1/kappa anti-MFI2 fue construido para comprender una región constante de cadena liviana (LC) nativa y región constante de cadena pesada (HC) nativa, donde la cisteína 220 (C220) en la región superior de la bisagra de HC, la cual forma un enlace de disulfuro intercadena con la cisteína 214 (C214) en la LC, fue sustituida con una serina (C220S). Cuando se ensamblan las HC y las LC forman un anticuerpo que comprenden dos cisteínas libres que son adecuadas para la conjugación a un agente terapéutico. Al menos que se anote de otra forma, toda la numeración de residuos de la región constante es de acuerdo con el esquema de numeración EU como se establece en Kabat et al.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética fueron generados como sigue. Se usó un vector de expresión que codifica al anticuerpo humanizado de largo completo anti-MFI2 hSC57.5v1 HC (SEQ ID NO: 111) o hSC57.32 (SEQ ID NO: 113), como el templado para la amplificación por PCR y la mutagénesis sitio dirigida. Se realizó mutagénesis sitio dirigida usando el sistema Quick-change® (Agilent Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El vector que codifica el mutante C220S HC de hSC57.5v1, hSC57.32, o hSC57.43 fue co-transfectado con las LC kapa nativas de largo completo de hSC57.5v1, que es idéntica a la LC de hSC57.5 (SEQ ID NO: 108), o de hSC57.32 (SEQ ID NO: 112) o de hSC57.43 (SEQ ID NO: 116), respectivamente, en células CHO-S y se expresó usando un sistema de expresión transiente de mamífero. Los anticuerpos anti-MFI2 sitio específicos, modificados por ingeniería genética que contienen la mutante C220S fueron denominados hSC57.5v1ss1 y hSC57.32ss1. Las secuencias de aminoácido de la LC y HC de largo completo de los anticuerpos sitio específicos hSC57.5v1ss1 (SEQ ID NO: 108 y 110), hSC57.32ss1 (SEQ ID NO: 112 y 114) y hSC57.43ss1 (SEQ ID NO: 116 y 118) se muestran en la FIG. 6D. La cisteína reactiva en la LC está subrayada como el residuo nativo o mutado en la posición 220 en la HC. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética anti-MFI2 fueron caracterizados por SDS-PAGE para confirmar que se habían generado las mutantes correctas. Se llevó a cabo la SDS-PAGE en un mini gel prefabricado con 10% Tris-Glicina de life technologies en presencia y ausencia de un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Luego de la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución coloidal de Coomassie. Bajo condiciones reductoras, se observaron dos bandas correspondientes a las LC libres y las HC libres, (datos no mostrados). Este patrón es típico de moléculas IgG en condiciones reductoras. Bajo condiciones no reductoras, los patrones de banda fueron diferentes de las moléculas de IgG nativa, indicativo de la ausencia de un enlace de disulfuro entre la HC y la LC. Se observó una banda alrededor de 98 kD correspondiente al dímero HC-HC. Además, se observó una banda débil correspondiente a la LC

libre y una banda predominante alrededor de 48 kD que correspondía a un dímero LC-LC. La formación de alguna cantidad de especies LC-LC se espera debido a las cisteína libres en el C terminal de cada LC.

EJEMPLO 11

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MFI2 HUMANIZADOS Y QUIMÉRICOS

5 Se generaron anticuerpos quiméricos anti-MFI2 usando técnicas reconocidas en el arte como sigue. Se extrajo ARN total de los hibridomas que producen el anticuerpo anti-MFI2- usando el método descrito en el Ejemplo 1 y se amplificó el ARN por PCR. Los datos respecto de los segmentos génicos V, D y J de las cadenas VH y VL de los anticuerpos de ratón se obtuvieron a partir de las secuencias de ácido nucleico (FIGURA 6C) de los anticuerpos anti-MFI2 de la invención. Conjunto de partidores específicos para la secuencia marco de la cadena VH y VL de los anticuerpos fueron diseñados utilizando los siguientes sitios de restricción: AgeI y XhoI para los fragmentos VH, y XmaI y DraIII para los fragmentos VL. Los productos de PCR fueron purificados con un kit de purificación Qiaquick PCR (Qiagen), seguido por digestión con enzimas de restricción AgeI y XhoI para los fragmentos VH y XmaI y DraIII para los fragmentos VL. Los productos de PCR de VH y VL digeridas se purificaron y se ligaron en vectores de expresión IgH o Igk, respectivamente. Se realizaron las reacciones de ligación en un volumen total de 10 µL con 200U de T4-ADN Ligasa (New England Biolabs), 7,5 µL de producto de PCR gen-específico digerido y purificado y 25 ng de vector ADN linearizado. Las bacterias de *E. coli* DH10B competentes (Life Technologies) fueron transformadas a través de choque térmico a 42°C con 3 µL de producto de ligación y se sembraron en placas de ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Luego de la purificación y digestión de los productos de ligación amplificados, el fragmento VH fue clonado en los sitios de restricción AgeI-XhoI del vector de expresión pEE6.4 (Lonza) que comprende HulgG1 (pEE6.4HulgG1) y el fragmento VL fue clonado en los sitios de restricción XmaI-DraIII del vector de expresión pEE12.4 (Lonza) que comprende una región constante liviana humana kappa (pEE12.4Hu-Kappa).

25 Los anticuerpos quiméricos se expresaron por co-transfección de células CHO-S con vectores de expresión pEE6.4HulgG1 y pEE12.4Hu-Kappa. Se agregaron 2,5 µg de ADN de cada uno de los vectores pEE6.4HulgG1 y pEE12.4Hu-Kappa a 15 µg de reactivo de transfección PEI en 400 µL de Opti-MEM. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agregaron a las células. Los sobrenadantes se cosecharon de tres a seis días después de la transfección. Los sobrenadantes de cultivo que contienen anticuerpos quiméricos recombinantes fueron aclarados de restos celulares por centrifugación a 800 xg durante 10 minutos y se almacenaron a 4°C. Se purificaron anticuerpos quiméricos recombinantes con perlas con Proteína A.

30

Además los anticuerpos anti-MFI2 de ratón fueron humanizados usando un método computarizado de injerto de CDR propietario (Abysis Database, UCL Business) y técnicas de ingeniería estándar molecular como sigue. Se diseñaron regiones marcos de las regiones variables humanas basado en la mayor homología entre las estructuras canónicas de las secuencias marco y CDR de secuencias anticuerpo de línea germinal humana, y las secuencias marco y las CDR de los anticuerpos de ratón relevantes. Para el propósito del análisis de la asignación de aminoácidos a cada uno de los dominios de CDR se realizó de acuerdo con la numeración Kabat *et al.*. Una vez que las regiones variables fueron seleccionadas, estas fueron generadas a partir de segmentos de genes sintéticos (Integrated DNA Technologies). Se clonaron anticuerpos humanizados y se expresaron usando los métodos moleculares descritos arriba para anticuerpos quiméricos.

Las secuencias de aminoácido VL y VH del anticuerpo humanizado hSC57.5 (SEQ ID NOS: 93 y 95), hSC57.32 (SEQ ID NOS: 99 y 101), hSC57.43 (SEQ ID NOS: 105 y 107) fueron derivadas de las secuencias VL y VH de los correspondientes anticuerpos de ratón SC57.5 (SEQ ID NOS: 33 y 35), SC57.32 (SEQ ID NOS: 49 y 51), y SC57.43 (SEQ ID NOS: 85 y 87), respectivamente. La TABLA 5 a continuación y las FIGURAS 6H – 6J muestran que relativamente pocos cambios en el marco fueron necesarios para mantener las propiedades favorables de los anticuerpos.

Se generó una variación de hSC57.5 en la cual se introdujo una mutación G55A en la VH CDRH2 para producir el anticuerpo hSC57.5v1 (SEQ ID NO: 93 y 97). La VL de hSC57.5v1 fue idéntica a la VL de hSC57.5 (SEQ ID NO: 93). La hSC57.5v1ss1 tuvo VH y VL idénticas a hSC57.5v1. Se introdujeron tres cambios marco en los anticuerpos hSC57.32 y hSC57.32ss1: dos en la VH: M69F y T71A, y uno en la VL: F71Y. En hSC57.32v1 se introdujeron dos cambios marco: uno en la VH: T71A, y uno en la VL: F71Y. Se introdujo una única mutación puntual S30G en la región marco VH de los anticuerpos hSC57.43 y hSC57.43ss1.

Las secuencias de aminoácido de la cadena liviana y cadena pesada de largo completo de los anticuerpos humanizados hSC57.5, hSC57.5v1, hSC57.5v1ss1, hSC57.32, hSC57.32v1, hSC57.32ss1, hSC57.43 y hSC57.43ss1 se muestran en la FIGURA 6D.

TABLA 5

Abm	Isotipo	VH humana	JH humana	Cambios en FR VH	Cambios en CDR VH	VK humana	JK humana	Cambios en FR VK	Cambios en CDR VK
hSC57.5	IgG1/k	IGHV5-51*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV1-39*01	JK1	Ninguno	Ninguno
hSC57.5 v1	IgG1/k	IGHV5-51*01	JH6	Ninguno	G55A	IGKV1-39*01	JK1	Ninguno	Ninguno
hSC57.5 v1ss1	IgG1 C220S/k	IGHV5-51*01	JH6	Ninguno	G55A	IGKV1-39*01	JK1	Ninguno	Ninguno
hSC57.32	IgG1/k	IGHV1-18*01	JH1	M69F T71A	Ninguno	IGKV1-39*01	JK4	F71Y	Ninguno
hSC57.32v1	IgG1/k	IGHV1-18*01	JH1	T71A	Ninguno	IGKV1-39*01	JK4	F71Y	Ninguno

hSC57.32ss1	IgG1 C220S/k	IGHV1- 18*01	JH1	M69F T71A	Ninguno	IGKV1-39*01	JK4	F71Y	Ninguno
hSC57.43	IgG1/k	IGHV3- 30*03	JH6	S30G	Ninguno	IGKV4-1*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC57.43ss1	IgG1 C220S /k	IGHV3- 30*03	JH6	S30G	Ninguno	IGKV4-1*01	JK4	Ninguno	Ninguno

EJEMPLO 12

MAPEO DE EPÍTOPE A NIVEL DE DOMINIO DE ANTICUERPOS ANTI-MFI2

Para poder caracterizar los epítopes con los cuales los anticuerpos anti-MFI2 descritos se asocian, se realizó el mapeo de epítope a nivel de dominio usando un método basado en FACS con dominios presentados por levaduras que es una modificación al protocolo descrito por Cochran *et al.* (2004, PMID: 15099763).

Las construcciones de plásmidos con representación en levaduras se generaron para la expresión del Dominio 1 tipo hMFI2 Tf (TLD1) que comprende los aminoácidos 20-357; y Dominio 2 tipo Tf (TLD2) que comprende los aminoácidos 366-709. La numeración de ambos dominios incluyó los aminoácidos 1-19, la secuencia líder de hMFI2. Para la información acerca del dominio en general véase la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot entrada P08582. La isoforma larga de hMFI2 comprende a ambos TLD1 y TLD2 mientras que la isoforma corta de hMFI2 comprende solo TLD1 pero no TLD2. Por lo cual, aquellos anticuerpos que se unen a TLD2 son específicos para la isoforma larga de hMFI2, anclada a GPI.

Los plásmidos de presentación en levadura se transformaron en levadura, los que luego se hicieron crecer y se indujeron como se describe en Cochran *et al.* (supra). Para probar para la unión a una construcción particular, se lavaron dos veces 200.000 células de levadura inducidas que expresan la construcción deseada en PBS con BSA 1 mg/mL (PBSA). Se incubaron células de levaduras en 50 µL de PBSA con anticuerpos de pollo anti c-Myc (Life Technologies) a un 1 µg/mL y anticuerpos purificados anti-MFI2 a 50 ng/mL por 90 minutos en hielo y después se lavaron dos veces en PBSA. Las células fueron entonces incubadas en 50 µL PBSA con Alexa 488 conjugado con anti-pollo y Alexa 647 conjugado con anticuerpos de cabra anti-ratón (ambos de Life Technologies) a 1 µg/mL cada uno. Luego de veinte minutos' incubación en hielo, las células se lavaron dos veces con PBSA y se analizaron en un FACSCanto II (BD Biosciences). La FIGURA 5 muestra que de los anticuerpos que fueron probados la mayoría se unió a TLD2 indicando que la mayor parte de los anticuerpos son específicos para la isoforma larga de MFI2, anclada a GPI. Es de destacar que sólo aquellos anticuerpos que estuvieron en Bin E (véase Ejemplo 8; FIGURA 5) se unieron a TLD1, mientras que los anticuerpos que estuvieron en los Bin A-D se unieron a TLD2. "ND" en la FIG. 5 se refiere a "no determinado", lo que significa que el experimento no se realizó en el anticuerpo específico.

Para poder clasificar un epítope como conformacional (por ejemplo, discontinuo) o lineal, se han tratado térmicamente las levaduras que presentan los dominios hMFI2 por 30 minutos a 80°C y después se lavaron dos veces en PBSA enfriado con hielo. Entonces las levaduras que presentan al antígeno desnaturado (levadura desnaturada) se sometieron al mismo protocolo de tinción y análisis de citometría de flujo como se describió antes. Los anticuerpos anti-MFI2 que se unieron a ambas la levadura desnaturada y nativa fueron clasificados como capaces de unirse a un epítope lineal, mientras que los anticuerpos anti-MFI2 que se unieron a la levadura nativa pero no a la levadura desnaturada fueron clasificados como conformacionalmente específicos. Se encontró que la mayoría de los anticuerpos probados eran conformacionalmente específicos con las excepciones de SC57.2, SC57.7, SC57.31, SC57.53, y SC57.57, que se unieron a epítopes lineales.

EJEMPLO 13

MAPEO FINO DE EPÍTOPE DE ANTICUERPOS ANTI-MFI2

Además se realizó el mapeo fino de epítope en anticuerpos anti-MFI2 seleccionados usando un método de presentación de levaduras (Chao et al., Nat Protoc. 1(2): 755-768, 2007). Brevemente, bibliotecas de ECD hMFI2 mutantes se generaron con PCR propensa a error utilizando análogos de nucleótido 8-oxo-2'-deoxiguanosin-5'-trifosfato y 2'-deoxi-p-nucleosido-5'-trifosfato (ambos de TriLink Bio) para una tasa de mutagénesis blanco de una mutación de aminoácido por clon. Estos fueron transformados en un formato de presentación en levadura. Usando la técnica descrita anteriormente para mapeo de nivel de dominio, la biblioteca se tiñó de c-Myc y unión de anticuerpo anti-MFI2 a 50nM. Usando un FACS Aria (BD), se crecieron clones que mostraron una pérdida de unión comparado con el ECD hMFI2 tipo Silvestre fueron crecidos de nuevo, y sometidos a otra ronda de clasificación FACS para la pérdida de unión al anticuerpo blanco. Usando el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (Zymo Research), clones individuales ECD fueron aislados y secuenciados. Cuando es necesario, se reformatearon las mutaciones como clones ECD de mutante única usando el kit mutagénesis sitio dirigida Quikchange (Agilent).

En seguida fueron controlados los clones ECD individuales de mutante única para determinar si la pérdida de unión se debía a una mutación en el epítope, o una mutación que causaba un mal plegamiento. Las mutaciones que involucran cisteína, prolina, y codones de término fueron descartados automáticamente debido a la alta probabilidad de una mutación de mal plegado. Los clones ECD a continuación, fueron seleccionados para la unión a diversos, anticuerpos conformacionalmente específicos de no competencia. Se concluyó que los clones ECD que perdieron la unión a los, anticuerpos conformacionalmente específicos de no competencia contenían mutaciones de mal plegado, mientras que se concluyó que los clones ECD que retuvieron

la unión equivalente como el ECD de hMFI2 tipo silvestre estaban adecuadamente plegados. Se concluyó que las mutaciones en los clones ECD en el último grupo estaban en el epítotope.

Los resultados del mapeo de varios anticuerpos se muestran a continuación en la TABLA 6 donde se indican mutaciones específicas junto con la capacidad del anticuerpo individual de unirse al homólogo de MFI2 mutado. En la TABLA 7 aquellos residuos implicados como constituyentes del epítotope se indican por un # en frente del residuo mutado.

TABLA 6

Bins	D	B	F	C	C	A
Mutante hMFI2	Pérdida de unión con SC57.4	Pérdida de unión con SC57.5	Pérdida de unión con SC57.9	Pérdida de unión con SC57.32	Pérdida de unión con SC57.41	Pérdida de unión con SC57.43
#D460A	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Parcial	Parcial	Ninguno
S461A	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
S462A	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
#H463A	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Completo	Completo	Ninguno
F465A	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
#N566A	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Parcial	Parcial	Ninguno
V570A	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

- implicado como un componente epítotope

10 En base a los datos derivados de los homólogos mutados son potenciales constituyentes de epítotope para SC57.32, y SC57.41 se definen en la TABLA 7 inmediatamente a continuación.

TABLA 7

Clon de Anticuerpo	Residuos Asociados al Epítoto
SC57.32	D460, H463, N566
SC57.41	D460, H463, N566

EJEMPLO 14 EXPRESIÓN DE PROTEÍNA MFI2 EN TUMORES

Teniendo en cuenta los elevados niveles de transcripción de ARNm MFI2 asociados con varios tumores descritos en Ejemplos 1-3, se trabajó en probar si la expresión de la proteína MFI2 también se elevaba en los tumores PDX. Para detectar y cuantificar la expresión de la proteína, fue desarrollado un ensayo ELISA sándwich electroquimioluminiscente de MFI2 utilizando la plataforma MSD Discovery (Meso Scale Discovery).

Se cortaron los tumores PDX de ratones y se congelaron ultra-rápido en hielo seco/etanol. Se agregó Tampón de Extracción de Proteína (Biochain Institute) a los trozos de tumor y tumores descongelados se pulverizaron utilizando un sistema TissueLyser (Qiagen). Los lisados fueron aclarados por centrifugación (20.000 g, 20 minutos, 4°C) y la concentración de proteína total en cada lisado fue cuantificada usando ácido bicinonínico. Las proteínas de los lisados fueron entonces normalizadas a 5 mg/mL y almacenadas a -80 °C hasta que se usaron. Tejidos normales fueron adquiridos de una fuente comercial.

Las concentraciones de proteína MFI2 provenientes de las muestras de lisado se determinaron interpolando los valores de una curva de concentración de proteína estándar que fue generada usando proteína MFI2-His recombinante purificada, generada como se describe en el Ejemplo 5. La curva estándar de proteína MFI2 y el ensayo de cuantificación de proteína fueron realizados como sigue:

Se recubrieron las placas MSD estándar durante la noche a 4°C con 15 µL de anticuerpo de captura SC57.2 a 2 µg/mL en PBS. Las placas se lavaron en PBST y se bloquearon en 35 µL MSD 3% de una solución de Bloqueador A, durante una hora mientras se agitaba. Las placas se lavaron de nuevo en PBST, se agregaron a los pocillos 10 µL de lisado diluido 10x (o estándar MFI2 recombinante serialmente diluido) en MSD 1% de Bloqueador A que contiene un 10% de Tampón de extracción de proteína también se añadió a los pocillos y se incubaron durante dos horas mientras se agitaba. Las placas se lavaron de nuevo en PBST. El anticuerpo de detección SC57.10 fue entonces marcado con sulfo usando un MSD® SULFO-TAG Éster NHS de acuerdo al protocolo del

fabricante. Se agregó 10 µL del anticuerpo SC57.10 marcado a las placas lavadas a 0,5 µg/mL en MSD 1% de Bloqueador A por 1 hora a temperatura ambiente mientras se agitaba. Las placas se lavaron en PBST. El Tampón T MSD Read con surfactante se diluyó hasta 1X en agua y se agregaron 35 µL a cada pocillo. Las placas se leyeron en un MSD Sector Imager 2400 utilizando un programa de análisis de software integrado para derivar las concentraciones de MFI2 en muestras PDX mediante la interpolación de la curva estándar. Los valores fueron divididos por la concentración de proteína total para entregar los nanogramos de MFI2 por miligramo de proteína total de lisado. Las concentraciones resultantes se exponen en la figura. 7 en la que cada punto representa las concentraciones de proteína MFI2 derivada a partir de una sola línea tumoral PDX. Mientras que cada punto se deriva de una sola línea PDX, en muchos casos múltiples muestras biológicas fueron probadas de la misma línea PDX y se promediaron los valores para proporcionar el punto de datos.

La FIGURA 7 muestra que muestras representativas de BD, BR (BR-tipo-basal, BR-HER2, BR-LumA, BR-LumB, BR-indefinido), EM, CR, LU, GA, LIV, OV, PA y SK las muestras de tumor exhibieron una alta expresión de proteína MFI2. Los niveles de expresión de proteína MFI2 para cada muestra se dan en ng/mg de proteína total y la mediana derivada para cada tipo de tumor se indica mediante la barra horizontal. Los tejidos normales que fueron probados incluyen glándula suprarrenal, arteria, colon, esófago, vejiga biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, nervio ciático periférico y, páncreas, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, tráquea, células sanguíneas rojas y blancas y plaquetas, vejiga, cerebro, mamas, ojo, ganglio linfático, ovario, glándula pituitaria, próstata y médula espinal. Niveles detectables de proteína MFI2 se observaron solamente en la médula espinal, células sanguíneas rojas empacadas y leucocitos de sangre periférica. Varias muestras de tumor PDX BD, BR, CR, LU, PA y SK fueron significativamente más altas que el tejido normal promedio. Estos datos, combinados con los datos de la transcripción del ARNm para la expresión MFI2 establecidos anteriormente refuerzan fuertemente la proposición de que MFI2 es un blanco atractivo para intervención terapéutica basada en anticuerpos.

EJEMPLO 15 INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó inmunohistoquímica (IHC) en tumor PDX y en secciones de tejido tumoral primario humano para evaluar la expresión y ubicación de las células tumorales de MFI2.

Para poder identificar un anticuerpo anti-MFI2 compatible con IHC, se realizó IHC en pellets de células HEK293T parentales o en pellets de células HEK293T que expresan MFI2 usando numerosos anticuerpos anti-MFI2 de la invención. Los anticuerpos anti-MFI2 SC57.5, SC57.11,

SC57.30, SC57.32, SC5735, SC5736 y SC57.47 fueron capaces de detectar específicamente pellets celulares HEK293T que sobreexpresan MFI2 de manera más efectiva que otros anticuerpos anti-MFI2 de la invención que fueron probados (datos no mostrados). La capacidad de estos anticuerpos para detectar específicamente MFI2 se confirmó a través de un experimento de competencia en donde el anticuerpo anti-MFI2 relevante se mezcló con una proporción molar 5x en exceso de proteína hMFI2-His y luego se incubó con células HEK293T que expresan MFI2 fijadas en formalina y secciones embebidas en parafina (FFPE). La ausencia de tinción positiva demostró que la proteína hMFI2-His interfirió con la unión del anticuerpo anti-MFI2 a las células HEK293T que sobreexpresan MFI2 (datos no mostrados).

Se realizó IHC, como se describe más adelante, en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE) as ese estándar en el arte. Las secciones planares de tejidos fueron cortadas y montadas en portaobjetos de vidrio. Después de desparafinar en xileno se pre-trataron secciones de 5 micras con Solución de Recuperación de Antígeno (Dako) por 20 minutos a 99°C, se enfrió a 75°C y luego se trató con 0,3% de peróxido de hidrógeno en PBS seguido por Solución de Bloqueo de Avidina/Biotina (Vector Laboratories). Las láminas FFPE fueron entonces bloqueadas con suero de equino 10% en BSA 3% en tampón PBS y se incubó con un anticuerpo anti-MFI2 primario de la invención, se diluyó a 10 µg/ml en BSA al 3%/PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente. Las láminas FFPE se incubaron con conjugado de biotina (Vector Laboratories), diluido con 2,5 µg/ml en 3% BSA/PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente seguido por incubación en estreptavidina-HRP (ABC Elite Kit; Vector Laboratories). Las láminas FFPE de tumores primarios humanos fueron entonces incubadas en biotinil tiramida seguido por incubación en estreptavidina-HRP siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de amplificación TSA (Kit de Amplificación TSA; Perkin Elmer). La detección cromogénica fue desarrollada con 3,3'-diaminobenzidina (Thermo Scientific) por 5 minutos a temperatura ambiente y los tejidos fueron contra teñidos con hematoxilina de Meyer's (IHC World), lavados con alcohol y sumergidos en xileno. Los tumores PDX no recibieron la amplificación TSA. Las secciones fueron observadas por microscopía de campo claro y la expresión membranosa de MFI2 en el epitelio tumoral fue señalada por H-score. El H-score se obtiene por la fórmula: 3 x porcentaje de núcleos intensamente teñidos + 2 x porcentaje de núcleos de moderadamente teñidos + porcentaje de núcleos débilmente teñidos, dando un rango de 0 a 300.

La FIGURA 8A muestra los valores de H-score de la expresión membranosa de la proteína hMFI2 por IHC en varias líneas PDX BR, LU y SK. La FIGURA 8B refleja la expresión de MFI2 en cáncer mamario primario humano, cáncer pulmonar y muestras de tejido melanoma mediante IHC. La MFI2 muestra tener una expresión en el 50% de las muestras de paciente de triple negativa con cáncer mamario por IHC, en 61% de las muestras de adenocarcinoma de pulmón, en 85% de las

muestras de carcinoma escamoso de pulmón, y en 61% de las muestras de melanoma metastásico en el paciente.

EJEMPLO 16
DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MFI2 EN CÉLULAS HEK293T Y TUMORES
USANDO CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo se usó para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-MFI2 de la invención para detectar específicamente la presencia de la proteína MFI2 humana en la superficie de líneas celulares tumorales PDX, SK, BR y LU. Además, como la expresión de MFI2 en la superficie de las células CSC, BR y LU también fue determinada.

Se cosecharon los tumores PDX y se disociaron usando técnicas de digestión de tejido enzimáticas conocidas en el arte para obtener suspensiones de células únicas de células tumorales PDX (véase, por ejemplo, la patente US 2007/0292414). Las suspensiones de células tumorales PDX únicas se incubaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para detectar las células muertas, anti-CD45 de ratón y anticuerpos H-2K^d para identificar células de ratón y anticuerpos EPCAM anti-humano para identificar células de carcinoma humano. Las suspensiones celulares únicas resultantes comprendían una muestra de masa de células tumorales incluyendo a ambas células NTG y CSC. Para poder particionar la población de células tumorales en masa PDX LU en subpoblaciones NTG y CSC, se incubaron las células tumorales PDX con anticuerpos anti-humano CD46 y/o CD324 y anticuerpos ESA (véase las patentes US 2013/0260385, 2013/0061340 y 2013/0061342). Se analizaron las células tumorales en masa o separadas para la expresión de hMFI2 por citometría de flujo usando un citómetro de flujo BD FACS Canto II con SC57.43, un anticuerpo anti-MFI2 que se une al dominio 2 tipo transferrina (TFLD2) en la isoforma larga de la proteína MFI2 humana.

La FIGURA 9A muestra que el anticuerpo SC57.43 detectó niveles mayores en expresión de superficie de hMFI2 en un subconjunto de líneas celulares tumorales vivas, humanas no clasificadas SK, (por ejemplo SK3, SK11, SK13, SK40, SK44, SK62, SK66, SK71) (línea color negro) comparado con el anticuerpo IgG control de isotipo (relleno de color gris). Un subconjunto de las líneas PDX SK expresadas en una proteína BRAF mutada (V600E) (por ejemplo SK3, SK11, SK13), mientras que otras expresaron BRAF tipo silvestre (SK40, SK44, SK62, SK66, SK71). Estos resultados indican que los anticuerpos anti-MFI2 de la invención pueden ser útiles para diagnosticar y tratar el melanoma y puede también ser útil en tratar el melanoma que expresa ya sea BRAF tipo silvestre o mutada.

La FIGURA 9B muestra que el anticuerpo anti-hMFI2 SC57.43 detectó la expresión de hMFI2 en la superficie de la masa de células tumorales PDX LU y BR. En todas las muestras, el anticuerpo

anti-MFI2 (línea color negro) detectó la expresión de MFI2 aumentada comparada con el anticuerpo control de isotipo IgG (relleno color gris). Para LU-Ad (LU58 y LU206) así como para LU-SCC (LU85) la línea negra sólida indica la tinción de la masa de células humanas tumorales del anticuerpo anti-MFI2, mostrando que la expresión de hMFI2 fue detectada en LU58 y LU85 pero no en la línea LU206 PDX. Las muestras de tumor PDX LU123 (LU-Ad), LU120 (LU-SCC), BR31 y BR86 (ambas BR tipo Basal) mostraron expresión aumentada de hMFI2 en subpoblaciones de células CSC (línea negra sólida) y de células NTG de células tumorales LU y BR PDX (línea punteada) comparado con el anticuerpo control de isotipo IgG (relleno de color gris). Esto demuestra que MFI2 es expresado en células CSC en un número de subtipos de tumor LU (LU-Ad y LU-SCC); y también en tumores BR. La expresión se puede cuantificar como el cambio en la intensidad de fluorescencia media geométrica (Δ MFI) observada en la superficie de células tumorales que han sido teñidas con un anticuerpo anti-MFI2 comparado con el mismo tumor que ha sido teñido con un anticuerpo isotipo control. Una tabla que resume Δ MFI para cada una de las líneas celulares tumorales que se analizaron se muestra como un inserto en las figuras 9A y 9B. Estos datos confirman los resultados de IHC en el Ejemplo 15 de arriba, donde las líneas de cáncer mamario PDX BR31 y BR86 y las líneas de melanoma PDX SK3 y SK40, también muestran tinción positiva por IHC y citometría de flujo. LU206 no mostró expresión de hMFI2 por citometría de flujo, lo que se esperó basado, en los datos de la baja expresión de ARN proporcionados en los Ejemplos 1, 2 y 3 anteriores; y además demuestra especificidad de unión de anticuerpo anti-MFI2. En conjunto, estos datos sugieren que la forma larga de MFI2, la cual está anclada a GPI, se expresa en células tumorales PDX SK, LU y BR haciendo a estos buenos indicadores para la terapia dirigida con un conjugado de droga anticuerpo anti-MFI2.

EJEMPLO 17

LOS ANTICUERPOS ANTI-MFI2 FACILITAN LA ENTREGA *IN VITRO* DE AGENTES CITOTÓXICOS

Para determinar si los anticuerpos anti-MFI2 de la invención fueron capaces de internalizar para poder mediar la entrega de agentes citotóxicos a las células tumorales vivas, se realizó un ensayo *in vitro* de eliminación de células usando anticuerpos anti-MFI2 seleccionados y un fragmento FAB de anticuerpo secundario anti-ratón unido a saporina. La saporina es una toxina de planta que desactiva ribosomas, inhibiendo de este modo la síntesis de proteína y resultando en la muerte de la célula. La saporina es tóxica solo en el interior de la célula donde tiene acceso a los ribosomas, pero que es incapaz de internalizar de manera independiente. Por lo cual, la citotoxicidad celular mediada por saporina en estos ensayos es indicativa de la capacidad de la construcción de

FAB anti-ratón-saporina de internalizar frente a la unión e internalización de los anticuerpos de ratón anti-MFI2 asociados a las células blanco.

5 Suspensiones de células únicas de HEK293T que sobre-expresan hMFI2 fueron plaqueadas a 500 células por pocillo en placas de Cultivo de Tejido BD (BD Biosciences). Un día después, se agregaron varias concentraciones de anticuerpos anti-MFI2 purificados (ya sea murino o humanizado) al cultivo junto con una concentración fija de 2 nM de construcciones de FAB de IgG anti-ratón-saporina (Advanced Targeting Systems) (para probar los anticuerpos de ratón) o 2nM de conjugados de FAB de IgG anti-humana-saporina (para probar anticuerpos humanizados). Después de la incubación por 96 horas se enumeraron las células viables usando CellTiter-Glo® (Promega) según las instrucciones del fabricante. Las cuentas de luminiscencia bruta usan los cultivos que contienen células incubadas solo con el conjugado secundario FAB-saporina fueron fijadas como 100% de los valores de referencia y todos los otros recuentos se calculan como un porcentaje del valor de referencia. Un gran subconjunto de conjugados de anticuerpo anti-MFI2-saporina a una concentración de 100 pM eliminó de manera efectiva las células HEK293T que sobre-expresan hMFI2 con eficacia variante (FIGURA 10A), mientras que el anticuerpo IgG1 de ratón control de isotipo a la misma concentración no lo hizo.

Se repitió el experimento anterior usando una línea celular tumoral de melanoma PDX (SK43). Los tumores SK PDX fueron cosechados de ratones y se depletaron magnéticamente de células de ratón usando anti-CD45 biotinilado de ratón y anticuerpos H-2K^d y perlas de estreptavidina-cubierta ferrosa. Los tumores fueron luego disociados usando técnicas de digestión de tejido enzimáticas reconocidas en el arte para obtener suspensiones de células únicas de células (véase, por ejemplo, la patente US 2007/0292414). Las células fueron plaqueadas a 2.500 células por pocillo en medio DMEM como se conoce en el arte. Se agregaron 250 pM de anticuerpos anti-MFI2 purificados al cultivo junto con una concentración fija de 2 nM de la construcción FAB de IgG anti-ratón saporina. Después de la incubación por siete días se enumeraron las células viables usando CellTiter-Glo® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las cuentas de luminiscencia netas usando cultivos que contienen células incubadas solamente con el conjugado secundario FAB-saporina fueron fijadas como los valores de 100% de referencia y todas las otras cuentas se calcularon como un porcentaje del valor de referencia. La FIGURA 10B muestra que un importante número de conjugados de anticuerpo anti- MFI2 de ratón-saporina eliminaron efectivamente las células tumorales PDX SK43.

Finalmente, los anticuerpos humanizados anti-MFI2 (hSC57.32, hSC57.32v1 y hSC57.43) eliminaron efectivamente células HEK-293T que sobreexpresan MFI2. Los anticuerpos humanizados mostraron una eficacia comparable a la del anticuerpo quimérico (en el caso de

hSC57.32 y hSC57.43) así como el anticuerpo murino (en el caso de hSC57.43) de los cuales estos se derivaron (FIGURA 10C). Los resultados anteriores demuestran la capacidad de los anticuerpos anti-MFI2 para mediar la internalización de una carga útil citotóxica conjugada, lo que soporta la hipótesis de que los anticuerpos anti-MFI2 pueden tener utilidad terapéutica como la porción dirigida para un ADC.

Era deseable para determinar si existe una correlación entre (i) la capacidad de anticuerpos anti-MFI2 de la invención para mediar la internalización y eliminar las células, y (ii) el epítipo sobre la proteína MFI2 al cual estos anticuerpos anti-MFI2 se unen. Esta información permite el diseño o selección de anticuerpos particularmente eficaces. Para ese propósito, luego de la finalización del ensayo de eliminación de células *in vitro* descrito arriba usando células HEK293T que sobre-expresan MFI2, el porcentaje de células vivas se grafican contra los anticuerpos anti-MFI2 que se usaron. Los anticuerpos se agruparon en bins según se determina por el experimento de binning descrito en el Ejemplo 7. Los anticuerpos en los Bin C y D fueron particularmente efectivos para internalizar y mediar la muerte celular, mientras que los anticuerpos en el Bin B fueron menos efectivos (FIGURA 10D). La mayoría de los anticuerpos en los Bin A y E fueron capaces de mediar la internalización y eliminar pero en grado menor que aquellos anticuerpos en los Bin C y D. Como se describió antes en el Ejemplo 7, todos los anticuerpos en los Bin A, B, C y D se unieron al dominio 2 tipo transferrina (TFLD2) mientras que los anticuerpos en el Bin E se unieron a TFLD1. Estos resultados indican que puede haber un epítipo particular dentro del dominio TFLD2 al cual los anticuerpos en los Bin C y D se unen, lo cual hace que los anticuerpos sean más eficaces, comparados con, por ejemplo con los epítopes A y B en TFLD2 al cual los anticuerpos en el Bin B se unen. Por lo cual, los anticuerpos en los Bin C y D, por ejemplo, SC57.32 y cualquiera de los anticuerpos que compitan con este anticuerpo comprenden un subconjunto de anticuerpos anti-MFI2 que pueden ser particularmente eficaces en el tratamiento de varios tumores debido a su capacidad superior para internalizar y eliminar células.

EJEMPLO 18

CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MFI2 A PIRROLOBENZODIAZEPINAS (PBD)

Se conjugaron siete anticuerpos murinos anti-MFI2 (SC57.4, SC57.5, SC57.9, SC57.32, SC57.41, SC57.43 y SC57.46) y dos anticuerpos humanizados sitio específicos anti-MFI2 (hSC57.32ss1 y hSC57.43ss1) a una pirrolobenzodiazepina (PBD1) a través del residuo terminal maleimida con un grupo sulfhidrilo libre para crear los ADC denominados hSC57.32ss1PBD1 y hSC57.43ss1PBD1.

Los conjugados murinos anti-MFI2 de droga anticuerpo (ADC) se prepararon como sigue. Los enlaces de cisteína de los anticuerpos anti-MFI2 fueron parcialmente reducidos con una adición molar pre-determinada de mol de tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) por mol de anticuerpo por 90 minutos a temperatura ambiente en suero salino tamponado con fosfato (PBS) con EDTA 5 mM.

5 Las preparaciones resultantes parcialmente reducidas fueron entonces conjugadas con PBD1 (la estructura de PBD1 se proporciona arriba en la memoria descriptiva actual) por medio de un agente de unión maleimida por un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue entonces detenida con la adición de N-acetil cisteína en exceso (NAC) comparado con el agente de unión-fármaco usando una solución stock de 10 mM preparada en agua. Luego de un tiempo de detención
10 mínimo de 20 minutos, el pH se ajustó a 6,0 con la adición de 0.5 M de ácido acético. Las preparaciones de los ADC se intercambiaron de tampón en tampón de diafiltración por medio de diafiltración usando una membrana de 30 kDa. El ADC anti-MFI2 diafiltrado luego fue formulado con sacarosa y polisorbato-20 hasta la concentración final objetivo. Los ADC anti-MFI2 resultantes se analizaron para la concentración de proteína (medida por UV), agregación (SEC), relación fármaco
15 a anticuerpo (DAR) por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) y citotoxicidad *in vitro*.

Los ADC anti-MFI2 humanizados sitio específicos se conjugaron utilizando un proceso de reducción parcial modificado. El producto deseado es un ADC que está conjugado de manera máxima en la cisteína no apareada (C214) en cada región constante LC y que minimiza los ADC que tienen una relación fármaco a anticuerpo (DAR) que es mayor que 2 (DAR>2) mientras que
20 maximiza los ADC que tienen un DAR de 2 (DAR=2). Para poder mejorar la especificidad de la conjugación, los anticuerpos fueron reducidos selectivamente usando un proceso que comprende un agente estabilizante (por ejemplo L-arginina) y un agente reductor suave (por ejemplo glutatión) antes de la conjugación con el agente de unión-fármaco, seguido por una diafiltración y una etapa de formulación. El proceso se describe en detalle a continuación.

25 Una preparación de cada anticuerpo fue parcialmente reducida en un tampón que contiene L-arginina 1M/EDTA 5mM con una concentración pre-determinada de glutatión reducido (GSH), pH 8,0 por un mínimo de dos horas a temperatura ambiente. Todas las preparaciones fueron entonces intercambiadas de tampón en un tampón de Tris 20mM /EDTA 3,2 mM, pH 7,0 usando una membrana de 30 kDa (Millipore Amicon Ultra) para retirar el tampón reductor. Las preparaciones
30 parcialmente reducidas resultantes fueron entonces conjugadas a PBD1 (la estructura de PBD1 se provee arriba en la memoria descriptiva actual) por medio de un agente de unión maleimida por un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue entonces detenida con la adición de NAC en exceso comparado con el agente de unión-fármaco usando una solución stock de 10 mM preparada en agua. Después de un mínimo de tiempo de detención de 20 minutos, el pH se

ajustó a 6,0 con la adición de 0,5 M de ácido acético. Las preparaciones de los ADC fueron intercambiadas de tampón en tampón de diafiltración a través de diafiltración usando una membrana de 30 kDa. El ADC anti-MFI2 diafiltrado fue luego formulado con sacarosa y polisorbato-20 hasta la concentración final objetivo. Los ADC anti-MFI2 resultantes se analizaron para la concentración de proteína (medida por UV), agregación (SEC), relación fármaco a anticuerpo (DAR) por HPLC fase reversa (RP-HPLC) y citotoxicidad *in vitro*.

EJEMPLO 19

CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MFI2 A CALIQUEAMICINA

Un anticuerpo anti-MFI2 (hSC57.32ss1) fue conjugado a un compuesto caliqueamicina (Cal) a través de un residuo de maleimida terminal con un grupo sulfhidrilo libre para crear el ADC denominado hSC57.32ss1Cal.

El producto deseado es un ADC que está conjugado de manera máxima en la cisteína no apareada (C214) en cada región constante LC y que minimiza los ADC que tienen una relación fármaco a anticuerpo (DAR) que es mayor que 2 ($DAR > 2$) mientras que maximiza los ADC que tienen un DAR de 2 ($DAR = 2$).

Además para poder mejorar la especificidad de la conjugación, los anticuerpos fueron reducidos selectivamente usando un proceso que comprende un agente estabilizante (por ejemplo L-arginina) y un agente reductor suave (por ejemplo glutatión) antes de la conjugación con el agente de unión-fármaco, seguido por una etapa de diafiltración y de formulación. El proceso se describe en detalle a continuación.

Una preparación de cada anticuerpo fue parcialmente reducida en un tampón que contiene L-arginina 1M/EDTA 5mM con una concentración pre-determinada de glutatión reducido (GSH), pH 8,0 por un mínimo de dos horas a temperatura ambiente. Todas las preparaciones fueron entonces intercambiadas de tampón a un tampón de Tris 20mM /EDTA 3,2 mM, pH 7,0 usando una membrana de 30 kDa (Millipore Amicon Ultra) para retirar el tampón reductor. Las preparaciones parcialmente reducidas resultantes fueron entonces conjugadas a caliqueamicina por medio de un agente de unión maleimida por un mínimo de 120 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue entonces detenida con la adición de un exceso de NAC comparado con el agente de unión-fármaco usando una solución stock de 10 mM preparada en agua. Después de un tiempo mínimo de detención de 20 minutos, el pH se ajustó a 6,0 con la adición de 0,5 M de ácido acético. La preparación del ADC fue intercambiado de tampón en tampón de diafiltración a través de diafiltración usando una membrana de 30 kDa. El ADC anti-MFI2 diafiltrado fue luego formulado con sacarosa y polisorbato-20 hasta la concentración final objetivo. Los ADC anti-MFI2 resultantes fueron analizados para la

concentración de proteína (medida por UV), agregación (SEC), relación fármaco a anticuerpo (DAR) por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) y citotoxicidad *in vitro*.

EJEMPLO 20

CONJUGADOS DE DROGA ANTICUERPO ANTI-MFI2 FACILITAN LA ENTREGA IN VITRO DE AGENTES CITOTÓXICOS

Para determinar si los ADC anti-MFI2 de la invención fueron capaces de internalizar para poder mediar la entrega de agentes citotóxicos a células tumorales vivas, se realizó un ensayo la eliminación de la célula *in vitro* usando los ADC anti-MFI2, hSC57.32ss1PBD1 y hSC57.43ss1PBD1 (producidas como se describe en el Ejemplo 18 de arriba) y hSC57.32ss1Cal (producida como se describe en el Ejemplo 19 de arriba).

Se plaqueroon suspensiones de células únicas de células HEK293T que sobre-expresan hMFI2, SK-MEL-28, células que expresan endógenamente MFI2 o células naive HEK293T a una cantidad de 500 células por pocillo en placas de Tejido de Cultivo BD (BD Biosciences). Las suspensiones de células únicas de células BR22 y SK19 derivadas de tumores PDX fueron plaqueadas a 2500 células por pocillo en placas Primarias. Un día más tarde, se agregaron varias concentraciones de ADC purificado o anticuerpo control IgG1 humano conjugado a PBD1 o Caliqueamicina a los cultivos. Las células se incubaron por 96 horas o 7 días en el caso de las líneas tumorales derivadas de PDX. Después de la incubación las células viables se enumeraron usando CellTiter-Glo® (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las cuentas de luminiscencia netas usando cultivos que contienen células no-tratadas fueron establecidas como el 100% de los valores de referencia y todas las otras cuentas se calcularon como un porcentaje del valor de referencia. Las FIGURAS 11A y 11B muestran que todas las células tratadas eran mucho más sensibles a los ADC anti-MFI2 comparado con el anticuerpo control IgG1 humano. Además, los ADC tienen muy poco efecto en las células naive HEK293T que no sobre-expresan MFI2 comparado con las células HEK293T que sobre-expresan MFI2, demostrando la especificidad de los ADC al antígeno MFI2 (FIGURA 11A). La FIGURA 11B muestra la capacidad de los ADC anti-MFI2 que comprenden varias toxinas (PBD y Caliqueamicina) para eliminar efectivamente los tumores BR y SK.

Los resultados anteriores demuestran la capacidad de los ADC anti-MFI2 para mediar específicamente la internalización y la entrega de las cargas útiles citotóxicas a células que expresan MFI2, incluyendo melanoma y células tumorales mamarias.

Ejemplo 21

CONJUGADOS ANTI-MFI2 DE DROGA ANTICUERPO SUPRIMEN EL CRECIMIENTO *IN VIVO* DEL TUMOR

Los ADC anti-MFI2, generados como se describe en el Ejemplo 18 arriba, fueron probados para demostrar su capacidad para suprimir el crecimiento tumoral BR, LU y SK en ratones inmunodeficientes.

Las líneas tumorales PDX que expresan MFI2 (por ejemplo SK44, LU92, BR22 y BR86) y las líneas tumorales que exhiben niveles más bajos de expresión de MFI2 (por ejemplo LU134), fueron cultivadas por vía subcutánea en los costados de ratones hembra NOD/SCID utilizando técnicas reconocidas en el arte. Los volúmenes tumorales y pesos de los ratones fueron controlados una vez o dos veces por semana. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 150-250 mm³, los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento.

En los estudios realizados en ratones con tumores BR, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única de 20 mg/kg de Paclitaxel o Docetaxel (el estándar de cuidado), una dosis única de 0,8 mg/kg de hSC57.32ss1PBD1 o IgG1PBD1 humana control anti-hapteno, o una dosis única de vehículo control (FIG. 12A). En los estudios realizados en ratones con melanoma o tumores de pulmón, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única de 2 mg/kg de hSC57.43PBD1 (denominado como ADC anti-MFI2 en la FIGURA 12B) o control anti-hapteno de IgG1PBD1 humano, o una dosis única de vehículo control (FIGURA 12B).

Siguiendo el tratamiento, los volúmenes de los tumores y los pesos de ratones fueron monitoreados hasta que los tumores superaron 800 mm³ o hasta que los ratones se enfermaron. Los ratones tratados con los ADC anti-MFI2 no mostraron ningún efecto adverso a la salud más allá de los que normalmente se observan en ratones NOD/SCID inmunodeficientes, que portan un tumor. La administración del ADC anti-MFI2, resultó en la supresión tumoral significativa que duró más de 100 días en los tumores SK44, LU92, BR22 y BR86, mientras que la administración del control ADC IgG1PBD1 (y en el caso de BR86, el estándar de cuidado, paclitaxel y docetaxel), no dio lugar a la reducción del volumen del tumor. Por el contrario, el ADC anti-MFI2 exhibió muy poco efecto sobre la reducción del volumen del tumor en tumores LU134 que tuvieron niveles de expresión mucho menores de MFI2 tal como se mide mediante un ensayo quimioluminiscente (Ejemplo 14) y citometría de flujo (Ejemplo 11).

La capacidad de los ADC anti-MFI2 para eliminar específicamente células tumorales que expresan MFI2 y suprimir drásticamente el crecimiento del tumor *in vivo* por períodos extensos valida además el uso de los ADC anti-MFI2 en el tratamiento terapéutico de cáncer y en particular en los subtipos TNBR de cáncer mamario. De interés adicional, como se muestra en la figura 12A con dos de los fármacos estándar de cuidado, BR86 es una línea de células tumoral resistente a

fármacos y por lo tanto los resultados también muestran que los ADC anti-MFI2 son eficaces para reducir el volumen del tumoral de tumores resistentes a fármacos.

EJEMPLO 22

ENRIQUECIMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE MFI2 EN POBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CANCEROSAS

Las células tumorales pueden ser divididas ampliamente en dos tipos de subpoblaciones celulares: células no tumorigénicas (NTG) y células iniciadoras de tumor o células tumorigénicas. Las células tumorigénicas tienen la capacidad de formar tumores cuando se implantan en ratones inmunocomprometidos, mientras que las células no tumorigénicas no lo hacen. Las células madres cancerosas (CSC) son un subconjunto de células tumorigénicas y son capaces de auto-replicarse indefinidamente mientras se mantiene la capacidad para la diferenciación multilínea.

Para determinar si la expresión MFI2 en tumores puede estar correlacionada con la tumorigenicidad aumentada, se realizó el siguiente estudio. Se crecieron muestras tumorales humanas PDX SK-MEL en ratones in inmunocomprometidos y fueron resectados después que el tumor alcanzó 800 – 2.000 mm³. Los tumores se disociaron en suspensiones de células únicas utilizando técnicas de digestión enzimáticas reconocidas en el arte (véase, por ejemplo, la patente US 2007/0292414). Las células tumorales humanas PDX SK-MEL se tiñeron con anticuerpos de ratón anti-CD45 o anti-H2kD para diferenciar entre células humanas y células de ratón tumorales. Los tumores fueron también teñidos con anticuerpo anti-MFI2 (SC57.43) y luego clasificados usando un Citómetro de Flujo FACS Aria™ (BD Biosciences). Las células tumorales humanas PDX TNBR fueron separadas en poblaciones celulares que expresan MFI2 (MFI2-hi) y poblaciones celulares que no expresan MFI2 (MFI2-neg), como se define con una muestra control isotipo-teñida en paralela. Cinco ratones hembras NOD/SCID inmunocomprometidas fueron inyectadas subcutáneamente 50 células tumorales MFI2-hi SK-MEL; y cinco ratones fueron inyectados con 200 células tumorales MFI2-neg SK-MEL. Se midieron los volúmenes tumorales en una base semanal por cuatro meses.

La FIGURA 13 muestra las células tumorales MFI2-hi que fueron capaces de reconstituir funcionalmente tumores *in vivo*, mientras que los tumores MFI2-neg no lo hicieron. Por lo cual, las células tumorales que expresan MFI2 fueron mucho más tumorigénicas que aquellas células tumorales que no expresaron MFI2, sugiriendo que la proteína MFI2 puede definir funcionalmente una subpoblación tumorigénica dentro de los tumores humanos, y que sustenta el concepto que los ADC anti-MFI2 seleccionados se pueden usar para dirigirse a una subpoblación tumorigénica de células tumorales, lo que puede resultar en una regresión importante del tumor y una prevención de la recurrencia del tumor.

EJEMPLO 23
REDUCCIÓN DE LA FRECUENCIA DE LA CÉLULA INICIADORA DE TUMOR POR
LOS CONJUGADOS DE ANTICUERPO ANTI-MFI2-FÁRMACO

Como se demuestra en los Ejemplos 1, 2 y 16 la expresión MFI2 se asocia con células tumorigénicas. De acuerdo con ello, para demostrar que el tratamiento con Los ADC anti-MFI2 reduce la frecuencia de las TIC que se sabe que son resistentes a fármacos y que dan impulso a la
5 recurrencia del tumor y la metástasis, se realizaron ensayos de dilución limitante *in vivo* (LDA), por ejemplo, esencialmente como se describe más adelante.

Los tumores PDX (por ejemplo mamas, pulmones o melanoma) se crecieron subcutáneamente en ratones inmunodeficientes. Cuando los volúmenes de los tumores tuvieron un promedio de 150 mm³ – 250 mm³ de tamaño, se segregaron los ratones al azar en dos grupos. Un
10 grupo se inyectó intraperitonealmente con un conjugado de IgG1 humana con fármaco como un control negativo; y el otro grupo se inyectó intraperitonealmente con un ADC anti-MFI2 (por ejemplo como se preparó en el Ejemplo 18). Una semana luego de la dosificación, se eutanizaron ratones representativos de cada grupo y sus tumores se cosecharon y dispersaron en suspensiones de células únicas. Las células tumorales de cada grupo de tratamiento entonces fueron cosechadas,
15 combinadas y desagregadas como se describió antes en el Ejemplo 1. Las células se marcaron con FITC conjugado con anticuerpos H2kD antiratón y anticuerpos anti-CD45 antiratón para detectar las células de ratón; EpCAM para detectar células humanas; y DAPI para detectar las células muertas. La suspensión resultante luego se clasificó por FACS usando un citómetro de flujo BD FACS Canto II y se aislaron y recolectaron las células humanas vivas tumorales.

Un número de cohortes de ratón se inyectó con ya sea 1250, 375, 115 o 35 células humanas clasificadas vivas, provenientes de tumores tratados con ADC anti-MFI2. Como el control negativo el mismo número de ratones por cohorte se transplantó ya sea con 1000, 300, 100 o 30 células humanas clasificadas vivas, provenientes de tumores tratados con el control ADC IgG1. Los tumores de los ratones receptores se midieron semanalmente, y los ratones individuales se eutanizaron
20 antes que los tumores alcanzaran 1500 mm³. Los ratones receptores recibieron un puntaje para ser positivos o negativos respecto del crecimiento del tumor. El crecimiento de tumor positivo se define como el crecimiento de un tumor que excede los 100 mm³. Se usó estadística de distribución de Poisson (software L-Calcul, Stemcell Technologies) para calcular la frecuencia de los TIC en cada población.