

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 269**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
C07K 16/22	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/US2013/031542**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148263**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13770310 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2831110**

54 Título: **La terapia anti-EMP2 reduce las células madre cancerosas**

30 Prioridad:

30.03.2012 US 201261617996 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US y
PAGANINI BIOPHARMA, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WADEHRA, MADHURI;
BRAUN, JONATHAN;
GORDON, LYNN K. y
LAZAR, GARY S.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 689 269 T3

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

DESCRIPCIÓN

La terapia anti-EMP2 reduce las células madre cancerosas.

Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. § 119(e) para la solicitud estadounidense núm. 61/617.996 presentada el 30 de marzo de 2012, cuya descripción se incorpora por referencia en su totalidad.

Derechos gubernamentales

Este trabajo fue respaldado por el Departamento Estadounidense de Asuntos de Veteranos (U.S. Department of Veterans Affairs), y el Gobierno Federal posee ciertos derechos sobre la presente invención.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-EMP2, a sus composiciones farmacéuticas y métodos para usarlos a fin de reducir y detectar células madre cancerosas en múltiples tipos de cáncer. Más específicamente, la invención también se refiere a métodos para identificar células madre cancerosas, al descubrimiento de dianas/fármacos, vacunas antitumorales y al diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Antecedentes

15 El cáncer en Estados Unidos provoca cientos de miles de casos de muerte por año y sigue siendo una causa de mortalidad en todo el mundo. A pesar de los avances en el tratamiento de ciertas formas de cáncer mediante cirugía, radioterapia y quimioterapia, muchos tipos de cáncer siguen siendo esencialmente incurables. Incluso cuando aparece inicialmente un episodio de cáncer que puede ser tratado de manera eficaz mediante extirpación quirúrgica, radioterapia y/o quimioterapia, el cáncer habitualmente recurre. Dichos tipos de cáncer recurrentes se tornan altamente
20 resistentes o insensibles a los agentes quimioterapéuticos. Se considera que dichas recurrencia rápida y resistencia, después de la quimioterapia, son causadas por células madre cancerosas (CSC).

25 Las CSC son células cancerosas que tienen las características comunes de las células madre normales. Concretamente, al igual que las células madre, las CSC tienen la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en múltiples linajes. Por consiguiente, las CSC pueden diferenciarse en células cancerosas (es decir, las CSC son tumorigénicas).

30 Las CSC comprenden una fracción de células tumorales con propiedades de tipo células madre, como la capacidad de iniciar y mantener clones neoplásicos. Estas células tienen la capacidad de autorrenovarse, pero también dan origen a progenitores que producen células cancerosas de diversos fenotipos, aunque con menos potencial tumorigénico. Esta subpoblación de células de tipo células madre son las que resultan eficientes en la formación de tumores y la propagación de tumores metastásicos en comparación con células tumorales que no son células madre cancerosas.

35 En los últimos años, se ha hecho un enorme avance en el reconocimiento y la comprensión de células madre de cáncer (CSC). Está ahora aceptado que la activación de las rutas específicas puede conferir propiedades de tipo "células madre" en un subconjunto de células tumorales. Las CSC tienen la capacidad de autorrenovarse o de diferenciarse en células "hijas" adicionales, y se cree que son las promotoras principales de la recurrencia de los tumores y las metástasis(1). Las CSC son de particular interés para el desarrollo de nuevos fármacos, ya que estas células no son eliminadas por la terapia convencional sino que de hecho son enriquecidas. Por lo tanto, identificar nuevas dianas y fármacos para eliminar estas células es crucial para la atención de los pacientes.

40 Las CSC son un prerrequisito para muchos tipos de ontogenia de cáncer. Las células madre de cáncer exhiben bajas tasas de proliferación, alta capacidad de autorrenovación, una propensión a diferenciarse en células tumorales de proliferación activa, y demuestran resistencia a la quimioterapia o la radiación (véase, p. ej., Van der Griend et al. 2008). Asimismo, se han identificado las CSC en una gran variedad de tipos de cáncer como por ejemplo cáncer de la sangre, mama, cerebro, colon, melanoma, páncreas, próstata, ovario y pulmón. Concretamente, las CSC se pueden hallar en leucemias, glioblastomas, meduloblastomas y en prácticamente todos los tipos de tumores epiteliales
45 (carcinomas). Por consiguiente, las CSC probablemente cumplen una función en el crecimiento de los tumores, la progresión del cáncer, las metástasis y la recurrencia en una gran variedad de tipos de cáncer.

50 Se ha identificado una serie de moléculas en células madre de cáncer que incluyen expresión de CD44+, CD24-, ESA+ y ALDH1, pero estas proteínas siguen siendo dianas poco atractivas puesto que se expresan ampliamente (Lobo et al., "The Biology of Cancer Stem Cells," Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2007;23:675-99; Charafe-Jauffret et al., "Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature", Cancer Research, 2009;69:1302-13; Biddle et al., "Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or Proliferative", Cancer Research, 2011;71:5317-26). A su vez, se ha demostrado que las células madre de cáncer son relativamente resistentes tanto a radiación como a quimioterapia, por lo tanto contribuyen de manera significativa a la resistencia y

recurrencia después de la terapia (Charafe-Jauffret et al., "Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature", *Cancer Research*, 2009;69:1302-13; Biddle et al., "Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or Proliferative", *Cancer Research*, 2011;71:5317-26; Li et al., "Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy", *Journal of the National Cancer Institute*, 2008;100:672-9; Croker et al., "Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ human breast cancer cells", *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012;133:75-87; Rich et al., "Chemotherapy and Cancer Stem Cells," *Cell Stem Cell* 2007;1:353-5). De hecho, se ha demostrado que los agentes quimioterapéuticos como Paclitaxel y Epirubicina incrementan el número de células positivas de ALDH (Tanei et al., "Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers", *Clinical Cancer Research*, 2009;15:4234-41).

Las CSC se pueden caracterizar en función de la investigación de distintos patrones de marcadores superficiales dentro de los tumores primarios. Entre un número cada vez mayor de biomarcadores propuestos, se han utilizado CD44, CD133, ABCG2 y ALDH para identificar CSC. Asimismo, las vías de señalización aberrantes se proponen como otro rasgo de las CSC. (Hu et al., *Am J Cancer Res*, 2012, 2(3):340-356). Por ejemplo, las vías de señalización Wnt, Notch y Hedgehog son rasgos propuestos de las CSC.

Se describió CD44 como un robusto marcador de las CSC (Chu et al. 2009; Takaishi et al. 2009). Una sola célula CD44+ de un tumor colorrectal pudo formar una esfera *in vitro* y fue capaz de generar un tumor de xenoinjerto con propiedades semejantes a las del tumor primario (Du et al. 2008). CD 133 es también un marcador de CSC. CD 133 fue inicialmente descrito como un antígeno superficial específico de células madre hematopoyéticas humanas y como marcador de neuroepitelios murinos y varios otros epitelios embrionarios (Singh et al. 2004). Algunos estudios han utilizado CD133, solos o en combinación con otros marcadores, para aislar CSC de tumores malignos de colon, pulmón e hígado (Haraguchi et al. 2008). Asimismo, las células tumorales CD133+ reparan el daño del ADN inducido por radiación de manera más eficaz que las células tumorales CD 133 (Bao et al. 2006).

Las CSC fueron descritas por primera vez en leucemia mieloide aguda (AML) humana. (Hu et al., *Am J Cancer Res*, 2012, 2(3):340-356 y Lapidot et al., *Nature*, 1994, 367:645-648). Hay menos de una cada 10.000 CSC en una muestra de AML. No obstante, incluso en la tasa de 1:10.000, las CSC tuvieron la capacidad de repoblar las células de AML, proporcionando así pruebas de la capacidad de las CSC para autorrenovarse y diferenciarse. Desde este primer informe de la presencia de las CSC en AML, se han identificado CSC en tumores sólidos. Por ejemplo, el primer informe de CSC en tumores sólidos fue en cáncer de mama en 2003, y en estudios posteriores las CSC también se han demostrado en tumores de cerebro, colon, melanoma, páncreas, próstata, ovario, pulmón y gástricos. Hu et al., *Am J Cancer Res*, 2012, 2(3):340-356 y Al-Hajj et al., *PNAS*, 2003, 100:3983-3988). Por consiguiente, las CSC son dominantes en una diversidad de tipos de cáncer, y se necesitan tratamientos que las seleccionen y erradiquen.

La presencia de células madre cancerosas presenta profundas implicancias para la terapia del cáncer. Las terapias existentes se han desarrollado en gran parte contra la población en volumen de células tumorales, puesto que las terapias se identifican por su capacidad de reducir la masa tumoral. No obstante, las CSC a menudo son resistentes a la quimioterapia y pueden ser responsables de su fracaso (Sell et al. 2008). Por lo tanto, las quimioterapias convencionales que destruyen la masa de células cancerosas a menudo dejan de lado las CSC que son resistentes a la quimioterapia convencional. En consecuencia, dado que las CSC pueden desarrollarse más rápido después de la reducción con quimioterapia de células de cáncer distintas de CSC, las CSC se consideran uno de los mecanismos de rápido relapso y reaparición después de las quimioterapias.

Además, las CSC surgen de una serie de fuentes distintas. Por ejemplo, las CSC pueden surgir de mutaciones aleatorias a las células normales estromales derivadas del tejido adiposo, células progenitoras, células diferenciadas y células madre normales. Las células madre normales son las dianas principales de las progenitoras de CSC. Esto se debe a que las células madre normales, como las CSC, tienen la capacidad de autorrenovarse y en teoría requerirían menos mutaciones para transformar las CSC. Asimismo, se ha planteado la hipótesis de que las CSC derivadas de células madre normales son las CSC más agresivas. (Park et al., *Mol Ther*. 2009, 17:219-230).

Por consiguiente, ya que las CSC en función de su resistencia relativa a la quimioterapia y a la radioterapia pueden contribuir a la resistencia y relapso del tratamiento, la selección exitosa de esta población de células es crítica. Las estrategias diseñadas para seleccionar en forma específica CSC representan un planteamiento importante para mejorar el desenlace del paciente. Por lo tanto, es altamente conveniente poder identificar otros marcadores de células madre cancerosas adecuados, y usar estos marcadores en métodos de diagnóstico y pronóstico y/o para desarrollar terapias que se dirijan a las CSC.

En consecuencia, identificar nuevas dianas moleculares expresadas en CSC sigue siendo una necesidad en la técnica. La presente descripción aborda esta necesidad y otras.

Como se describe en este documento, la proteína de membrana epitelial 2 (EMP2) se expresa excesivamente en las CSC. EMP2 es una proteína tetraspan que pertenece a la familia específica de detención del crecimiento 3

(GAS3). Funcionalmente, la EMP2 se asocia con y modula la localización y la actividad de integrina $\alpha\beta 3$ y de cinasa de adhesión focal (FAK). EMP2 (SEC ID NO:1) se expresa en altos niveles en las células epiteliales del pulmón, el ojo y el aparato genitourinario. Al igual que varias proteínas tetraspan (CD9, CD81, PMP22), EMP2 en fibroblastos murinos se localiza en dominios de balsas lipídicas. La EMP2 controla el tráfico de la superficie celular y la función de determinadas integrinas, proteínas unidas a GPI y moléculas MHC de clase I, y regula en forma recíproca la expresión de caveolina. (véanse, Claas et al., J Biol Chem 276:7974-84 (2001); Hasse et al., JNeurosci Res 69:227-32 (2002); Wadehra et al., Exp Mol Pathol 74:106-12 (2003); Wadehra et al., Mol Biol Cell 15:2073-2083 (2004); Wadehra et al., J Biol Chem 277:41094-41100 (2002); y Wadehra et al., Clin Immunol 107:129-136 (2003)).

SEC ID NO:1 (ACCESO P54851) MLVLLAFIIA FHITSAALLF IATVDNAWWV GDEFFADVWR ICTNNTNCTV INDSFQEYST LQAVQATMIL STILCCIAFF IFVLQLFRLK QGERFVLTSI IQLMSCLCVM IAASIYTD RR EDIHDKNKAF YPVTREGSYG YSYILAWVAF ACTFISGMMY LILRKRK

La EMP2 parece regular el tráfico de diversas proteínas y glucolípidos facilitando la transferencia de moléculas de compartimientos endosomales post-Golgi hacia sitios de membrana plasmática apropiados. Concretamente, se cree que EMP2 facilita el tráfico correcto de moléculas selectas hacia los microdominios de balsas lipídicas enriquecidas con glucolípidos (GEM) (Wadehra et al., Mol Biol Cell 15:2073-83 (2004)). Los GEM son microdominios ricos en colesterol a menudo asociados con chaperonas, receptosomas y complejos de proteínas que son importantes para la transducción eficiente de señales (Leitinger et al., J Cell Sci 115:963-72 (2002); Moffett et al., J Biol Chem 275:2191-8 (2000)). A su vez, los GEM están implicados en la correcta clasificación de proteínas del aparato Golgi a la membrana plasmática (Abrami et al., J Biol Chem 276:30729-36 (2001); Galbiati et al., Cell 106:403-11 (2001); Gruenberg et al., Curr Opin Cell Biol 7: 552-63 (1995)). En este sentido, la modulación de los niveles de expresión de EMP2 o su ubicación en la membrana plasmática altera el repertorio superficial de varias clases de moléculas, como las integrinas, la cinasa de adhesión focal, las moléculas de histocompatibilidad mayor de clase I y otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulina como proteínas unidas a CD54 y GPI (Wadehra et al., Dev Biol 287:336-45 (2005); Wadehra et al., Clinical Immunology 107:129-36 (2003); Morales et al., Invest Ophthalmol Vis Sci (2008)).

La expresión de EMP2 se asocia con neoplasia de EMP2 (Wadehra et al., Cancer 107:90-8 (2006)). En cáncer de endometrio, por ejemplo, EMP2 es un indicador pronóstico independiente para tumores con mal desenlace clínico. Los tumores EMP2 positivos, comparados con tumores EMP2 negativos, tuvieron una invasión del miometrio significativamente mayor, un estado clínico superior, enfermedad recurrente o persistente después de la cirugía y una mortalidad más precoz. Los documentos WO2009/048980A2 y US2010/0272732A1 describen métodos y composiciones para el tratamiento y la prevención de infección por *Chlamydia* y cáncer. Los métodos y composiciones seleccionan tipos de cáncer que expresan o expresan de manera excesiva ácidos nucleicos y polipéptidos de EMP2 dirigiendo EMP2.

En función de los estudios descritos en este documento, se demuestra ahora que EMP2 se puede usar como diana en el tratamiento de las CSC en una diversidad de tipos de cáncer (p. ej., cáncer de mama). Por consiguiente, los polipéptidos de EMP2, anticuerpos anti-EMP2 y EMP2 ARNip se pueden usar para diagnosticar y tratar las CSC y promover la cura de una diversidad de tipos de cáncer. Como se describió anteriormente, aún existe una gran necesidad de métodos y composiciones útiles en la prevención, el tratamiento y la modulación de las CSC en cáncer. Por consiguiente, la presente invención da a conocer nuevas composiciones y métodos para satisfacer estas y otras necesidades.

Breve compendio de la invención

En una realización, la presente invención comprende un método para reducir la tasa de reaparición de un cáncer en un paciente. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar células madre de cáncer en un paciente. En determinadas realizaciones, las células madre de cáncer expresan EMP2 y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD133 ABCG2 y ALDH. En determinadas realizaciones, después de detectar las células madre de cáncer, se administra a un paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EMP2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo en el segundo bucle extracelular de EMP2. En determinadas realizaciones, el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos DIHDKNKAFYPVTREGSYG.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo además comprende un vehículo fisiológico aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, el anticuerpo compite con un anticuerpo que comprende las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo KS49, KS41, KS83, o KS89. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comparte 90% de identidad de aminoácidos con las regiones variable de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo KS49, KS41, KS83, o KS89. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia CDR idéntica a aquellas de un anticuerpo KS49, KS41, KS83 o KS89.

En determinadas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente una cantidad eficaz de por lo menos un agente anticáncer adicional. En determinadas realizaciones, el por lo menos un agente anticáncer adicional se selecciona del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos a base de platino, taxanos, inhibidores de tirosina cinasa, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-ErbB2 y sus combinaciones.

- 5 En determinadas realizaciones, el por lo menos un agente anticáncer adicional comprende un inhibidor de EGFR. En determinadas realizaciones, el inhibidor de EGFR comprende un anticuerpo anti-EGFR. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR comprende cetuximab.. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se selecciona del grupo que consiste en matuzumab, panitumumab y nimotuzumab. En determinadas realizaciones, el inhibidor de EGFR es un inhibidor de señalización de moléculas pequeñas.
- En determinadas realizaciones, el inhibidor de señalización de EGFR de moléculas pequeñas se selecciona del grupo que consiste en gefitinib, lapatinib, canertinib, pelitinib, erlotinib HCL, PKI-166, PD158780 y AG 1478.
- 10 En determinadas realizaciones, el por lo menos un agente anticáncer adicional comprende un inhibidor de VEGF. En determinadas realizaciones, el inhibidor de VEGF comprende un anticuerpo anti-VEGF. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
- En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EMP2 se conjuga con un resto efector. En determinadas realizaciones, el resto efector es un agente tóxico. En determinadas realizaciones, el agente tóxico es tal como ricino.
- 15 En determinadas realizaciones, el tratamiento comprende bloquear la capacidad de invasión del cáncer.
- En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-EMP2 se usan en las terapias de vacunas contra el cáncer.
- En determinadas realizaciones, el paciente es un ser humano o un mamífero.
- En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer que se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cerebro, cáncer de colon, melanoma, leucemia (p. ej., AML), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón y cáncer gástrico.
- 20 En determinadas realizaciones, el método comprende además un diagnóstico complementario. En determinadas realizaciones, el diagnóstico complementario comprende un anticuerpo anti-EGFR.
- En una segunda realización, la presente invención comprende un método para reducir la tasa de reaparición de un cáncer de mama en un paciente. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar células madre de cáncer en un paciente. En determinadas realizaciones, las células madre de cáncer expresan EMP2 y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD133 ABCG2 y ALDH. En determinadas realizaciones, después de detectar las células madre de cáncer, se administra a un paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EMP2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo en el segundo bucle extracelular de EMP2. En determinadas realizaciones, el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos DIHDKNAKFYPVTREGSYG.
- 25 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EMP2 además comprende un vehículo fisiológico aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EMP2 compite con un anticuerpo que comprende las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un diacuerpo KS49, KS41, KS83, o KS89. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comparte 90% de identidad de aminoácidos con las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un diacuerpo KS49, KS41, KS83, o KS89. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia CDR idéntica a aquellas de un diacuerpo KS49, KS41, KS83 o KS89.
- 30 En determinadas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente una cantidad eficaz de por lo menos un agente anticáncer adicional.
- En determinadas realizaciones, el por lo menos un agente anticáncer adicional se selecciona del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos a base de platino, taxanos, inhibidores de tirosina cinasa, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-ErbB2 y sus combinaciones.
- 35 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR comprende cetuximab.. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se selecciona del grupo que consiste en matuzumab, panitumumab y nimotuzumab.
- En determinadas realizaciones, por lo menos un agente anticáncer adicional se selecciona del grupo que consiste en gefitinib, lapatinib, canertinib, pelitinib, erlotinib HCL, PKI-166, PD158780 y AG 1478.
- 40 En determinadas realizaciones, el por lo menos un agente anticáncer adicional comprende un inhibidor de VEGF.
- En una tercera realización, la presente invención comprende un método para reducir la tasa de recurrencia de un cáncer de endometrio en un paciente. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar células madre de cáncer en un paciente. En determinadas realizaciones, las células madre de cáncer expresan EMP2 y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD133 ABCG2 y ALDH. En determinadas realizaciones, después de detectar las células madre de cáncer, se administra a un paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EMP2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo en el
- 45
- 50

segundo bucle extracelular de EMP2. En determinadas realizaciones, el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos DIHDKNAKFYPVTREGSYG.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EMP2 además comprende un vehículo fisiológico aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EMP2 compite con un anticuerpo que comprende las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un diacuerpo KS49, KS41, KS83, o KS89. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EMP2 comparte 90% de identidad de aminoácidos con las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un diacuerpo KS49, KS41, KS83, o KS89. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EMP2 comprende la secuencia CDR idéntica a aquellas de un diacuerpo KS49, KS41, KS83 o KS89.

10 En determinadas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente una cantidad eficaz de por lo menos un agente anticáncer adicional.

En determinadas realizaciones, el por lo menos un agente anticáncer adicional se selecciona del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos a base de platino, taxanos, inhibidores de tirosina cinasa, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-ErbB2 y sus combinaciones.

15 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR comprende cetuximab.. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR se selecciona del grupo que consiste en matuzumab, panitumumab y nimotuzumab.

En determinadas realizaciones, el por lo menos un agente anticáncer adicional se selecciona del grupo que consiste en gefitinib, lapatinib, canertinib, pelitinib, erlotinib HCL, PKI-166, PD158780 y AG 1478.

En determinadas realizaciones, el por lo menos un agente anticáncer adicional comprende un inhibidor de VEGF.

20 En una cuarta realización, la invención comprende un método A para detectar células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, el método comprende obtener una muestra biológica derivada de un ser humano que tiene o se sospecha que tiene cáncer. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar la expresión de EMP2 y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD133 ABCG2 y ALDH.

25 En determinadas realizaciones, la expresión de EMP2 se detecta con un anticuerpo que comprende las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un diacuerpo KS49, KS41, KS83, o KS89. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comparte 90% de identidad de aminoácidos con las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un diacuerpo KS49, KS41, KS83, o KS89.

30 En determinadas realizaciones, el ser humano tiene o se sospecha que tiene cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el ser humano tiene o se sospecha que tiene cáncer de mama triple negativo. En determinadas realizaciones, el ser humano tiene o se sospecha que tiene cáncer de endometrio.

Breve descripción de la invención

La Figura 1 ilustra el análisis metabólico (A) por análisis de tomografía de emisión de positrones (PET) funcional de células HS578t en un animal utilizando ¹⁸F-fludesoxiglucosa. (B) Análisis de los marcadores indicados en células HEC1a tratadas como se describió. (C) Análisis de los marcadores indicados en células BT474 con y sin tratamiento.

35 La Figura 2 ilustra los resultados de la aplicación de un anticuerpo anti-EMP2 en los marcadores indicados en células HCC1937 y (B) aplicación sistémica de anticuerpos anti-EMP2 en las células de los xenoinjertos indicados.

La Figura 3 ilustra experimentos que demuestran que el anticuerpo anti-EMP2 reduce las células madre cancerosas en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231.

40 La Figura 4 ilustra experimentos que demuestran que el anticuerpo anti-EMP2 reduce las células madre cancerosas en células de cáncer de endometrio humano HEC1A.

Figure 5 ilustra experimentos que demuestran que el anticuerpo anti-EMP2 + Docetaxel reduce la carga del tumor en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231.

Descripción detallada de la invención

Introducción

45 Las células de cáncer de mama (CSC) son células dentro de un tumor que tienen la capacidad de autorrenovarse. Las CSC también causan la generación de linajes heterogéneos de células cancerosas que comprenden el tumor. Se ha identificado a las CSC en una amplia variedad de tipos de cáncer. Por ejemplo, las CSC se han hallado en cáncer de mama, colon, melanoma, páncreas, sangre, próstata, ovario y pulmón.

50 Si bien las CSC se diferencian en células cancerosas, las CSC y las células cancerosas diferenciadas responden distinto a las terapias comunes para el cáncer. Específicamente, debido a que las CSC a menudo son resistentes a

la quimioterapia y a la radioterapia, las terapias comunes para el cáncer que se dirigen a las células cancerosas con quimioterapéuticos y radiación no son eficaces para combatir las CSC.

Los solicitantes han descubierto que la EMP2 se expresa en las CSC. Por consiguiente, en su primer aspecto, la invención da a conocer composiciones de anticuerpos anti-EMP2 y métodos para detectar las CSC en cáncer y células no cancerosas. En otro aspecto, la invención da a conocer composiciones de anticuerpos anti-EMP2 y métodos para inactivar y extraer las CSC en cáncer y células no cancerosas. En otro aspecto, la invención da a conocer composiciones de anticuerpos anti-EMP2 y métodos para diagnosticar cáncer y la probabilidad de recurrencia de cáncer. En un aspecto específico, la invención da a conocer la administración de anticuerpos anti-EMP2 en un vehículo fisiológicamente aceptable o en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la invención da a conocer composiciones de anticuerpos anti-EMP2 y métodos para detectar las CSC en cáncer de mama. En otro aspecto, la invención da a conocer composiciones de anticuerpos anti-EMP2 y métodos de co-administración con una o más terapias adicionales. En otro aspecto, la invención da a conocer métodos y productos diagnósticos complementarios para uso con los métodos y anticuerpos que se describen en este documento.

Por ejemplo, se describió previamente que dirigir EMP2 puede ofrecer una estrategia terapéutica para tratar cáncer de mama, cáncer de endometrio y enfermedades oculares. Las publicaciones de patentes estadounidenses 20100272732, 2012026420, 20120020983 y 20100196509, se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad. Al margen del tratamiento con anticuerpos anti-EMP2, los fármacos quimioterapéuticos comunes utilizados para tratar cáncer como cáncer de mama son terapias anti-VEGF que inhiben la angiogénesis. Por ejemplo, las terapias con VEGF incluyen Avastin® (bevacizumab), Sutent® (sunitinib), Lucentis® (ranibizumab), Tykerb® (lapatinib), Nexavar® (sorafenib), axitinib y pazopanib. Sin embargo, si bien estos fármacos reducen los tumores y demoran el tiempo hasta el avance del cáncer, el efecto no dura y el cáncer eventualmente recurre, crece y se propaga. Por consiguiente, si bien los fármacos como Avastin® y Sutent® pueden inactivar las células de cáncer de mama, existe un mecanismo subyacente que causa re-crecimiento y metástasis.

Se ha demostrado que los tratamientos del cáncer como Avastin® y Sutent®, es decir, tratamientos que inhiben el crecimiento y la formación de vasos sanguíneos, aumentan el número de células madre de cáncer. (Conley et al., PNAS, 2012, 109(8):2784-2789). Específicamente, se descubrió que en ratones los tumores tratados con estos fármacos desarrollaron más células madre cancerosas, el pequeño número de células dentro de un tumor que exacerban el crecimiento y la propagación del cáncer y que a menudo son resistentes al tratamiento estándar. Asimismo, tanto el número de células madre cancerosas como el porcentaje de células madre cancerosas que componen el tumor aumentaron después de ser tratadas con cada una de estas terapias. Esto posiblemente explique por qué los fármacos como Avastin® y Sutent® pueden reducir el tamaño del tumor y demostrar el progreso de la reaparición, pero no prevenir la recurrencia del tumor y la mortalidad. Por consiguiente, con el fin de que dichos fármacos sean eficaces para prevenir la recurrencia y reducir la mortalidad, se necesitan terapias que se dirijan e inhiban la supervivencia de las CSC.

Por consiguiente, la presente descripción da a conocer anticuerpos anti-EMP2 que se dirigen a las CSC. La presente descripción da a conocer también un método para combinar anti-angiogénesis con anticuerpos anti-EMP2 para potenciar la eficacia de los tratamientos del cáncer actuales.

Cáncer de mama

En determinadas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos anti-EMP2 se pueden usar para dirigir CSC asociadas con cáncer de mama (Figuras 2 - 5).

Un problema fundamental para desarrollar terapéuticos más eficaces para tratar el cáncer de mama, incluido el cáncer de mama triple negativo (TNBC), es la incapacidad de los tratamientos de afectar la viabilidad de las células madre de cáncer de mama que son críticas para el desarrollo, la proliferación y metástasis del cáncer de mama (Dick JE, "Breast cancer stem cells revealed", PNAS, 2003;100:3547-9). Estas células madre componen una población muy pequeña de las células totales en los tumores. No obstante, al igual que las células madre clásicas, tienen la capacidad de autorrenovarse, y esta propiedad es crítica para causar la formación de tumores, especialmente durante las metástasis. Una serie de estudios han indicado que la mayoría de los agentes anticáncer disponibles reducen los tumores inactivando las células tumorales más diferenciadas pero no debilitan las células madre cancerosas. La incapacidad de los quimioterapéuticos de afectar las células madre cancerosas se puede relacionar con la capacidad de las células madre de oscilar entre células de proliferación activa y células no divisoras más estáticas. Dado que la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos se dirigen a células divisoras y proliferativas, pueden no afectar las células madre de cáncer de mama en su etapa quiescente. Por ejemplo, se ha sugerido que la incapacidad de los fármacos quimioterapéuticos de afectar la supervivencia de las células madre de cáncer de mama y a la vez inactivar células tumorales diferenciadas podría explicar el motivo por el cual la reducción del tumor puede no ser un buen indicador de la supervivencia del paciente (Liu et al., "Targeting Breast Cancer Stem Cells", Journal of Clinical Oncology, 2010;28:4006-12). Si bien está aceptado que los nuevos fármacos terapéuticos que se dirigen a las células madre de cáncer de mama pueden ofrecer una eficacia mayor para tratar esta enfermedad y reducir la recurrencia de la enfermedad, no existe ningún fármaco que se dirija de manera eficaz y segura a estas células y que las inactive.

El cáncer de mama es el crecimiento anormal de células que se alinean en los conductos y lóbulos del tejido mamario, y se clasifica en función de si el cáncer comenzó en los conductos o lóbulos o si las células han invadido (se han desarrollado o propagado) por el conducto o lóbulo, y por el modo en que lucen las células bajo el microscopio (histología del tejido). No es inusual que un solo tumor de mama tenga una mezcla de cáncer invasivo e *in situ*.

La clasificación molecular de cáncer de mama ha identificado subtipos específicos, a menudo llamados subtipos "intrínsecos", con implicancias clínicas y biológicas, incluidos un subtipo luminal intrínseco, un subtipo intrínseco enriquecido con HER2 (también denominado subtipo HER2⁺ o ER⁻/HER2⁺) y un subtipo de cáncer de mama de tipo basal intrínseco (BLBC). (Perou et al. 2000). La identificación de los subtipos intrínsecos habitualmente se ha logrado mediante una combinación de métodos, incluidos (1) detección histopatológica, (2) estado de expresión de ER, PR y HER2 y (3) detección de marcadores celulares característicos.

El cáncer de mama de tipo basal, que expresa genes característicos de células epiteliales basales en la glándula mamaria normal, comprende hasta 15%-25% de todos los tipos de cáncer de mama (Kreike et al. 2007) y se asocia con el peor pronóstico de todos los tipos de cáncer de mama. Los BLBC expresan en forma deficiente el receptor de estrógenos (ER⁻), el receptor de progesterona (PR⁻) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2⁻) y abarcan 60% a 90% de los llamados tipos de cáncer "triple negativo" (ER⁻/PR⁻/HER2⁻). Si bien la mayoría de los tipos de cáncer de mama de tipo basal a menudo se denominan triple negativo en función del estado de expresión de ER, PR y HER2, no todos los tipos de cáncer de mama basales son triples negativos.

Por ende, el subtipo de cáncer de mama de tipo basal intrínseco puede además subdividirse en por lo menos tres subtipos distintos que se describen en este documento como subtipos de cáncer de mama de tipo basal "híbridos". Además de un subtipo triple negativo híbrido, los subtipos de cáncer de mama de tipo basales híbridos tienen perfiles que se asemejan al cáncer de mama de tipo basal y por lo menos a otro subtipo molecular de cáncer de mama. Por ejemplo, los subtipos de tipo basales híbridos pueden incluir un subtipo de tipo basal, híbrido/HER2⁺ que tenga un perfil receptor de ER⁻/PR⁻/HER⁺, un subtipo de tipo basal híbrido/luminal que tenga un perfil receptor de ER⁺/PR⁻/HER⁻ y un subtipo de tipo basal híbrido/triple negativo que tenga un perfil receptor de ER⁻/PR⁻/HER⁻.

El subtipo de cáncer de mama luminal intrínseco se caracteriza por la expresión o el exceso de expresión de ER y/o PR (ER⁺ y/o PR⁺). El subtipo luminal puede además subdividirse en función del estado HER2 en el subtipo luminal A, que además se caracteriza por la expresión deficiente de HER2 (ER⁺/PR⁺/HER⁻), y el subtipo luminal B, que además se caracteriza por la expresión excesiva de HER2 (ER⁺/PR⁺/HER⁺). Los subtipos luminales intrínsecos a menudo se consideran el subtipo de cáncer de mama más tratable y se asocian con el mejor pronóstico.

Mientras que ER y HER2 guían el tratamiento de los tipos del cáncer de mama luminal y HER2, respectivamente, la quimioterapia sigue siendo la única modalidad de terapia sistémica para BLBC. Los BLBC preferencialmente afectan a mujeres jóvenes, particularmente a mujeres afroamericanas, y se asocian con un comportamiento clínico agresivo de alto grado histológico y con un alto índice de metástasis en el cerebro y el pulmón (Carey et al. 2006). A diferencia de otros subtipos de cáncer de mama, parece no haber correlación entre el tamaño del tumor y las metástasis de los ganglios linfáticos en BLBC (Dent et al. 2007).

Los BLBC se asocian con expresión de citoqueratinas basales (CK5/6, CK14 y CK17), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), c-kit y p53, y se asocian con ausencia de expresión de ER, PR y HER2. Con una gran diversidad de genes asociados, los BLBC se han definido de forma diferencial en distintos estudios usando un conjunto de marcadores diagnósticos. Por ejemplo, Nielsen et al. definieron BLBC en base a la expresión de ER negativo y HER2 negativo además de citoqueratina basal positiva, EGFR y/o expresión de c-kit (Nielsen et al. 2004). Por otra parte, otros grupos han definido los BLBC en base a una combinación de expresión de ER negativo y expresión de HER2 negativo y CK5 positivo, P-cadherina y p63 (Elsheikh et al. 2008) o vimentina positiva, EGFR y CK5/6 (Livasy et al. 2006). Estos planteamientos técnicos diferentes en combinación con cohortes de pacientes ampliamente variables pueden explicar los resultados experimentales inconsistentes de estos marcadores.

La identificación del subtipo de tipo basal que usa inmunohistoquímica (IHC) para detectar receptores de hormonas solos es menos conveniente que detectar un biomarcador teranostático, ya que la identificación se basa en la ausencia de tinción de IHC para el receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) en lugar de la presencia de un marcador o marcadores de tumores específicos. Su diagnóstico es más uno de exclusión que de inclusión.

El cáncer de mama de tipo basal a menudo se denomina en forma sinónima "triple negativo" (es decir, ER⁻/PR⁻/HER2⁻), no obstante, no todos los tipos de cáncer de mama triples negativos son de tipo basal, y no todos los tipos de cáncer de mama de tipo basal son triples negativos. Si bien se han asociado otros marcadores moleculares con el cáncer de mama de tipo basal anteriormente descrito, dichos marcadores no son exclusivos de este cáncer de mama de tipo basal.

Los subconjuntos de cáncer de mama se pueden tratar con anticuerpos tales como aquellos descritos en este documento.

Anticuerpos

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden adoptar un número de formatos como los anticuerpos tradicionales, además de derivados, fragmentos y miméticos de anticuerpos. En determinadas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos anti-EMP2 son KS49, KS41, KS83 o KS89. Estos anticuerpos y su uso se describen en este documento.

Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está típicamente compuesto por dos pares de cadenas de polipéptidos idénticas, en donde cada par tiene una cadena "ligera" (típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG posee varias subclases, entre ellas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM posee subclases, entre ellas IgM1 e IgM2. Por lo tanto, "isotipo" tal como se emplea en este documento, significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE. Se ha de entender que los anticuerpos terapéuticos pueden también comprender híbridos de isotipos y/o subclases.

La porción aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. En la región variable, se juntan tres bucles por cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión a antígenos. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementaridad (en lo sucesivo "CDR"), en donde la variación en la secuencia de aminoácidos es lo más importante. "Variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de la región variable difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no se distribuye de manera uniforme. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-15 aminoácidos de largo o más.

Cada VH y VL está compuesto por tres regiones hipervariables ("regiones determinantes de complementaridad" "CDR") y cuatro FR, dispuestas desde el término amino hasta el término carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La región hipervariable en general abarca residuos de aminoácidos de aproximadamente residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1; "L" indica cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de la cadena ligera y aproximadamente 31-35B (HCDR1; "H" indica cadena pesada), 50-65 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3) en la región variable de la cadena pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos residuos que forman un bucle hipervariable (p. ej., los residuos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3) en la región variable de la cadena ligera y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Las CDR específicas de la invención se describen a continuación.

En toda la memoria, se emplea en general el sistema de numeración Kabat para hacer referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente residuos 1-107 de la región variable de las cadenas ligeras y residuos 1-113 de la región variable de las cadenas pesadas) (p. ej., Kabat *et al.*, supra (1991)).

Las CDR contribuyen a la formación de la unión a antígenos, o más concretamente, el sitio de unión a epítomos de los anticuerpos. "Epítomo" hace referencia a un determinante que interactúa con un sitio de unión a antígenos específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátomo. Los epítomos son agrupaciones de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y por lo general tienen características estructurales específicas, así como también características de carga específicas. Un solo antígeno puede tener más de un epítomo. Por ejemplo, como se describe en este documento, los anticuerpos se unen a un epítomo en el segundo dominio extracelular presunto de EMP2.

El epítomo puede comprender residuos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también llamado componente inmuno dominante del epítomo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, como residuos de aminoácidos efectivamente bloqueados por el péptido de unión a antígenos específico; En otros términos, el residuo de aminoácidos está dentro de la huella del péptido de unión a antígenos específico.

En algunas realizaciones, el epítomo deriva de la SEC ID NO:2, en donde la SEC ID NO:2 es EDIHDKNAKFYPVTREGSYG y representa una secuencia de polipéptidos de 20-mer del segundo bucle extracelular de EMP2 humana

Los epítomos pueden ser o bien conformacionales o lineales. Un epítomo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de distintos segmentos de la cadena de polipéptidos lineal. Un isotopo lineal es aquel producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. Los epítomos

conformacionales y no conformacionales se pueden distinguir porque la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

5 Un epítipo típicamente incluye por lo menos 3, y más usualmente por lo menos 5 u 8-10, aminoácidos en una conformación espacial única. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden verificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo "binning".

10 La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat *et al.* recogieron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. En base al grado de conservación de las secuencias, clasificaron secuencias primarias individuales en CDR y el marco, y elaboraron una lista de esto (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5a edición, publicación de NIH núm. 91-3242, E.A. Kabat et al., que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad).

15 En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulinas en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en este documento se entiende una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. Son de interés en la presente invención los dominios de cadena pesada, incluidos los dominios de cadena constante (CH) y los dominios bisagra. En el contexto de anticuerpos IgG, los isotipos de IgG tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, los dominios "CH" en el contexto de IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat.

20 Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región bisagra. Por "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra del anticuerpo" o "región bisagra de inmunoglobulina" se entiende en este documento el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primero y el segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio IgG CH1 finaliza en la posición de la UE 220, y el dominio IgG CH2 comienza en la posición 237 del residuo de la UE. Por lo tanto, para IgG se define en este documento que la bisagra del anticuerpo incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, en donde "bisagra inferior" en general hace referencia a las posiciones 226 o 230.

30 Son de interés en la presente invención las regiones Fc. Por "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc" tal como se emplea en la presente memoria se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el dominio inmunoglobulina de la primera región constante y en algunos casos la parte de la bisagra. Por lo tanto, Fc hace referencia a los dos últimos dominios inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, a los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y a la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, el dominio Fc comprende dominios inmunoglobulina Cy2 y Cy3 (Cy2 y Cy3) y la región bisagra inferior entre Cy1 (Cy1) y Cy2 (Cy2). Si bien los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana usualmente se define que incluye los residuos C226 o P230 a su término carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. En algunas realizaciones, como se describe más completamente a continuación, se realizan modificaciones de aminoácidos a la región Fc, por ejemplo para alterar la unión a uno o más receptores FcγR o al receptor FcRn.

40 En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud total. Por "anticuerpo de longitud total" se entiende en este documento la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluidas las regiones variables y constantes, incluidas una o más modificaciones, como se señala en el presente documento.

45 Alternativamente, los anticuerpos pueden ser una diversidad de estructuras, entre ellas fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en este documento "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (a veces denominadas "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de cada uno, respectivamente. Las estructuras que aún se basan [sic]

50 En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos específicos incluyen, entre otros, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo individual; (iv) el fragmento the dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546, incorporado por referencia en su totalidad) que consiste en una sola variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:5879-5883, que se incorpora por referencia en su totalidad), (viii) Fv de monocadena biespecífica (WO 03/11161, que se incorpora por referencia) y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por la fusión de genes (Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol.

326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:6444-6448, todos incorporados por referencia en su totalidad).

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser una mezcla de diferentes especies, p. ej., un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. Es decir, en la presente invención, los conjuntos de CDR se pueden usar con regiones marco y constantes distintas de aquellas específicamente descritas por la secuencia en el presente documento.

10 En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" hace referencia a anticuerpos que combinan regiones de una o más especies. Por ejemplo, "anticuerpos quiméricos" tradicionalmente comprende una región o regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la región o regiones constantes de un ser humano. "Anticuerpos humanizados" en general se refieren a anticuerpos no humanos a los que se les han intercambiado las regiones marco del dominio variable para las secuencias halladas en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, todo el anticuerpo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de sus CDR. Las CDR, de las cuales algunas o todas están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se insertan en el marco de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo cuya especificidad es determinada por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, p. ej., en los documentos WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536, todos incorporados por referencia en su totalidad. La "retromutación" de residuos marco aceptores seleccionados a los correspondientes residuos donantes a menudo es necesaria para recuperar la afinidad que habitualmente se pierde en el constructo injertado inicial (documentos US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, todos incorporados por referencia en su totalidad). El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente aquella de una inmunoglobulina humana, y por lo tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados pueden también generarse usando ratones con un sistema inmune genéticamente modificado. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, que se incorpora por referencia en su totalidad. Se conocen en el campo una diversidad de técnicas y métodos para humanizar y reconfigurar anticuerpos no humanos (Véase Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EE. UU.), y referencias allí citadas, incorporado por referencia en su totalidad). Los métodos de humanización incluyen, aunque sin limitarse a ello, los métodos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, EE. UU. 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci EE. UU. 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8, todos incorporados por referencia en su totalidad. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de resurfacing, como se escribe por ejemplo en Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 91:969-973, incorporado por referencia en su totalidad. En una realización, el anticuerpo original ha sido madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. <Se pueden emplear métodos basados en estructuras para humanización y maduración por afinidad, por ejemplo como se describe en USSN 11/004.590. Se pueden emplear métodos basados en selección para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables de anticuerpos, entre otros, los métodos descritos en Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759, todos incorporados por referencia en su totalidad. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de solamente partes de las CDR, como por ejemplo los métodos descritos en USSN 09/810,510; Tan et al., 45 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, todos incorporados por referencia en su totalidad.

En una realización, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos multiespecíficos, y notablemente anticuerpos biespecíficos. Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes, o epítopos diferentes en el mismo antígeno.

50 En algunas realizaciones, los anticuerpos son diacuerpos.

En una realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas de tipo anticuerpo minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061, incorporado por referencia en su totalidad. En algunos casos, el scFv se puede unir a la región Fc, y puede incluir parte de la región bisagra o la totalidad de esta.

55 Los anticuerpos de la presente invención en general se aíslan o son recombinantes. Un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen distintas especificidades antigénicas. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a EMP2 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de EMP2.

60 Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de EMP2 humana o EMP2 murina puede, no obstante, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otras

especies, como homólogos de especies de EMP2. A su vez, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

MAQVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSY
 AMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR
 DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRRGRKSAGIDYWG
 QGTLVTVSS

5 Los anticuerpos monoclonales aislados, que tienen diferentes especificidades, se pueden combinar en una composición bien definida. Por lo tanto, por ejemplo todas las combinaciones posibles de los anticuerpos KS49, KS41, KS83 o KS89 se pueden combinar en una sola formulación, si se desea.

Las siguientes secuencias de anticuerpos de origen humano codifican anticuerpos de gran avidéz específicos de EMP2 de seres humanos (KS49, KS83) y ratones (KS83) y tienen cadenas pesadas y ligeras de regiones variables de anticuerpos adecuadas para uso en cualquiera de los aspectos de la invención:

10 Cadena pesada de KS49

Cadena ligera de KS49

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNW
 YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
 QPEDFATYYCLQDYNGWTFGQGTKVDIKRAAAEQKLISEED
 LNGAA

Cadena pesada de KS83

MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY
 AMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR
 DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVGGATGAFDIWGGQ
 TMVTVSSS

15 Cadena ligera de KS83

DIVMTQSPSTVSASVGDRIIPCRASQSIGKWLAWY
 QQKPGKAPKLLIYKASSLEGWVPSRFSGSGSGTEFSLTISLQ
 PDDSATYVCQQSHNFPPTFGGGTKLEIKRAAAEQKLISEEDL
 NGAA

Otros diacuerpos para uso de acuerdo con cualquier aspecto de la invención incluyen KS41 y KS89:

Cadena pesada de KS41

MAQVQLVQSGGGGLVQPGRSLRLS CAASGFSFSEYP
 MHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRDD
 SKSTVY LQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGGTTVT
 VSS

20 Cadena ligera de KS41

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGW
 YQQKPGKAPELLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
 QPEDSATY YCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAAEQKLISEED
 LNGAA

Cadena pesada de KS89

MAQVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFSEYP
 MHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRDD
 SKSTVY LQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGT T V T
 V S S

Cadena ligera de KS89

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGW
 YQQKPGKAPELLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
 QPEDSATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAAEQKLISEED
 L N G A A

5 Las secuencias de región variable anti-EMP-2, utilizadas para codificar proteínas en esqueletos, incluyendo anticuerpos naturales, fragmentos de anticuerpos o esqueletos sintéticos, pueden unirse con avidez a EMP-2. Mediante esta unión, estas proteínas se pueden emplear para detección de EMP-2 y para bloquear la función de la EMP-2. La expresión de estas secuencias de región variable en esqueletos de anticuerpos naturales, o como en scFv, triacuerpo, diacuerpo o minicuerpo, marcado con radionúclido, son particularmente útiles en la detección *in vivo* de células que portan EMP-2. La expresión en estos esqueletos o esqueletos de anticuerpos naturales es favorable para bloquear la función de EMP-2 y/o inactivar células que portan EMP-2 (p. ej., tumores ginecológicos) *in vivo*.

10 En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer secuencias anti-EMP-2 que comprenden regiones CDR de un anticuerpo seleccionado entre KS49, KS83, KS41 y KS89, como se muestra en la Figura 8. Las regiones CDR provistas por la invención se pueden utilizar para construir una proteína de unión anti-EMP-2, entre ellas, un anticuerpo, un scFv, un triacuerpo, un diacuerpo, un minicuerpo y similares. En una realización determinada, una proteína de unión anti-EMP-2 de la invención comprenderá por lo menos una región CDR de un anticuerpo seleccionado entre KS49, KS83, KS41 y KS89. Las proteínas de unión anti-EMP-2 pueden comprender, por ejemplo, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 o una de sus combinaciones, de un anticuerpo humano provisto en la presente invención. En realizaciones particulares de la invención, una proteína de unión anti-EMP-2 puede comprender las tres secuencias CDR-H de un anticuerpo provisto en la presente invención, las tres secuencias CDR de un anticuerpo provisto en la presente invención, o ambas. Se pueden utilizar secuencias CDR anti-EMP2 CDR en un esqueleto de anticuerpo o su fragmento, y asimismo se pueden incluir anticuerpos humanizados o anticuerpos que contienen secuencias humanizadas. Estos anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, para detectar EMP-2, para detectar células que expresan EMP-2 *in vivo*, o para bloquear la función de la EMP-2. En algunas realizaciones, las regiones CDR se pueden definir usando la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM, la definición de contacto y cualquier otro sistema de numeración de CDR adecuado.

En algunas realizaciones las CDR son las siguientes:

CDR 1 pesada

30 SYAMH (49)

SYAMH (83)

EYPMH (41)

EYPMH (89)

CDR 2 pesada

35 VISYDGSNKYYADSVKG (49)

VISYDGSNKYYADSVKG (83)

VISYDGEYQKYADSVKG (41)

VISYDGEYQKYADSVKG (89)

CDR 1 ligera

40 QASQDISNYLN (49)

ES 2 689 269 T3

RASQSIGKWLA (83)

RASQGIRNDLG (41)

RASQGIRNDLG (89)

CDR 2 ligera

5 AASSLQS (49)

KASSLEG (83)

GASSLQS (41)

GASSLQS (89)

Secuencia de diacuerpos (KS49)

10 Cadena pesada, KS49

MAQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY
AMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRRGRKSAGIDYWG
QGTLVTVS

CDR1 SYAMH

[00147] CDR2 VISYDGSNKYYADSVKG

Cadena ligera, KS49

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNW
YQQKPGKAPKLLIYAAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCLQDYNGWTFGGGTKVDIKRAAAEQKLISEED
LNAAA

15 CDR 1 QASQDISNYLN

CDR2 AASSLQS

Secuencia de diacuerpos (KS83)

Cadena pesada, KS83

MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY
AMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMMNSLRAEDTAVYYCARTVGATGAFDIWGGQ
TMVTVSS

20 CDR1 SYAMH

CDR2 VISYDGSNKYYADSVKG

Cadena ligera, KS83

DIVMTQSPSTVSASVGDRTIIPCRRASQSIGKWLAWY
QQKPGKAPKLLIYKASSLEGWVPSRFSGSGSGTEFSLTISSLQ
PDDSATYVCQQSHNFPPTFGGGTKLEIKRAAAEQKLISEEDL
NAAA

25 CDR1 RASQSIGKWLA

CDR2 KASSLEG

Secuencia de diacuerpos (KS41)

Cadena pesada, KS41

MAQVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAAASGFSFSEYP
MHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRDD
 SKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGTTVT
 VSS

5 CDR 1 EYPMH

CDR 2 VISYDGEYQKYADSVKG

Cadena ligera, KS41

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW
 YQQKPGKAPELLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
 QPESATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAAEQKLISEED
 LNGAA

CDR 1 RASQGIRNDLG

10 CDR 2 GASSLQS

Secuencia de diacuerpos (KS89)

Cadena pesada, KS89

MAQVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAAASGFSFSEYP
MtH WVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRDD
 DSKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGTTV
 TVSS

CDR1 EYPMH

15 CDR2 VISYDGEYQKYADSVKG

Cadena ligera, KS89

DIVMetTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLG
 WYQQKPGKAPELLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 SLQPESATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAAEQKLISE
 EDLNGAA

CDR 1 RASQGIRNDLG

CDR 2 GASSLQS

20 En algunas realizaciones, la invención da a conocer anticuerpos (p. ej., diacuerpos, minicuerpos, triacuerpos) o sus fragmentos que tienen las CDR de un diacuerpo seleccionados entre KS49, KS83, KS41 y KS89. En algunas realizaciones, estos anticuerpos carecen de la marca de polihistina. En otras realizaciones, los diacuerpos poseen las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de un diacuerpo KS49, KS83, KS41 o KS89. Incluso en otras realizaciones, los anticuerpos son sustancialmente idénticos en secuencia a un diacuerpo seleccionado del grupo que consiste en KS49, KS83, KS41 y KS89 con o sin la marca de polihistidina. Incluso en otras realizaciones, los anticuerpos son sustancialmente idénticos en secuencia a las secuencias de cadenas ligeras y pesadas de un diacuerpo seleccionado del grupo que consiste en KS49, KS83, KS41 y KS89. Estas identidades pueden tener 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, y preferiblemente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos mencionados, los anticuerpos comprenden secuencias de CDR idénticas a aquellas del diacuerpo KS49, KS83, KS41 o KS89.

Los anticuerpos anti-EMP2 de la presente invención se unen específicamente a los ligandos de EMP2 (p. ej., las proteínas EMP2 humanas y murinas de SEC ID NO:1 y 2.

La unión específica para un antígeno o epítipo particular se puede exhibir, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene un KD para un antígeno o epítipo de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, por lo menos aproximadamente 10^{-12} M o más, en donde KD se refiere a una constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá un KD que es 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5,000-, 10,000- o más veces mayor para una molécula control en relación al antígeno o epítipo.

Además, la unión específica para un antígeno o epítipo particular se puede exhibir, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene un KA o Ka para un antígeno o epítipo de por lo menos 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5.000-, 10.000- o más veces más para el epítipo en relación a un control, en donde KA o Ka se refiere a una constante de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

La presente invención da a conocer además variantes de anticuerpos. Es decir, existe una serie de modificaciones que se pueden realizar a los anticuerpos de la invención, entre ellas, modificaciones de aminoácidos en las CDR (maduración por afinidad), modificaciones de aminoácidos en la región Fc, variantes de glucosilación, modificaciones covalentes de otros tipos, etc.

Por "variante" se entiende en la presente invención una secuencia de polipéptidos que difiere de aquella de un polipéptido original en función de por lo menos una modificación de aminoácidos. Las modificaciones de aminoácidos pueden incluir sustituciones, inserciones y eliminaciones, prefiriéndose las primeras en muchos casos.

En general, las variantes pueden incluir cualquier número de modificaciones, siempre y cuando la función de la proteína aún esté presente, como se describe en este documento. Es decir, en el caso de variantes de aminoácidos generadas con las CDR de KS49, KS41, KS83 o KS89, por ejemplo, el anticuerpo debe incluso unirse específicamente a EMP2 humana y/o murina. De manera similar, si las variantes de aminoácidos se generan con la región Fc, por ejemplo, las variantes de anticuerpos deben mantener la función de unión a los receptores requeridas para la aplicación o indicación particular del anticuerpo.

No obstante, en general, se utilizan entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 sustituciones de aminoácidos ya que a menudo la meta es alterar la función con un número mínimo de modificaciones. En algunos casos, hay entre 1 y 5 modificaciones, en donde entre 1-2, 1-3 y 1-4 también son útiles en muchas realizaciones.

Cabe destacar que el número de modificaciones de aminoácidos puede estar dentro de los dominios funcionales: por ejemplo, puede ser conveniente tener entre 1-5 modificaciones en la región Fc de proteínas de tipo salvaje o genéticamente modificadas, además de 1 a 5 modificaciones en la región Fv, por ejemplo. Una secuencia de variante de polipéptido preferiblemente poseerá por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95% o hasta to 98 o 99% identidad con las secuencias originales (p. ej., regiones variables, regiones constantes y/o secuencias de las cadenas pesadas y ligeras para KS49, KS41, KS83 o KS89. Se ha de destacar que dependiendo del tamaño de la secuencia, el porcentaje de identidad dependerá del número de aminoácidos.

Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" se entiende en este documento el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S100A se refiere a una variante de polipéptidos en la que la serina en la posición 100 se reemplaza con alanina. Por "inserción de aminoácidos" o "inserción" tal como se emplea en la presente memoria, se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original. Por "eliminación de aminoácidos" o "eliminación" tal como se emplea en la presente memoria, se entiende la extracción de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original.

Por "polipéptido original", "proteína original", "polipéptido precursor" o "proteína precursora" tal como se emplean en la presente memoria, se entiende un polipéptido no modificado que es subsiguientemente modificado para generar una variante. En general, los polipéptidos originales en este documento son Ab79 y Ab19. El polipéptido original puede hacer referencia al polipéptido propiamente dicho, a composiciones que comprenden el polipéptido original o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, por "polipéptido Fc original" tal como se emplea en la presente memoria, se entiende un polipéptido Fc modificado para generar una variante, y por "anticuerpo original" tal como se emplea en la presente memoria se entiende un anticuerpo modificado para generar una variante de anticuerpo.

Por "de tipo salvaje" o "WT" o "natural" se entiende en la presente memoria una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluidas variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG WT, etc. tiene una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos que no ha sido modificada intencionalmente.

Por "región Fc variante" se entiende en la presente invención una secuencia de Fc que difiere de aquella de una secuencia de Fc de tipo salvaje en función de por lo menos una modificación de aminoácidos. Variante de Fc puede hacer referencia al polipéptido Fc propiamente dicho, a composiciones que comprenden la variante del polipéptido Fc o a la secuencia de aminoácidos.

- 5 En algunas realizaciones, se realizan una o más modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR del anticuerpo (KS49, KS41, KS83 o KS89). En general, se sustituyen solamente 1 o 2 o 3 aminoácidos en una sola CDR, y en general no se hacen más de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios dentro de un conjunto de CDR. No obstante, se ha de apreciar que cualquier combinación de ninguna sustitución, de 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier CDR puede combinarse en forma independiente y opcional con cualquier otra sustitución.
- 10 En algunos casos, las modificaciones de aminoácidos en las CDR se denominan "maduración por afinidad". Un anticuerpo "maduro por afinidad" es uno que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que resulta en una mejoría de la afinidad del anticuerpo para un antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee esa alteración o alteraciones. En algunos casos, puede ser conveniente reducir la afinidad de un anticuerpo a su antígeno, pero esto en general no se prefiere.
- 15 La maduración por afinidad se puede llevar a cabo para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno por al menos aproximadamente 10% a 50-100-150% o más, o de 1 a 5 veces en comparación con el anticuerpo "original". Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783 que describe la maduración por afinidad mediante transposición del dominio de las cadenas pesadas variables (VH) y las cadenas ligeras variables (VL). La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos de marco se describe en: Barbas, et al. 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE. UU.* 91:3809-3813; Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9; y Hawkins et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 226:889-896, por ejemplo.
- 20

Alternativamente, las modificaciones de aminoácidos pueden realizarse en una o más de las CDR de los anticuerpos de la invención que son "silenciosas", p. ej., que no alteran significativamente la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Estas pueden realizarse por una serie de razones, como optimizar la expresión (como puede hacerse para los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención).

25

Por lo tanto, se incluyen dentro de la definición de las CDR y anticuerpos de la invención variantes de CDR y anticuerpos; es decir, los anticuerpos de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de KS49, KS41, KS83 o KS89. Asimismo, como se señala a continuación, las modificaciones de aminoácidos pueden también independiente y opcionalmente realizarse en cualquier región fuera de las CDR, incluidas regiones marco y constantes.

30

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-EMP2 de la invención están compuestos por un dominio Fc variante. Como se sabe en la técnica, la región Fc de un anticuerpo interactúa con un número de receptores Fc y ligandos, impartiendo un conjunto de funcionalidades importantes denominadas funciones efectoras. Estos receptores Fc incluyen, aunque sin limitarse a ello, (en seres humanos) FcγRI (CD64) incluidas isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluidas isoformas FcγRIIa (incluidos alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluidos FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluidas isoformas FcγRIIIa (incluidos alotipos V158 y F158, correlacionados con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) y FcγRIIIb (incluidos alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), FcRn (el receptor neonatal), C1q (proteína de complemento implicada en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)) y FcRn (receptor neonatal implicado en la semivida del suero). Se pueden efectuar modificaciones adecuadas en una o más posiciones como se señala en general, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE. UU. 11/841.654 y referencias allí citadas, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341,769, patente de EE. UU. núm. 6.737.056, patente de EE. UU. núm. 7.670.600, patente de EE. UU. núm. 6.086.875 todas incorporadas expresamente por referencia en su totalidad, y en particular para sustituciones específicas de aminoácidos que incrementan la unión a receptores Fc.

35

40

45

Además de las modificaciones señaladas anteriormente, se pueden efectuar otras modificaciones. Por ejemplo, las moléculas se pueden estabilizar por incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245, que se incorpora por referencia en su totalidad). Además, existe una variedad de modificaciones covalentes de anticuerpos que se pueden efectuar como se señala a continuación.

50

Las modificaciones covalentes de anticuerpos se incluyen dentro del alcance de la presente invención, y en general, pero no siempre, se realizan post-traducción. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula, sometiendo a reacción los residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivación orgánico capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales.

55

Los residuos cisteinilo más comúnmente se someten a reacción con α -haloacetatos (y las correspondientes aminas), como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos

cisteinilo pueden además derivarse por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoi)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-piridil disulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol y similares.

5 A su vez, las modificaciones en cisteínas son particularmente útiles en las aplicaciones de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), que se describen en más detalle a continuación. En algunas realizaciones, la región constante de los anticuerpos se puede modificar genéticamente para contener una o más cisteínas que son particularmente "tiol reactivas", como para permitir la disposición más específica y controlada del resto de fármaco. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. núm. 7.521.541, que se incorpora por referencia en su totalidad a la presente invención.

10 Los residuos histidilo derivan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo es también útil; la reacción preferiblemente se efectúa en cacodilato sódico 0,1M a pH 6,0.

15 Los residuos lisinilo y amino terminales se someten a reacción con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. La derivación con estos agentes tiene el efecto de revertir el cambio de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como metil picolinimidato; piridoxal fosfato; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasas con glioxilato.

20 Los residuos arginilo se modifican por reacción con uno o más de varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la gran pKa del grupo funcional guanidina. Asimismo, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como también con el grupo arginina épsilon-amino.

25 Se puede efectuar la modificación específica de residuos tirosilo, con particular interés en introducir etiquetas espectrales en los reiduos tirosilo por reacción con compuestos diazonio aromáticos o tetranitrometano. Lo más comúnmente, se usan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilo se yodinan usando 125I o 131I para preparar proteínas etiquetadas para uso en radioinmunoensayos, en donde el método T de cloramina anteriormente descrito es adecuado.

30 Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidias ($R^1-N=C=N-R^2$), en donde R y R' son grupos alquilo opcionalmente distintos, como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Asimismo, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten a residuos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

35 La derivación con agentes bifuncionales se usa para reticular anticuerpos a una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en una diversidad de métodos, además de los métodos descritos a continuación. Los agentes reticulantes comúnmente utilizados incluyen, p. ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos ésteres disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como -N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivación tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditiol]propioimidato producen intermedios fotoactivables capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Alternativamente, las matrices insolubles en agua reactivas, como carbohidratos activados por bromuro de gen de cynomolgus y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE. UU. núm. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440, todas incorporadas por referencia en su totalidad, se emplean para inmovilización de proteínas.

Los residuos glutaminilo y asparaginilo frecuentemente se desamidán a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidán bajo condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos residuos está dentro del alcance de la presente invención.

45 Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de reiduos serilo treonilo, metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86, incorporado por referencia en su totalidad), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Además, como apreciarán los expertos en la técnica, las etiquetas (incluidas las fluorescentes, enzimáticas, magnéticas, radiactivas, etc. se pueden añadir a los anticuerpos (además de otras composiciones de la invención).

50 Otro tipo de modificación covalente consiste en alteraciones en la glucosilación. En otra realización, los anticuerpos descritos en este documento se pueden modificar para incluir una o más glucoformas genéticamente modificadas. Por "glucoforma genéticamente modificada" tal como se emplea en la presente invención se entiende una composición de carbohidratos que se une covalentemente al anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidratos difiere químicamente de aquella de un anticuerpo original. Las glucoformas genéticamente modificadas pueden ser útiles para una diversidad de propósitos como, aunque sin limitarse a ello, aumentar o reducir la función efectora. Una forma preferida de glucoforma genéticamente modificada es la afucosilación, que se ha demostrado que se correlaciona con un incremento en la función ADCC, supuestamente a través de la unión más

5 firme al receptor FcγRIIIa. En este contexto, "afucosilación" significa que la mayor parte del anticuerpo producido en las células madre está prácticamente desprovista de fucosa, p. ej., 90-95-98% de los anticuerpos generados no tienen fucosa apreciable como componente del resto carbohidrato del anticuerpo (en general unido en N297 en la región Fc). Definidos desde el punto de vista funcional, los anticuerpos afucosilados en general exhiben por lo

10 Las glucoformas genéticamente modificadas se pueden generar mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; US 6.602.684; USSN 10/277.370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1, todos incorporados por referencia en su totalidad; tecnología Potelligent@ [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de ingeniería de glucosilación GlycoMAb@ [Glycart Biotechnology AG, Zurich, Suiza]). Muchas de estas técnicas se basan en controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectores que se unen en forma covalente a la región Fc, por ejemplo expresando una IgG en diversos organismos o líneas celulares, genéticamente modificadas o no (por ejemplo células CHO Lec-13 o células YB2/0 de hibridoma de rata, regulando las enzimas implicadas en la vía de glucosilación (por ejemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasa] y/o β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o modificando carbohidrato(s) después de que se ha expresado la IgG. Por ejemplo, el "anticuerpo modificado por azúcar" o "tecnología SEA" de Seattle Genetics funciona añadiendo sacáridos modificados que inhiben la fucosilación durante la producción; véase por ejemplo 20090317869, que se incorpora por referencia en su totalidad. Glucoforma genéticamente modificada típicamente se refiere al carbohidrato u

15 oligosacárido diferente; por lo tanto, un anticuerpo puede incluir una glucoforma genéticamente modificada.

20 Alternativamente, la glucoforma genéticamente modificada puede referirse a la variante de IgG que comprende el carbohidrato u oligosacárido diferente. Como se conoce en la técnica, los patrones de glucosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (p. ej., la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glucosilación particular, analizados anteriormente), como del organismo o célula hospedante en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se analizan a continuación.

25 La glucosilación de polipéptidos típicamente está unida en N o unida en O. Unida en N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tri-péptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para sujeción enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tri-péptidos en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación unida en O se refiere a la sujeción de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxilisina.

30 La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo tal que contenga una o más de las secuencias de péptidos anteriormente descritas (para sitios de glucosilación unidos en N). La alteración puede también efectuarse por adición de, o sustitución de, uno o más residuos serina o treonina a la secuencia de partida (para glucosilación unida en O). Para facilidad, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo preferiblemente se altera mediante cambios en el nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de modo tal que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

35 Otro medio para aumentar el número de restos carbohidrato en el anticuerpo es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos en el sentido que no requieren la producción de la proteína en una célula hospedante que tiene funciones de glucosilación para glucosilación unida en N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento empleado, el azúcar o azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como aquellos de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como aquellos de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como fenilamina, tirosina o triptofán, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306, ambos incorporados por referencia en su totalidad.

40 La eliminación de restos carbohidrato presentes en el anticuerpo de partida (p. ej., post-traducción) se puede llevar a cabo química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayor parte o de todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que el polipéptido queda intacto. La desglucosilación química se describe en Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y en Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131, ambos incorporados por referencia en su totalidad. La escisión enzimática de restos carbohidrato en los polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glucoasidasas como se describe en Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350, que se incorpora por referencia en su totalidad. La glucosilación en sitios de glucosilación potenciales se puede prevenir con el uso del compuesto tunicamicina como se describe en Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105, que se incorpora por referencia en su totalidad. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glucósido.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende el enlace del anticuerpo a diversos polímeros no proteínicos, entre ellos, diversos polímeros tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en el modo expuesto en, por ejemplo, el Catálogo PEG 2005-2006 de Nektar Therapeutics (disponible del sitio web de Nektar) las patentes de EE. UU. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337, todos incorporados por referencia en su totalidad. Además, como se conoce en la técnica, las sustituciones de aminoácidos se pueden efectuar en distintas posiciones dentro del anticuerpo para facilitar la adición de polímeros tales como PEG. Véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. núm. 2005/0114037A1, que se incorpora por referencia en su totalidad.

La presente invención da a conocer un número de anticuerpos en donde cada uno tiene un conjunto específico de CDR (incluidas, como se señaló anteriormente, algunas sustituciones de aminoácidos). Como se señaló anteriormente, los anticuerpos pueden estar definidos por conjuntos de 6 CDR, por regiones variables o por cadenas pesadas y ligeras de longitud total, incluidas las regiones constantes. A su vez, como se señaló anteriormente, también pueden efectuarse sustituciones de aminoácidos. En general, en el contexto de cambios dentro de las CDR, debido a la longitud relativamente corta de las CDR, las modificaciones de aminoácidos se describen en general en términos del número de modificaciones de aminoácidos que se pueden realizar. Si bien esto es también aplicable al análisis del número de modificaciones de aminoácidos que se pueden introducir en secuencias variables, constantes o de longitud total, además del número de cambios, es también apropiado definir estos cambios en términos del "% de identidad". Por lo tanto, como se describe en este documento, los anticuerpos incluidos dentro de la invención son 80, 85, 90, 95, 98 o 99% idénticos a KS49, KS41, KS83 o KS89 descritos en la presente invención.

En algunas realizaciones, se dan a conocer anticuerpos que pueden competir con los anticuerpos de la invención (por ejemplo, con KS49, KS41, KS83 o KS89) para unión a EMP2 humano y/o EMP2 murino. La competición para la unión a EMP2 o a una porción de EMP2 por dos o más anticuerpos anti-EMP2 se puede determinar por cualquier técnica adecuada, como se conoce en el campo.

Competición en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier reducción detectablemente significativa en la propensión de un anticuerpo de la invención (p. ej., KS49, KS41, KS83 o KS89) a unirse a su pareja de unión particular, p. ej., EMP2, en presencia del compuesto de ensayo. Típicamente, competición significa por lo menos aproximadamente 10-100% reducción en la unión de un anticuerpo de la invención a EMP2 en presencia del competidor, según lo medido por técnicas estándar tales como ensayos ELISA o Biacore®. Por consiguiente, por ejemplo, es posible establecer criterios para competitividad en donde se detecta por lo menos aproximadamente 10% de inhibición relativa; se detecta por lo menos aproximadamente 15% de inhibición relativa; o se detecta por lo menos aproximadamente 20% de inhibición relativa antes de que un anticuerpo se considere suficientemente competitivo. En casos en los que epítopos que pertenecen a los anticuerpos competitivos están ubicados próximos a un antígeno, la competición se puede marcar por una inhibición relativa mayor que aproximadamente 40% de unión a EMP2 (p. ej., por lo menos aproximadamente 45% de inhibición, como por lo menos aproximadamente 50% de inhibición, por ejemplo por lo menos aproximadamente 55% de inhibición, como por lo menos aproximadamente 60% de inhibición, por ejemplo por lo menos aproximadamente 65% de inhibición, tal como por lo menos aproximadamente 70% de inhibición, por ejemplo por lo menos aproximadamente 75% de inhibición, como por lo menos aproximadamente 80% de inhibición, por ejemplo por lo menos aproximadamente 85% de inhibición, como por lo menos aproximadamente 90% de inhibición, por ejemplo por lo menos aproximadamente 95% de inhibición, o un nivel superior de inhibición relativa).

En algunos casos, se etiquetan uno o más de los componentes de los ensayos de unión competitivos.

También puede ser el caso de que exista competición entre los anticuerpos anti-EMP2 con respecto a más de un epítipo de EMP2, y/o una porción de EMP2, p. ej., en un contexto en el que las propiedades de unión al anticuerpo de una región particular de EMP2 se retienen en sus fragmentos, como en el caso de un epítipo lineal bien presentado ubicado en varios fragmentos ensayados o un epítipo conformacional presentado en fragmentos de EMP2 suficientemente grandes, además de EMP2.

Evaluar la competición típicamente implica una evaluación de unión inhibidora relativa usando un anticuerpo de la invención, EMP2 (o bien humano, murino o ambos), y la molécula de ensayo. Las moléculas de ensayo pueden incluir cualquier molécula, incluidos otros anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, etc. Los compuestos se mezclan en cantidades suficientes para preparar una comparación que imparte información sobre la selectividad y/o especificidad de las moléculas en cuestión con respecto a las otras moléculas presentes.

Las cantidades del compuesto de ensayo, EMP2 y los anticuerpos de la invención pueden variar. Por ejemplo, para evaluaciones ELISA se requieren aproximadamente 5-50 µg (p. ej., aproximadamente 10-50 µg, aproximadamente 20-50 µg, aproximadamente 5-20 µg, aproximadamente 10-20 µg, etc.) del anticuerpo anti-EMP2 y/o dianas de EMP2 para evaluar si existe competición. Las condiciones también deben ser adecuadas para la unión. Típicamente, son adecuadas condiciones fisiológicas o prácticamente fisiológicas (p. ej., temperaturas de aproximadamente 20-40°C., pH de aproximadamente 7-8, etc.) para unión anti-EMP2:EMP2.

A menudo la competición es marcada por una inhibición relativa significativamente superior a aproximadamente 5% según lo determinado por ELISA y/o análisis FACS. Puede ser conveniente fijar un umbral superior de inhibición

relativa como criterio/determinante de lo que es un nivel adecuado de competición en un contexto particular (p. ej., en donde el análisis de competición se usa para seleccionar o detectar nuevos anticuerpos diseñados con la función de bloquear la unión de otro péptido o molécula de unión a EMP2 (p. ej., las parejas de unión naturales de EMP2 o anticuerpo anti-EMP2 natural).

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EMP2 de la presente invención se une específicamente a uno o más residuos o regiones en EMP2 pero no reacciona en forma cruzada con otras proteínas con homología a EMP2.

Típicamente, una falta de reactividad cruzada significa menos de aproximadamente 5% de inhibición competitiva relativa entre las moléculas cuando se evalúa por ELISA y/o análisis FACS usando cantidades suficientes de las moléculas bajo condiciones de ensayo adecuadas.

- 10 Los anticuerpos descritos pueden ser útiles para bloquear una interacción ligando-receptor o inhibir la interacción de componentes del receptor. Los anticuerpos anti-EMP2 de la invención pueden ser "bloqueantes" o "neutralizantes". Un "anticuerpo neutralizante" hace referencia a un anticuerpo cuya unión a EMP2 resulta en la inhibición de la actividad biológica de EMP2, por ejemplo su capacidad de interactuar con ligandos, actividad enzimática y/o capacidad de señalización. La inhibición de la actividad biológica de EMP2 se puede evaluar mediante uno o más de
15 varios ensayos estándar *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica.

- Que "inhibe la unión o "bloquea la unión" (por ejemplo cuando se hace referencia a la inhibición/bloqueo de la unión de una pareja de unión de EMP2 a EMP2) abarca tanto inhibición/bloqueo parcial como completo. La inhibición/bloqueo de la unión de una pareja de unión de EMP2 a EMP2 puede reducir o alterar el nivel normal o tipo de señalización celular que ocurre cuando una pareja de unión de EMP2 se une a EMP2 sin inhibición o bloqueo. La
20 inhibición o el bloqueo también están destinados a incluir cualquier reducción mensurable en la afinidad de unión de una pareja de unión de EMP2 a EMP2 cuando entra en contacto con un anticuerpo anti-EMP2, en comparación con el ligando no en contacto con un anticuerpo anti-EMP2, por ejemplo un bloqueo de unión de una pareja de unión de EMP2 a EMP2 por al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

- La presente invención también da a conocer métodos para producir los anticuerpos anti-EMP2 descritos. Estos métodos abarcan cultivar una célula hospedante que contiene ácido(s) nucleico aislado que codifica los anticuerpos de la invención. Como apreciará el experto en la técnica, esto se puede realizar en una variedad de formas, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo. En algunas realizaciones, en el caso en el que los anticuerpos de la invención sean anticuerpos tradicionales de longitud total, por ejemplo, una región variable de cadena pesada y una
25 región variable de cadena ligera bajo condiciones tales que se produce un anticuerpo y puede aislarse.

- 30 En general, se dan a conocer ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos la invención. Dichos polinucleótidos codifican las regiones variables y constantes de cada una de las cadenas pesadas y ligeras, aunque se contemplan también otras combinaciones en la presente invención de conformidad con las composiciones descritas en este documento. La presente invención también contempla fragmentos de oligonucleótidos derivados de los polinucleótidos y secuencias de ácido nucleico descritas complementarias a estos polinucleótidos.

- 35 Los polinucleótidos pueden estar en la forma de ARN o ADN. Los polinucleótidos en la forma de ADN, ADNc, ADN genómico, análogos de ácido nucleico y ADN sintético están dentro del alcance de la presente invención. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario, puede ser de cadena codificante (sentido) o no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante provista en este documento o puede ser una secuencia codificante diferente, en donde la secuencia,
40 como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica los mismos polipéptidos que el ADN provisto en la presente invención.

- En algunas realizaciones, el ácido(s) nucleico que codifica los anticuerpos de la invención se incorpora a vectores de expresión, que pueden ser extracromosómicos o estar diseñados para integrarse al genoma de la célula hospedante que se introduce. Los vectores de expresión pueden contener cualquier número de secuencias reguladoras
45 adecuadas (entre ellas secuencias de control de transcripción o traducción, promotores, sitios de unión al ribosoma, potenciadores, orígenes de replicación, etc.) u otros componentes (genes de selección, etc.), todos operativamente unidos como se conoce en la técnica. En algunos casos, se usan dos ácidos nucleicos y cada uno se dispone en un vector de expresión diferente (p. ej., cadena pesada en un primer vector de expresión, cadena ligera e un segundo vector de expresión) o alternativamente pueden disponerse en el mismo vector de expresión. Los expertos en la
50 técnica han de apreciar que el diseño del vector o vectores de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc.

- En general, los ácidos nucleicos y/o la expresión pueden introducirse en una célula hospedante adecuada para crear
55 una célula hospedante recombinante usando cualquier método apropiado para la célula hospedante seleccionada (p. ej., transformación, transfección, electroporación, infección), de modo tal que la molécula(s) de ácido nucleico están operativamente unida a uno o más elementos de control de expresión (p. ej., en un vector, en un constructo creado por procesos en la célula, integrados en el genoma de la célula hospedante). La célula hospedante recombinante resultante puede mantenerse bajo condiciones adecuadas para expresión (p. ej., en presencia de un inductor, en un

animal no humano adecuado, en medio de cultivo enriquecido con sales adecuadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc.), mediante lo cual se produce el polipéptido(s) codificado. En algunos casos, las cadenas pesadas se producen en una célula y la cadena ligera en otra.

5 Las líneas celulares mamíferas disponibles como hospedantes para expresión se conocen en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA entre ellas las células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK 293, células NSO, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2) y un número de otras líneas celulares. Las células no mamíferas incluidas, entre otras, células bacterianas, de levadura, insectos y plantas también se pueden utilizar para expresar anticuerpos recombinantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden producir en animales transgénicos tales como vacas o pollos.

Ácidos nucleicos que interactúan con EMP2

15 Diseño de secuencias de oligonucleótidos y ARN de interferencia (ARNi). Se utilizan métodos conocidos para identificar secuencias que inhiben genes candidatos relacionados con resistencia a los fármacos y reducción de la tasa de supervivencia. Dichos inhibidores pueden incluir, aunque sin limitarse a ello, oligonucleótidos de ARNip, oligonucleótidos antisentido, inhibidores de péptidos y secuencias de aptámeros que se unen y actúan para inhibir la expresión y/o la función de PVT1.

20 Se usa ARN interferente para generar inhibidores de ARN bicatenario pequeño (ARN pequeño de interferencia o ARNip) a fin de afectar la expresión de un gen candidato en general a través de escisión y destrucción de su ARN análogo. El ARN pequeño de interferencia (ARNip) es por lo general ADN bicatenario de 19-22 nt. Se puede obtener ARNip por síntesis química o por tecnología de ARNi basada en vectores de ADN. Usando tecnología de ARNip basada en vectores de ADN, se clona en un vector comercial un pequeño inserto de AD (aproximadamente 70 bp) que codifica un ARN de horquilla corta que se dirige al gen de interés. El vector que contiene el inserto se puede transfectar a la célula y expresar el ARN de horquilla corta. El ARN de horquilla se procesa rápidamente con dispositivos celulares en ARN bicatenario de 19-22 nt (ARNsi). En una realización preferida, el ARNip se inserta en un vector de ARNi adecuado ya que el ARNip sintético tiende a ser menos estable y menos eficaz en la transfección.

25 El ARNip se puede preparar usando métodos y algoritmos tales como aquellos descritos por Wang L, Mu F Y. (2004) A Web-based Design Center for Vector-based siRNA and siRNA cassette. Bioinformatics. (impreso); Khvorova A, Reynolds A, Jayasena S D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 115(2):209-16; Harborth J, Elbashir S M, Vandeburgh K, Manninga H, Scaringe S A, Weber K, Tuschl T. (2003) Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 13(2):83-105; Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall W S, Khvorova A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. Nat Biotechnol. 22(3):326-30 y Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. Nucleic Acids Res. 32(3):936-48, todos incorporados por referencia.

35 Otras herramientas para construir secuencias de ARNip son herramientas web tales como *siRNA Target Finder and Construct Builder* disponible de GenScript (<http://www.genscript.com>), *Oligo Design and Analysis Tools* de Integrated DNA Technologies (URL: <<http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx>>) o *siDESIGN.TM*. Center de Dharmacon, Inc. (URL: <<http://design.dharmacon.com/default.aspx?source=0>>). Se sugiere que el ARNip se construye usando el ORF (marco de lectura abierto) como la región que selecciona la diana, preferiblemente 50-100 nt en dirección 3' del codón de partida. Ya que los ARNip funcionan a nivel del ARNm, no al nivel de la proteína, para diseñar ARNip, puede ser necesaria la secuencia nucleotídica precisa de ARNm diana. Debido a la naturaliza degenerada del código genético y del sesgo del codón, es difícil pronosticar la secuencia nucleotídica correcta de la secuencia de péptidos. Asimismo, puesto que la función de los ARNip es escindir las secuencias de ARNm, es importante usar la secuencia de nucleótidos de ARNm y no la secuencia genómica para el diseño de ARNip, aunque como se señaló en los Ejemplos, la secuencia genómica puede utilizarse exitosamente para el diseño de ARN. No obstante, los diseños que usan información genómica podrían seleccionar involuntariamente intrones y como consecuencia el ARNip no sería funcional para silenciar el correspondiente ARN.

40 Un diseño de ARNip racional también debe minimizar los efectos fuera de la diana que con frecuencia surgen de la complementariedad parcial de las cadenas sentido o antisentido con una diana no intencionada. Se sabe que estos efectos tienen una dependencia de la concentración, y una forma de minimizar los efectos fuera de la diana a menudo consiste en reducir las concentraciones de ARNip. Otra forma de minimizar dichos efectos fuera de la diana es determinar el ARNip para especificidad de la diana.

45 El ARNip se puede modificar en el extremo 5' de la cadena sentido para presentar compuestos tales como tintes fluorescentes, grupos químicos o grupos polares. Se ha demostrado que la modificación en el extremo 5' de la cadena antisentido interfiere con la actividad de silenciamiento de ARNip y en consecuencia no se recomienda esta posición para la modificación. Se ha demostrado que las modificaciones en los otros tres extremos tienen un efecto mínimo o ningún efecto sobre la actividad de silenciamiento.

Se recomienda que los cebadores estén diseñados para asociar uno de los sitios de escisión de ARNip, ya que esto ayudará a eliminar posibles sesgos en los datos (es decir, uno de los cebadores debe estar en dirección 5' del sitio de escisión, el otro debe estar en dirección 3' del sitio de escisión). El sesgo puede introducirse en el experimento si la PCR amplía o bien 5' o 3' de un sitio de escisión, en parte porque es difícil anticipar cuánto tiempo puede persistir el producto de ARNm escindido antes de degradarse. Si la región ampliada contiene el sitio de escisión, entonces no puede ocurrir ninguna ampliación si el ARNip ha desempeñado su función.

Los oligonucleótidos antisentido ("oligos") se pueden diseñar para inhibir la función de genes candidatos. Los oligonucleótidos antisentido son ácidos nucleicos monocatenarios cortos, que funcionan hibridándose selectivamente a su ARNm diana, bloqueando de este modo la traducción. La traducción se inhibe o bien por actividad de RNase H nucleasa en el ADN-ARN, o inhibiendo la progresión del ribosoma, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas. Esto resulta en una síntesis discontinuada y la pérdida subsiguiente de la función de la proteína para la cual codifica el ARNm diana.

En una realización preferida, los oligos antisentido son fosforotioados tras la síntesis y purificación, y por lo general tienen 18-22 bases de longitud. Se contempla que los oligos antisentido del gen candidato pueden tener otras modificaciones tales como 2'-O-Metil ARN, metilfosfonatos, oligos quiméricos, bases modificadas y muchas otras modificaciones, incluidos oligos fluorescentes.

En una realización preferida, los oligos antisentido activos deben compararse con los oligos control que tienen la misma química general, composición base y longitud que el oligo antisentido. Estos pueden incluir secuencias inversas, secuencias desorganizadas y secuencias sentido. Se recomiendan las secuencias inversas y desorganizadas porque poseen la misma composición base, por lo tanto el mismo peso molecular y Tm que los oligonucleótidos antisentido activos. Se debe considerar el diseño oligo antisentido racional, por ejemplo, que los oligos antisentido no se aparean a un ARNm no intencional o no contienen motivos conocidos por invocar respuestas inmunoestimuladoras como cuatro residuos G contiguos, palíndromos de 6 o más bases y motivos CG.

Los oligonucleótidos antisentido se pueden usar *in vitro* en la mayoría de los tipos celulares con buenos resultados. Sin embargo, algunos tipos de células requieren el uso de reactivos de transfección para efectuar el transporte eficiente hacia el interior de las células. Se recomienda llevar a cabo experimentos de optimización usando diferentes concentraciones finales de oligonucleótidos en el intervalo de 1-5 μM en la mayoría de los casos con la adición de reactivos de transfección. La ventana de oportunidad, es decir, aquella concentración en la que se obtendrá un efecto antisentido reproducible, puede ser bastante estrecha, en donde encima de ese intervalo se pueden experimentar efectos no antisentido confusos y no específicos, y debajo de ese intervalo puede no verse ningún resultado en absoluto. En una realización preferida, la reducción del ARNm seleccionado demostrará el uso de técnicas tales como northern blot, PCR en tiempo real, matriz de ADNc/oligo o western blot. Se pueden tomar los mismos criterios de valoración para experimentos *in vivo*, y a la vez evaluar criterios de valoración conductuales.

Para cultivo celular, los oligonucleótidos antisentido deben resuspenderse en agua libre de nucleasa estéril (no se recomienda el uso de agua tratada con DEPC). Los oligonucleótidos antisentido se pueden purificar, liofilizar y estar listos para uso tras la resuspensión. Tras la suspensión, se pueden congelar disoluciones stock de oligonucleótidos a -20 grados C. y estables por varias semanas.

Se pueden preparar secuencias de aptámeros que se unen a secuencias de ARN o ADN específicas. Las secuencias de aptámeros se pueden aislar a través de métodos tales como aquellos descritos en la solicitud de patente de EE. UU conjuntamente en trámite de serie núm. 10/934.856, titulada "Aptamers and Methods for their Invitro Selection and Uses Thereof," que se incorpora por referencia al presente documento.

Se contempla que las secuencias descritas en este documento pueden variar para resultar en secuencias sustancialmente homólogas que retienen la misma función que la original. Tal como se emplea en este documento, un polinucleótido o su fragmento es "sustancialmente homólogo" (o "sustancialmente similar") a otro si, cuando se alinea de manera óptima (con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas) con el otro polinucleótido (o su cadena complementaria), usando un programa de alineación tal como BLASTN (Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) "Basic local alignment search tool" J. Mol. Biol. 215:403-410), hay una identidad de secuencia de nucleótidos de por lo menos aproximadamente 80%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95-98% de las bases de nucleótidos.

Las líneas celulares mamíferas disponibles como hospedantes para expresión se conocen en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA entre ellas las células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK 293, células NSO, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2) y un número de otras líneas celulares. Las células no mamíferas incluidas, entre otras, células bacterianas, de levadura, insectos y plantas también se pueden utilizar para expresar anticuerpos recombinantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden producir en animales transgénicos tales como vacas o pollos.

Métodos de tratamiento

Composiciones de anticuerpos para administración *in vivo*

Las formulaciones de los anticuerpos utilizados de acuerdo con la presente invención se preparan para conservar mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed.), en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metilo o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación de la presente invención puede además contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades de complementaridad que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser conveniente proporcionar anticuerpos con otras especificidades. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de moléculas pequeñas. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación con cantidades que son eficaces para el propósito que se tiene como fin.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se han de utilizar para administración *in vivo* deben ser estériles o prácticamente estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden obtener preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en donde las matrices tienen la forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de EE. UU. núm. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxitúterico. Si bien los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas por periodos de tiempo más breves.

Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo por un periodo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como consecuencia de la exposición a humedad a 37°C, lo que produce una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden contemplar estrategias racionales para estabilización, dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace intermolecular S-S a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

Modalidades administrativas

Los anticuerpos y los agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto de acuerdo con métodos conocidos, como administración intravenosa como bolo o infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

En ciertos aspectos, los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto con cáncer. En ciertos aspectos, los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto con cáncer de mama. En ciertos aspectos, los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto con cáncer de mama triple negativo. En ciertos aspectos, los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto con cáncer de cerebro, cáncer de colon, melanoma, leucemia (p. ej., AML), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón y/o cáncer gástrico.

Modalidades de tratamiento

- En los métodos de la invención, la terapia se usa para proveer una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad o afección. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende una mejoría en la enfermedad o afección, y/o una mejoría en los síntomas asociados con la enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva haría referencia a una o más de las siguientes mejorías en la enfermedad: (1) una reducción en el número de células neoplásicas; (2) un incremento en la muerte de células neoplásicas; (3) inhibición de la supervivencia de células neoplásicas; (5) inhibición (es decir, demora en algún grado, preferiblemente detención) del crecimiento del tumor; (6) un aumento en la tasa de supervivencia de los pacientes; y (7) alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección.
- Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección particular se pueden determinar por criterios de respuesta estandarizados específicos de esa enfermedad o afección. Se puede evaluar la respuesta del tumor para cambios en la morfología del tumor (es decir, la carga del tumor general, el tamaño del tumor y similares) usando técnicas de evaluación tales como resonancia magnética (RMN), radiografías, tomografía computada (TC), centellograma óseo, endoscopia y muestras de biopsias del tumor.
- Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejoría de los síntomas asociados con la enfermedad.
- Dicha respuesta puede persistir por lo menos de 4 a 8 semanas, o algunas veces de 6 a 8 semanas, después del tratamiento de acuerdo con la invención. Alternativamente, una mejoría en la enfermedad se puede categorizar como una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se entiende una reducción de por lo menos aproximadamente 50% de toda la carga del tumor mensurable (es decir, el número de células malignas presentes en el sujeto, o el volumen medido de las masas de tumor o la cantidad de proteína monoclonal anormal) en ausencia de nuevas lesiones, que puede persistir durante 4 a 8 semanas, o 6 a 8 semanas.
- El tratamiento de acuerdo con la presente invención incluye una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los medicamentos utilizados. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y por los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado.
- Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de los medicamentos de producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o la porción de anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.
- Una "cantidad terapéuticamente eficaz" para la terapia del tumor puede también medirse por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto de inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos.
- Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular o de inducir la apoptosis por ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño del tumor o aliviar los síntomas en un sujeto. El experto en la técnica podría determinar dichas cantidades en función de factores tales como la talla del sujeto, la intensidad de los síntomas del sujeto y la composición particular o ruta de administración seleccionada.
- Los esquemas de dosis se ajustan para proveer la respuesta deseada óptima (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo, o la dosis puede reducirse o aumentarse en forma proporcional según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales se pueden formular en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria utilizada en la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas como dosis unitarias para los sujetos que se han de tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.
- La especificación de las formas de dosis unitarias de la presente invención se rige por y depende directamente de (a) las características exclusivas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se ha de alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad de los individuos.
- Las dosis eficientes y los esquemas de dosis para los anticuerpos anti-EMP2 utilizados en la presente invención dependen de la dosis o la afección que se ha de tratar, y pueden ser determinados por el experto en la técnica.
- Un intervalo ilustrativo y no limitativo para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-EMP2 utilizado en la presente invención es aproximadamente 0,1-100 mg/kg, como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,1-20 mg/kg, como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,3, aproximadamente 1 o aproximadamente 3 mg/kg. En otra realización, el anticuerpo se

administra en una dosis de 1 mg/kg o más, como una dosis de 1 a 20 mg/kg, p. ej., una dosis de 5 a 20 mg/kg, p. ej., una dosis de 8 mg/kg.

5 Un profesional médico que tiene experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, un médico o un veterinario podría comenzar las dosis del medicamento empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores que aquel requerido para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la unidad de dosis hasta lograr el efecto deseado.

10 En una realización, el anticuerpo anti-EMP2 se administra por infusión en una forma de dosis semanal de 10 a 500 mg/kg tal como entre 200 y 400 mg/kg. Dicha administración se puede repetir, p. ej., de 1 a 8 veces, como de 3 a 5 veces. La administración se puede realizar por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, como de 2 a 12 horas.

En una realización, el anticuerpo anti-EMP2 se administra por infusión continua lenta durante un largo periodo, como más de 24 horas, si se requiere para reducir los efectos colaterales, como toxicidad.

15 En una realización, el anticuerpo anti-EMP2 se administra en una dosis semanal de 250 mg a 2000 mg, como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, por hasta 8 veces, como de 4 a 6 veces. La administración se puede realizar por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, como de 2 a 12 horas. Dicho esquema se puede repetir una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosis se puede determinar o ajustar midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre tras la administración, por ejemplo tomando una muestra biológica y usando anticuerpos anti-idiotípicos que seleccionan la región de unión al antígeno del anticuerpo anti-EMP2.

20 En otra realización, el anticuerpo anti-EMP2 se administra una vez por semana durante 2 a 12 semanas, como durante 3 a 10 semanas, como durante 4 a 8 semanas.

En una realización, el anticuerpo anti-EMP2 se administra como terapia de mantenimiento, como p. ej., una vez por semana durante un periodo de 6 meses o más.

25 En una realización, el anticuerpo anti-EMP2 se administra con un esquema que incluye una infusión de un anticuerpo anti-EMP2 seguida de una infusión de un anticuerpo anti-EMP2 conjugado a un radioisótopo. El esquema se puede repetir, p. ej., 7 a 9 días después.

30 Como ejemplos no limitativos, el tratamiento de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar como una dosis diaria de un anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en por lo menos uno del día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o alternativamente, por lo menos uno de la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquiera de sus combinaciones, usando dosis individuales o divididas cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquiera de sus combinaciones.

35 Terapia de combinación

40 En algunas realizaciones, su molécula de anticuerpo anti-EMP2 se usa en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, p. ej., un agente quimioterapéutico. Los ejemplos no limitativos de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen inhibidores de topoisomerasa I (p. ej., irinotecán, topotecán, camptotecina y sus análogos o metabolitos, y doxorubicina); inhibidores de topoisomerasa II (p. ej., etopósido, tenipósido y daunorrubicina); agentes alquilantes (p. ej., melfalán, clorambucil, bisulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbazina, metotrexato, mitomicina C y ciclofosfamida); intercaladores de ADN (p. ej., cisplatino, oxaliplatino y carboplatino); intercaladores de ADN y generadores de radicales libres como bleomicina; y miméticos de nucleósidos (p. ej., 5-fluorouracil, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e hidroxiaurea).

45 Los agentes quimioterapéuticos que perturban la replicación celular incluyen: paclitaxel, docetaxel y análogos relacionados; vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida y análogos relacionados (p. ej., CC-5013 y CC-4047); inhibidores de proteína tirosina cinasa (p. ej., mesilato de imatinib y gefitinib); inhibidores de proteasomas (p. ej., bortezomib); inhibidores de NF- κ B, incluidos inhibidores de I κ B cinasa; anticuerpos que se unen a proteínas que se expresan excesivamente en cáncer y otros inhibidores de proteínas o enzimas conocidos por estar aumentados, expresados excesivamente o activados en cáncer, cuya inhibición reduce la replicación celular.

50 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se pueden usar antes, simultáneamente o después del tratamiento con cualquiera de los agentes quimioterapéuticos descritos en la presente invención o conocidos por el experto en la técnica en este momento o con posterioridad.

Eficacia de los métodos descritos en este documento

5 En ciertos aspectos de la presente invención, la eficacia de la terapia anti-EMP2 se mide por concentraciones reducidas en suero de los marcadores específicos del tumor, aumento del tiempo de supervivencia total, reducción del tamaño del tumor, remisión de cáncer, reducción de respuesta de marcadores de metástasis y disminución de efectos adversos de la quimioterapia.

En ciertos aspectos de la presente invención, la eficacia se mide con métodos y productos diagnósticos complementarios. Las mediciones de diagnósticos complementarios se pueden efectuar antes, durante o después del tratamiento anti-EMP2.

Diagnósticos complementarios

10 En otras realizaciones, la presente descripción se refiere a métodos y productos diagnósticos complementarios. En una realización, el método y los productos diagnósticos complementarios se pueden usar para monitorear la regeneración y diferenciación de CSC. En una realización, el método y los productos diagnósticos complementarios se pueden usar para monitorear el tratamiento del cáncer. En una realización específica, el método y los productos diagnósticos complementarios se pueden usar para monitorear el tratamiento del cáncer de mama triple negativo. En una realización específica, el método y los productos diagnósticos complementarios se pueden usar para monitorear el tratamiento de cáncer de mama triple negativo. En una realización, el método y los productos diagnósticos complementarios se pueden usar para monitorear el tratamiento de cáncer de cerebro, cáncer de colon, melanoma, leucemia (p. ej., AML), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón y/o cáncer gástrico.

20 En algunas realizaciones, los métodos y productos diagnósticos complementarios incluyen ensayos moleculares para medir los niveles de proteínas, genes o mutaciones genéticas específicas. Dichas mediciones se pueden usar, por ejemplo, para pronosticar si la terapia anti-EMP2 beneficiará a un individuo específico, para pronosticar la dosis eficaz de la terapia anti-EMP2, para monitorear la terapia anti-EMP2, ajustar la terapia anti-EMP2, adaptar la terapia anti-EMP2 a un individuo y supervisar la progresión y la remisión del cáncer.

25 En algunas realizaciones, el diagnóstico complementario se puede usar para monitorear una terapia de combinación.

En algunas realizaciones, el diagnóstico complementario puede incluir un anticuerpo anti-EMP2 descrito en la presente invención.

30 En algunas realizaciones, el diagnóstico complementario se puede usar antes, durante o después de la terapia anti-EMP2.

Artículos de fabricación

35 En otras realizaciones, se da a conocer un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos anteriormente descritos. El artículo comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una diversidad de materiales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo. La etiqueta en o asociada con el recipiente indica que la composición se utiliza para tratar la afección de elección. El artículo de manufactura puede además comprender un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, como disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede además incluir otros materiales deseables desde el punto de vida comercial y del usuario, como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Ejemplos

45 Ejemplo 1. Anti-EMP2 reduce las células madre cancerosas en tumores

50 Con el fin de ejemplificar la capacidad del anticuerpo anti-EMP2 de reducir las células madre cancerosas en tumores, se administra anti-EMP2 a una línea celular de mama triple negativa humana. Se inyectó la línea celular de mama triple negativa humana MDA-MB-231 a ratones lampiños con el fin de establecer tumores de xenoinjerto, y los tumores se trataron por vía parenteral o bien con PG-101 (anticuerpo monoclonal anti-EMP2 IgG1) o IgG1 control. El gráfico de la línea superior izquierda demuestra el cese del crecimiento del tumor observado con el tratamiento anti-EMP2. Después del periodo de tratamiento, los tumores se disecaron y se evaluó la frecuencia de las células tumorales positivas para el marcador de células madre cancerosas de mama aldefluor (un ensayo enzimático para ALDH1).

El tratamiento anti-EMP2 redujo las células madre de cáncer positivas para el biomarcador (**Figura 3**, gráfico de barras superior derecho).

Ejemplo 2. El tratamiento anti-EMP2 previene el reinicio de la formación de tumores.

5 Una característica clave de las células de cáncer de mama es la capacidad de reiniciar la formación de tumores en hospedantes secundarios. Para ensayar si el anticuerpo anti-EMP2 puede prevenir la formación de tumores, células de tumores viables aisladas después del tratamiento con anti-EMP2 IgG1 o IgG1 se transfirieron a nuevos ratones lampiños receptores, y se ensayaron para deficiencia del reinicio del tumor. Para limitar las células transferidas (500, 5000 o 50000 células), se observó el reinicio eficiente con células tumorales después del tratamiento IgG1 control, pero se observó el reinicio del tumor residual mínimo con células tumorales después del tratamiento anti-EMP2 IgG1. Estos hallazgos demuestran que el anticuerpo anti-EMP2 reduce las células madre cancerosas cuando son enumeradas por los biomarcadores o la funcionalidad evaluada por el reinicio de tumores.

El efecto equivalente de anti-EMP2 en células madre cancerosas se ejemplifica también con HEC1A, una línea de células de cáncer de endometrio (Figura 4). Esto demuestra que el efecto de las células madre cancerosas de anti-EMP2 se exhibe en tumores humanos de tejido diferente y origen epitelial.

15 Ejemplo 3. El tratamiento anti-EMP2 previene el reinicio de la formación de tumores.

Para ejemplificar la acción del anticuerpo anti-EMP2 de reducir las células madre cancerosas en el contexto de la quimioterapia combinada, las células madre cancerosas se trataron con una combinación de docetaxel y anticuerpo anti-EMP2.

20 Las células madre de cáncer son resistentes a y aumentadas en abundancia por varias categorías de quimioterapia citotóxica. Esta biología pronostica que seleccionar células madre cancerosas en el contexto de quimioterapia citotóxica será altamente eficaz en el control de tumores. Como se describe en la Figura 5, se inocularon células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231 en ratones lampiños para establecer xenoinjertos, y luego se trataron con una combinación de docetaxel y anti-EMP2 IgG1 (la barra indica periodo de tratamiento). El crecimiento del tumor se demoró en presencia o bien de docetaxel o de anti-EMP2 IgG1. No obstante, en presencia de ambos agentes, el tumor remitió, y en 60% de los ratones, el tumor fue indetectable. Esto aporta una prueba directa de la sinergia pronosticada de la quimioterapia del cáncer (que se dirige a las células de cáncer del tumor) y anti-EMP2 (que se dirige a las células madre cancerosas) para la terapia eficaz contra el cáncer.

30 Si bien la invención anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de comprensión, será fácilmente obvio para aquellos con experiencia en la técnica en vista de las descripciones de la presente invención que se pueden efectuar ciertos cambios y modificaciones sin desviarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones anejas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo para uso en la reducción de células madre cancerosas que expresan EMP2 en un paciente que tiene cáncer y que se ha identificado previamente que comprende células madre cancerosas que expresan EMP2 y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD 133 ABCG2 y ALDH, en donde:

5 a) el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

MAQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRRGRKSAGIDYWGQGLTVTVSS, y una cadena ligera que tiene la
secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQDYNGWTFGQGTKVDIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA;

10 b) el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

MAQVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFSEYPMHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRD
DSKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGTTVT, y una cadena ligera que tiene la secuencia de
aminoácidos:

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPELLIYGASSLQ
SGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDSATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA;

15 c) el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVIGATGAFDIWGQGTMTVTVSSS, y una cadena ligera que tiene la secuencia
de aminoácidos:

DIVMTQSPSTVSASVGDRVIIPCRASQSIGKWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLE
GWVPSRFRSGSGSGTEFSLTISLQPDSDATYYVCQSHNFPPTFGGGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA;

20 d) el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

MAQVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFSEYPMHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRD
DSKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGTTVT, y una cadena ligera que tiene la secuencia de
aminoácidos:

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPELLIYGASSLQ
SGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDSATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA;

25 e) el anticuerpo compite para la unión a EMP2 con un anticuerpo que codifica a), b), c) o d);

f) el anticuerpo comparte 90% de identidad de aminoácidos con las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de acuerdo con a), b), c) o d); o

g) el anticuerpo comprende secuencias de CDR idénticas a aquellas de un anticuerpo de acuerdo con a), b), c) o d).

30 2. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho uso comprende además la administración de por lo menos un agente anticáncer adicional.

3. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el por lo menos un agente anticáncer adicional

(i) se selecciona del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos basados en platino, taxanos, inhibidores de tirosina cinasa, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-ErbB2 y combinaciones de estos,

35 (ii) comprende un inhibidor de EGFR, o

(iii) comprende un inhibidor de VEGF.

4. El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde el anticuerpo se conjuga con un resto efector, por ejemplo un agente tóxico.

5 5. El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el cáncer es cáncer de mama.

6. El anticuerpo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el cáncer se selecciona del grupo que comprende cáncer de cerebro, cáncer de colon, melanoma, leucemia (p. ej., AML), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón y cáncer gástrico.

10 7. El anticuerpo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho uso comprende además el uso de un diagnóstico acompañante, por ejemplo, un anticuerpo anti-EMP2.

8. El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el cáncer es cáncer de endometrio.

9. Un método *in vitro* para detectar células madre cancerosas, en donde el método comprende:

15 proporcionar una muestra biológica derivada de un ser humano que tiene o se sospecha que tiene cáncer; y detectar la expresión de EMP2 y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD 133, ABCG2 y ALDH, en donde la expresión de EMP2 se detecta con un anticuerpo que comparte 90% de identidad de aminoácidos en donde las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo comprenden:

a) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

20 MAQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRRGRKSAGIDYWGQGTLLVTVSS, y una cadena ligera que tiene la
secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQDYNGWTFGQGTKVDIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA;

b) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

25 MAQVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFSEYPMHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRD
DSKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGTTVT, y una cadena ligera que tiene la secuencia de
aminoácidos:

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPPELLIYGASSLQ
SGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDSATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA;

c) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

30 MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVGATGAFDIWGQGTMTVTVSS, y una cadena ligera que tiene la secuencia
de aminoácidos:

DIVMTQSPSTVSASVGDRIIPCRASQSIGKWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLE
GWVPSRFRSGSGSGTEFSLTISLQPDSSATYVCQSHNFPPTFGGGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA; o

d) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

35 MAQVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFSEYPMHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRD
DSKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGTTVT, y una cadena ligera que tiene la secuencia de
aminoácidos:

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPELLIYGASSLQ
SGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la expresión de EMP2 se detecta con un anticuerpo que comprende:

a) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

- 5 MAQVQLVQSGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARDRRGRKSAGIDYWGGTLVTVSS, y una cadena ligera que tiene la secuencia
de aminoácidos:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNGWTFGQGTKVDIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA;

b) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

- 10 MAQVQLVQSGGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFSEYPMHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRDN
DSKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGTTVT, y una cadena ligera que tiene la secuencia de
aminoácidos:

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPELLIYGASSLQ
SGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA;

c) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

- 15 MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARTVIGATGAFDIWGQGTMTVTVSS, y una cadena ligera que tiene la secuencia
de aminoácidos:

DIVMTQSPSTVSASVGDRVIIPCRASQSIGKWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLE
GWVPSRFGSGSGTEFSLTISSLQPDDSATYVCQSHNFPPTFGGGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA; or

d) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

- 20 MAQVQLVQSGGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFSEYPMHWVRQAPGRGLESVAVISYDGEYQKYADSVKGRFTISRDN
DSKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARTINNGMDVWGQGTTVT, y una cadena ligera que tiene la secuencia de
aminoácidos:

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPELLIYGASSLQ
SGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCLQDYNGWTFGQGTKLEIKRAAA
EQKLISEEDLNGAA.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde el ser humano tiene o se sospecha que tiene
25 cáncer de mama, por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, o cáncer de endometrio.

Figura 1

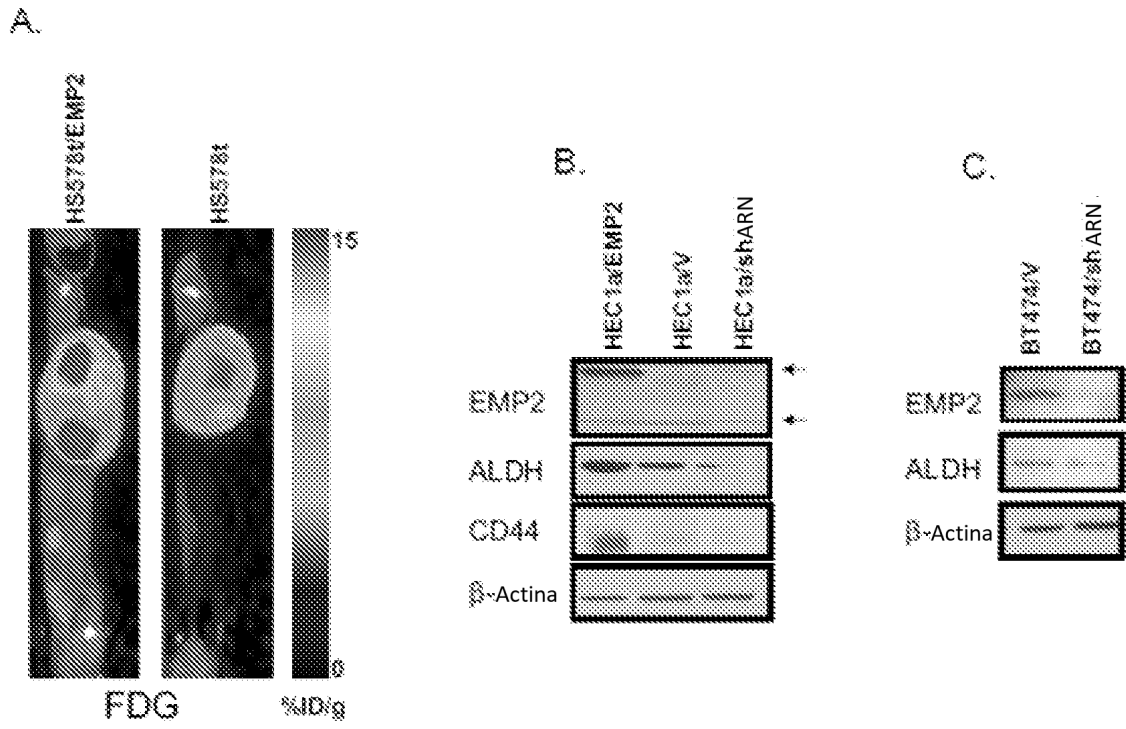
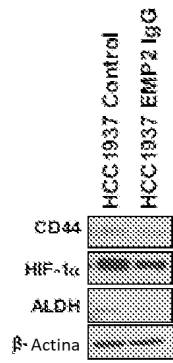
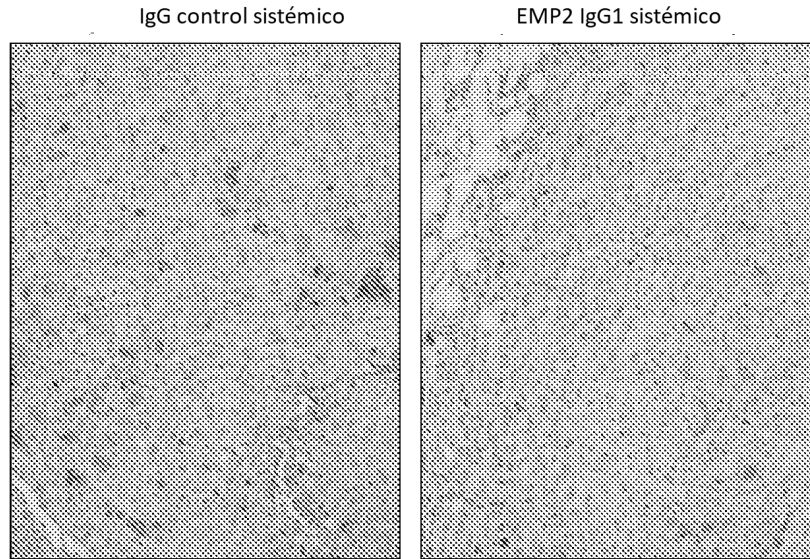


Figura 2

A.



B.



xenoinjertos TNBC MDA-MB468 tratados

FIGURA 3

EN BLANCO DESPUÉS DE LA PRESENTACIÓN

FIGURA 4

EN BLANCO DESPUÉS DE LA PRESENTACIÓN

FIGURA 5

EN BLANCO DESPUÉS DE LA PRESENTACIÓN