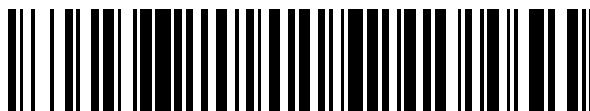


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 283**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2011 PCT/US2011/026079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO2011106528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2011 E 11748067 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2538976**

54 Título: **Inmunoconjugados contra el receptor 1 de folato y usos de los mismos**

30 Prioridad:

12.11.2010 US 413172 P

20.05.2010 US 346595 P

24.02.2010 US 307797 P

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

16.06.2017

73 Titular/es:

**IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**AB, OLGA;
TAVARES, DANIEL;
RUI, LINGYUN;
PAYNE, GILLIAN y
GOLDBAKHER, VIKTOR S.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 617 283 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

Inmunocjugados contra el receptor 1 de folato y usos de los mismos

Campo de la invención

5 El campo de esta invención se refiere en general a inmunocjugados que se unen al receptor 1 de folato humano, así como a inmunocjugados para uso en el tratamiento de enfermedades, tales como el cáncer.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo desarrollado, con más de un millón de personas diagnosticadas con cáncer y 500.000 muertes al año sólo en los Estados Unidos. En total, se estima que más de 1 de cada 3 personas desarrollarán algún tipo de cáncer durante su vida. Existen más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro de los cuales, mama, pulmón, colorrectal y próstata, representan más de la mitad de todos los nuevos casos (Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53: 5-26).

15 El receptor 1 de folato (FOLR1), también conocido como Receptor-alfa de Folato o Proteína de unión a Folato, es una proteína N-glicosilada expresada en la membrana plasmática de las células. El FOLR1 tiene una gran afinidad por el ácido fólico y por varios derivados reducidos del ácido fólico. El FOLR1 media en la distribución del folato fisiológico, 5-metilteetrahidrofolato, al interior de las células.

20 El FOLR1 está sobreexpresado en la gran mayoría de los cánceres de ovario, así como en muchos cánceres uterinos, de endometrio, pancreáticos, renales, de pulmón y de mama, mientras que la expresión del FOLR1 en tejidos normales se restringe a la membrana apical de las células epiteliales en los túbulos proximales del riñón, en los neumocitos alveolares del pulmón, en la vejiga, en los testículos, en el plexo coroideo y en la tiroides (Weitman SD, et al., Cancer Res 52: 3396-3401 (1992), Anthony AC, Annu Rev Nutr 16: 501-521 (1996); Kalli KR, et al., Gynecol Oncol 108: 619-626 (2008)). Este patrón de expresión del FOLR1 lo convierte en una diana deseable para la terapia del cáncer dirigida contra el FOLR1.

25 Debido a que el cáncer de ovario es típicamente asintomático hasta un estadio avanzado, a menudo se diagnostica en una etapa tardía y tiene un mal pronóstico cuando se trata con los procedimientos actualmente disponibles, típicamente fármacos quimioterapéuticos después de la citorreducción quirúrgica (von Gruenigen V et al., Cancer 112: 2221-2227 (2008), Ayhan A et al., Am J Obstet Gynecol 196: 81 e81-86 (2007), Harry VN et al., Obstet Gynecol Surv 64: 548-560 (2009)). Por ello, existe una clara necesidad médica no satisfecha de terapias más eficaces para los cánceres de ovario.

30 Se han examinado tres anticuerpos anti-FOLR1 como posibles fármacos contra el cáncer. Los anticuerpos monoclonales murinos Mov18 y Mov19 se aislaron a finales de los años 80 (Miotti S et al., Int J Cancer 39: 297-303 (1987)), confirmados para dirigirse al FOLR1 (Coney LR et al., Cancer Res 51: 6125-6132 (1991)), y se ensayaron en estudios preclínicos para determinar su capacidad para erradicar las células cancerosas que expresan antígenos como conjugados con una proteína citotóxica inactivadora de ribosomas (Conde FP et al., Eur J Biochem 178: 795-802 (1989)).

35 El Mov19 se ensayó como un anticuerpo bi-específico dirigido a células T citotóxicas y a células asesinas naturales (Mezzanzanica D et al., Int J Cancer 41: 609-615 (1988), Ferrini S et al., Int J Cancer Suppl 4: 53-55, 1989), Ferrini S et al., Int J Cancer 48: 227-233 (1991); y como una proteína de fusión del Fv de cadena sencilla (scFv) de Mov19 con interleucina-2 *in vivo* (Melani C et al., Cancer Res 58: 4146-4154 (1998)). Los anticuerpos anti-FOLR1 quiméricos (variable murina/constante humana) Mov18 y Mov19 se han examinado preclínicamente para determinar su capacidad para mediar en la muerte, dependiente de células inmunitarias citotóxicas, de células tumorales que expresan FOLR1 *in vitro* (Coney LR et al., Cancer Res 54: 2448-2455 (1994)), y se ensayó un Mov18-IgE quimérico en modelos preclínicos inmunoterapéuticos dependientes de IgE (Karagiannis SN et al., J Immunol 179: 2832-2843 (2007), Gould HJ et al., Eur J Immunol 29: 3527-3537 (1999)).

45 El Mov18 se estudió en forma de conjugados con diversos radionúclidos en estudios preclínicos y luego, a principios de los años noventa, en pruebas clínicas (Zacchetti A et al., Nucl Med Biol 36: 759-770 (2009)), que terminaron sin que ningún fármaco fuera aprobado para uso clínico.

50 El MORAb003, una forma humanizada del anticuerpo anti-FOLR1 monoclonal murino LK26 se evaluó preclínicamente como un anticuerpo no modificado (Ebel W et al., Cancer Immun 7: 6 (2007)) y como un conjugado con el radionúclido ¹¹¹In (Smith-Jones PM et al., Nucl Med Biol 35: 343-351 (2008)), y está actualmente experimentando pruebas clínicas como un anticuerpo no modificado (D. K. Armstrong et al., J. Clin. Oncol. 26: 2008, suplemento de 20 de mayo; resumen 5500).

55 En la técnica (WO 2005/080431) se han descrito los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al receptor alfa-folato y bloquean la actividad biológica de un antígeno tumoral. En la técnica (WO 2006/116592) se han descrito los anticuerpos que se unen específicamente a, y llegan a ser asimilados por, las células que expresan o que llevan el receptor alfa de folato, induciendo de ese modo una actividad efectora inmune tal como citotoxicidad

celular dependiente de anticuerpo.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona inmunoconjugados que comprenden nuevos anticuerpos que se unen al receptor 1 de folato humano según la presente reivindicación 1, y procedimientos de su uso. Adicionalmente, en la presente invención se describen nuevos polipéptidos, tal como los anticuerpos que se unen al receptor 1 de folato humano, fragmentos de tales anticuerpos y otros polipéptidos relacionados con dichos anticuerpos. También se describen polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, como los vectores que comprenden los polinucleótidos. Adicionalmente, se describen las células que comprenden los polipéptidos y/o polinucleótidos. También se proporcionan composiciones (p. ej., composiciones farmacéuticas) que comprenden inmunoconjugados. Además, también se proporcionan inmunoconjugados para uso en procedimientos, tales como inmunoconjugados para uso en el tratamiento del cáncer.

Por ello, en un aspecto, en el presente documento se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa₁ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa₂ se selecciona de Q, H, N, y R; y Xaa₃ se selecciona de G, E, T, S, A y V. En un ejemplo determinado, el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un receptor 1 de folato humano con sustancialmente la misma afinidad que el anticuerpo Mov19 quimérico. En un ejemplo determinado, el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia CDR2 de cadena pesada RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2).

En un caso determinado, la afinidad de unión se mide por citometría de flujo, Biacore o radioinmunoensayo.

En el presente documento se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos.

En el presente documento se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 6. En otro aspecto, el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo está codificado por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene los depósitos ATCC n.º PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.

Además en el presente documento se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que compete por la unión a FOLR1 con un anticuerpo que comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa₁ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa₂ se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa₃ se selecciona de G, E, T, S, A y V. En un cierto aspecto, el anticuerpo humanizado comprende la secuencia RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2) de la CDR2 de cadena pesada.

También en el presente documento se describe un polipéptido, un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio variable de la cadena pesada al menos aproximadamente un 90% idéntico a la SEQ ID NO: 4, y un dominio variable de la cadena ligera al menos aproximadamente un 90% idéntico a la SEQ ID NO: 10 o a la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada al menos aproximadamente un 95% idéntico a la SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de la cadena ligera al menos aproximadamente un 95% idéntico a la SEQ ID NO: 10 o a la SEQ ID NO: 11. En un aspecto adicional, el anticuerpo humanizado comprende un dominio variable de la cadena pesada al menos aproximadamente un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de la cadena ligera al menos aproximadamente un 99% idéntico a la SEQ ID NO: 10 o a la SEQ ID NO: 11. En un cierto

aspecto, el anticuerpo humanizado comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11. En determinados aspectos, la invención describe un polipéptido, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno al menos aproximadamente un 90% idéntico a las SEQ ID NO: 88-119. En ciertos aspectos descritos en el presente documento se encuentra un polipéptido, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno al menos aproximadamente un 95% idéntico a las SEQ ID NO: 88-119. También, en el presente documento se describe un polipéptido, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno al menos aproximadamente un 99% idéntico a las SEQ ID NO: 88-119.

En el presente documento también se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se expresa al menos diez veces más que chMov19 en células eucariotas. En un cierto aspecto, las células eucariotas son células HEK-293T.

En el presente documento se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSYGMS (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINWLA (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29). En otro aspecto, el anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMQ (SEQ ID NO: 60); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RDGNAAAY (SEQ ID NO: 62); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57); una CDR2 de cadena ligera que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 58); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59). En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMY (SEQ ID NO: 66); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RHDYGMADY (SEQ ID NO: 68); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYTDLA (SEQ ID NO: 63); una CDR2 de cadena ligera que comprende TASNLD (SEQ ID NO: 64); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65). En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSFGMH (SEQ ID NO: 72); una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQNNLNLA (SEQ ID NO: 69); una CDR2 de cadena ligera que comprende YVSQSVS (SEQ ID NO: 70); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71). En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TSYTMH (SEQ ID NO: 78); una CDR2 de cadena pesada que comprende YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GGAYGRKPMYD (SEQ ID NO: 80); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQNVGPNVA (SEQ ID NO: 75); una CDR2 de cadena ligera que comprende SASYRYS (SEQ ID NO: 76); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 77).

En ciertos aspectos, los polipéptidos son anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión al antígeno. En ciertos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un Fv de cadena sencilla o scFv, un Fv unido a disulfuro, un dominio VNAR, un IgNar, un intracuerpo, un IgG-CH₂, un minicuerpo, un F(ab')₃, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo de dominio simple, un DVD-Ig, Fcab, mAb₂, un (scFv)₂ o un scFv-Fc.

En ciertos aspectos, un anticuerpo o polipéptido se une a un receptor 1 de folato humano con una K_d de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 nM. En una realización, el anticuerpo o polipéptido se une a un receptor 1 de folato humano con una K_d de aproximadamente 1,0 nM o mejor. En un cierto aspecto, la afinidad de unión se mide por citometría de flujo, Biacore o radioinmunoensayo.

También en el presente documento se describe un procedimiento para preparar un anticuerpo que comprende cultivar una célula que expresa dicho anticuerpo; y (b) aislar el anticuerpo desde dicha célula cultivada. En un cierto aspecto, la célula es una célula eucariota.

La invención también proporciona un inmunoconjugado que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde: (A) es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la invención; (L) es un conector; y (C) es un maitansinoide o un análogo de maitansinoide, en donde dicho conector (L) enlaza (A) a (C), y en donde (A) se selecciona del grupo que consiste en: i) un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSF AGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); ii) un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ

5 ID NO: 11; iii) un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 12 o 13; o iv) un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una cadena pesada codificada por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene el número de depósito en la ATCC de PTA-10772 y una cadena ligera codificada por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene el número de depósito en la ATCC de PTA-10773 o 10774.

10 En una realización, el conector se selecciona del grupo de un conector escindible, un conector no escindible, un conector hidrófilo y un conector basado en ácido dicarboxílico. En una realización adicional, el conector se selecciona del grupo que consiste en: 4-(2-piridilditio)-pentanoato de N-succinimidilo (SPP) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPP); 4-(2-piridilditio)-butanoato de N-succinimidilo (SPDB) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de N-succinimidil (SMCC); 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de N-sulfosuccinimidilo (sulfoSMCC); 4-(yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB); y éster de N-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] (NHS-PEG4-maleimida). En una cierta realización, el conector es éster de N-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol-(NHS-PEG4-maleimida). En una realización, los inmunoconjugados comprenden un agente citotóxico seleccionado del grupo de un maitansinoide, o un análogo de maitansinoide. En una realización adicional, el agente citotóxico es un maitansinoide. En otra realización, el agente citotóxico es N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina o N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina.

20 En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) éster de N-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] (NHS-PEG4-maleimida); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

25 En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

30 En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

35 En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPP); y (C) N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

40 En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP); y (C) N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una cierta realización, la composición farmacéutica comprende además un segundo agente anticanceroso.

45 La invención también proporciona un reactivo de diagnóstico que comprende un inmunoconjugado de la invención que está marcado. En una realización, el marcador se selecciona del grupo de un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de imágenes y un ión metálico.

La invención describe también un kit que comprende el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, polipéptido o inmunoconjugado de la invención.

50 La invención describe también un inmunoconjugado para uso en un procedimiento de inhibición del crecimiento del tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de inmunoconjugado, o de la composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado para uso en un procedimiento de inhibición del crecimiento del tumor en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inmunoconjugado que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde: (A) es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) es el conector 4-(2-piridiltio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); y (C) es la citotoxina N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C) y en donde el

- inmunoconjugado reduce el volumen tumoral medio al menos dos veces en un modelo de xenoinjerto de KB. En una cierta realización, la invención describe la administración de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa₁ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa₂ se selecciona de Q, H, N, y R; y Xaa₃ se selecciona de G, E, T, S, A y V. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2).
- En una cierta realización, la invención describe un procedimiento para inhibir el crecimiento del tumor que comprende administrar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo codificado por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene los depósitos ATCC n.º PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.
- En otra realización, la invención describe la administración de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) éster de N-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] (NHS-PEG4-maleimida); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina.
- En otra realización, la invención describe la administración de un inmunoconjugado que comprende (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).
- En otra realización, la invención describe la administración de un inmunoconjugado que comprende (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).
- En otra realización, la invención proporciona un inmunoconjugado para uso en el tratamiento de cáncer que comprende (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)-2-sulfopentanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPP); y (C) N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).
- En otra realización, la invención describe la administración de un inmunoconjugado que comprende (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP); y (C) N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).
- En otra realización, la invención describe la administración de un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo huFR-1-21 depositado en ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene los depósitos ATCC n.º PTA-10775 y PTA-10776. En una cierta realización, el anticuerpo huFR1-21 comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSYGMS (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31); y una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29). En ciertas realizaciones, la invención describe la administración de un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que es el anticuerpo huFR1-48 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMQ (SEQ ID NO: 60); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61); y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDGNAAAY (SEQ ID NO: 62); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57); una CDR2 de cadena ligera que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 58); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59). En ciertas realizaciones la invención describe administrar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que es el anticuerpo huFR1-49 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWY (SEQ ID NO: 66); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67); y una CDR3 de cadena pesada que comprende RHDYGAMDY (SEQ ID NO: 68); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYTNL (SEQ ID NO: 63); una CDR2 de cadena ligera que comprende TASNLD (SEQ ID NO: 64); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65). En ciertas realizaciones la invención describe administrar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que es el anticuerpo huFR1-57 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSFGMH (SEQ ID NO: 72); una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73); y una CDR3 de cadena pesada que comprende EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQNNLNH (SEQ ID NO: 69); una CDR2 de cadena ligera que comprende YVSQSVS (SEQ ID NO: 70); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71). En ciertas realizaciones la invención describe administrar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que es el anticuerpo huFR1-65 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TSYTMH (SEQ ID NO: 78); una CDR2 de cadena

pesada que comprende YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79); y una CDR3 de cadena pesada que comprende GGAYGRKPM DY (SEQ ID NO: 80); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQNVGP NVA (SEQ ID NO: 75); una CDR2 de cadena ligera que comprende SASYRYS (SEQ ID NO: 76); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYNSYPYT (SEQ ID N O: 77).

5 En una realización, el inmunoconjugado es para uso en el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer se selecciona del crecimiento de tumor de ovario, tumor cerebral, tumor de mama, tumor uterino, tumor de endometrio, tumor pancreático, tumor renal o tumor de pulmón. En una cierta realización, el inmunoconjugado es para uso en la inhibición del crecimiento de tumores de ovario. En otra realización, la invención inhibe el crecimiento del tumor de pulmón. En una cierta realización, la inhibición del crecimiento del tumor se usa para tratar el cáncer. En una
10 realización adicional, la invención describe la administración de un segundo agente anticanceroso al sujeto. En una cierta realización, el segundo agente anticanceroso puede ser un agente quimioterapéutico.

En el presente documento se describe también una célula aislada que produce el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o el polipéptido. En el presente documento se describe también un polinucleótido aislado que comprende una secuencia al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:
15 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. En un cierto aspecto, el polinucleótido aislado es al menos un 95% idéntico a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. En otro aspecto, el polinucleótido aislado es al menos un 99% idéntico a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. En el presente documento se describe también un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos de las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38,
20 43, 44, 47, 48 y 120-127. En otro aspecto, la invención describe una célula anfitriona que comprende un vector que contiene un polinucleótido de las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Restos superficiales de Mov19 murino (muMov19) y humanizado (huMov19). (A) Restos superficiales de
25 cadena ligera de Mov19 murino y humanizado. Se proporcionan los restos superficiales del marco de región variable de cadena ligera de Mov19 murino y humanizado y el número de posición (sistema de Kabat). Los restos humanos que son diferentes de las secuencias murinas originales están subrayados. La *posición 74 no es una posición de superficie, pero para eliminar un sitio de glicosilación de consenso enlazado a N en la versión 1.00, esta posición se cambió a una Treonina (el resto humano más común en esta posición), dando como resultado la versión 1.60. (B)
30 Restos superficiales de cadena pesada de Mov19 Murino y Humano. Se proporcionan restos superficiales del marco de la región variable de cadena pesada de Mov19 murino y humanizado y el número de posición (sistema Kabat). Los restos humanos que son diferentes de las secuencias de murino originales están subrayados. Restos superficiales similares se proporcionan para FR1-21 (C) y (D).

Figura 2. Alineamientos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de Mov19 quimérico y huMov19 y de
35 dominios variables de de cadena pesada y ligera muFR1-21 y huFR1-21. Alineamiento de secuencias resurgidas para las regiones variables de Mov19 y de Fr1-21 con sus homólogos murinos. Dominios variables de cadena ligera A) y C); dominios variables de cadena pesada B) y D). Los guiones "-" indican identidad con la secuencia murina. Las CDR (definición de Kabat) están subrayadas.

Figura 3. Expresión de Mov19 quimérico y huMov19 en células HEK. Los plásmidos de expresión Mov19 quimérico y
40 humano se transfectaron transitoriamente en células HEK293-T en suspensión, se recolectaron 7 días más tarde y el anticuerpo expresado se determinó mediante ELISA cuantitativo. Los plásmidos de cadena ligera y de cadena pesada se transfectaron en relaciones molares respectivas de 3:1 o 6:1.

Figura 4. Especificidad de unión de anticuerpos anti-FOLR1, como se detecta por su unión a células 300-19 que
45 expresan FOLR1. La unión de huMov19 a células 300-19-FOLR1 mediante citometría de flujo. Células parentales 300-19 que expresan FOLR-1. El sombreado continuo gris representa la autofluorescencia celular; las líneas discontinuas negras representan células incubadas con anticuerpo secundario antihumano conjugado con FITC, las líneas continuas negras representan células incubadas con el anticuerpo huMov-19 y el anticuerpo secundario anti-humano conjugado con FITC.

Figura 5. Afinidades de unión y actividad citotóxica *in vitro* de anticuerpos anti-FOLR1 e inmunoconjugados. La
50 afinidad de unión de huMov19 y diversos anticuerpos FR-1 murinos y humanizados se midió en células SKOV3. También se ensayó la actividad citotóxica *in vitro* de conjugados de PEG4-Mal-DM4 de los anticuerpos enumerados.

Figura 6. Citotoxicidad celular de inmunoconjugados dependiente de anticuerpo. La actividad ADCC de huMov19,
huFR1-21 y Mor003 se ensayó contra células Igrov1. Las Igrov 1 se incubaron a 15.000 células/pocillo en una proporción de células Diana:NK de 1:4.

Figura 7. Actividad citóxica de exposición continua de huFR1-21-PEG4-mal-DM4 y huMov19-PEG4-mal-DM4 en
55 células KB. Un exceso de anticuerpos no conjugados suprimió la actividad de los inmunoconjugados cuando se incubaron conjuntamente en presencia de células KB, lo que indica que la actividad citotóxica es dependiente del antígeno.

Figura 8. Eficacia *in vivo* de conjugados dirigidos a huMov19 en un modelo de xenoinjerto de KB. El conjugado huMov19-SPDB-DM4 (B) escindible dirigido a FOLR1 en comparación con el huC242-SPDB-DM4 (D) no dirigido a FOLR1, y el conjugado huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C) no escindible en comparación con el huC242-PEG4Mal-DM4 (E) se ensayaron usando un modelo de xenoinjerto establecido de células KB implantadas subcutáneamente en ratones SCID. El direccionamiento de FOLR1 por huMov19 dio como resultado una reducción significativa en el volumen tumoral medio.

Figura 9. Eficacia *in vivo* de huMov19-PEG4-Mal-DM4 en comparación con anticuerpos anti-FOLR1 del FR-1 de murino en un modelo de xenoinjerto de KB. Se analizaron los anticuerpos de las series FR-1, no conjugados, o conjugados con PEG4-Mal-DM4, para determinar su capacidad para reducir el volumen tumoral medio en comparación con huMov19-PEG4-Mal-DM4 en un modelo de tumor de xenoinjerto de KB. (A) FR-1-9, (B) FR-1-13, (C) FR-1-22, y (D) FR-1-23.

Figura 10. Eficacia *in vivo* de huMov19-PEG4-Mal-DM4 y huFR1-21-PEG4-Mal-DM4 en un modelo de xenoinjerto de KB. Se realizaron inyecciones únicas de 10 mg/kg de huMov19-PEG4-Mal-DM4 y de huFR1-21-PEG4-Mal-DM4 al día 6 después de la inoculación. Tanto huMov19-PEG4-Mal-DM4 como huFR1-21-PEG4-Mal-DM4 mostraron una reducción significativa en el volumen tumoral medio. "VT Medio" se refiere al volumen tumoral medio.

Figura 11. HuMov19-PEG4-mal-DM4 muestra actividad dependiente de la dosis en el modelo de xenoinjerto de KB. La actividad dependiente de la dosis del inmunocombinado se ensayó a través del intervalo de dosis ensayadas. La dosificación semanal dio como resultado una mejora de la actividad antitumoral. Las altas cargas de fármacos sólo mejoraron marginalmente la actividad en los grupos de dosis de 10 mg/kg, con actividad reducida en los grupos de dosis más bajas. 3,7 DAR se refiere a 3,7 moléculas de fármaco por anticuerpo.

Figura 12. Eficacia *in vivo* de huMov19 conjugado con DM1 y DM4 con varios conectores. HuMov19 se conjugó con SMCC-DM1 a 3,9 moléculas de fármaco por anticuerpo; sulfo-mal-DM4 a 3,7 moléculas de fármaco por anticuerpo (B), y sulfo-mal-DM4 a 8,23 moléculas de fármaco por anticuerpo (C) y se analizó su capacidad para reducir el volumen tumoral medio a varias concentraciones en comparación con huMov19-PEG4-mal-DM4.

Figura 13. Eficacia *in vivo* de huMov19 conjugado con DM1 y DM4 con varios conectores. HuMov19 se conjugó con SPP-DM1 a 4,3 moléculas de fármaco por anticuerpo; sulfo-SPDB-DM4 a 3,8 moléculas de fármaco por anticuerpo, SPDB-DM4 a 3,8 moléculas de fármaco por anticuerpo y sulfo-SPDB-DM4 a 6,8 moléculas de fármaco por anticuerpo y se analizó su capacidad para reducir el volumen tumoral medio. Los ratones se trataron con 5 mg/kg (A) y 2,5 mg/kg (B) de uno de los conjugados enumerados anteriormente o sólo con PBS.

Figura 14. Eficacia *in vivo* de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 en el modelo de tumor de xenoinjerto OVCAR-3. Los ratones se trataron con 25, 50 o 100 µg/kg de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 o sólo con PBS.

Figura 15. Eficacia *in vivo* de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 en el modelo de tumor de xenoinjerto IGROV-1. Los ratones se trataron con 25, 50 o 100 µg/kg de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 o solo con PBS

Figura 16. Eficacia *in vivo* de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 en el modelo de tumor de xenoinjerto OV-90. Los ratones se trataron con 25, 50 o 100 µg/kg de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 o sólo con PBS.

Figura 17. Efecto de los conectores escindibles y no escindibles sobre la eficacia de los inmunocombinados en modelos de xenoinjerto de KB.

Figura 18. Efecto de los conectores escindibles sobre la eficacia de los inmunocombinados en el modelo de xenoinjerto KB (A) y en el modelo de xenoinjerto OVCAR-3 (B).

Figura 19. Eficacia *in vitro* e *in vivo* de huFR1-48, huFR1-49, huFR1-57 y huFR1-65-SMCC-DM1 en modelos de tumor de KB y de xenoinjerto. Los ratones se trataron con dosis únicas de 200 µg/kg.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos agentes en forma de inmunocombinados que se unen al receptor 1 de folato humano (FOLR1). También se describen polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes de unión a FOLR1, y procedimientos para fabricar los agentes de unión a FOLR1. Se proporcionan adicionalmente nuevos agentes de unión a FOLR1 para uso en procedimientos, tales como procedimientos para inhibir el crecimiento de los tumores y/o tratar el cáncer.

I. Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se definen una serie de términos y expresiones.

La expresión "receptor 1 de folato humano" o el término "FOLR1", tal como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier FOLR1 humano nativo, a menos que se indique lo contrario. El término "FOLR1" abarca FOLR1 sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de FOLR1 que resulte del procesamiento dentro de la

célula. El término también abarca variantes de FOLR1 de origen natural, p. ej., variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos FOLR1 descritos en el presente documento pueden aislarse a partir de una diversidad de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o preparados mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. Ejemplos de secuencias de FOLR1 incluyen pero no se limitan a números de referencia P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1 y NP_057936.1 del NCBI.

El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, hidrato de carbono, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación del antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno siempre y cuando los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

Un anticuerpo de "bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une, tal como FOLR1. En una cierta realización, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben de forma sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. De forma deseable, la actividad biológica se reduce en un 10%, un 20%, un 30%, un 50%, un 70%, un 80%, un 90%, un 95% o incluso un 100%.

La expresión "anticuerpo anti-FOLR1" o "un anticuerpo que se une a FOLR1" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a FOLR1 con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico a dirigir el FOLR1. El grado de unión de un anticuerpo anti-FOLR1 a una proteína no FOLR1 no relacionada es menor que aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a FOLR1 según se mide, p. ej., mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a FOLR1 tiene una constante de disociación (K_d) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM o ≤ 0,1 nM.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea implicada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de un determinante antigénico simple, o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales tanto intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos fabricados en cualquier cantidad de maneras incluyendo, pero sin limitarse a, mediante hibridoma, selección del fago, expresión recombinante y animales transgénicos.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, de murino). Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los restos de la región determinante complementaria (CDR) son reemplazados por restos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo ratón, rata, conejo y hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones et al., 1986, Nature, 321: 522-525, Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327, Verhoeyen et al., 1988, Science, 239: 1534-1536). En algunos casos, los restos Fv de la región marco (FR) de una inmunoglobulina humana son reemplazados por los restos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede ser modificado adicionalmente mediante la sustitución de restos adicionales en la región marco Fv y/o dentro de los restos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y, típicamente, dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una

inmunoglobulina humana. Ejemplos de procedimientos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes de EE.UU. 5.225.539 o 5.639.641.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, solo o en combinación. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera constan cada una de cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de los anticuerpos de unión al antígeno. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de la secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273: 927-948)). Además, a veces se utilizan en la técnica combinaciones de estos dos enfoques para determinar las CDR.

El sistema de numeración Kabat se utiliza generalmente cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente restos 1-107 de la cadena ligera y restos 1-113 de la cadena pesada) (p. ej., Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

La numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat, se refiere al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o adicionales aminoácidos que corresponden a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (p. ej., restos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después de resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar". Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numeran usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B, si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32, si sólo está presente 35A, el bucle termina en 33, si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de los AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		(Numeración de Kabat)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Numeración de Chothia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

La expresión "anticuerpo humano" significa un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un humano fabricado usando cualquier técnica conocida en la tecnología. Esta definición de anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada y/o ligera tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera de murino y

cadena pesada de humano.

La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable tanto de las cadenas ligera como pesada corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otra (usualmente humano) para evitar la provocación de una respuesta inmune en esa especie.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la porción de un antígeno capaz de ser reconocida y específicamente unida por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítipos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos por desnaturalización de las proteínas, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente tras la desnaturalización de las proteínas. Un epítipo incluye, típicamente, al menos 3, y más usualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

La "afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo) y su pareja de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse, en general, mediante la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen, en general, al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen, en general, al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conocen una diversidad de procedimientos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede utilizar para los fines de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

"O mejor", cuando se usa en el presente documento para referirse a la afinidad de unión se refiere a una unión más fuerte entre una molécula y su pareja de unión. "O mejor", cuando se usa en el presente documento se refiere a una unión más fuerte, representada por un valor K_d numérico más pequeño. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene afinidad por un antígeno de "0,6 nM o mejor", la afinidad del anticuerpo por el antígeno es <0,6 nM, es decir, 0,59 nM, 0,58 nM, 0,57 nM, etc., o cualquier valor inferior a 0,6 nM.

La frase "substancialmente similar", o "sustancialmente igual", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador) de tal manera que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de las características biológicas medidas por dichos valores (p. ej., valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es menor que aproximadamente 50%, menor que aproximadamente 40%, menor que aproximadamente 30%, menor que aproximadamente 20%, o menor que aproximadamente 10% como una función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está "aislado" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen aquellos que han sido purificados hasta un grado en donde ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está aislado es sustancialmente puro.

Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a material que es puro (es decir, exento de contaminantes) en al menos un 50%, puro en al menos un 90%, puro en al menos un 95%, puro en al menos un 98% o puro en al menos un 99%.

El término "inmunoconjugado" o "conjugado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o un derivado del mismo que está unido a un agente de unión a células (es decir, un anticuerpo anti-FOLR1 o un fragmento del mismo) y está definido por una fórmula genérica: C-L-A, en donde C = citotoxina, L = conector, y A = agente de unión celular o anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento de anticuerpo. Los inmunoconjugados pueden definirse también mediante la fórmula genérica en orden inverso: A-L-C.

Un "conector" es cualquier resto químico que es capaz de enlazar un compuesto, usualmente un fármaco, tal como un maitansinoide, con un agente de unión a células tal como un anticuerpo anti-FOLR1 o un fragmento del mismo de una manera covalente estable. Los conectores pueden ser susceptibles de, o ser sustancialmente resistentes a, la escisión inducida por ácido, a la escisión inducida por la luz, a la escisión inducida por peptidasa, a la escisión inducida por esterasa y a la escisión por enlace disulfuro, en condiciones bajo las cuales el compuesto o anticuerpo

permanece activo. Los conectores adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa y grupos lábiles de esterasa. Los conectores también incluyen conectores cargados, y formas hidrófilas de los mismos como se describe en el presente documento y se conocen en la técnica.

5 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a, o describen, la condición fisiológica en mamíferos en los que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular irregular. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen
 10 cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, o carcinoma uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

15 "Tumor" y "neoplasia" se refieren a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento o proliferación celular excesivo, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones precancerosas.

Los términos "célula cancerosa", "célula tumoral" y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas de un tumor o de una lesión precancerosa, incluyendo tanto células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales, como células madre tumorigénicas (células madre de cáncer). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula tumoral" se modificará por el término
 20 "no tumorigénica" cuando se refiere únicamente a aquellas células tumorales que carecen de capacidad para renovar y diferenciar para distinguir esas células tumorales de las células madre de cáncer.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero no limitándose a seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un
 25 sujeto humano.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

30 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contenga componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dicha formulación puede ser estéril.

Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo como se describe en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin específicamente declarado. Una "cantidad eficaz" se puede determinar empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el propósito declarado.

35 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, retardar en cierta medida y en alguna realización, detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, retardar en cierta medida y en alguna realización, detener) la metástasis tumoral; inhibir,
 40 en cierta medida, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de "tratando" en el presente documento. En la medida en que el fármaco puede impedir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente pero no necesariamente, puesto que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será
 45 menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o
 50 composición de sustrato que sea detectable.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales con actividad antimitótica, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de cinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen
 55 compuestos usados en "terapia dirigida" y quimioterapia convencional.

Términos tales como "tratando" o "tratamiento" o "tratar" o "aliviando" o "aliviar" se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas y/o frenan la progresión de un estado o trastorno

patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que impiden y/o retardan el desarrollo de un estado o trastorno patológico dirigido. Así, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya están con el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en los que el trastorno se va a impedir. Un sujeto es "tratado" con éxito contra el cáncer si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción en el número o la ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición o ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejido blando y en hueso; inhibición o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento del tumor; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad; mejora de la calidad de vida; reducción de la tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica, de un tumor; reducción en el número o frecuencia de células madre de cáncer en un tumor; diferenciación de células tumorigénicas para un estado no tumorigénico; o alguna combinación de efectos.

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", tal como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda ser incorporado en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, se puede impartir una modificación a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede ser modificado adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapones", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, pli-L-lisina, etc., aquellos con intercaladores (p. ej., acridina, psolaren, etc.), aquellos quelantes (p. ej., metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos), así como formas no modificadas del polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede ser sustituido, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH terminal 5' y 3' puede ser fosforilado o sustituido con aminas o restos del grupo de tope orgánicos de entre 1 y 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden ser reemplazados por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato es reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluidos el ARN y el ADN.

El término "vector" significa un constructo que es capaz de proporcionar y expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula anfitriona. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tal como células productoras.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos incluyen también un polímero de aminoácido que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se comprende que, debido a que los polipéptidos de esta invención se basan en anticuerpos, en ciertas realizaciones, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas simples o cadenas asociadas.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o restos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir utilizando software de comparación de secuencias o algoritmos o mediante inspección visual. En la técnica se conocen varios algoritmos y

software que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Uno de tales ejemplos no limitativos de un algoritmo de alineamiento de secuencias es el algoritmo descrito en Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 2264-2268, modificado en Karlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 5873-5877, e incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul et al., 1991, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402). BLAST con huecos puede usarse como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology, 266: 460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (DNASTAR) son programas de software accesibles al público que se pueden utilizar para alinear secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en software GCG (p. ej., usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de huecos de 40, 50, 60, 70 o 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Como alternativa, se puede usar el programa GAP en el paquete de software GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (44): 444-453 (1970)) para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos (p. ej., utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de huecos de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). Como alternativa, el porcentaje de identidad entre las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)). Por ejemplo, se puede determinar el porcentaje de identidad utilizando el programa ALIGN (versión 2.0) y utilizando un PAM120 con tabla de restos, una penalización por longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Los parámetros apropiados para alineamiento máximo se pueden determinar mediante software de alineamiento particular por un experto en la técnica. Se pueden usar los parámetros por defecto del software de alineamiento. El porcentaje de identidad "X" de una primera secuencia de aminoácidos con respecto a una segunda secuencia de aminoácidos puede calcularse como $100 \times (Y/Z)$, donde Y es el número de restos de aminoácidos apuntados como coincidencias idénticas en el alineamiento de la primera y segunda secuencias (alineadas mediante inspección visual o un programa de alineamiento de secuencias particular) y Z es el número total de restos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia con respecto a la segunda secuencia será mayor que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia con respecto a la primera secuencia.

Como ejemplo no limitativo, si cualquier polinucleótido particular tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia (p. ej., es al menos un 80% idéntico, al menos un 85% idéntico, al menos un 90% idéntico, y en algunas realizaciones, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos) a una secuencia de referencia puede determinarse usando el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se utiliza Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se establecen de manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre toda la longitud de la secuencia nucleotídica de referencia y que se permiten huecos en la homología de hasta el 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

Dos ácidos nucleicos o polipéptidos pueden ser sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% y en algunas realizaciones al menos un 95%, un 96% 97%, 98%, 99% de identidad de resto nucleótido o aminoácido, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, medida utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. La identidad puede existir sobre una región de las secuencias que es al menos aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 40-60 restos en longitud o cualquier valor integral entre ellos, o sobre una región más larga que 60-80 restos, al menos aproximadamente 90-100 restos, o las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, tal como la región codificante de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que un resto de aminoácido es reemplazado por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluidas las cadenas laterales básicas (p. ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina e Isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. Las sustituciones conservadas en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno(s), es decir, al FOLR1 al que se une el polipéptido o anticuerpo. Los procedimientos para identificar sustituciones conservadas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993), Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999); y Burks et al., Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 94: 412-417 (1997)).

Como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen formas en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Se entiende que donde quiera que las realizaciones se describen en el presente documento con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan las realizaciones análogas descritas en términos de "consisten en" y/o "consisten esencialmente en".

5 El término "y/o", tal como se usa en una frase tal como "A y/o B" en el presente documento, pretende incluir tanto "A y B", "A o B", "A" y "B". Del mismo modo, el término "y/o", tal como se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C", pretende abarcar cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

II. Agentes de unión al FOLR1

10 La presente invención proporciona agentes que se unen específicamente al FOLR1 humano. Estos agentes se denominan en el presente documento como "agentes de unión al FOLR1". Las secuencias de aminoácidos (aa) y nucleótidos (nt) de longitud completa para FOLR1 son conocidas en la técnica y también se proporcionan en el presente documento representadas por las SEQ ID NO: 25 y 26, respectivamente.

15 Los agentes de unión al FOLR1 de la presente invención son inmunoconjugados. En algunas realizaciones, los agentes de unión al FOLR1 comprenden anticuerpos humanizados. En ciertas realizaciones, los agentes de unión al FOLR-1 comprenden versiones humanizadas del anticuerpo Mov19 de murino (cadena pesada y ligera variable mostradas como SEQ ID NO: 17 y 18, respectivamente).

20 En ciertas realizaciones, los agentes de unión a FOLR1 tienen uno o más de los siguientes efectos: inhiben la proliferación de células tumorales, reducen la tumorigenicidad de un tumor reduciendo la frecuencia de células madre de cáncer en el tumor, inhiben el crecimiento de tumores, aumentan la supervivencia, desencadenan la muerte celular de las células tumorales, diferencian las células tumorigénicas a un estado no tumorigénico, o impiden la metástasis de las células tumorales.

25 En ciertas realizaciones, los inmunoconjugados que se unen específicamente al FOLR1 humano desencadenan la muerte celular a través de un agente citotóxico. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo contra un anticuerpo FOLR1 humano se conjuga con un maitansinoide que se activa en células tumorales que expresan el FOLR1 por internalización de proteínas. En ciertas realizaciones alternativas, el anticuerpo no está conjugado.

En ciertas realizaciones, los agentes de unión a FOLR1 son capaces de inhibir el crecimiento del tumor. En ciertas realizaciones, los agentes de unión a FOLR1 son capaces de inhibir el crecimiento del tumor *in vivo* (p. ej., en un modelo de ratón de xenoinjerto y/o en un ser humano que tiene cáncer). En ciertas realizaciones, los agentes de unión a FOLR1 son capaces de inhibir el crecimiento de tumores en un ser humano.

30 Así, la invención proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa₁ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa₂ se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa₃ se selecciona de G, E, T, S, A y V. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo huMov19, que es el anticuerpo descrito anteriormente que comprende la CDR2 de cadena pesada RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2).

40 En ciertas realizaciones, la invención proporciona inmunoconjugados que comprenden anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huMov19 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservadas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención proporciona inmunoconjugados que comprenden anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácido; y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos.

55 La invención describe también un anticuerpo humanizado (huFR1-21) o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSYGMS (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31); y una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO:

32); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINWLA (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29).

5 En ciertas realizaciones, la invención describe anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-21 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservadas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de
10 cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINWLA (SEQ ID NO: 27) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que
15 comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención describe anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-48 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservadas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención describe anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMQ o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de
20 cadena pesada que comprende IYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RDGNYAAY (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57) o una variante de la misma que
25 comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 58) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención describe anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-49 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservadas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención describe anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMY o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de
35 cadena pesada que comprende AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RHDIYAMDY (SEQ ID NO: 68) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYTNL (SEQ ID NO: 63) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que
40 comprende TASNLA (SEQ ID NO: 64) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención describe anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-57 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservadas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención describe anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSFGMH (SEQ ID
50 NO: 72) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQINNNLH (SEQ ID NO: 69) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que
55 comprende YVSQSVS (SEQ ID NO: 70) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos.

60 En ciertas realizaciones, la invención describe anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-65 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservadas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención describe

anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígenos que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TSYTMH o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GGAYGRKPMY (SEQ ID NO: 80) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQNVGPNVA (SEQ ID NO: 75) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende SASYRYS (SEQ ID NO: 76) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 77) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadas de aminoácidos.

Los polipéptidos que comprenden una de las cadenas ligeras o cadenas pesadas individuales descritas en el presente documento, así como los polipéptidos (p. ej., anticuerpos) que comprenden tanto una cadena ligera como una cadena pesada, también se proporcionan en forma de inmunoconjugados. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 4 y 6 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huMov19, y la cadena pesada de huMov19, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 10-13 comprenden la versión 1.00 de cadena ligera de dominio variable, la versión 1.60 de cadena ligera de dominio variable, la versión 1.00 de cadena ligera y la versión 1.60 de cadena ligera de huMov19, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 42 y 46 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-21 y la cadena pesada de huFR1-21, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 41 y 45 comprenden la cadena ligera del dominio variable y la cadena ligera de huFR1-21, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 97 y 113 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-48 y la cadena pesada de huFR1-48, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 96 y 112 comprenden la cadena ligera de dominio variable y la cadena ligera de huFR1-48, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 99 y 115 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-49 y la cadena pesada de huFR1-49, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 98 y 114 comprenden la cadena ligera de dominio variable y la cadena ligera de huFR1-49, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 101 y 117 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-57 y la cadena pesada de huFR1-57, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 100 y 116 comprenden la cadena ligera de dominio variable y la cadena ligera de huFR1-57, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 103 y 119 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-65 y la cadena pesada de huFR1-65, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 102 y 118 comprenden la cadena ligera de dominio variable y la cadena ligera de huFR1-65, respectivamente.

También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 o 6; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 10-13. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 42 o 46; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41 y 45. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 97 o 113; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 96 o 112. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 99 o 115; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 98 o 114. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 101 o 117; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 100 o 116. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 103 o 119; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 102 o 118. El polipéptido puede comprender un apolipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98% o al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 10-13, 41, 42, 45 o 46. Así, el polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 o 6, y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10-13. El polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 42 o 46, y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41 o 45. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 97 o 113; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 96 o 112. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 99 o 115; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 98 o 114. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 101 o 117; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 100 o 116. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con

SEQ ID NO: 103 o 119; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 102 o 118. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. El polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 46. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. El polipéptido es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al receptor 1 de folato humano. En ciertas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor 1 de folato humano. Por ejemplo, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humanizado que específicamente se une a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 4 es una región variable de cadena pesada. En ciertas realizaciones, el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 10 o 11 es una región variable de cadena ligera. La invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. La invención describe también un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. La invención describe también un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113. La invención también describe un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115. La invención describe también un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117. La invención describe también un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119. En ciertas realizaciones, el polipéptido que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 10-13, 41, 42, 45, 46, 96-103 y 112-119 difiere de SEQ ID NO: 4, 6, 10-13, 41, 42, 45, 46, 96-103 y 112-119 mediante sustituciones conservadas de aminoácidos solamente.

En ciertas realizaciones, el agente de unión a FOLR1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un anticuerpo anti-FOLR1 seleccionado de entre el grupo que consiste en anticuerpos huMov19, FR-1-21, FR1-48, FR1-49, FR1-57 y FR1-65.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo huMov19 está codificado por los plásmidos depositados en el American Type Culture Collection (ATCC) el 7 de abril de 2010 y que tienen los n.º de depósito ATCC de PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.

El anticuerpo FR-1-21 se codifica mediante los plásmidos depositados en la ATCC el 7 de abril de 2010 y se le asignan los números de designación de depósito PTA-10775 y 10776.

Los anticuerpos humanizados se unen a FOLR1 con sustancialmente la misma afinidad que el anticuerpo químico Mov19. La afinidad o aidez de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier procedimiento adecuado bien conocido en la técnica, p. ej., citometría de flujo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA), o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE®). Pueden emplearse fácilmente ensayos de unión directa así como formatos de ensayo de unión competitiva (véanse, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions", en *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed., Raven Press, Nueva York, NY, 1984; Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y procedimientos descritos en el presente documento. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones (p. ej., concentración de sal, pH, temperatura). Así, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno (p. ej., KD o Kd, K_{on}, K_{off}) se hacen con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado, tal como se conoce en la técnica y tal como el tampón descrito en el presente documento.

Los ensayos de unión se pueden realizar usando citometría de flujo en células que expresan el antígeno FOLR1 en la superficie. Por ejemplo, células positivas en FOLR1 como SKOV3 se incubaron con concentraciones variables de anticuerpos anti-FOLR1 usando 1 x 10⁵ células por muestra en 100 µl de tampón FACS (medio RPMI-1640 complementado con suero de cabra normal al 2%). Después, las células se sedimentaron, se lavaron y se incubaron durante 1 h con 100 µl de anticuerpo IgG de cabra anti-ratón o de cabra anti-humano conjugado con FITC (tal como se puede obtener de, por ejemplo, Jackson Laboratory, 6 µg/ml en tampón FACS). Las células se sedimentaron de nuevo, se lavaron con tampón FACS y se resuspendieron en 200 µl de PBS que contenía formaldehído al 1%. Las muestras se adquirieron, por ejemplo, utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador HTS de múltiples pocillos y se analizaron usando CellQuest Pro (todos ellos de BD Biosciences, San Diego, EE.UU.). Para

5 cada muestra se exportó la intensidad de fluorescencia media para FL1 (MFI) y se representó gráficamente frente a la concentración de anticuerpo en un gráfico semilogarítmico para generar una curva de unión. Se ajusta una curva sigmoideal de dosis-respuesta para las curvas de unión y los valores de EC50 se calculan usando programas tales como GraphPad Prism v4 con parámetros por defecto (software de GraphPad, San Diego, CA). Se pueden usar los valores de EC50 como una medida de la constante de disociación aparente "Kd" o "KD" para cada anticuerpo.

10 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Utilizando el procedimiento del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal anfitrión apropiado, como se ha descrito anteriormente, para hacer que los linfocitos produzcan anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. Los linfocitos también pueden inmunizarse *in vitro*. Después de la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que pueden después ser seleccionadas fuera de los linfocitos y células de mieloma no fusionados. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno escogido, como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o mediante un ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)) pueden propagarse después ya sea por cultivo usando procedimientos estándar *in vitro* (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales pueden entonces purificarse a partir del medio de cultivo o del fluido ascítico como se describe para los anticuerpos policlonales anteriores.

20 Como alternativa, también pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando procedimientos de ADN recombinante como se describe en la patente de EE.UU. 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan a partir de células B maduras o células de hibridoma, tales como por RT-PCR usando cebadores oligonucleotídicos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesadas y ligeras se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, los cuales cuando se transfectan en células anfitrionas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo inmunoglobulina, los anticuerpos monoclonales son generados por las células anfitrionas. También pueden aislarse anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de las especies deseadas a partir de bibliotecas de presentación de fagos que expresan las CDR de la especie deseada tal como se describe (McCafferty et al., 1990, Nature, 348: 552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352: 624-628 y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581-597).

35 El o los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal pueden modificarse adicionalmente en una serie de diversas maneras utilizando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunas realizaciones, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón pueden ser sustituidos 1) para aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) para un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas realizaciones, las regiones constantes se truncan o se eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. La mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable puede usarse para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal contra el FOLR1 humano es un anticuerpo humanizado. En ciertas realizaciones, dichos anticuerpos se usan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas de HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administran a un sujeto humano.

45 También se pueden usar procedimientos para el diseño, humanización o resurgimiento de anticuerpos no humanos o humanos y son bien conocidos en la técnica. Un anticuerpo humanizado, resurgido o diseñado de forma similar puede tener uno o más restos de aminoácidos de un origen que no sea humano, p. ej., pero sin limitarse a, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos restos de aminoácidos no humanos son reemplazados por restos que se denominan, a menudo, restos de "importación", que se toman típicamente de una variable "de importación", de una constante o de otro dominio de una secuencia humana conocida.

50 Tales secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, tasa de crecimiento, tasa de decrecimiento, avidéz, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. En general, los restos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influir en la unión de FOLR1. Por consiguiente, una parte o la totalidad de las secuencias CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se pueden reemplazar con aminoácidos humanos u otros.

55 Los anticuerpos pueden también, opcionalmente, ser anticuerpos humanizados, resurgidos, de ingeniería o humanos diseñados por ingeniería genética con retención de alta afinidad para el antígeno FOLR1 y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos anti-FOLR1 humanizados (o humanos) o de ingeniería y los anticuerpos resurgidos pueden prepararse opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados y de ingeniería utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales, de ingeniería y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están normalmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están

disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno, tal como FOLR1. Así, pueden seleccionarse restos de marco (FR) y combinarse a partir de las secuencias de consenso y de importación de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el antígeno o los antígenos diana.

La humanización, resurgimiento o ingeniería de anticuerpos se pueden realizar usando cualquier procedimiento conocido, tal como, pero sin limitarse a, los descritos en Winter (Jones et al., Nature 321: 522 (1986), Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988), Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993), pat. de EE.UU. n.º 5.639.641, 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; 4.816.567; documentos PCT/: US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; EP 229246; 7.557.189; 7.538.195; y 7.342.110.

El anticuerpo contra FOLR1 puede ser también un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden prepararse directamente utilizando varias técnicas conocidas en la técnica. Los linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana pueden ser generados (véanse, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985), Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95 y patente de EE.UU. 5.750.373). Además, el anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos, como se describe, por ejemplo, en Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14: 309-314, Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95: 6157-6162, Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227: 381, y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581). Las técnicas para la generación y uso de bibliotecas de fagos de anticuerpos también se describen en las patentes de EE.UU. n.º 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793, 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081; 6.300.064; 6.653.068; 6.706.484; y 7.264.963; y Rothe et al., 2007, J. Mol. Bio., doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.018. Las estrategias de maduración por afinidad y las estrategias de barajado de cadena (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10: 779-783 son conocidas en la técnica y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

También pueden hacerse anticuerpos humanizados en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que son capaces tras la inmunización de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en las patentes de EE.UU. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016.

Esta invención también describe anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente un receptor 1 de folato humano. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer específicamente y unirse a al menos dos epítopos diferentes. Los diferentes epítopos pueden estar dentro de la misma molécula (p. ej., el mismo receptor 1 de folato humano) o en diferentes moléculas de tal manera que ambos, por ejemplo, los anticuerpos pueden reconocer y unirse específicamente a un receptor 1 de folato humano así como, por ejemplo, 1) una molécula efectora sobre un leucocito tal como un receptor de células T (por ejemplo, CD3) o receptor Fc (por ejemplo, CD64, CD32, o CD16) o 2) un agente citotóxico como se describe con detalle a continuación.

Anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido. Como alternativa, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG con el fin de enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el antígeno particular. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Las técnicas para preparar anticuerpos biespecíficos son normales en la técnica (Millstein et al., 1983, Nature 305: 537-539; Brennan et al., 1985, Science 229: 81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol., 121: 120; Trauneker et al., 1991, EMBO J. 10: 3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175: 217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol., 148: 1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol., 152: 5368, y patente de EE.UU. 5.731.168). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos (Tutt et al., J. Immunol., 147: 60 (1991)). Así, en ciertas realizaciones los anticuerpos para FOLR1 son multiespecíficos.

Se describe un fragmento de anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la penetración del tumor. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229: 81). Los fragmentos de anticuerpo se pueden producir de forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden ser expresados en y secretados a partir de E. coli u otras células anfitrionas, permitiendo así la producción de grandes cantidades de

estos fragmentos. Tales fragmentos de anticuerpos también se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos expuestas anteriormente. El fragmento de anticuerpo también pueden ser anticuerpos lineales como se describe en la patente de EE.UU. 5.641.870, por ejemplo, y puede ser monoespecíficos o biespecíficos. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el facultativo experto.

5 Pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos para el receptor 1 de folato humano (véase la patente de EE.UU. n.º 4.946.778). Además, se pueden adaptar procedimientos para el constructo de bibliotecas de expresión de Fab (Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un receptor 1 de folato, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo pueden producirse mediante técnicas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a: (a) un fragmento F(ab')₂ producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado por la reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂, (c) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (d) fragmentos Fv.

10 Además, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión al receptor de salvamento en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en una etiqueta de péptido que se fusiona a continuación al fragmento de anticuerpo en un extremo o en el medio (por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptido).

15 También se describen anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos de forma covalente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células inmunitarias a células no deseadas (patente de EE.UU. n.º 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden ser preparados *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluidos aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

20 Debe comprenderse que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con los polipéptidos de un FOLR1 humano. A este respecto, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que pueda ser inducido a montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado al tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, primate no humano (por ejemplo monos cynomolgus, macacos, etc.) o lupino. Tanto las regiones variables como las constantes de las inmunoglobulinas modificadas pueden ser humanas. Las regiones variables de anticuerpos compatibles (generalmente derivadas de una fuente no humana) también pueden ser diseñadas o adaptadas específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables útiles en la presente invención pueden ser humanizadas o, si no, alteradas mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

25 Los dominios variables tanto en la cadena pesada como ligera pueden ser alterados mediante la sustitución al menos parcial de una o más CDR y, si es necesario, mediante sustitución parcial de la región marco y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase como el anticuerpo del que derivan las regiones marco, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de diferente clase y, en ciertas realizaciones, de un anticuerpo de una especie diferente. Puede que no sea necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede que solo sea necesario transferir los restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión al antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de EE.UU. n.º 5.585.069, 5.693.761 y 5.693.762, estará bien dentro de la competencia de los expertos en la técnica, ya sea llevando a cabo experimentos de rutina o por ensayos de prueba y error para obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

30 A pesar de las alteraciones a la región variable, los expertos en la técnica comprenderán que los anticuerpos modificados de esta invención comprenderán anticuerpos (p. ej., anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante ha sido suprimida o, si no, alterada con el fin de proporcionar las características bioquímicas deseadas tales como una mayor localización del tumor o una reducida semivida del suero cuando se compara con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no alterada. La región constante de los anticuerpos modificados puede comprender una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatibles con esta invención comprenden adiciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados descritos en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). Se contemplan las regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios están parcial o totalmente eliminados. Los anticuerpos modificados pueden comprender constructos o variantes eliminados en el dominio en donde se ha eliminado todo el dominio CH2 (constructos ΔCH2). El dominio de la región constante omitido puede ser

reemplazado por un espaciador corto de aminoácidos (p. ej., 10 restos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular impartida típicamente por la región constante ausente.

Además de su configuración, se sabe en la técnica que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 de complemento para los anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a las células a través de la región Fc, con un sitio receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluidos IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen engolfamiento y destrucción de partículas revestidas de anticuerpos, eliminación de complejos inmunes, lisis de células diana revestidas de anticuerpo por células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo, o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulina.

Los anticuerpos de unión a FOLR1 proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan al perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando de este modo la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de regiones constantes, conforme a esta invención, ligan moderadamente el complemento y, por tanto, reduzcan la semivida del suero y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, pueden usarse otras modificaciones de la región constante para eliminar enlaces disulfuro o fragmentos de oligosacáridos que permitan una localización mejorada debido al aumento de la especificidad del antígeno o la flexibilidad del anticuerpo. De manera similar, las modificaciones a la región constante según esta invención pueden hacerse fácilmente utilizando técnicas bioquímicas o de ingeniería molecular bien conocidas, bien dentro del alcance del experto en la técnica.

Un agente de unión a FOLR1 que es un anticuerpo puede que no tenga una o más funciones efectoras. Por ejemplo, el anticuerpo puede que no tenga actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). El anticuerpo puede que no se una a un receptor Fc y/o a factores del complemento. El anticuerpo puede que no tenga función efectora.

Se observará que los anticuerpos modificados se pueden diseñar para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra de los respectivos anticuerpos modificados. En otros constructos puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, podrían expresarse constructos compatibles en donde el dominio CH2 se ha suprimido y el dominio CH3 que queda (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Un espaciador de este tipo se puede añadir, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanecen libres y accesibles o que la región bisagra permanece flexible. Sin embargo, debe observarse que los espaciadores aminoácidos pueden, en algunos casos, demostrar ser inmunogénicos y provocar una respuesta inmune no deseada contra el constructo. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, cualquier espaciador añadido al constructo será relativamente no inmunogénico, o incluso omitido en conjunto, con el fin de mantener las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la eliminación de dominios de región constante completa, se comprenderá que los anticuerpos pueden proporcionarse mediante la eliminación o sustitución parcial de unos pocos o incluso de un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y, de este modo, aumentar la localización del tumor. De manera similar, puede desearse simplemente eliminar la parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (p. ej., la unión C1Q del complemento) a modular. Dichas supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida del suero) mientras deja intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante del sujeto. Además, como se ha mencionado anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden modificarse mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que realzan el perfil del constructo resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (p. ej., unión a Fc) manteniendo sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Ciertas realizaciones pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para realizar características deseables tal como disminuir o aumentar la función efectora o proporcionar más unión a citotoxina o hidrato de carbono. Puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

La presente invención comprende además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos humanizados, o a los fragmentos de anticuerpos de los mismos, expuestos en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadas, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro dentro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido

neutro. Lo que se pretende mediante una sustitución conservadora de aminoácidos es bien conocido en la técnica.

5 Los polipéptidos pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra un FOLR1 humano. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la invención se pueden variar sin efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Así, la invención incluye además variaciones de los polipéptidos que muestran una actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra una proteína receptora de folato humano. Tales mutantes incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo.

10 Los polipéptidos y análogos pueden modificarse adicionalmente para contener restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Los restos derivados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Los restos también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y similares. Se puede encontrar una descripción general de estas fracciones en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

15 Los polipéptidos aislados descritos en el presente documento pueden producirse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Tales procedimientos van desde procedimientos sintéticos de proteína directa hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos aislados y expresan esas secuencias en un anfitrión transformado adecuado. Se puede construir una secuencia de ADN utilizando tecnología recombinante aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína de interés de tipo salvaje. Opcionalmente, la secuencia puede ser mutagenizada por mutagénesis específica en el sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Véanse, p. ej., Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 81: 5662-5066 (1984) y la pat. de EE.UU. 4.588.585.

20 Una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se construiría mediante síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos se pueden diseñar basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionar aquellos codones que son favorecidos en la célula anfitriona en donde se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse procedimientos estándar para sintetizar una secuencia polinucleotídica aislada que codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, se puede usar una secuencia completa de aminoácidos para construir un gen traducido de nuevo. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido particular aislado. Por ejemplo, se pueden sintetizar varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y después se ligan. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente salientes 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

25 Una vez ensamblados (mediante síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro procedimiento), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se unirán operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un anfitrión deseado. El ensamblaje adecuado puede confirmarse mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un anfitrión adecuado. Como es bien conocido en la técnica, para obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un anfitrión, el gen debe estar operativamente unido a secuencias de control de expresión de transcripción y de traducción que sean funcionales en el anfitrión de expresión elegido.

30 Se usan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar anticuerpos codificantes de ADN, o fragmentos de los mismos, contra FOLR1 humano. Los vectores de expresión recombinantes son constructos de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una cadena polipeptídica de un anticuerpo anti-FOLR1, o fragmento de la misma, operativamente unidos a elementos reguladores de transcripción o de traducción adecuados derivados de genes de mamíferos, microbianos, víricos o de insectos. Una unidad de transcripción comprende generalmente un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores de la transcripción, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en una proteína, y (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción, como se describe con detalle a continuación. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia de operador para controlar la transcripción. Además, se puede incorporar la capacidad de replicarse en un anfitrión, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes. Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está posicionado de manera que permita la traducción. Los elementos estructurales destinados a ser utilizados en sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula anfitriona. Como alternativa, cuando la proteína recombinante se expresa sin un líder o secuencia de transporte, puede incluir un resto de metionina N-terminal. Opcionalmente, este resto puede separarse posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

60 La elección de la secuencia de control de expresión y del vector de expresión dependerá de la elección de la

anfitriona. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones anfitrión/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para anfitrionas eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para anfitriones bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Escherichia coli*, que incluyen pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de intervalo anfitrión más amplio, tal como M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario.

Las células anfitrionas adecuadas para la expresión de un polipéptido o anticuerpo de unión a FOLR1 (o una proteína FOLR1 para usar como antígeno) incluyen células procariotas, de levaduras, de insectos o células eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gram-negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe a continuación. También podrían emplearse sistemas de traducción sin células. Vectores apropiados de clonación y expresión para uso con anfitriones celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamíferos están descritos por Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985). Se puede encontrar información adicional con respecto a los procedimientos de producción de proteínas, que incluyen la producción de anticuerpos, p. ej., en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2008/0187954, patentes de EE.UU. n.º 6.413.746 y 6.660.501, y publicación de patente internacional n.º WO 04009823.

También se emplean ventajosamente varios sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar proteína recombinante. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero puede realizarse porque dichas proteínas están generalmente plegadas correctamente, adecuadamente modificadas y completamente funcionales. Ejemplos de líneas celulares anfitrionas de mamífero adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (*Cell* 23: 175, 1981) y otras líneas celulares incluidas, por ejemplo, las células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados unidos al gen a expresar y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3' y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como sitios de unión a ribosomas necesarias, un sitio de poliadenilación, sitios dador y aceptor de empalmes, y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto son revisados por Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988).

Las proteínas producidas por una anfitriona transformada pueden purificarse según cualquier procedimiento adecuado. Dichos procedimientos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. A la proteína se pueden unir etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de una capa de la gripe y glutatión-S-transferasa para permitir una fácil purificación por paso sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente usando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medio de cultivo pueden, en primer lugar, concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Como alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos normalmente empleados en la purificación de proteínas. Como alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios RP-HPLC hidrófobos, p. ej., gel de sílice que tiene metilo u otros grupos alifáticos colgantes, para purificar adicionalmente un agente de unión a FOLR1. También se pueden emplear algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, mediante extracción inicial de gránulos de células, seguida de una o más etapas de concentración, desalado, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden ser interrumpidas por cualquier procedimiento conveniente, incluidos ciclos de congelación-descongelación, ultrasonidos, interrupción mecánica, o uso de agentes de lisis celular.

Procedimientos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, los descritos en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

El agente de unión a FOLR1 puede ser un polipéptido que no sea un anticuerpo. En la técnica se conocen una diversidad de procedimientos para identificar y producir polipéptidos no anticuerpos que se unen con alta afinidad a una diana de la proteína. Véanse, por ejemplo, Skerra, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18: 295-304 (2007), Hosse et al.,

Protein Science, 15: 14-27 (2006), Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17: 653-658 (2006), Nygren, FEBS J., 275: 2668-76 (2008) y Skerra, FEBS J., 275: 2677-83 (2008). La tecnología de visualización de fagos se ha utilizado para identificar/producir el polipéptido de unión a FOLR1. El polipéptido puede comprender un armazón de proteínas de un tipo seleccionado del grupo que consiste en proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición de consenso de anquirina y tiorredoxina.

El agente también puede ser una molécula no proteica. El agente puede ser una molécula pequeña. Las bibliotecas de química combinatoria y las técnicas útiles en la identificación de agentes de unión a FOLR1 no proteínicos son conocidas por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Kennedy et al., J. Comb. Chem, 10: 345-354 (2008), Dolle et al, J. Comb. Chem., 9: 855-902 (2007), y Bhattacharyya, Curr. Med. Chem., 8: 1383-404 (2001). El agente puede ser un hidrato de carbono, un glicosaminoglicano, una glicoproteína o un proteoglicano.

El agente también puede ser un aptámero de ácido nucleico. Los aptámeros son moléculas polinucleotídicas que han sido seleccionadas (p. ej., de reservas aleatorias o mutagenizadas) basándose en su capacidad para unirse a otra molécula. El aptámero puede comprender un polinucleótido de ADN. En ciertas realizaciones alternativas, el aptámero comprende un polinucleótido de ARN. El aptámero puede comprender uno o más restos de ácido nucleico modificados. Los procedimientos de generación y cribado de aptámeros de ácido nucleico para la unión a proteínas son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.270.163, la patente de EE.UU. n.º 5.683.867, la patente de EE.UU. n.º 5.763.595, la patente de EE.UU. n.º 6.344.321, la patente de EE.UU. n.º 7.368.236, la patente de EE.UU. n.º 5.582.981, la patente de EE.UU. n.º 5.756.291, la patente de EE.UU. n.º 5.840.867, la patente de EE.UU. n.º 7.312.325, la patente de EE.UU. n.º 7.329.742, la publicación de patente internacional N° WO 02/077262, la publicación de patente internacional N° WO 03/070984, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0239134, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2005/0124565, y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2008/0227735.

III. Inmunoconjugados

La presente invención también se refiere a conjugados (también denominados inmunoconjugados en el presente documento), que comprenden los anticuerpos anti-FOLR1, fragmentos de anticuerpo, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus aspectos como se describe en el presente documento, unidos o conjugados a una citotoxina (fármaco) o profármaco. Así, en un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1) ; una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa1FXaa2Xaa3 (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa1 se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa2 se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa3 se selecciona de G, E, T, S, A y V. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo huMov19, que es el anticuerpo descrito anteriormente que comprende la CDR2 de cadena pesada RIHPYDGDTFYNQKFG (SEQ ID NO: 2). También se describe que el anticuerpo es FR1-21 y comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSYGM (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29). También se describe que el anticuerpo es FR1-48 y comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMQ (SEQ ID NO: 60); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPNGDSR (SEQ ID NO: 61); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RDGNAAAY (SEQ ID NO: 62); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57); una CDR2 de cadena ligera que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 58); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59). También se describe que el anticuerpo es FR1-49 y comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWY (SEQ ID NO: 66); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RHDYGAMDY (SEQ ID NO: 68); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYTNL (SEQ ID NO: 63); una CDR2 de cadena ligera que comprende TASNLD (SEQ ID NO: 64); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65). También se describe que el anticuerpo es FR1-57 y comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSFGMH (SEQ ID NO: 72); una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQNNLNH (SEQ ID NO: 69); una CDR2 de cadena ligera que comprende YVSQSVS (SEQ ID NO: 70); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71). También se describe que el anticuerpo es FR1-65 y comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TSYTMH (SEQ ID NO: 78); una CDR2 de cadena pesada que comprende YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GGAYGRKPMYD (SEQ ID NO: 80); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQNVGPVA (SEQ ID NO: 75); una CDR2 de cadena ligera que comprende SASYRYS (SEQ ID NO: 76); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 77).

En la técnica se conocen fármacos o profármacos adecuados. En ciertas realizaciones, los fármacos o profármacos

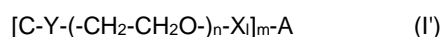
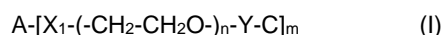
son agentes citotóxicos. El agente citotóxico usado en el conjugado citotóxico de la presente invención es un maitansinoide o un análogo de maitansinoide.

5 Tales conjugados se pueden preparar usando un grupo de enlace para unir un fármaco o profármaco al anticuerpo o equivalente funcional. Los grupos de enlace adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos de peptidasa lábiles y grupos de esterasa lábiles.

10 El fármaco o profármaco puede, por ejemplo, estar enlazado al anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo a través de un enlace disulfuro. La molécula conectora o agente reticulador comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo. En ciertas realizaciones, los grupos químicos reactivos para la reacción con el agente de unión celular son ésteres de N-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo. Adicionalmente, la molécula conectora comprende un grupo químico reactivo, en ciertas realizaciones un grupo ditiopiridilo que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones, las moléculas conectoras incluyen, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson et al., Biochem., 173: 723-737 (1978), 4-(2-piridilditio)-butanoato de N-succinimidilo (SPDB) (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 4.563.304), 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB) (véase la publicación de EE.UU. n.º 20090274713), 4-(2-piridiltio)-pentanoato de N-succinimidilo (SPP) (véase, p. ej., número de registro CAS 341498-08-6), 2-iminotiolano o anhídrido acetilsuccínico. Por ejemplo, el anticuerpo o agente de unión a célula puede ser modificado con reactivos de reticulación y el anticuerpo o agente de unión a célula que contiene grupos tiol libres o protegidos así derivados se hace reaccionar después con un maitansinoide que contiene disulfuro o tiol para producir conjugados. Los conjugados se pueden purificar por cromatografía, que incluye, pero sin limitarse a, HPLC, exclusión por tamaño, adsorción, intercambio iónico y captación por afinidad, diálisis o filtración de flujo tangencial. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FOLR1 está enlazado a la citoxina a través de un conector SPDB o sulfo-SPDB. En una cierta realización, el anticuerpo huMov19 está enlazado a una citotoxina a través de un conector SPDB o sulfo-SPDB.

25 El anticuerpo anti-FOLR1 puede estar enlazado a fármacos citotóxicos a través de enlaces disulfuro y un espaciador de polietilenglicol para realzar la potencia, la solubilidad o la eficacia del inmunconjugado. Dichos conectores hidrófilos escindibles se describen en el documento WO2009/0134976. El beneficio adicional de este diseño de conector es la deseada elevada proporción de monómero y la mínima agregación del conjugado anticuerpo-fármaco. Específicamente contemplados en este aspecto son los conjugados de agentes de unión a célula y fármacos ligados a través del grupo disulfuro (-S-S-) que llevan espaciadores de polietilenglicol $((\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n=1-14})$ con un estrecho intervalo de carga de fármaco de 2-8 que se describe que muestran una actividad biológica potente relativamente alta hacia células cancerosas y tienen las propiedades bioquímicas deseadas de alto rendimiento de conjugación y elevada proporción de monómeros con una mínima agregación de proteínas.

30 Específicamente contemplado en este aspecto es un conjugado de fármaco anticuerpo anti-FOLR1 de fórmula (I) o un conjugado de fórmula (I'):



en donde:

A representa un anticuerpo o fragmento anti-FOLR1;

40 C representa una citotoxina o fármaco;

X representa una unidad alifática, aromática o heterocíclica unida al agente de unión celular a través de un enlace tioéter, un enlace amida, un enlace carbamato o un enlace éter;

Y representa una unidad alifática, aromática o heterocíclica unida al fármaco a través de un enlace disulfuro;

I es 0 o 1;

45 m es un número entero de 2 a 8; y

n es un número entero de 1 a 24.

m puede ser un número entero de 2 a 6.

m puede ser un número entero de 3 a 5.

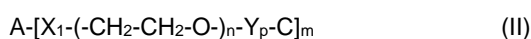
50 Además, n puede ser un número entero de 2 a 8. Como alternativa, tal como se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.441.163 y 7.368.565, el fármaco puede, en primer lugar, modificarse para introducir un éster reactivo adecuado para reaccionar con un agente de unión celular. La reacción de estos fármacos que contienen un resto conector activado con un agente de unión celular proporciona otro procedimiento para producir

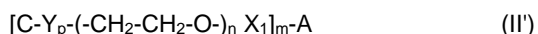
un conjugado de fármaco de agente de unión a células. Los maitansinoídes también pueden estar enlazados a un anticuerpo o fragmento anti-FOLR1 usando grupos de enlace PEG, como se expone por ejemplo en la patente de EE.UU. 6.716.821. Estos grupos no escindibles de enlace PEG son solubles tanto en agua como en disolventes no acuosos, y pueden usarse para unir uno o más agentes citotóxicos a un agente de unión celular. Ejemplos de grupos de enlace PEG incluyen conectores PEG heterobifuncionales que reaccionan con agentes citotóxicos y agentes de unión a células en extremos opuestos de los conectores a través de un grupo funcional sulfhidrilo o disulfuro en un extremo y un éster activo en el otro extremo. Como un ejemplo general de la síntesis de un conjugado citotóxico usando un grupo de enlace PEG, se hace referencia de nuevo a la patente de EE.UU. 6.716.821. La síntesis comienza con la reacción de uno o más agentes citotóxicos que portan un resto reactivo PEG con un agente de enlace a células, dando como resultado el desplazamiento del éster activo terminal de cada resto reactivo de PEG por un resto de aminoácido del agente de unión celular, conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión celular a través de un grupo de enlace PEG. Como alternativa, la unión celular puede modificarse con el reticulador bifuncional de PEG para introducir un resto disulfuro reactivo (tal como un disulfuro de piridilo), que puede tratarse después con un maitansinoíde que contiene tiol para proporcionar un conjugado. En otro procedimiento, la unión celular puede modificarse con el reticulador PEG bifuncional para introducir un resto tiol que puede tratarse después con un maitansinoíde que contiene disulfuro reactivo (tal como un disulfuro de piridilo), para proporcionar un conjugado.

También se pueden preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoíde con enlaces no escindibles. Dichos reticuladores se describen en la técnica (véase el ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbook y la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0169933) e incluyen, pero no se limitan a, 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de N-succinimidilo que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster N-succinimidílico del ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster N-succinimidílico del ácido β -maleimidopropanoico (BMPS), éster N-succinimidílico del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), 6-(β -maleimidopropionamido)-hexanoato de succinimidilo (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), e isocianato de N-(p-maleimidofenil) (PMPI), 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA) y 3-(bromoacetamido)-propionato de N-succinimidilo (SBAP). El anticuerpo puede modificarse con reactivos de reticulación tales como 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), sulfo-SMCC, éster maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS o yodoacetato de succinimidilo, como se describe en la bibliografía, para introducir 1-10 grupos reactivos (Yoshitake et al., Eur. J. Biochem., 101: 395-399 (1979), Hashida et al, J. Applied Biochem., 56-63 (1984), y Liu et al., Biochem., 18: 690-697 (1979)). El anticuerpo modificado se hace reaccionar a continuación con el derivado de maitansinoíde que contiene tiol para producir un conjugado. El conjugado puede ser purificado por filtración en gel a través de una columna G25 Sephadex o por diálisis o filtración tangencial del flujo. Los anticuerpos modificados se tratan con el maitansinoíde que contiene tiol (1 a 2 equivalentes molares/grupo maleimido) y los conjugados anticuerpo-maitansinoíde son purificados por filtración en gel a través de una columna Sephadex G-25, cromatografía sobre una columna de hidroxiapatita cerámica, diálisis o filtración tangencial del flujo o una combinación de sus procedimientos. Típicamente, se enlacen un promedio de 1-10 maitansinoídes por anticuerpo. Un procedimiento consiste en modificar anticuerpos con 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para introducir grupos maleimido seguido por la reacción del anticuerpo modificado con un maitansinoíde que contiene tiol para dar un conjugado ligado a tioéter. De nuevo, resultan 1 a 10 moléculas de fármaco por molécula de anticuerpo. De la misma manera se preparan conjugados de maitansinoíde de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hormonas de proteínas, factores de crecimiento de proteínas y otras proteínas.

El anticuerpo FOLR1 (p. ej., huMov19, FR1-21, FR1-48, FR1-49, FR1-57 o FR1-65) puede estar enlazado también al fármaco a través de un enlace no escindible a través de la intermediación de un espaciador de PEG. Los reactivos de reticulación adecuados que comprenden cadenas de PEG hidrófilas que forman enlaces entre un fármaco y el anticuerpo o fragmento anti-FOLR1 son también bien conocidos en la técnica, o están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Quanta Biodesign, Powell, Ohio). Reticuladores adecuados que contienen PEG se pueden sintetizar también a partir de los propios PEG disponibles comercialmente usando técnicas de química sintética estándares conocidas por el experto en la técnica. Los fármacos pueden hacerse reaccionar con reticuladores bifuncionales que contienen PEG para dar compuestos de la siguiente fórmula, Z-X₁-(-CH₂-CH₂-O)_n-Y_p-D, por procedimientos descritos en detalle en la publicación de patente de EE.UU. 20090274713 y en WO2009/0134976, que puede entonces reaccionar con el agente de unión celular para proporcionar un conjugado. Como alternativa, la unión de células puede modificarse con el reticulador bifuncional con PEG para introducir un grupo reactivo con tiol (tal como una maleimida o haloacetamida) que puede tratarse después con un maitansinoíde que contiene tiol para proporcionar un conjugado. En otro procedimiento, la unión celular puede modificarse con el reticulador bifuncional con PEG para introducir un resto tiol que puede tratarse después con un maitansinoíde reactivo con tiol (tal como un maitansinoíde que lleva una maleimida o haloacetamida), para proporcionar un conjugado.

Según esto, otro aspecto es un conjugado de fármaco anticuerpo anti-FOLR1 de fórmula (II) o de fórmula (II')





en donde A representa un anticuerpo o fragmento anti-FOLR1;

C representa una citotoxina o fármaco;

X representa una unidad alifática, aromática o heterocíclica unida al agente de unión celular a través de un enlace tioéter, un enlace amida, un enlace carbamato o un enlace éter;

Y representa una unidad alifática, aromática o heterocíclica unida al fármaco a través de un enlace covalente seleccionado del grupo que consiste en un enlace tioéter, un enlace amida, un enlace carbamato, un enlace éter, un enlace amina, un enlace carbono-carbono y un enlace hidrazona;

l es 0 o 1;

p es 0 o 1;

m es un número entero de 2 a 15; y

n es un número entero de 1 a 2.000.

En una cierta realización, m es un número entero de 2 a 8; y

n es un número entero de 1 a 24.

m puede ser un número entero de 2 a 6.

n puede ser un número entero de 2 a 8.

m puede ser un número entero de 3 a 5. En una cierta realización, el anticuerpo es huMov19. El anticuerpo puede ser FR1-21. El anticuerpo puede ser FR-1-48. El anticuerpo puede ser FR-1-49. El anticuerpo puede ser FR-1-57. El anticuerpo puede ser FR-1-65.

Ejemplos de conectores que contienen PEG adecuados incluyen ligandos que tienen un éster de N-succinimidilo o resto de éster de N-sulfosuccinimidilo para la reacción con el anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo, así como un resto basado en maleimido o haloacetilo para la reacción con el compuesto. Un espaciador de PEG puede ser incorporado en cualquier reticulador conocido en la técnica por los procedimientos descritos en el presente documento.

Muchos de los conectores descritos en el presente documento se describen con detalle en las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 20050169933 y 20090274713 y en WO2009/0134976.

La presente invención incluye aspectos en donde aproximadamente 2 a aproximadamente 8 moléculas de fármaco (carga de fármaco), por ejemplo, maitansinoide, están enlazadas a un anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo, el efecto antitumoral del conjugado es mucho más eficaz como En comparación con una carga de fármaco de un número menor o mayor de fármacos enlazados al mismo agente de unión celular. "Carga de fármaco", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al número de moléculas de fármaco (p. ej., un maitansinoide) que se puede unir a un agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo). El número de moléculas de fármaco que se pueden unir a un agente de unión celular puede promediar de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 (p. ej., 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1). En ciertas realizaciones, el fármaco es N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N²-desacetil-N²-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4). Así, en una cierta realización, el anticuerpo huMov19 se conjuga con DM1 o DM4. También se describe que el anticuerpo FR-1-21 se conjuga con DM1 o DM4. También se describe que el anticuerpo FR-1-48 se conjuga con DM1 o DM4. Adicionalmente, se describe que el anticuerpo FR-1-49 se conjuga con DM1 o DM4. Todavía se describe adicionalmente que el anticuerpo FR-1-57 se conjuga con DM1 o DM4. También se describe que el anticuerpo FR-1-65 se conjuga con DM1 o DM4.

Así, un inmunoconjugado comprende 1 maitansinoide por anticuerpo o, Como alternativa, un inmunoconjugado comprende 2 maitansinoides por anticuerpo, o como alternativa, un inmunoconjugado comprende 3 maitansinoides por anticuerpo o, como alternativa, un inmunoconjugado comprende 4 maitansinoides por anticuerpo o, como alternativa, un inmunoconjugado comprende 5 maitansinoides por anticuerpo o, como alternativa, un inmunoconjugado comprende 6 maitansinoides por anticuerpo, o como alternativa, un inmunoconjugado comprende 7 maitansinoides por anticuerpo, o como alternativa, un inmunoconjugado comprende 8 maitansinoides por anticuerpo.

Es decir, un inmunoconjugado comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 maitansinoides por anticuerpo, o un inmunoconjugado comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 maitansinoides por anticuerpo, o un inmunoconjugado comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 maitansinoides por anticuerpo, o un inmunoconjugado comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 5 maitansinoides por anticuerpo, o un inmunoconjugado comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 maitansinoides por anticuerpo, o un inmunoconjugado comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 maitansinoides por anticuerpo.

Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 (por ejemplo, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6,

- 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1) moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) unidos por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo.
- Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente $2 \pm 0,5$, aproximadamente $2,5 \pm 0,5$, aproximadamente $3 \pm 0,5$, aproximadamente $3,5 \pm 0,5$, aproximadamente $4 \pm 0,5$, aproximadamente $4,5 \pm 0,5$, aproximadamente $5 \pm 0,5$, aproximadamente $5,5 \pm 0,5$, aproximadamente $6 \pm 0,5$, aproximadamente $6,5 \pm 0,5$, aproximadamente $7 \pm 0,5$, aproximadamente $7,5 \pm 0,5$, o aproximadamente $8 \pm 0,5$ moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) unidas por anticuerpo. Preferiblemente, una composición que comprende inmunoconjugados tiene un promedio de aproximadamente $3,5 \pm 0,5$ moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo.

El anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo puede modificarse haciendo reaccionar un reactivo de reticulación bifuncional con el anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo, dando como resultado de este modo la unión covalente de una molécula conectora al anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, un "reactivo de reticulación bifuncional" es cualquier resto químico que enlaza covalentemente un agente de unión celular a un fármaco, tal como los fármacos descritos en el presente documento. En otro procedimiento, una porción del resto de enlace es proporcionado por el fármaco. A este respecto, el fármaco comprende un resto de enlace que es parte de una molécula conectora más grande que se usa para unir el agente de unión celular al fármaco. Por ejemplo, para formar el maitansinoide DM1, la cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de la maitansina se modifica para que tenga un grupo sulfhidrilo libre (SH). Esta forma tiolada de maitansina puede reaccionar con un agente de unión celular modificado para formar un conjugado. Por lo tanto, el conector final se ensambla a partir de dos componentes, uno de los cuales es proporcionado por el reactivo de reticulación, mientras que el otro es proporcionado por la cadena lateral de DM1.

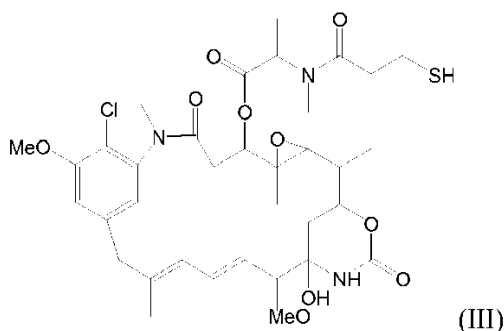
Las moléculas de fármaco también pueden estar enlazadas a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula portadora intermedia tal como seroalbúmina.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "enlazado a un agente de unión celular" o "enlazado a un anticuerpo o fragmento anti-FOLR1" se refiere a la molécula conjugada que comprende al menos un derivado de fármaco unido a un agente de unión a célula, anticuerpo o fragmento anti-FOLR1 a través de un grupo de enlace adecuado, o un precursor del mismo. En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es SMCC.

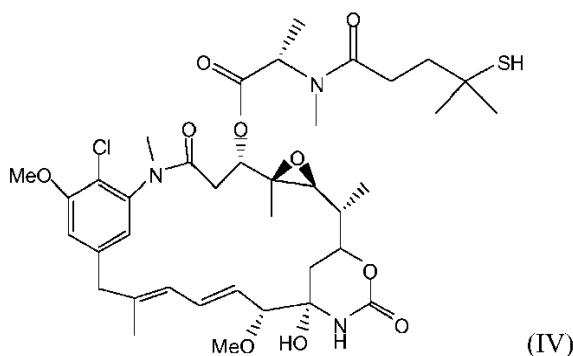
Los agentes citotóxicos útiles en la presente invención son maitansinoides y análogos de maitansinoides. Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen ésteres de maitansinol y análogos de maitansinol. Se incluyen todos los fármacos que inhiben la formación de microtúbulos y que son altamente tóxicos para las células de mamífero, al igual que maitansinol y los análogos de maitansinol.

Ejemplos de ésteres de maitansinol adecuados incluyen los que tienen un anillo aromático modificado y los que tienen modificaciones en otras posiciones. Tales maitansinoides adecuados se describen en las patentes de EE.UU. n.º 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 5.208.020; 5.416.064; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545; 6.333.410; 7.276.497 y 7.473.796.

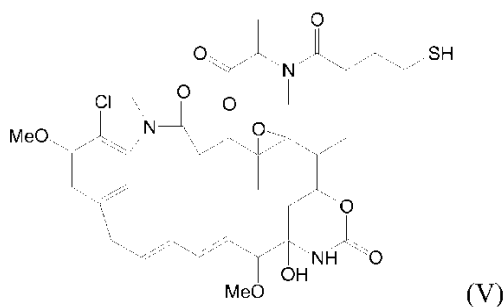
En una cierta realización, los inmunoconjugados de la invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), denominado formalmente N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como agente citotóxico. DM1 está representado por la siguiente fórmula estructural (III):



5 En otra realización, los conjugados de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tioles, N²-desacetil-N^{2'}(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (por ejemplo, DM4) como agente citotóxico. DM4 está representado por la siguiente fórmula estructural (IV):



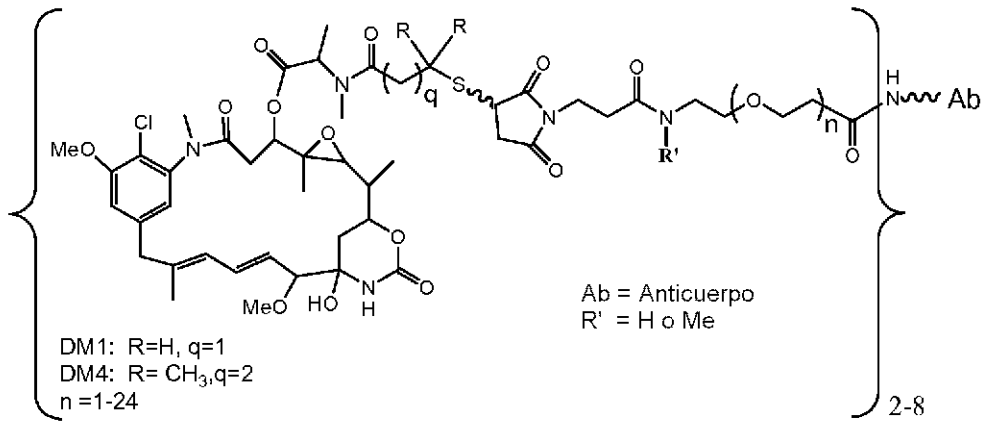
10 Otro maitansinoide que comprende una cadena lateral que contiene un enlace tiol estéricamente impedido es N²-desacetil-N^{2'}(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM3), representado por la siguiente fórmula estructural (V):



15 En el conjugado de la presente invención se pueden utilizar también cada uno de los maitansinoides descritos en las patentes de EE.UU. n.º 5.208.020 y 7.276.497.

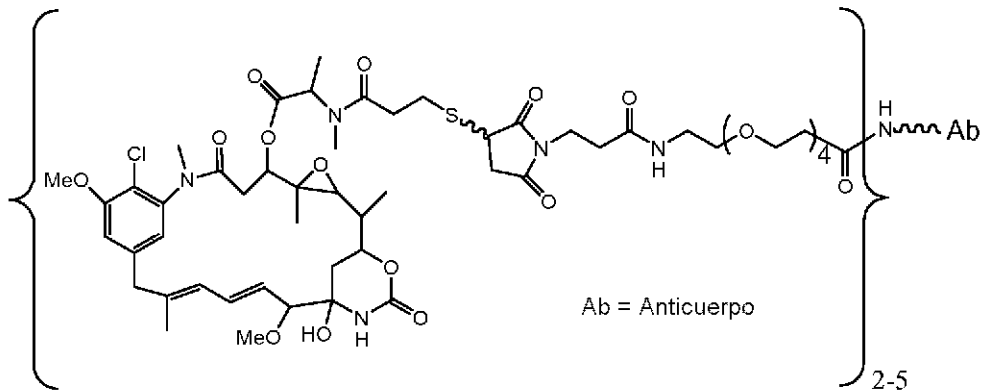
20 Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como la posición para enlazar químicamente el resto de enlace. Por ejemplo, se espera que sean útiles todos los de la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En ciertas realizaciones, se utiliza la posición C-3. En ciertas realizaciones, se utiliza la posición C-3 del maitansinol.

Las representaciones estructurales de ciertos conjugados se muestran a continuación:



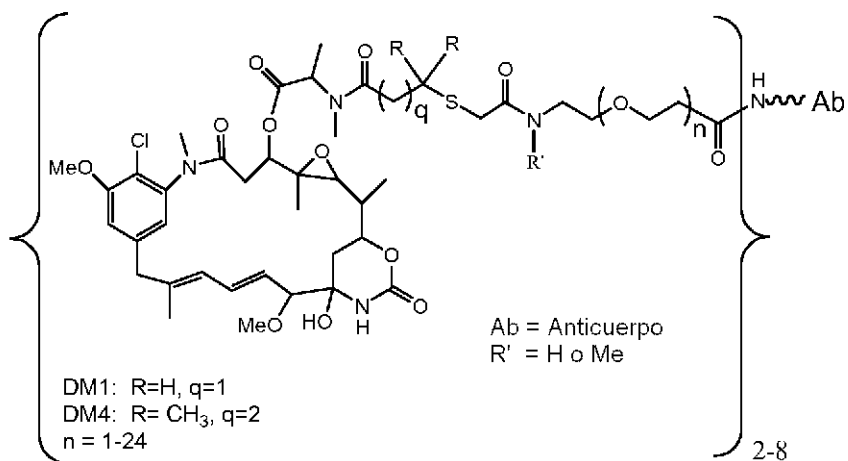
Ab-PEG-Mal-DM1/DM4

(VI)



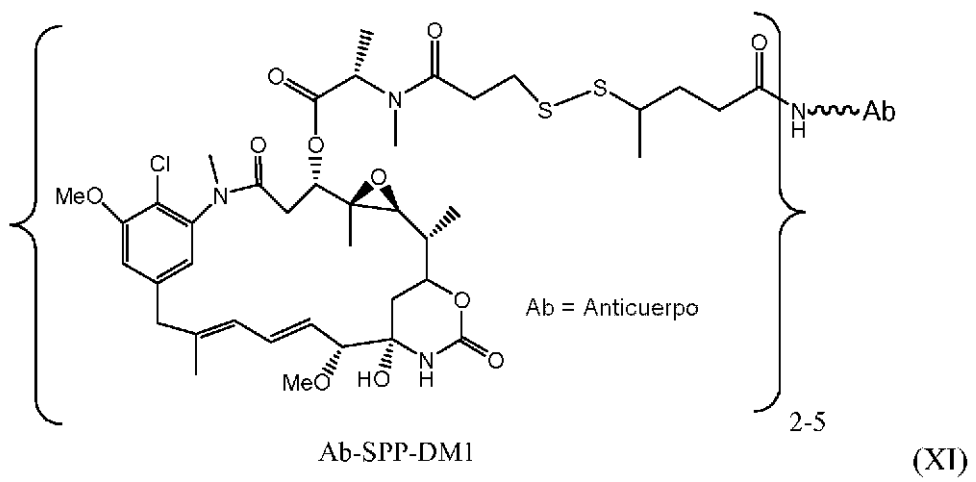
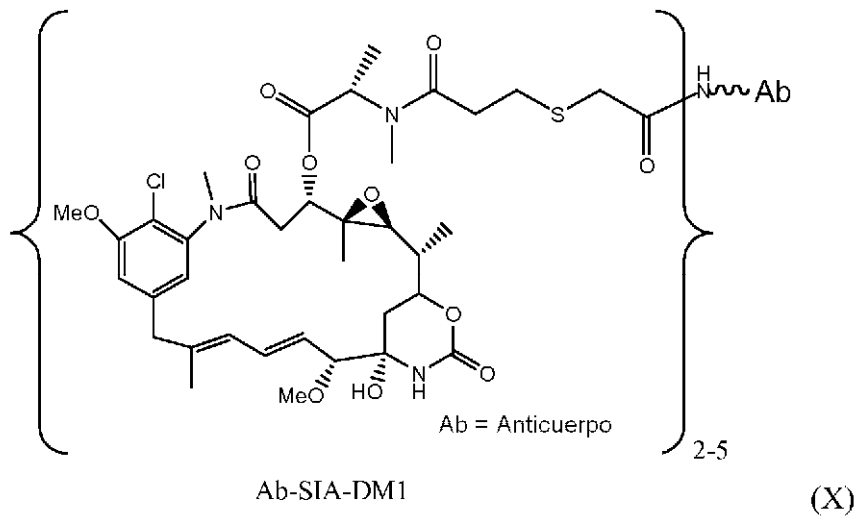
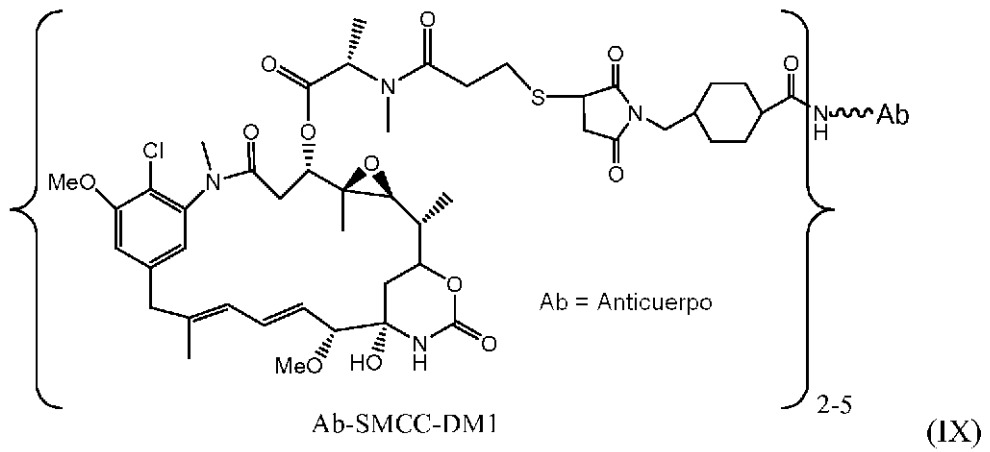
Ab-PEG4-Mal-DM1

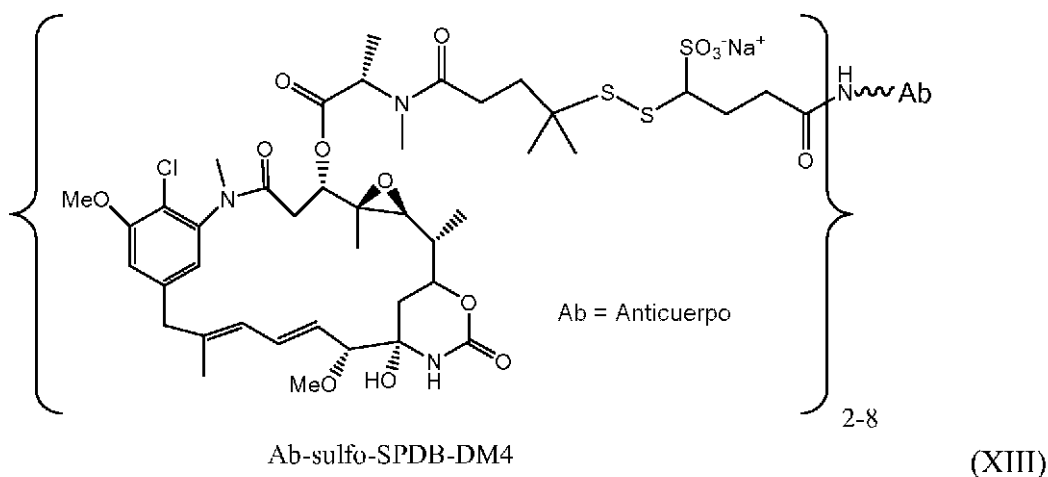
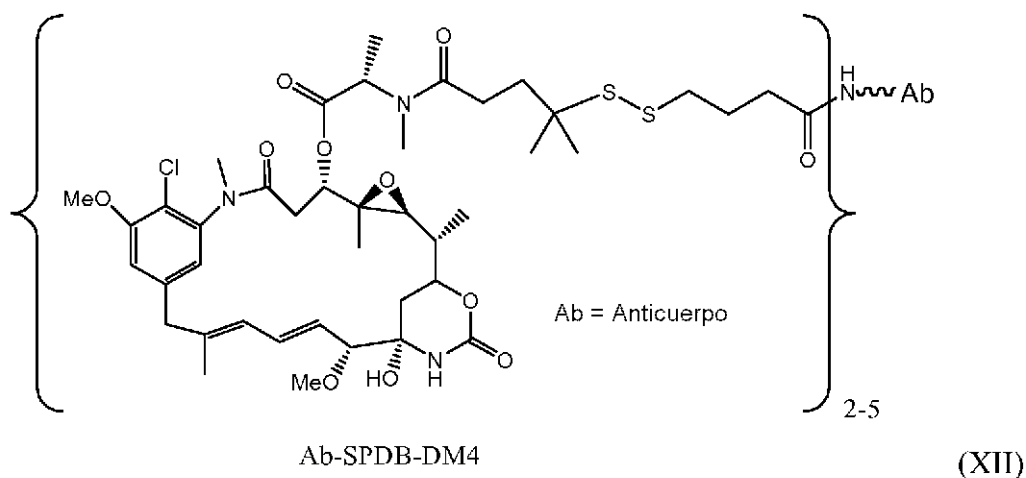
(VII)



Ab-PEG-SIA-DM1/DM4

(VIII)





En una cierta realización, el anticuerpo es huMov19. El anticuerpo también puede ser FR1-21.

5 Se proporcionan varias descripciones para producir tales conjugados de anticuerpo-maitansinoide en las patentes de EE.UU. n.º 6.333.410, 6.441.163, 6.716.821 y 7.368.565.

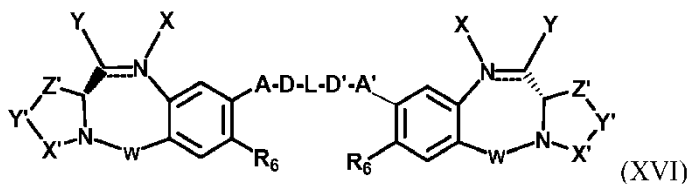
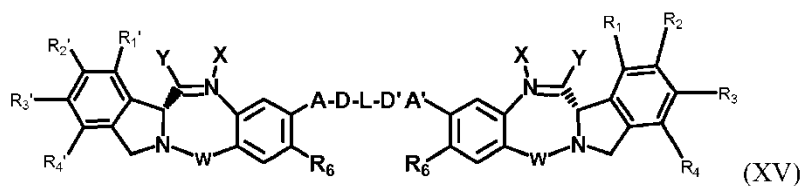
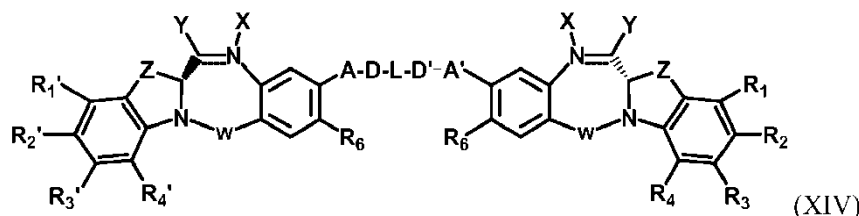
En general, una solución de un anticuerpo en tampón acuoso puede incubarse con un exceso molar de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo. La mezcla de reacción se puede templar por adición de amina en exceso (tal como etanolamina, taurina, etc.). El conjugado de maitansinoide-anticuerpo puede entonces purificarse por filtración en gel. El número de moléculas de maitansinoides unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo espectrofotométricamente la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Se usa un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo y se usa también un promedio de 2-5 en ciertas realizaciones. El número medio de moléculas de maitansinoides/anticuerpo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1-10, 2-5, 3-4, 3,5-4 o 3,5. Preferiblemente, el número medio de moléculas de maitansinoides/anticuerpo es de aproximadamente $3,5 \pm 0,5$. Preferiblemente, el número medio de moléculas de maitansinoides/anticuerpo es de aproximadamente 3,5-4.

Los conjugados de anticuerpos con fármacos maitansinoides pueden evaluarse por su capacidad para suprimir la proliferación de varias líneas celulares no deseadas *in vitro*. Por ejemplo, las líneas celulares tales como la línea de células KB humanas, pueden usarse fácilmente para la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos. Las células a evaluar pueden estar expuestas a los compuestos durante 4 a 5 días y las fracciones de células sobrevivientes medidas en ensayos directos por procedimientos conocidos. Los valores de IC_{50} pueden entonces calcularse a partir de los resultados de los ensayos.

También se pueden utilizar compuestos de benzodiazepina descritos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2010/0203007 (p. ej., indolinobenzodiazepinas u oxazolidinobenzodiazepinas), derivados de

los mismos, intermedios de los mismos para preparar fragmentos o conjugados de anticuerpos anti-FOLR1.

Las benzodiazepinas útiles incluyen compuestos de fórmula (XIV), (XV) y (XVI), en los que los compuestos dímeros llevan opcionalmente un grupo de enlace que permite la unión a agentes de unión celular.



en donde la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, con la condición de que cuando es un enlace doble, X está ausente e Y es H, y cuando es un enlace sencillo, X es H o un resto protector de amina que transforma el compuesto en un profármaco;

Y se selecciona de -OR, un éster representado por -OCOR', un carbonato representado por -OCOOR', un carbamato representado por -OCONR'R'', una amina o una hidroxilamina representada por NR'R'', amida representada por -NRCOR', un péptido representado por NRCOP, en donde P es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 y 20 unidades de aminoácido, un tioéter representado por SR', un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfito -SO₃, un bisulfito -OSO₃, un halógeno, ciano, un azido o un tiol, en donde R, R' y R'' son iguales o diferentes y se seleccionan entre H, alquilo, alquenilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol (-OCH₂CH₂)_n, en donde n es un número entero de 1 a 2.000, arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono en donde el sustituyente se selecciona de halógeno, OR₇, NR₈R₉, NO₂, NRCOR', SR₁₀, un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfito -SO₃, un bisulfito -OSO₃, una sulfonamida representada por SO₂NRR', ciano, un azido, -COR₁₁, OCOR₁₁ u OCONR₁₁R₁₂, en donde las definiciones de R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son como se han dado anteriormente, opcionalmente R'' es OH;

W es C = O, C = S, CH₂, BH, SO o SO₂;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' se seleccionan cada uno independientemente entre H, alquilo, alquenilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico, sustituido o no sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol (-COCH₂CH₂)_n, en donde n es un número entero de 1 a 2.000, o un sustituyente seleccionado entre un halógeno, guanidinio [-NH (C = NH) NH₂], OR₇, NR₈R₉, NO₂, NRCOR', SR₁₀, un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfito -SO₃, un bisulfito -OSO₃, una sulfonamida representada por SO₂NRR', ciano, un azido, -COR₁₁, OCOR₁₁ u OCONR₁₁R₁₂, en donde R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol (-OCH₂CH₂)_n, en donde n es un número entero de 1 a 2.000, arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, R₁₀ opcionalmente es SR₁₃ o COR₁₃, donde R₁₃ se selecciona de alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol (-OCH₂CH₂)_n, donde n es un número entero de 1 a 2.000, arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, opcionalmente R₁₁ es OR₁₄, donde R₁₄ tiene la misma definición que R, opcionalmente uno cualquiera de R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' o R₄' es un grupo de enlace que permite la unión a un agente de unión celular a través de un enlace covalente o se selecciona de una unidad de poli-pirroló, poli-indolilo, poli-imidazolilo, poli-pirroló-imidazolilo, poli-pirro-indolilo o poli-imidazol-indolilo que llevan opcionalmente un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión celular;

Z se selecciona de $(\text{CH}_2)_n$, donde n es 1, 2 o 3, $\text{CR}_{15}\text{R}_{16}$, NR_{17} , O o S, en donde R_{15} , R_{16} y R_{17} se seleccionan cada uno independientemente entre H, alquilo lineal, ramificado o cíclico, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000;

R_6 es OR, SR o NRR' , en donde R y R' tienen la misma definición que se ha dado anteriormente;

5 X' se selecciona de CH_2 , NR, CO, BH, SO o SO_2 en donde R tiene la misma definición que la dada anteriormente;

Y' es O, CH_2 , NR o S, donde R tiene la misma definición que la dada anteriormente;

Z' es CH_2 o $(\text{CH}_2)_n$, donde n es 2, 3 o 4, con la condición de que X', Y' y Z' no sean todos CH_2 al mismo tiempo;

A y A' son iguales o diferentes y se seleccionan entre O, $-\text{CRR}'\text{O}$, S, $-\text{CRR}'\text{S}$, $-\text{NR}_{15}$ o $\text{CRR}'\text{NHR}_{15}$, en donde R y R' tienen la misma definición que la dada anteriormente y en donde R_{15} tiene la misma definición dada anteriormente para R;

10 D y D' son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno cualquiera de halógeno, OR_7 , NR_8R_9 , NO_2 , NRCOR' , SR_{10} , un sulfóxido representado por SOR' , una sulfona representada por $\text{SO}_2\text{R}'$, un sulfito $-\text{SO}_3$, un bisulfito $-\text{OSO}_3$, una sulfonamida representada por $\text{SO}_2\text{NRR}'$, ciano, un azido, $-\text{COR}_{11}$, OCOR_{11} u $\text{OCONR}_{11}\text{R}_{12}$, en donde las definiciones de R_7 , R_9 , R_{10} , R_{11} y R_{12} son como se han dado anteriormente, una unidad de polietilenglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000;

15 L es un grupo fenilo opcional o un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono que está opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es un grupo enlazante que permite el enlace con un agente de unión celular a través de un enlace covalente, o se selecciona de alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno cualquiera de halógeno, OR_7 , NR_8R_9 , NO_2 , NRCOR' , SR_{10} , un sulfóxido representado por SOR' , una sulfona representada por $-\text{SO}_2\text{R}'$, un sulfito $-\text{SO}_3$, un bisulfito $-\text{OSO}_3$, una sulfonamida representada por $\text{SO}_2\text{NRR}'$, ciano, un azido, $-\text{COR}_{11}$, OCOR_{11} u $\text{OCONR}_{11}\text{R}_{12}$, en donde las definiciones de R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} y R_{12} son como se han dado anteriormente, una unidad de polietilenglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000; opcionalmente, el propio L es un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión celular a través de un enlace covalente; o sus solvatos, sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros, enantiómeros o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos; siempre que el compuesto no tenga más de un grupo de enlace que permita el enlace con un agente de unión celular a través de un enlace covalente.

30 En un aspecto, la línea doble --- entre N y C representa un enlace sencillo o un enlace doble, con tal de que cuando es un enlace doble, X está ausente e Y es H, y cuando es un enlace sencillo, X es H o un grupo protector de amina que transforma el compuesto en un profármaco; Y se selecciona de $-\text{OR}$, $\text{NR}'\text{R}''$, un sulfito $-\text{SO}_3$, o un bisulfito $-\text{OSO}_3$, en donde R se selecciona de H, alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000, anillo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono,

35 W es C = O, CH_2 o SO_2 ;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' y R_4' se seleccionan cada uno independientemente de H, NO_2 o un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión celular a través de un enlace covalente;

R_6 es OR_{18} , donde R_{18} tiene la misma definición que R;

40 Z se selecciona de $(\text{CH}_2)_n$, donde n es 1, 2 o 3, $\text{CR}_{15}\text{R}_{16}$, NR_{17} , O o S, en donde R_{15} , R_{16} y R_{17} se seleccionan cada uno independientemente entre H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000; X' se selecciona de CH_2 , o C=O;

Y' es O, NR o S, donde R es como se ha definido anteriormente;

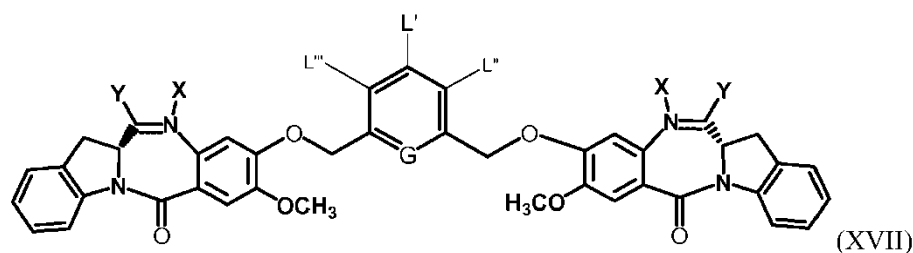
45 Z' es CH_2 o $(\text{CH}_2)_2$;

A y A' son cada uno O;

D y D' son iguales o diferentes e independientemente seleccionados de alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

50 L es un grupo fenilo opcional o un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono que está opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es un grupo enlazante que permite la unión a un agente de unión celular a través de un enlace covalente, o se selecciona de grupos alquilo, alqueno o alquino lineales, ramificados o cíclicos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno cualquiera de halógeno, OR_7 , NR_8R_9 , NO_2 , NRCOR' , SR_{10} , un sulfóxido representado por SOR' , una sulfona representada por $-\text{SO}_2\text{R}'$, un sulfito $-\text{SO}_3$, un bisulfito $-\text{OSO}_3$, una sulfonamida representada por $\text{SO}_2\text{NRR}'$, ciano, un azido, $-\text{COR}_{11}$, OCOR_{11} u $\text{OCONR}_{11}\text{R}_{12}$, una unidad de polietilenglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000; opcionalmente, el propio L es un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión celular a través de un enlace covalente; o sus solvatos, sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros, enantiómeros o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos.

En otro aspecto, el compuesto está representado por la fórmula (XVII):



en donde la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, con la condición de que cuando es un enlace doble, X está ausente e Y es H, y cuando es un enlace sencillo, X es H o un grupo protector de amina que transforma el compuesto en un profármaco, e Y se selecciona de OH, un éter representado por -OR, un sulfito $-\text{SO}_3$, o un bisulfito $-\text{OSO}_3$, en donde R se selecciona de un resto alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico de 1 a 10 átomos de carbono uno de R_2 , R_3 es un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión celular a través de un enlace covalente y el otro es H, uno de L' , L'' o L''' es un grupo enlazante que permite la unión a un agente de unión celular, mientras que los otros son H; L' puede ser el grupo de enlace y G es CH o N. Otros ejemplos se describen en la solicitud de patente de EE.UU. nº 61/150.201. Así, el anticuerpo huMov19 puede conjugarse con un benzodiazepeno que tiene una estructura mostrada en las XIX-XXII anteriores. El anticuerpo FR-1-21 puede conjugarse con un benzodiazepeno que tiene una estructura mostrada en las XIX-XXII anteriores.

IV. Polinucleótidos

La invención abarca polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido que se une específicamente a un receptor FOLR1 humano o a un fragmento de dicho polipéptido. Por ejemplo, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo para un FOLR1 humano o que codifica un fragmento de dicho anticuerpo. Los polinucleótidos pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y pueden ser de cadena doble o monocatenaria, y si son de cadena sencilla pueden ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido).

Los polinucleótidos pueden aislarse. Los polinucleótidos pueden ser sustancialmente puros.

La invención proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13. También se describe un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98% o al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 10, 11, 41, 42 y 88-103.

Los polinucleótidos SEQ ID NO: 5, 14 y 15 comprenden la secuencia codificante para la cadena pesada de dominio variable huMov19, la versión 1.00 de cadena ligera de dominio variable y la versión 1.60 de cadena ligera de dominio variable, respectivamente.

La invención describe además un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. También se describe un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. Así, el polinucleótido puede comprender (a) un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, y/o (b) un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14 o 15. El polinucleótido puede comprender (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y/o (b) un polinucleótido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.

Los polinucleótidos pueden comprender la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula anfitriona (p. ej., una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula anfitriona para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es la proteína madura más restos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosequencia es escindida queda una proteína madura activa.

Los polinucleótidos pueden comprender la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura con una secuencia marcadora que permita, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexa-histidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un anfitrión bacteriana

o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína hemaglutinina de la gripe cuando se usa un anfitrión de mamífero (por ejemplo células COS-7).

La presente invención se refiere además a variantes de los polinucleótidos anteriormente descritos que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos y derivados.

- 5 Las variantes polinucleotídicas pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, en las regiones no codificantes, o en ambas. Las variantes polinucleotídicas pueden contener alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresiones silentes, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Las variantes de nucleótidos pueden ser producidas por sustituciones silentes debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polinucleótidos pueden ser producidas por diversas razones, p. ej., para optimizar la expresión de codones para una anfitrión particular (codones de cambio en el ARNm humano para los preferidos por una anfitrión bacteriana tal como *E. coli*).

También se describen los vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento.

V. Procedimientos de uso y composiciones farmacéuticas

- 15 Los agentes de unión al FOLR1 (inmunoconjugados) de la invención son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de tratamiento terapéutico, tales como para uso en el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, los agentes son útiles para su uso en la inhibición del crecimiento del tumor, la inducción de la diferenciación, la reducción del volumen tumoral y/o la reducción de la tumorigenicidad de un tumor. Los inmunoconjugados pueden ser para uso en procedimientos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. El agente o anticuerpo o
- 20 inmunoconjugado o polipéptido de unión a FOLR1 puede ser un antagonista del FOLR1 humano al que se une.

- Los anticuerpos e inmunoconjugados anti-FOLR1 de la invención son útiles para detectar la presencia de FOLR1 en una muestra biológica. El término "detección" tal como se utiliza en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una muestra biológica comprende una célula o tejido. Tales tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan FOLR1 a niveles más altos con relación a otros tejidos. La sobreexpresión
- 25 FOLR1 detecta la presencia de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer renal o cáncer pancreático.

- La invención describe un procedimiento de detección de la presencia de FOLR1 en una muestra biológica. El procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-FOLR1 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-FOLR1 con el FOLR1, y detectar si se forma un complejo entre el
- 30 anticuerpo anti-FOLR1 y FOLR1.

- La invención describe un procedimiento para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión aumentada de FOLR1. El procedimiento puede comprender poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-FOLR1; determinar el nivel de expresión (ya sea cuantitativa o cualitativamente) de FOLR1 por la célula de ensayo detectando la unión del anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1; y comparar el nivel de expresión de FOLR1 por la célula de ensayo con el nivel de expresión de FOLR1 por una célula de control (p. ej., una célula normal del mismo origen tisular que la célula de ensayo o una célula que expresa FOLR1 a niveles comparables con tal célula normal, en donde un mayor nivel de expresión de FOLR1 por la célula de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con una expresión aumentada de FOLR1. La célula de ensayo puede obtenerse de un individuo sospechoso de tener un trastorno asociado con una expresión aumentada de FOLR1. El trastorno puede ser un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.
- 35
- 40

- Un procedimiento de diagnóstico o detección, tal como los descritos anteriormente, puede comprender detectar la unión de un anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1 expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida a partir de una célula que expresa FOLR1 en su superficie. El procedimiento puede comprender poner en contacto una célula con un anticuerpo anti-FOLR1 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-FOLR1 y FOLR1 en la superficie celular. Un ensayo de ejemplo para detectar la unión de un anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1 expresado en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".
- 45

- Pueden usarse otros procedimientos para detectar la unión de anticuerpos anti-FOLR1 a FOLR1. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión al antígeno que son bien conocidos en la técnica, tales como inmunotransferencias, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos e inmunohistoquímica (IHC).
- 50

- Los anticuerpos anti-FOLR1 pueden ser marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y marcadores radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, p. ej., a través de una reacción enzimática o interacción molecular.
- 55

Los anticuerpos anti-FOLR1 pueden inmovilizarse sobre una matriz insoluble. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-FOLR1 de cualquier FOLR1 que quede libre en solución. Esto se lleva a cabo convencionalmente ya sea insolubilizando el anticuerpo anti-FOLR1 antes del procedimiento de ensayo, como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., patente de EE.UU. n.º 3.720.760) o por acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o insolubilizando el anticuerpo anti-FOLR1 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-FOLR1 y FOLR1, p. ej., mediante inmunoprecipitación.

Cualquiera de las realizaciones anteriores de diagnóstico o detección puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo anti-FOLR1.

En ciertas realizaciones, la enfermedad tratada con el agente o antagonista de unión a FOLR1 (por ejemplo, un anticuerpo huMov19 o inmunoconjugado) es un cáncer. En ciertas realizaciones, el cáncer se caracteriza por tumores que expresan el receptor 1 de folato al que se une el agente de unión a FOLR1 (por ejemplo, anticuerpo).

La presente invención proporciona Inmunoconjugados para su uso en procedimientos de tratamiento de cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FOLR1 a un sujeto (p. ej., un sujeto que necesita tratamiento). En ciertas realizaciones, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervical, cáncer de vejiga, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello. En ciertas realizaciones, el cáncer es cáncer de ovario. En ciertas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

La presente invención proporciona además inmunoconjugados para uso en procedimientos para inhibir el crecimiento de tumores usando los anticuerpos u otros agentes descritos en el presente documento. El procedimiento para inhibir el crecimiento del tumor puede comprender poner en contacto la célula con un agente de unión a FOLR1 (p. ej., anticuerpo) *in vitro*. Por ejemplo, una línea celular inmortalizada o una línea celular de cáncer que expresa FOLR1 se cultiva en medio al cual se añade el anticuerpo u otro agente para inhibir el crecimiento del tumor. Las células tumorales se pueden aislar de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre y se cultivan en un medio al que se añade un agente de unión a FOLR1 para inhibir el crecimiento del tumor.

El procedimiento para inhibir el crecimiento del tumor puede comprender poner en contacto el tumor o las células tumorales con el agente de unión a FOLR1 (p. ej., el anticuerpo) *in vivo*. El contacto de un tumor o célula tumoral con un agente de unión a FOLR1 se puede realizar en un modelo animal. Por ejemplo, se pueden administrar agentes de unión a FOLR1 a xenoinjertos que expresan uno o más FOLR1 que se han desarrollado en ratones inmunocomprometidos (p. ej., ratones NOD/SCID) para inhibir el crecimiento del tumor. Las células madre de cáncer se pueden aislar de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre y se inyectan en ratones inmunocomprometidos que se administran a continuación a un agente de unión a FOLR1 para inhibir el crecimiento de células tumorales. El agente de unión a FOLR1 se puede administrar al mismo tiempo o poco después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para impedir el crecimiento del tumor. El agente de unión a FOLR1 se puede administrar como un agente terapéutico después de que las células tumorigénicas se hayan desarrollado hasta un tamaño especificado.

En ciertas realizaciones, el procedimiento para inhibir el crecimiento del tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FOLR1. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un tumor o ha tenido un tumor que se ha eliminado.

El tumor puede expresar el receptor de folato al que se unen el agente de unión a FOLR1 o el anticuerpo. El tumor puede sobreexpresar el FOLR1 humano.

En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste en tumor cerebral, tumor colorrectal, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervical, tumor de vejiga, glioblastoma y tumor de cabeza y cuello. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor de ovario.

Además, la invención describe un procedimiento para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FOLR1 al sujeto. El tumor puede comprender células madre de cáncer. La frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor puede reducirse mediante la administración del agente.

Así, en ciertas realizaciones la invención proporciona inmunoconjugados para uso en procedimientos de tratamiento de cáncer usando anticuerpo huMov19. El inmunoconjugado huMov19 puede ser huMov19-SPDB-DM4; huMov19-sulfo-SPP-DM1; huMov19-SPP-DM1; o de huMov19-PEG4-Mal-DM4.

La invención describe además procedimientos de diferenciación de células tumorigénicas en células no tumorigénicas que comprenden poner en contacto las células tumorigénicas con un agente de unión a FOLR1 (por ejemplo, administrando el agente de unión a FOLR1 a un sujeto que tiene un tumor que comprende las células

tumorigénicas o que ha tenido un tumor de este tipo eliminado. Las células tumorigénicas pueden ser células tumorales ováricas.

5 La presente invención proporciona además procedimientos para reducir la activación de miofibroblastos en el estroma de un tumor sólido, que comprende poner en contacto el estroma con una cantidad eficaz del agente de unión a FOLR1, polipéptido o anticuerpo.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los agentes de unión a FOLR1 descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento del tumor y en el tratamiento del cáncer en pacientes humanos.

10 En ciertas realizaciones, las formulaciones se preparan para su almacenamiento y uso combinando un anticuerpo o agente purificado de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, portador, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20^a Edición, Mack Publishing, 2000). Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones no tóxicos tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (p. ej., cloruro de octadecildimetilbencil-amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (p. ej., menor que aproximadamente restos de 10 aminoácidos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; hidratos de carbono tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como AEDT; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tal como sodio; complejos metálicos (p. ej. complejos de proteína-Zn); y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en cualquier número de maneras para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como a las membranas mucosas que incluyen la administración vaginal y rectal) tales como parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos; pulmonar (p. ej., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico y transdérmico); oral; o parenteral que incluyen inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal (p. ej., intratecal o intraventricular).

30 Un inmunoconjugado de la invención puede combinarse en una formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tenga propiedades anticancerosas. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación tiene preferiblemente actividades complementarias al ADC de la combinación de manera que no se afecten negativamente entre sí. También se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión a FOLR-1 y el segundo agente anticanceroso.

35 Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un inmunoconjugado de la presente invención depende del tipo de enfermedad a tratar, de la gravedad y del curso de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, si el anticuerpo o agente se administra con fines terapéuticos o preventivos, terapia previa, historia clínica del paciente, etc., todo ello a discreción del médico tratante. El anticuerpo o agente se puede administrar una vez o a lo largo de una serie de tratamientos que duran desde varios días hasta varios meses, o hasta que se consigue una curación o se consigue una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Los horarios de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de las mediciones de la acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo o agente individual. El médico que lo administra puede determinar fácilmente dosis óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. En ciertas realizaciones, la dosificación es de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo u otro agente de unión a FOLR1 se administra una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En ciertas realizaciones, la dosificación del anticuerpo u otro agente de unión a FOLR1 es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación basándose en los tiempos de residencia medidos y en las concentraciones del fármaco en los fluidos corporales o tejidos.

40 La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar ser "sinérgica", es decir, el efecto conseguido cuando los ingredientes activos usados conjuntamente es mayor que la suma de los efectos que resulta del uso de los compuestos por separado. Se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos son: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación combinada de dosificaciones unitarias; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; O (3) por algún otro régimen. Cuando se administra en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministrados secuencialmente, p. ej., por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, se administra una dosificación eficaz de cada ingrediente

activo secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, las dosificaciones efectivas de dos o más ingredientes activos se administran conjuntamente.

VI. Kits que comprenden agentes de unión a FOLR1

5 La presente invención describe kits que comprenden los anticuerpos, inmunoconjugados u otros agentes descritos en el presente documento y que pueden usarse para realizar los procedimientos descritos en el presente documento. Un kit comprende al menos un anticuerpo purificado contra el receptor 1 de folato humano en uno o más recipientes. Los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluidos todos los controles, direcciones para realizar ensayos y cualquier software necesario para el análisis y presentación de resultados. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los anticuerpos, 10 inmunoconjugados u otros agentes descritos de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

También se describen kits que comprenden un agente de unión a FOLR1 (p. ej., un anticuerpo que se une a FOLR1), así como un segundo agente anticanceroso. El segundo agente anticanceroso puede ser un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina o irinotecán).

15 Las realizaciones de la presente descripción se pueden definir adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que describen en detalle la preparación de ciertos anticuerpos de la presente descripción y procedimientos para usar anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden practicar muchas modificaciones, tanto a materiales como a procedimientos, sin salirse del ámbito de la presente descripción.

20 **Ejemplos**

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son sólo con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Quimerización del anticuerpo Mov19 monoclonal murino

25 Las secuencias de aminoácidos de región variable para Mov19 se obtuvieron a partir de la base de datos NCBI (los n.º de acceso CAA68253 para la cadena ligera (SEQ ID NO: 24) y CAA68252 para la cadena pesada (SEQ ID NO: 23)) y luego se optimizaron codones y se sintetizaron mediante Blue Heron Biotechnology. La región variable de cadena ligera se clonó en los sitios EcoRI y BsiWI del plásmido pAbKZeo y la región variable de la cadena pesada se clonó en los sitios HindIII y Apa1 del plásmido pAbG1Neo.

Ejemplo 2

30 Humanización de los anticuerpos Mov19 y FR1-21 monoclonales murinos

El anticuerpo Mov19 se humanizó siguiendo procedimientos de resurgimiento del marco previamente descritos (Roguska M. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU., febrero de 1994, 91: 969-973 y Roguska et al., Protein Eng.9(10): 895-904 (1996)). En resumen, se calculó la accesibilidad media del disolvente para cada resto del marco de la región variable usando estructuras de anticuerpos resueltas estrechamente relacionadas a partir de la base de datos PDB, y las posiciones con una accesibilidad media superior al 30% se marcaron como restos superficiales (Pedersen J. T. et al., J. Mol. Biol. 1994; 235: 959-973). La secuencia de reemplazo de la superficie humana se seleccionó alineando las posiciones superficiales de las secuencias de anticuerpos murinos con las posiciones correspondientes de las secuencias de la línea germinal del anticuerpo humano en la base de datos Kabat (Johnson, G. y Wu, T. T. (2001) Nucleic Acids Research, 29: 205-206). La superficie de la región variable de la cadena ligera humana más homóloga (clon DPK19, IMGT locus IGKV2D-30*01 para Mov19 e IMGT locus IGKV1/OR2-0*01 para FR1-21) y la superficie de la región variable de la cadena pesada humana más homóloga (clon 8M27, IMGT locus IGHV1-69*08 para Mov19 e IMGT locus IGHV5-51*02 para FR1-21) se seleccionó para reemplazar las posiciones de la superficie del marco Mov19 murino, dejando las 6 CDR (Tabla 1) sin alteración. Las 35 posiciones y restos de las superficies de Mov19 y FR1-21 murinos y humanos se dan en las Figuras 1A-D.

CDR de Mov19	CDR de FR1-21
Cadena Ligera	Cadena Ligera
CDR1: KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7)	CDR1: KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27)
CDR2: RASNLEA (SEQ ID NO: 8)	CDR2: GATSLET (SEQ ID NO: 28)

CDR de Mov19	CDR de FR1-21
CDR3: QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9)	CDR3: QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29)
Cadena Pesada	Cadena Pesada
CDR1: GYFMN (SEQ ID NO: 1)	CDR1: SSYGMS (SEQ ID NO: 30)
CDR2 (AbM): RIHPYDGDTF (SEQ ID NO: 131)	CDR2 (AbM): TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31)
CDR3: YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3)	CDR3: DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32)
CDR2 de Cadena Pesada de Mov19 definido por Kabat	CDR2 de Cadena Pesada de FR1-21 definido por Kabat
Murino	Murino
CDR2 de Cadena Pesada: RIHPYDGDTFY <u>NQNFKD</u> (SEQ ID NO: 128)	CDR2 de Cadena Pesada: TISSGGSYTY <u>PDGVKG</u> (SEQ ID NO: 33)
Humano	Humano
CDR2 de Cadena Pesada: RIHPYDGDTFY <u>NQKFQG</u> (SEQ ID NO: 129)	CDR2 de Cadena Pesada: TISSGGSYTY <u>SPGFQG</u> (SEQ ID NO: 34)
Tabla 1A: Se proporcionan las CDR de las cadenas ligera y pesada de Mov19 y FR1-21 definidas para resurgimiento. También se da la definición de Kabat para la CDR2 de cadena pesada para los anticuerpos murino y humano.	

Ninguno de los cambios en los restos planteó preocupaciones por el impacto sobre las interacciones de las CDR de Mov19 o FR1-21 con sus epítomos diana sobre el receptor 1 de folato, por lo que no se consideraron mutaciones reversivas de la superficie para las secuencias humanizadas de cualquiera de los anticuerpos. Sin embargo, la secuencia Mov19 resurgida presentó un sitio de glicosilación de consenso enlazado a N en la cadena ligera N74 (versión 1.00 de cadena ligera), de modo que se preparó una segunda versión de cadena ligera humanizada para eliminar este sitio. Una revisión de la base de datos de secuencias de la cadena ligera humana de Kabat reveló que la treonina es el resto más común encontrado en la posición 74 de la cadena ligera de modo que la versión 1.60 de la cadena ligera Mov19 humanizada se construyó con una treonina en la posición 74. La posición 74 no es un resto superficial, por eso esta sustitución de restos no tiene ningún impacto en la humanización por resurgimiento. Los alineamientos de las secuencias de regiones variables de Mov19 y de FR1-21 murinos y humanizados se dan en la Figura 2.

Las secuencias de regiones variables para Mov19 y FR1-21 humanizados fueron optimizadas por codón y sintetizadas por Blue Heron Biotechnology. Las secuencias están flanqueadas por sitios de enzimas de restricción para facilitar la clonación en marco con las respectivas secuencias constantes en plásmidos de expresión de mamíferos de cadena sencilla. La región variable de la cadena ligera se clonó en los sitios EcoRI y BsiWI del plásmido pAbKZeo. Los ADN plasmídicos resultantes que codifican la cadena ligera huMov19 se depositaron en la ATCC como Depósito ATCC n.º PTA-10773 y PTA-10774 y el ADN plasmídico resultante que codifica la cadena ligera huFR1-21 se depositó como Depósito ATCC n.º PTA-10776. La región variable de la cadena pesada se clonó en los sitios HindIII y Apa1 del plásmido pAbG1Neo. El ADN plasmídico resultante que codifica la cadena pesada huMov19 se depositó en la ATCC como Depósito ATCC n.º PTA-10772 y el ADN plasmídico resultante que codifica la cadena pesada huFR1-21 se depositó como Depósito ATCC n.º PTA-10775. Estos plásmidos, se transfectaron después como se describe en el ejemplo 3 para producir huMov19. El plásmido que codifica la cadena ligera huMov19 (es decir, que se depositó como Depósito ATCC n.º PTA-10773 o PTA-10774) se puede emparejar con el plásmido que codifica la cadena pesada huMov19 para crear un anticuerpo huMov19 según los procedimientos proporcionados en el presente documento y como son bien conocidos por el experto corriente en la técnica.

Ejemplo 3

Expresión de anticuerpos recombinantes

Los constructos de anticuerpos quiméricos y humanizados se produjeron transitoriamente en cualquiera de las

células HEK-293T adherentes usando un procedimiento de fosfato cálcico estándar (BD Biosciences, Kit de Transfección de Mamíferos CalPhos, Cat # 631312) o en células HEK-293T adaptadas a suspensión usando un procedimiento PEI modificado [Durocher Y, Perret S, Kamen A High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 15 enero 2002; 30(2):E9] en matraces giratorios. Las transfecciones transitorias de PEI se realizaron como se describió anteriormente (Durocher, Y. et al., *Nucleic Acids Res.* 30 (2): E9 (2002)), excepto que las células HEK-293T se cultivaron en Freestyle 293 (Invitrogen) y el volumen de cultivo se dejó sin diluir después de la adición de los complejos PEI-ADN. Tanto en las transfecciones transitorias adherentes y en suspensión se incubaron durante una semana y después el sobrenadante aclarado se purificó mediante una columna de Proteína A seguida de una cromatografía de intercambio iónico de columna CM como se describe a continuación. Como se muestra en la Figura 3, la expresión de huMov19 era al menos 10 veces mayor que la expresión de Mov19 quimérico en las células transfectadas.

Ejemplo 4

Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular aclarados usando procedimientos estándar, tales como, por ejemplo, cromatografía de Proteína A o G (HiTrap Proteína A o G HP, 1 ml, Amersham Biosciences). En resumen, el sobrenadante se preparó para cromatografía mediante la adición de 1/10 volumen de tampón Tris/HCl 1 M, pH 8,0. El sobrenadante ajustado al pH se filtró a través de una membrana de filtro de 0,22 µm y se cargó en una columna equilibrada con tampón de unión (PBS, pH 7,3). La columna se lavó con tampón de unión hasta que se obtuvo una línea base estable sin absorbancia a 280 nm. El anticuerpo se eluyó con tampón de ácido acético 0,1 M que contenía NaCl 0,15 M, pH 2,8, usando un caudal de 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,25 ml y se neutralizaron mediante la adición de 1/10 de volumen de Tris/HCl 1M, pH 8,0. La fracción o fracciones máximas se dializaron durante la noche dos veces contra 1x PBS y se esterilizaron filtrando a través de una membrana de filtro de 0,2 µm. El anticuerpo purificado se cuantificó por absorbancia a A₂₈₀.

Las fracciones purificadas de proteína A se purificaron adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico (IEX) con cromatografía de carboximetilo (CM). En resumen, a las muestras de la purificación en proteína A se les cambió el tampón por tampón de partida (fosfato de potasio 10 mM, cloruro de sodio 10 mM, pH 7,5) y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. La muestra preparada se cargó a continuación sobre una resina de flujo rápido CM (GE lifesciences) que se equilibró con el tampón de partida a una velocidad de flujo de 120 cm/h. El tamaño de la columna se eligió para tener capacidad suficiente para unir todo el anticuerpo en la muestra. La columna se lavó entonces con tampón de unión hasta que se obtuvo una línea base estable sin absorbancia a 280 nm. El anticuerpo se eluyó iniciando un gradiente de 10 mM a 500 mM de cloruro de sodio en 20 volúmenes de columna (CV). Se recogieron las fracciones con la lectura UV por encima de 50 mAu del pico principal. Se evaluó la pureza (el porcentaje de monómero y agregados solubles de alto peso molecular) con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) sobre un gel TSK G3000SWXL, 7,8 x 300 mm con una columna de protección SWXL, 6,0 x 40 mm (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) utilizando un sistema Agilent HPLC 1100 (Agilent, Santa Clara, CA). Las fracciones con la pureza deseada (>95%) se agruparon, se les cambió el tampón a PBS (pH 7,4) usando un sistema TFF, y se esterilizaron por filtración a través de una membrana de filtro de 0,2 µm. El anticuerpo purificado se ensayó adicionalmente para su pureza por SEC y se determinó la concentración de IgG mediante medición de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1,47. Si era necesario se hacía la dilución. Como alternativa, se puede usar hidroxiapatita cerámica (CHT) para refinar tanto anticuerpos murinos como humanizados con una selectividad mejorada. Se aplicó resina CHT de tipo II con un tamaño de partícula de 40 µm (Bio-Rad Laboratories) al refinado de anticuerpos con un protocolo similar al de la cromatografía IEX. El tampón de partida para CHT era fosfato sódico 20 mM, pH 7,0 y el anticuerpo se eluyó con un gradiente de fosfato sódico 20-160 mM sobre 20 CV.

Ejemplo 5

Desarrollo de anticuerpos anti-FOLR1 murinos

Hubo dos diferentes series de inmunización/cribado. La primera serie ha conducido a la generación del clon FR1-21, la segunda serie ha dado como resultado la generación de clones FR1-48, FR1-49, FR1-57 y FR1-65. En la primera serie, los ratones se inmunizaron subcutáneamente con aproximadamente 5x10⁶ células KB que expresan FOLR1 (American Tissue Culture Collection, ATCC CCL-17). En la segunda serie se usaron células 300-19 que expresaban FOLR1 humano en su superficie para inmunizar los ratones. Para obtener estas células, la secuencia de aminoácidos FOLR1 humana se obtuvo a partir del sitio web del NCBI (acceso NP_057937), luego se optimizó por codón y se sintetizó por Blue Heron Biotechnologies, se flanqueó por sitios de restricción EcoRI y Xba1 para facilitar la clonación en el vector de expresión pSRa de mamífero. Las células 300-19, una línea de células pre-B derivada de un ratón Balb/c (Reth et al., *Nature*, 317:353-355 (1985)) se transfectaron con el plásmido de expresión pSRa-FolR1 para expresar de forma estable niveles altos de FOLR1 humano en la superficie celular. Para ambas series se aplicaron protocolos de inmunización estándar conocidos por los expertos, por ejemplo, tales como los usados en ImmunoGen, Inc. Los ratones inmunizados fueron reforzados con antígeno tres días antes de ser sacrificados para la generación de hibridomas. Los bazos de los ratones se recogieron según protocolos animales estándar, tales

como, por ejemplo, tejido de trituración entre dos portaobjetos de microscopio esterilizados, esmerilados para obtener una suspensión de células individuales en medio RPMI-1640. Las células del bazo se centrifugaron, se sedimentaron, se lavaron y se fusionaron con un mieloma murino, tal como, por ejemplo, células P3X63Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol., 123: 1548-1550 (1979)) usando polietilenglicol-1500 (Roche 783 641). Las células fusionadas se resuspendieron en medio de selección RPMI-1640 que contenía hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma H-0262) y se seleccionaron para el cultivo en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Corning-Costar 3596, 0,2 ml de suspensión celular Por pocillo) a 37 °C con CO₂ al 5%. Después de 5 días de incubación, se retiraron 0,1 ml de sobrenadante de cultivo de cada pocillo y se reemplazaron con 0,1 ml de medio RPMI-1640 que contenía suplemento de hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). La incubación a 37 °C con CO₂ 5% se continuó hasta que los clones de hidridoma estaban listos para el cribado de anticuerpos. También pueden usarse otras técnicas de inmunización y producción de hibridomas, incluidas las descritas en Langone et al. (Eds., "Immunochemical Techniques, Part I", Methods in Enzymology, Academic Press, volumen 121, Florida) y Harlow et al. ("Antibodies: A Laboratory Manual"; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1988)).

Tabla 1B: Se proporcionan las CDR de las cadenas ligera y pesada FR1-48, 49, 57 y 65. La definición de Kabat para la CDR2 de cadena pesada se da también para ambos anticuerpos murino y humano.

CDR FR1-48	CDR FR1-49	CDR FR1-57	CDR FR1-65
Cadena Ligera	Cadena Ligera	Cadena Ligera	Cadena Ligera
CDR1 - RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57)	CDR1 - RASENIYTNLA (SEQ ID NO: 63)	CDR1 - RASQNNNNLH (SEQ ID NO: 69)	CDR1 - KASQNVGPNVA (SEQ ID NO: 75)
CDR2 - AATNLAD (SEQ ID NO: 58)	CDR2 - TASNLA (SEQ ID NO: 64)	CDR2 - YVSQSVS (SEQ ID NO: 70)	CDR2 - SASYRYS (SEQ ID NO: 76)
CDR3 - QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59)	CDR3 - QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65)	CDR3 - QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71)	CDR3 - QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 77)
Cadena Pesada	Cadena Pesada	Cadena Pesada	Cadena Pesada
CDR1 - TNYWMQ (SEQ ID NO: 60)	CDR1 - TNYWMY (SEQ ID NO: 66)	CDR1 - SSFGMH (SEQ ID NO: 72)	CDR1 - TSYTMH (SEQ ID NO: 78)
CDR2 - AIYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61)	CDR2 - AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67)	CDR2 - YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73)	CDR2 - YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79)
CDR3 - RDGNAAAY (SEQ ID NO: 62)	CDR3 - RHDYGAMDY (SEQ ID NO: 68)	CDR3 - EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74)	CDR3 - GGAYGRKPM DY (SEQ ID NO: 80)
CDR2 de Cadena Pesada de Kabat	CDR2 de Cadena Pesada de Kabat	CDR2 de Cadena Pesada de Kabat	CDR2 de Cadena Pesada de Kabat
Murino AIYPGNGDSRYTQKFKG (SEQ ID NO: 81)	Murino AIYPGNSDTTYNLKFKG (SEQ ID NO: 83)	Murino YISSGSSTISYADTVKG (SEQ ID NO: 85)	Murino YINPISGYTNYNQKFKD (SEQ ID NO: 87)
Humano AIYPGNGDSRYTQKFQG (SEQ ID NO: 82)	Humano AIYPGNSDTTYNQKFQG (SEQ ID NO: 84)	Humano YISSGSSTISYADSVKG (SEQ ID NO: 86)	Humano YINPISGYTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 88)

Ejemplo 6

Cribado y selección de hibridomas

Se usaron células FOLR1-300-19 transfectadas con células FOLR1 y KB humanas en la primera y segunda series de cribados de manera correspondiente. Los sobrenadantes del cultivo del hibridoma se cribaron por citometría de flujo para la secreción de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen a células FOLR1 positivas, tales como células 300-19 que expresan FOLR1 o células KB, pero no a las células FOLR1 negativas, como las células 300-19

no transfectadas. Se incubaron 0,1 ml de los sobrenadantes de hibridoma durante 3 h, con células FOLR1 positivas o con las células 300-19 no transfectadas (1×10^5 células por muestra) en 0,1 ml de tampón FACS (medio RPMI-1640 complementado con suero de cabra normal al 2%). A continuación, las células se centrifugaron, se sedimentaron, se lavaron y se incubaron durante 1 hora con 0,1 ml de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con PE (como el que puede obtenerse a partir de, por ejemplo Jackson Laboratory, 6 $\mu\text{g/ml}$ en tampón FACS). Las células se centrifugaron, se sedimentaron de nuevo, se lavaron con tampón FACS y se resuspendieron en 0,2 ml de PBS que contenía formaldehído al 1%. La fluorescencia asociada a las células se midió usando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador de pocillos múltiples HTS o un citómetro de flujo de matriz FACS y se analizó usando CellQuest Pro (todos ellos de BD Biosciences, San Diego, EE.UU.). Los clones de hibridoma positivo se subclonaron mediante dilución limitante. Para un análisis posterior se eligió un subclon de cada hibridoma, que mostró la misma reactividad frente a FOLR1 que las células parentales por citometría de flujo. Se cultivaron subclones estables y se identificó el isotipo de cada anticuerpo anti-FOLR1 secretado usando reactivos de isotipos comerciales (Roche 1493027). Los anticuerpos murinos fueron la proteína A purificada a partir de medios de hibridoma aclarados como se ha descrito anteriormente. Estos anticuerpos se designaron anticuerpos FR-1.

15 Ejemplo 7

Purificación de anticuerpos monoclonales murinos

Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de subclones de hibridoma usando procedimientos estándar, tales como, por ejemplo, cromatografía de Proteína A o G (HiTrap Proteína A o G HP, 1 ml, Amersham Biosciences). En resumen, se preparó el sobrenadante para cromatografía mediante la adición de 1/10 volumen de tampón Tris/HCl 1 M, pH 8,0. El sobrenadante ajustado al pH se filtró a través de una membrana de filtro de 0,22 μm y se cargó en una columna equilibrada con tampón de unión (PBS, pH 7,3). La columna se lavó con tampón de unión hasta que se obtuvo una línea base estable sin absorbancia a 280 nm. El anticuerpo se eluyó con tampón de ácido acético 0,1 M que contenía NaCl 0,15 M, pH 2,8, usando un caudal de 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,25 ml y se neutralizaron mediante la adición de 1/10 de volumen de Tris/HCl 1M, pH 8,0. La fracción o fracciones máximas se dializaron durante la noche dos veces contra 1x PBS y se esterilizaron filtrando a través de una membrana de filtro de 0,2 μm . El anticuerpo purificado se cuantificó por absorbancia a A_{280} .

Ejemplo 8

Caracterización de unión por citometría de flujo

La especificidad de unión se ensayó mediante citometría de flujo usando anticuerpos purificados. Los histogramas FACS que demuestran la unión de anti-FOLR1 a células 300-19 que expresan FOLR1 y la ausencia de unión a las células 300-19 parentales se muestran en la Figura 4. Cada anticuerpo se incubó durante 3 horas, con células 300-19 que expresan FOLR1 o las células 300-19 no transfectadas (1×10^5 células por muestra) en 0,1 ml de tampón FACS (medio RPMI-1640 complementado con suero de cabra normal al 2%). A continuación, las células se sedimentaron, se lavaron y se incubaron durante 1 hora con 0,1 ml de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con FITC (como el que se puede obtener de, por ejemplo Jackson Laboratory, 6 $\mu\text{g/ml}$ en tampón FACS). Las células se sedimentaron de nuevo, se lavaron con tampón FACS y se resuspendieron en 200 μl de PBS que contenía formaldehído al 1%. Las muestras se adquirieron usando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador de múltiples pozos HTS o un citómetro de flujo de matriz FACS y se analizaron usando CellQuest Pro (todos ellos de BD Biosciences, San Diego, EE.UU.). Los histogramas FACS de anticuerpos anti-FOLR1 mostraron un cambio de fluorescencia, mientras que las células 300-19 parentales no lo hicieron. Tampoco se detectó ningún cambio de fluorescencia significativo cuando cualquiera de las líneas celulares se incubaba solo con anticuerpo IgG anti-humano de cabra conjugado con FITC.

Ejemplo 9

Clonación y secuenciación de las regiones VL y VH de muFR1-21

El ARN celular total se preparó a partir de 5×10^6 células de hibridoma usando un kit RNeasy (QIAGEN) según el protocolo del fabricante. El ADNc se sintetizó posteriormente a partir del ARN total utilizando el kit de síntesis de ADNc SuperScript II (Invitrogen). El procedimiento para la primera ronda de la reacción de la PCR degenerada en el ADNc derivado de células de hibridoma se basó en procedimientos descritos en Wang et al. ((2000) J Immunol Methods, Jan 13, 233 (1-2): 167-77) y Co et al. ((1992) J Immunol, 15 de febrero, 148 (4): 1149-54). Las secuencias de VH se amplificaron mediante la PCR utilizando los siguientes cebadores degenerados: EcoMH1 CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID NO: 50) y EcoMH2 CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID NO: 51) y BamIlgG1 GGAGGATCCATAGACAGATGGGGTGTCTGTTTGGC (SEQ ID NO: 52). Las secuencias de VL se amplificaron por PCR usando los siguientes cebadores degenerados: SacIMK GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID NO: 53) y HindKL TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO: 54) (las bases mixtas se definen como sigue: N = G + A + T + C, S = G + C, Y = C + T, M = A + C, R = A + G, W = A + T).

Las mezclas de reacción de PCR se hicieron pasar después sobre un gel de agarosa de baja temperatura de fusión

al 1%, se cortaron las bandas de 300 a 400 pb, se purificaron usando minicolumnas de ADN de Zymo y se enviaron a Agencourt Biosciences para secuenciación. Los respectivos cebadores de PCR 5' y 3' se usaron como cebadores de secuenciación para generar los ADNc de región variable de ambas direcciones. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL se obtuvieron traduciendo los resultados de la secuenciación del ADN con el software VectorNTI.

Para identificar los artefactos de secuenciación de cebadores en el extremo 5' en las secuencias preliminares de ADNc de región variable, el sitio IgBlast del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) se utilizó para buscar las secuencias de líneas germinales murinas de las que se derivaron las secuencias de anticuerpos. Las secuencias de regiones variables limpias se combinaron entonces con las secuencias de referencia del NCBI para las regiones constantes de anticuerpo específico para ensamblar con las secuencias de anticuerpos de murino de longitud completa esperadas. El peso molecular de las cadenas ligeras y pesadas Fr1-21 murinas esperadas se calculó entonces y se comparó con la masa medida por análisis de cromatografía líquida/espectrofotometría de masas (LC/MS). La cadena pesada FR1-21 de murino coincidió con la masa medida, pero la cadena ligera requirió un esfuerzo de secuenciación de seguimiento para determinar la secuencia en el extremo 5'. Se diseñó el cebador de la PCR CD37-1LClead1 (tttgaattcgccaccatgaagtctctcaactct) para hibridar con la secuencia líder ligada a la línea germinal del anticuerpo murino de manera que esta nueva reacción de la PCR produzca una secuencia de ADNc de región variable completa, inalterada por los cebadores. Las reacciones de PCR, purificaciones de banda y secuenciación se realizaron como se ha descrito anteriormente y la nueva secuencia completa codificó una cadena ligera que se ajustaba a la masa de la cadena ligera Fr1-21 medida por LC/MS.

Ejemplo 10

Expresión de anticuerpos de referencia

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo Morphotech anti-FOLR1, MorAb-003 (Farletuzumab), se obtuvo de la lista de Nombres comunes internacionales para sustancias farmacéuticas (INN) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y fue optimizada por codones y sintetizada por Blue Heron Biotechnology. La secuencia de la región variable de la cadena ligera está flanqueada por los sitios de la enzima de restricción EcoRI y BsiWI y la secuencia de la región variable de la cadena pesada flanqueada por los sitios de las enzimas de restricción HindIII y Apa1 para la clonación en marco con las respectivas secuencias constantes en plásmidos de expresión de mamíferos de cadena sencilla. La clonación, expresión y purificación se llevó a cabo como se describe para el Mov19 humanizado y el Fr1-21 anteriores.

Ejemplo 11

Actividad de ADCC de huMov19

Se utilizó un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) para medir la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de líneas de células tumorales utilizando células asesinas naturales (NK) humanas recién aisladas como células efectoras (p. ej., Shields, J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604 (2001)). Las células NK se aislaron primero de sangre humana de un donante normal (Research Blood Components, Inc., Brighton, MA) usando un protocolo modificado para el kit II de aislamiento NK (Miltenyi Biotech, 130-091-152). La sangre se diluyó 2 veces con 1x PBS. Sobre 25 ml de Ficoll Paque en un tubo cónico de 50 ml se colocaron cuidadosamente 25 ml de sangre diluida y se centrifugaron a 400 g durante 45 minutos a T_a . Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogieron de la interfaz, se transfirieron a un nuevo tubo cónico de 50 ml y se lavaron una vez con 1x PBS. Las PBMC se resuspendieron en 2 ml de tampón de aislamiento de NK (1 x PBS, BSA al 0,5%, AEDT 2 mM) y luego se añadieron 500 μ l de cóctel de Biotina-Anticuerpo a la suspensión celular. El cóctel de Biotina-Anticuerpo contiene anticuerpos biotinilados que se unen a los linfocitos, excepto para las células NK, lo que da como resultado una selección negativa de las células NK. La mezcla se incubó a 4°C durante 10 minutos, y luego se añadieron 1,5 ml de tampón de aislamiento NK y 1 ml de microbolas anti-biotina. La mezcla de anticuerpos celulares se incubó durante otros 15 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavaron una vez con 50 ml de tampón de aislamiento de NK y se resuspendieron en 3 ml de tampón de aislamiento de NK. A continuación, se montó una columna MACS LS en el separador autoMACS (Miltenyi Biotech) y se lavó previamente con 3 ml de tampón de aislamiento de NK. La suspensión celular se aplicó automáticamente sobre la columna, se lavó y la fracción efluente con células NK no marcadas se recogió en un nuevo tubo cónico de 50 ml. Las células NK resultantes se sembraron en 30 ml de medio RPMI completo (RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 5%, penicilina estreptomocina al 1%, HEPES 1 mM, piruvato de sodio 1 mM, solución de aminoácido no esencial 100X MEM al 1%) durante la noche. El ensayo posterior y todas las diluciones se llevaron a cabo en medio RHBP (medio RPMI 1640 complementado con HEPES 20 mM, pH 7,4, BSA al 0,1% y estreptomocina penicilina al 1%). Se dividieron alícuotas de varias concentraciones de anticuerpos en medio RHBP por duplicado a 50 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células diana se resuspendieron a 10^6 células/ml en medio RHBP y se añadieron a 100 μ l/pocillo a cada pocillo que contenía diluciones de anticuerpo. La placa que contenía células diana y diluciones de anticuerpo se incubó durante 30 minutos a 37°C. Entonces se añadieron células NK a los pocillos que contenían las células diana a 50 μ l/pocillo. La relación típica era de aproximadamente 1 célula diana por 3-4 células NK. Se establecieron al menos los siguientes controles para cada experimento: células NK solas, células diana solas (liberación espontánea de LDH), células diana con células NK (liberación de LDH independiente de

anticuerpos), células diana con TritonX-100 al 10% (liberación máxima de LDH). Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 4 horas para permitir la lisis celular. Las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 1.200 rpm y se transfirieron cuidadosamente 100 µl del sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano. Mezcla de reacción de LDH (100 µl/pocillo) del kit de Detección de Citotoxicidad (Roche 1 644 793) se añadió a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 30 minutos. La densidad óptica de las muestras se midió a 490 nm (OD₄₉₀). El porcentaje de lisis específica de cada muestra se determinó usando la siguiente fórmula: Porcentaje de lisis específica = [(valor de la muestra-liberación espontánea)/(liberación máxima-liberación espontánea)] * 100.

La incubación con huMov19 condujo a una buena actividad de ADCC frente a células IGROV-1 en presencia de células efectoras NK humanas. La actividad ADCC en las células IGROV-1 se comparó con huMov19, huFR-1-21, Mor003, y chTK1 (control de isotipo) (Figura 6]. El tratamiento con 0,9 ng/ml de huMov19 dio como resultado aproximadamente 30% de lisis de células IGROV-1, similar a la actividad que se observó con los otros anticuerpos anti-FOLR1. La actividad de ADCC por huMov19 tenía una EC₅₀ de 0,20 ng/ml, huFR-1-21 tenía una EC₅₀ de 0,11 ng/ml, Mor003 de 0,16 ng/ml y chTK1 no mostró ninguna actividad frente a las células IGROV-1.

Ejemplo 12

15 Preparación de inmunoconjugados anti-FOLR1

Preparación de huMOV19v1.6-sulfo-SPDB-DM4

El conector 2-sulfo-SPDB ejemplar se disolvió en DMA. El anticuerpo huMOV19v1.6 se incubó a 8 mg/ml con un exceso molar de 12 veces el conector 2-sulfo-SPDB durante aproximadamente 2 horas a 25 °C a pH 7,5. La mezcla de reacción se purificó usando una columna G25F SEPHADEX® equilibrada con tampón de fosfato de potasio 50 mM que contenía NaCl 50 mM, AEDT 2 mM, pH 6,5. El DM4 maitansinoide se disolvió en dimetilacetamida (DMA, la concentración final es 5%) y un exceso molar de 1,7 veces en comparación con el conector se añadió gota a gota al anticuerpo modificado con sulfo-SPDB. La mezcla de reacción se ajustó a pH 7,5 con tampón HEPES 1 mM. Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, el anticuerpo conjugado se purificó por cromatografía sobre G25F SEPHADEX® equilibrada con histidina 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 1%, pH 5,5. El número de moléculas DM4 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó utilizando los coeficientes de extinción informados anteriormente para anticuerpo y maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de las especies de maitansinoides libres totales se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM4 por anticuerpo huMov19v1.6 con <1% presente como maitansinoide no conjugado.

30 Preparación de huMOV19v1.6-SPP-DM1

El conector 4-(2-piridilditio)-pentanoato de N-succinimidilo (SPP) de ejemplo se disolvió en etanol. El anticuerpo huMOV19v1.6 se incubó a 8 mg/ml con un exceso molar de 6,5 a 6 veces del conector SPP durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente en tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM, AEDT 2 mM, y etanol al 5%. El anticuerpo modificado con SPP se diluyó 2 veces en PBS, pH 6,5 y se modificó con un exceso molar de 1,5 veces del DM1 maitansinoide mediante la adición de una solución concentrada (15-30 mM) de DM1 en dimetilacetamida (DMA). La concentración de DMA se ajustó al 5% y después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, el anticuerpo conjugado se purificó por cromatografía sobre G25F SEPHADEX® equilibrada con histidina 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 1%, pH 5,5. El número de moléculas de DM1 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y DM1 (Liu et al., Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU., 93, 8618-8623 (1996)). El porcentaje de maitansinoide libre presente después de la reacción de conjugación se determinó inyectando 20-50 µg de conjugado sobre una columna HiSep™ equilibrada en acetonitrilo al 25% en tampón de acetato de amonio 100 mM, pH 7,0, y eluyendo en acetonitrilo. El área máxima de la especie de maitansinoides libre total (eluida en el gradiente e identificada por comparación del tiempo de elución con patrones conocidos) se midió usando un detector de absorbancia ajustado a una longitud de onda de 252 nm y comparado con el área del máximo relacionado con maitansinoide ligado (eluido en el máximo de conjugado en las fracciones no retenidas por la columna) para calcular el porcentaje de especies de maitansinoides libres totales. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM1 por huMOV19v1,6 con <1% presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.6 SPDB-DM4

El conector 4-(2-piridiltio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) de ejemplo se disolvió en etanol. El anticuerpo huMOV19v1.6 se incubó a 8 mg/ml con un exceso molar de 5,5-5 veces del conector SPDB durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente en tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM, AEDT 2 mM y etanol al 3%. El anticuerpo modificado con SPDB se diluyó 2 veces en PBS, pH 6,5 y se modificó con un exceso molar de 1,5 veces del DM4 maitansinoide mediante la adición de una solución concentrada (15-30 mM) de DM4 en dimetilacetamida (DMA). Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, el anticuerpo conjugado se purificó por cromatografía sobre G25F SEPHADEX® equilibrada con histidina 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 1%, pH 5,5. El número de moléculas de DM4 unidas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y maitansinoide (Widdison,

WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de las especies de maitansinoides libres totales se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM4 por anticuerpo huMOV19v1.6 con <1% presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.0-3-sulfo-mal-DM4

- 5 El conector NHS-3-sulfo-mal y DM4 se disolvieron por separado en DMA. El conector tiol DM4 se mezclaron juntos en una solución de DMA que contenía 40% de tampón de succinato 200 mM, AEDT 2 mM, pH 5,0 para dar una relación molar de DM4 a un conector de 1,6:1 y una concentración final de DM4 igual a 10 mM. La mezcla se hizo reaccionar durante 2 horas a 25 °C. Sin purificación, la mezcla de reacción se añadió de manera que un equivalente de exceso molar de 9,6 de conector frente a anticuerpo se añadió a una solución de anticuerpo huMOV19v1.0 en tampón de fosfato (pH 7,5) bajo condiciones de conjugación final de anticuerpo de 4 mg/ml, 90% de tampón de fosfato/10% de DMA, pH 7,5 (v/v). Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de conjugación se purificó por cromatografía sobre G25 SEPHADEX equilibrada en PBS pH 7,5. El huMOV19v1.0-3-sulfo-mal-DM4 se dializó a continuación en un tampón que contenía fosfato 9,55 mM, NaCl 139,6 mM, pH 6,5. El número de moléculas de DM4 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de la especie maitansinoide libre total se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM4 por anticuerpo huMOV19v1.0 con <1% presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.0-SMCC-DM1

- 20 El conector NHS-sulfo-SMCC y DM1 se disolvieron por separado en DMA. El conector y el tiol DM1 se mezclaron juntos en una solución de DMA que contenía 40% de tampón de succinato 200 mM, AEDT 2 mM, pH 5,0 para dar una relación molar de DM1 frente a conector de 1,2:1 y una concentración final de DM1 igual a 3,75 mM. La mezcla se hizo reaccionar durante 75 minutos a 20°C. Sin purificación, se añadió la mezcla de reacción de manera que se añadió un equivalente de 6,4 de exceso molar de conector frente a anticuerpo a una solución de anticuerpo huMOV19v1.0 en tampón de fosfato (pH 7,5) bajo condiciones de conjugación final de 4 mg/ml de anticuerpo, 88% de fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM, AEDT 2 mM, pH 7,5/12% de DMA, pH 7,5 (v/v). Después de 2 horas de incubación a 20°C, la mezcla de conjugación se purificó por cromatografía sobre G25 SEPHADEX equilibrada en PBS pH 7,5. El huMOV19v1.0-SMCC-DM1 se dializó luego en un tampón que contenía Glicina 250 mM, Histidina 10 mM pH 5,5. El número de moléculas de DM1 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de la especie maitansinoide libre total se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM1 por anticuerpo huMOV19v1.0 con <2,8% presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.0-PEG4-mal-DM1

- 35 El reactivo de 1 etapa NHS-PEG4-mal-DM1 se disolvió en DMA. El anticuerpo huMov19v1.0 se incubó a 5 mg/ml con un exceso molar de 5,7 veces de NHS-PEG4-mal-DM1 durante la noche a 25°C en KPi 50 mM, NaCl 50 mM, AEDT 2 mM, pH 7,5 y DMA al 10% en volumen. La mezcla de reacción se purificó mediante columna G25 SEPHADEX equilibrada en PBS pH 7,5. El huMOV19v1.0-PEG4-mal-DM1 se dializó en tampón que contenía Glicina 250 mM, Histidina 10 mM pH 5,5. El número de moléculas de DM1 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de la especie maitansinoide libre total se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM1 por anticuerpo huMOV19v1.0 con <1,1% presente como maitansinoide no conjugado.

Ejemplo 13

- 45 Afinidad de unión de anticuerpos y conjugados

Las afinidades de unión de anticuerpos anti-FOLR1 y de sus conjugados SPDB-DM4, PEG4Mal-DM4, SMCC-DM1, o anti-FOLR1-sulfo-SPDB-DM4 se ensayaron mediante Citometría de Flujo. Las células SKOV3 que expresan FOLR1 se incubaron con concentraciones variables de anticuerpos anti-FOLR1 o sus conjugados y se procesaron como se describió anteriormente para análisis de citometría de flujo. El análisis de los datos se realizó utilizando CellQuest Pro (BD Biosciences, San Diego, EE.UU.) y para cada muestra se exportó la intensidad media de fluorescencia para FL1 (MFI) y se representó gráficamente frente a la concentración de anticuerpos en un gráfico semi-logarítmico. Se generó una curva de dosis-respuesta mediante regresión no lineal y se calculó el valor para la constante de disociación de equilibrio aparente (K_d) de las muestras de ensayo para la unión a células SKOV3 utilizando GraphPad Prism v4 (software GraphPad, San Diego, CA) y se presentan en la Figura 5. Los resultados demuestran que la conjugación a DM1 o DM4 a través de cualquiera de los conectores utilizados, no alteraba notablemente la afinidad de cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, huMov19).

Ejemplo 14

Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La capacidad de los conjugados muFR1-9, muFR1-13, muFR1-22, muFR1-23, huFR1-23, muFR1-21 y huFR1-21 de ejemplo para inhibir el crecimiento celular se midió usando ensayos de citotoxicidad *in vitro* mediante el procedimiento descrito en Kovtun YV et al. (Cancer Res. 66: 3214-3221 (2006)). Se añadió un conjugado de PEG4-mal-DM4 en diversas concentraciones a células KB que expresan FOLR1 en una placa de 96 pocillos a 1.000 células por pocillo en 100 μ l en medio RPMI completo (RPMI-1640, suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, gentamicina al 1%, todos los reactivos de Invitrogen). Los anticuerpos y conjugados se diluyeron en medio RPMI completo usando series de dilución de 3 veces y se añadieron 100 μ l por pocillo. La concentración final oscilaba típicamente entre 3×10^{-8} M y $4,6 \times 10^{-12}$ M. Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control que contenían células y el medio pero que carecían de los conjugados, y pocillos que contenían solo medio. Las placas se incubaron de cuatro a seis días a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. Se añadió entonces un reactivo WST-8, 10% v/v (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD, EE.UU.) a los pocillos y las placas se incubaron a 37°C durante 2-6 h. WST-8 se reduce por deshidrogenasas en células viables a un producto de formazán de color naranja (máximo) que es soluble en medio de cultivo de tejidos. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables. Las placas se analizaron midiendo la absorbancia a 450 nm (A_{450}) y a 650 nm (A_{650}) en un lector de placas de múltiples pocillos. En primer lugar, el fondo de la opalescencia de las células (A_{650}) se restó de A_{650} . El A_{450} resultante se utilizó entonces para determinar la fracción de células sobrevivientes. La absorbancia A_{450} era la de los pocillos con solamente medio y WST-8. La fracción sobreviviente se calculó como sigue: Porcentaje de viabilidad = $100 \times (\text{muestra } A_{450} \text{ de la muestra tratada} - A_{450} \text{ de fondo}) / (A_{450} \text{ de la muestra no tratada} - A_{450} \text{ de fondo})$. Los valores de la fracción superviviente se representaron frente a la concentración de anticuerpo o conjugado en un gráfico semi-logarítmico para cada tratamiento. A partir de estos datos, a continuación se determinaron los valores de IC₅₀ utilizando GraphPad Prism v4 (software GraphPad, San Diego, CA) y se presentan en la Figura 5. Los resultados mostrados en la Figura 5 demuestran que todos los conjugados son igualmente activos en su potencia citotóxica frente a células KB que expresan FOLR1. Para verificar adicionalmente la especificidad de los conjugados anti-FOLR1-maitansinoides frente a FOLR1, se evaluaron sus actividades en presencia de un exceso de anticuerpos no conjugados frente a células KB. La adición de un exceso de anticuerpo no conjugado competitivo a los conjugados suprimió su citotoxicidad, como se observa en la Figura 7. Estos datos indican que los conjugados matan células KB de una manera dependiente de antígeno. Datos adicionales demostraron que el huMov19-SPDB-DM4 inducía la detención del ciclo celular en la fase G2/M en células KB en ensayos *in vitro*.

Ejemplo 15

Eficacia *in vivo* de los conjugados huMov19-PEG4Mal-DM4 y huMov19-SPDB-DM4 en comparación con conjugados similares no dirigidos al objetivo en un modelo de xenoinjerto de KB

El conjugado huMov19-SPDB-DM4 escindible dirigido a FOLR1 en comparación con huC242-SPDB-DM4 y el conjugado no escindible huMov19-PEG4-Mal-DM4 en comparación con el huC242-PEG4Mal-DM4 no dirigido se ensayaron utilizando un modelo establecido de xenoinjerto de células KB implantadas subcutáneamente en ratones SCID. Los ratones se asignaron al azar por peso corporal a grupos de tratamiento y se trataron individualmente (conjugados de SPDB) al día 3 después de la inoculación de células, o semanalmente tres veces en los días 3, 10 y 17 después de la inoculación de las células con 5 y 10 mg/kg de conjugado, respectivamente. El volumen tumoral medio de los diferentes grupos de tratamiento se representa en la Figura 8. Los tratamientos con huMov19-SPDB-DM4 o huMov19-PEG4Mal-DM4 dieron como resultado una disminución del volumen tumoral medio en comparación con el control de PBS, mientras que los tratamientos con cualquiera de los respectivos conjugados no dirigidos no produjeron ningún efecto significativo.

Ejemplo 16

Eficacia *in vivo* de conjugados anti-FOLR1-PEG4Mal-DM4 en un modelo de xenoinjerto de KB

Los conjugados de PEG4Mal-DM4 de los anticuerpos anti-FOLR1 de ejemplo huMov19, muFR-1-9, muFR-1-13, muFR-1-22, muFR-1-23 y huFR-1-21 se ensayaron usando un modelo de xenoinjerto establecido de células KB implantadas subcutáneamente en ratones SCID. Los ratones se asignaron al azar por peso corporal a grupos de tratamiento y se trataron una vez el día 3 después de la inoculación de células con 10 mg/kg de uno de los conjugados enumerados anteriormente o sólo con PBS. Se mostró anteriormente que HuMov19-PEG4Mal-DM4 era similar a los conjugados PEG4Mal-DM4 de muFR-1-9, muFR-1-13, muFR-1-22, muFR-1-23 y huFR-1-21 en su potencia citotóxica *in vitro*. HuMov19-PEG4Mal-DM4 y huFR-1-21-PEG4Mal-DM4 eran significativamente más potentes *in vivo* que cualquiera de los otros conjugados, dando como resultado una disminución más pronunciada en el volumen tumoral medio (Figuras 9 y 10). También se demostró que la potencia era dependiente de la dosis (Figura 11) y la elección del conector también desempeñó su papel (Figuras 12 y 13).

Ejemplo 17

Eficacia *in vivo* de conjugados anti-FOLR1-sulfo-SPDB-DM4 en un modelo de xenoinjerto

Los conjugados huMov19-sulfo-SPDB-DM4 anti-FOLR1 se ensayaron en tres xenoinjertos de adenocarcinoma

seroso ovárico: OVCAR-3, IGROV-1 y OV-90. Cada uno de estos tumores de xenoinjerto mostró niveles de expresión de FOLR1 comparables a los tumores de pacientes cuando se medían usando un procedimiento de tinción inmunohistoquímico calibrado (IHC) en secciones fijadas en parafina fijadas con formalina. Los ratones que presentaban tumores de xenoinjerto subcutáneo establecidos (aproximadamente 100 mm³) se trataron con una sola inyección intravenosa de conjugado huMov19-sulfo-SPDB-DM4 a 1,2, 2,5 y 5,0 mg/kg (basado en la concentración de anticuerpos). Las Figuras 14-16 muestran la concentración del conjugado de maitansinoide en µg/kg). El conjugado fue activo en los tres modelos evaluados. En los xenoinjertos OVCAR-3, la dosis mínimamente eficaz (MED) fue de 1,2 mg/kg (Figura 14). Los niveles de dosis más altos fueron altamente activos, dando como resultado regresiones completas (RC) en ratones 4/6 y 2/6 en los grupos de tratamiento de 2,5 y 5,0 mg/kg, respectivamente. El tratamiento con el conjugado dio como resultado una fuerte actividad antitumoral tanto en el modelo de xenoinjerto IGROV-1 como en el OV-90, con un MED de 2,5 mg/kg, una sola inyección (Figuras 15 y 16). Estos datos demuestran la fuerte actividad antitumoral de conjugados huMov19-sulfo-SPDB-DM4 contra tumores de xenoinjerto de ovario con niveles de expresión de FOLR1 comparables a tumores de pacientes.

Ejemplo 18

Efecto de los conectores sobre la eficacia del inmunoconjugado

El anticuerpo huMov19 anti-FOLR1 se unió a DM1 o DM4 a través de los conectores escindibles que contienen disulfuro SPP, SPDB o sulfo-SPDB, o a través del conector SMCC no escindible. Se examinaron las actividades citotóxicas *in vitro* de estos conjugados en las líneas de células KB, IGROV-1 y JEG-3. El análisis FACS indicó que las células KB (cervicales) tenían >2.000.000 sitios de unión a anticuerpo por célula. Las células IGROV-1 (ovárica) tenían 260.000 sitios de unión a anticuerpo por célula, y las células JEG-3 (coriocarcinoma) tenían 40.000 sitios de unión a anticuerpo por célula. Los resultados de la citotoxicidad *in vitro* se resumen en la Tabla 2 a continuación. Los conjugados escindibles mostraron marcadamente mayores actividades *in vitro* comparadas con las del conjugado SMCC.

Tabla 2: Efecto de los conectores de inmunoconjugados sobre la citotoxicidad *in vitro*.

	IC ₅₀ , nM (n=3), basado en Ab			
Células	SPP-DM1	SPDB-DM4	Sulfo-SPDM-DM4	SMCC-DM1
KB	0,1	0,1	0,1	0,1
Igrov 1	0,1	0,1	0,3	1,0
Jeg3	0,2	0,2	3,0	20

También se ensayaron las actividades *in vivo* de los conjugados en modelos de tumores FOLR-1 positivos, KB y OVCAR-3. Los resultados mostrados en la Figura 17 demuestran que los conjugados SPDB-DM4 y sulfo-SPDB-DM4 escindibles son más evidentes que los conjugados SMCC-DM1 no escindibles *in vivo*. Además, entre los conjugados escindibles, el conjugado SPP-DM1 era menos activo que los conjugados SPDB-DM4 o sulfo-SPDB-DM4 en ambos modelos de xenoinjerto (Figura 18). Los dos últimos conjugados eran igualmente activos contra los tumores KB, mientras que el conjugado sulfo-SPDB-DM4 era más activo contra el modelo OVCAR-3. Los datos obtenidos usando el modelo OVCAR-3 se resumen en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Efecto de los conectores inmunoconjugados sobre el tamaño del tumor en el modelo de xenoinjerto OVCAR-3.

Conjugado	Tumor frente a control (%)	Respuesta Parcial	Respuesta Completa	Respuesta
SPP-DM1	54	0/6	0/6	Inactivo
SPDB-DM4	9	6/6	1/6	Muy activo
Sulfo-SPDB-DM4	0	6/6	4/6	Muy activo

Estos datos demuestran que los inmunoconjugados que contienen un conector escindible muestran una mayor eficacia tanto *in vitro* como *in vivo*, y los inmunoconjugados anti-FOLR1 que contienen sulfo-SPDB son muy activos

en modelos tumorales.

Ejemplo 19

Eficacia *in vitro* e *in vivo* del conjugado SMCC-DM1 del anticuerpo huFR1

- 5 HuFR1-48, huFR1-49, huFR1-57 y huFR1-65 anti-FOLR1 se conjugaron con un conector SMCC y DM1 y se analizaron como se ha descrito anteriormente los efectos sobre células KB, e *in vivo* utilizando los modelos de xenoinjerto anteriormente descritos. Aunque cada uno de los anticuerpos mostró una eficacia similar en el modelo de células KB, los inmunocojugados huFR1-48, huFR1-49, huFR1-57 y huFR1-65 mostraron una eficacia *in vivo* variable, pero significativa, a una dosis de 200 µg/kg en un sistema de modelo de xenoinjerto (Tabla 4 y Figura 19).

Tabla 4: Eficacia *in vitro* e *in vivo* del conjugado SMCC-DM1 del anticuerpo huFR1

Clon	Afinidad aparente (nM)	Actividad de huAb-smcc-DM1 sobre KB <i>in vitro</i> (nM)	Actividad de huAb-smcc-DM1 <i>in vivo</i>
huFR1-48	0,13	0,05	+
huFR1-49	0,08	0,10	+
huFR1-57	0,14	0,10	+
huFR1-65	0,15	0,10	+
huMov19	0,06	0,10	++

10

LISTA DE SECUENCIAS

& Lt; 110 & gt; Immunogen, Inc.

<120> Anticuerpos e inmunoconjugados del receptor 1 de folato y sus usos

<130> S68328PCEP

5 <140> EP 11748067.3

<141> 2011-02-24

<150> US 61/413.172

<151> 2010-11-12

<150> US 61/346.595

10 <151> 2010-05-20

<150> US 61/307.797

<151> 2010-02-24

<160> 130

<170> patenteln versión 3.5

15 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

& Lt; 220 & gt;

20 <223> huMov19 vHC CDR1

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vHC CDR2

<400> 2

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

30 Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

ES 2 617 283 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> huMov19 vHC CDR3
 <400> 3
 Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
 5 1 5
 <210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> huMov19 vHC
 <400> 4
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 5
 15 <211> 440
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> huMov19 vHC
 20 <400> 5

ES 2 617 283 T3

aagcttgcca ccatgggttg gtcattgcatc atcctcttct tggttgcaac tgctaccgga 60
gtgcacagtc aggtacagct cgtgcagtcc ggcgccgagg tggatgaagcc tggatgccagc 120
gtgaagatct cctgtaaagc cagtggatac acattcaccg gttattttat gaattgggtg 180
aaacagagcc caggccaatc cctcgaatgg atagggcgaa tccaccata tgacggggac 240

accttttaca accagaaatt ccaggggaaa gccactctga cagtggacia gaggccaac 300
actgcacaca tggagcttct ctccctgacc agcgaagact tcgctgttta ttactgtacc 360
cgttatgatg gttcccgtgc aatggactac tggggccaag ggaccactgt caccgtaagt 420
tccgccagca ccaagggccc 440

<210> 6

5 <211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 HC

10 <400> 6

ES 2 617 283 T3

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

ES 2 617 283 T3

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 7

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 617 283 T3

<223> huMov19 vLC CDR1

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
 1 5 10 15

<210> 8

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vLC CDR2

10 <400> 8

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
 1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vLC CDR3

<400> 9

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

20 <210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> huMov19 vLCv1.00

<400> 10

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

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

ES 2 617 283 T3

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

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

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

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

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vLCv1.60

<400> 11

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

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

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

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

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

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

10 <210> 12

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> huMov19 LCv1.00

<400> 12

ES 2 617 283 T3

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 14

<211> 408

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico huMov19 LCV1.00

<400> 14

ES 2 617 283 T3

gaattcgcca ccatgggctg gagctgcatt atcctttttc tggtagccac agctacaggc 60
 gtgcatagcg atatcgtgct gacacaatcc cccctctctc tggccgtgtc actcggacag 120
 cccgctatca tcagctgcaa agccagccag tctgtcagct togctggaac aagtcttatg 180
 cattggtatc atcagaagcc tggccagcaa cccaggctgc tgatctatcg agcctcaaac 240
 ttggaagcag gagtgccaga ccggttttct gggccggga gtaaaaccga ttttacactt 300
 aatatctcac ctgtcgaggc cgaggacgcc gccacctact actgtcagca gagccgagag 360
 tacccttaca cttttggcgg tgggactaaa ctggaaataa aacgtacg 408

<210> 15

<211> 408

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 LCv1.60

<400> 15

gaattcgcca ccatgggctg gtcttgtatc atcctgtttc tggtagccac cgcaaccggt 60
 gttcactcgg acattgtgct gacacagtcc cccctttcac tggctgtatc cctcggccag 120
 cccgctatca tcagctgcaa ggctagccag agcgtgagtt ttgccggcac ttcacttatg 180
 cattggtacc atcagaaacc aggccagcaa cctaggctgc tgatttatcg ggctagcaac 240
 ctggaggccg gcgtgcccga ccgctttagc gggagcggct ccaagactga cttcactctg 300
 accatctccc ccgtagaagc agaagatgct gcaacctact actgtcagca gtctcggcag 360
 tatecttata cattcggagg cggaactaaa ctggagatta aacgtacg 408

10 <210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> muMov19 vHC CDR2

<400> 16

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 17

<211> 117

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 617 283 T3

<223> muMov19 vHC_CAA68252

<400> 17

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser
115

5 <210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> muMov19 vLC_CAA68253

<400> 18

ES 2 617 283 T3

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

Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

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

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

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

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

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105

<210> 19

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> chMov19 HC

<400> 19

10

ES 2 617 283 T3

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

ES 2 617 283 T3

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> chMov19 LC

<400> 20

ES 2 617 283 T3

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

Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 21

<211> 441

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico de cadena pesada (HC) chMov19

<400> 21

ES 2 617 283 T3

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr
 20 25 30

Cys Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Cys Ala
 35 40 45

Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Thr Cys Cys
 50 55 60

Ala Thr Thr Cys Ala Cys Ala Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ala Cys Thr
 65 70 75 80

Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys
 85 90 95

Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Thr Thr Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly
 100 105 110

Gly Ala Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala Thr
 115 120 125

Cys Thr Cys Ala Thr Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala
 130 135 140

Gly Gly Ala Thr Ala Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Cys Thr Gly
 145 150 155 160

Gly Cys Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly
 165 170 175

Gly Gly Thr Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys Ala Cys
 180 185 190

Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Thr
 195 200 205

Gly Gly Ala Thr Cys Gly Gly Ala Cys Gly Thr Ala Thr Thr Cys Ala
 210 215 220

ES 2 617 283 T3

Cys Cys Cys Cys Thr Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Ala Thr
225 230 235 240

Ala Cys Thr Thr Thr Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala
245 250 255

Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys
260 265 270

Thr Ala Cys Ala Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Thr Gly Ala Cys
275 280 285

Ala Ala Ala Thr Cys Ala Thr Cys Thr Ala Ala Cys Ala Cys Cys Gly
290 295 300

Cys Thr Cys Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Cys Thr
305 310 315 320

Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Ala
325 330 335

Gly Ala Cys Thr Thr Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Thr Ala Thr Thr
340 345 350

Ala Cys Thr Gly Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Cys Gly Ala
355 360 365

Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly
370 375 380

Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly
385 390 395 400

Gly Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala Gly Thr
405 410 415

Cys Thr Cys Ala Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr
420 425 430

Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala
435 440

<210> 22

<211> 408

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico de cadena ligera (LC) chMov19

<400> 22

ES 2 617 283 T3

gaattcgcca ccatgggttg gtcttgtatt atcctctttc tgcgcgcaac cgcaacaggg 60
 gtccattcag atatcgaact cacacaatca ccagcttccc tcgcagtctc tctcgggtcaa 120
 cgcgcaatca tctcttgtaa agcctcccaa tcagtctcat tcgccggcac gtcctcatg 180
 cattgggtacc atcaaaaacc cggtcagcaa cccaaactcc ttatctatag agcaagcaac 240
 ctggaagcag gcgttccac cagatttagc ggatcaggaa gtaaaaccga tttcacactc 300
 aacattcatc cagtogaaga agaagatgca gctacttatt attgccaaca gtctagagaa 360
 tatccatata cattcggagg gggtagcaaa ctgaaatta aacgtacg 408

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muMov19 vHC_CAA68252

<400> 23

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser
 115

10 <210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> muMov19 vLC_CAA68253

<400> 24

ES 2 617 283 T3

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

Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

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

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

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

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

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105

<210> 25

<211> 257

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Receptor 1 de folato humano

<400> 25

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

10

ES 2 617 283 T3

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
 195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255

Ser

<210> 26

<211> 771

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico del receptor 1 de folato humano

<400> 26

atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctcttctag tgtgggtggc tgtagtaggg 60

gaggctcaga caaggattgc atgggccagg actgagcttc tcaatgtctg catgaacgcc 120

aagcaccaca aggaaaagcc aggccccgag gacaagttgc atgagcagtg tgcaccctgg 180

aggaagaatg cctgctgttc taccaacacc agccaggaag cccataagga tgtttcctac 240

ctatatagat tcaactggaa ccaactgtga gagatggcac ctgcctgcaa acggcatttc 300

atccaggaca cctgccteta cgagtgtcc cccaacttgg ggccctggat ccagcaggtg 360

10

ES 2 617 283 T3

gatcagagct ggcgcaaaga gcgggtactg aacgtgcccc tgtgcaaaga ggactgtgag 420
 caatggtggg aagattgtcg cacctcctac acctgcaaga gcaactggca caagggctgg 480
 aactggactt cagggtttaa caagtgcgca gtgggagctg cctgccaacc tttccatttc 540
 tacttccccca caccactgt tctgtgcaat gaaatctgga ctactccta caaggtcagc 600
 aactacagcc gagggagtgg ccgctgcatc cagatgtggt togaccacgc ccagggcaac 660
 cccaatgagg aggtggcgag gttctatgct gcagccatga gtggggctgg gccctgggca 720
 gcctggcctt tcctgcttag cctggcccta atgctgctgt ggctgctcag c 771

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-21 vLC CDR1

<400> 27

Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp Leu Ala
 1 5 10

10 <210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> FR1-21 vLC CDR2

<400> 28

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr
 1 5

<210> 29

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-21 vLC CDR3

<400> 29

25 **Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Phe Thr**
 1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> FR1-21 vHC CDR1
 <400> 30
Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5

5 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <223> FR1-21 vHC CDR2
 <400> 31
Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr
 1 5 10

<210> 32
 <211> 11

15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> FR1-21 vHC CDR3
 <400> 32
Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
 20 1 5 10

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> CDR-H2 de murino Kabat FR1-21
 <400> 33
Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Gly Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 34

30 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 617 283 T3

<223> FR1-21 Kabat CDR-H2 humano

<400> 34

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Pro Gly Phe Gln
1 5 10 15

Gly

5 <210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> muFR1-21 vLC

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 36

<211> 120

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-21 vHC

<400> 36

ES 2 617 283 T3

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

<210> 37

<211> 323

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de muFR1-21 vLC

<400> 37

gacatccaga tgacacaatc ttcacacctac ttgtctgtat ctctaggagg cagagtcacc 60
 attacttgca aggcaagtga ccacataaat aattgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 ggaaatgctc ctaggctctt aatatctggt gcaaccagtt tggaaactgg ggttccttca 180
 agattcagtg gcagtgatc tggaaaggat tacactctca gcatttccag tcttcagact 240
 gaagatggtg ctacttatta ctgtcaacag tattggagta ctccattcac gttcggctcg 300
 10 gggacaaagt tggaaataaa acg 323

<210> 38

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> muFR1-21HcvarPat

<400> 38

ES 2 617 283 T3

gaagtgaagc tggaggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaaga ggttggagtg tgtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta cacctactat 180
ccagacggtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagggacggc 300
gagggggggc tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-21 LC

<400> 39

ES 2 617 283 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 40

<211> 456

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-21 HC

<400> 40

ES 2 617 283 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Cys Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Gly Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu
 165 170 175
 Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser
 210 215 220

ES 2 617 283 T3

Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile
245 250 255

Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
275 280 285

Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
325 330 335

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val
340 345 350

Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser
355 360 365

Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly
370 375 380

Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe
420 425 430

Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys
435 440 445

Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 41

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21 vLC

<400> 41

ES 2 617 283 T3

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 42

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21 vHC

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Pro Gly Phe
 50 55 60

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

10 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

ES 2 617 283 T3

85

90

95

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43

<211> 446

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21VH_co

<400> 43

aagcttgcca ccatgggatg gtcatgcatc attctttttc togtcgccac tgccacaggt 60
 gtgcattccg aggtgcaact tgtagaatct ggcgggggatg ttgtgaagcc tggaggtagt 120
 ctcaagtgt cctgtgctgc atctgggttt accttctctt cctacggaat gagctgggtg 180
 agacagactc ctggcaaggg gctggagtgc gttgccacca ttagtagtgg aggttcttac 240
 acctactatt cacctgggtt tcagggacgc ttacaatct cccgcgataa gtctaagaac 300
 acccttacc tccagatgag tagccttaag gctgaggaca cagccatgta ttattgcgct 360
 cgcgatgggg agggagggtt ttacgctatg gactactggg gccagggtac cagcgtgacc 420
 gtttcctctg ctagtaccaa gggccc 446

10 <210> 44

<211> 396

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> huFR21VL_co

<400> 44

gaattcgcca ccatgggatg gtcatgtatc attctgttct tggtagcaac agcaactggc 60
 gtccattctg acatocagat gacccaatcc tccagcagct tgtcagtatc cgttgggggc 120
 cgcgttacta ttacctgtaa ggcctccgac catataaata actggcttgc atggtatcaa 180
 cagaagcctg ggaaggcacc taaactgctt atctctgggg ccacaagcct ggagaccggc 240
 gtgccttcca ggttctctgg aagtggatct ggcaaggact ataccttgag cattagtagc 300
 cttcaacctg aggacgtcgc cacctactat tgtcagcagt attggtctac acccttacc 360
 tttggacagg gcactaaatt ggagataaaa cgtacg 396

<210> 45

<211> 214

ES 2 617 283 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21 LC

5 <400> 45

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 46

<211> 449

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

ES 2 617 283 T3

<220>

<223> huFR1-21 HC

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Pro Gly Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

ES 2 617 283 T3

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 47

<211> 642

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21LC

<400> 47

ES 2 617 283 T3

gacatccaga tgaccaatc ctccagcagc ttgtcagtat ccggttggggg ccgcgttact 60
 attacctgta aggccctccga ccatataaat aactggcttg catggtatca acagaagcct 120
 ggggaaggcac ctaaactgct tatctctggg gccacaagcc tggagaccgg cgtgccttcc 180
 aggttctctg gaagtggatc tggcaaggac tataccttga gcattagtag ccttcaacct 240
 gaggacgtcg ccacctacta ttgtcagcag tattggtcta caccctttac ctttggacag 300
 ggcactaaaat tggagataaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 48

<211> 1347

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21HC

<400> 48

gagggtgcaac ttgtagaatc tggcggggat gttgtgaagc ctggaggtag tctcaagttg 60
 tcctgtgctg catctgggtt taccttctct tcctacggaa tgagctgggt gagacagact 120
 cctggcaagg ggctggagtg cgttgccacc attagtagtg gaggttctta cacctactat 180
 tcacctgggtt ttcagggacg ctttacaatc tcccgcgata agtctaagaa caccctttac 240
 ctccagatga gtagccttaa ggctgaggac acagccatgt attattgcgc tcgcgatggg 300
 gagggagggc tttacgctat ggactactgg ggccagggta ccagcgtgac cgtttcctct 360
 gctagtacca agggcccac agttttcccc ttggtccaa gttctaaatc cacaagcgg 420
 ggaacagctg cactgggatg cctcgttaa gattatttcc ctgagcctgt gacagtgagc 480
 tggaatagcg gagcattgac ttcaggtgtg cacacttttc ccgctgtgtt gcagtctcc 540
 ggtctgtact cactgtccag tgtcgtaac gtcccttcta gcagcttggg aaccagacc 600
 tacatctgta acgtcaacca taaacatcc aacacaaagg tggataagaa ggttgaacca 660
 aagagctgtg ataagacaca tacatgccct ccttgtcctg caccagagct cctcggaggt 720
 ccatctgtgt tcctgtttcc ccccaaacc aaggacactc ttatgatctc tcgtactcca 780
 gaggtcacct gtgttgttgt cgacgtgagc catgaagatc ccgaggttaa attcaactgg 840
 tacgtggatg gagtcgaggt tcacaatgcc aagaccaagc ccagggagga gcaatataat 900
 tctacatatac gggtagttag cgttctgacc gtgctccacc aagattggct caatggaaaa 960

ES 2 617 283 T3

gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggct ctccccgtc ccattgagaa aactatctcc 1020
 aaagccaagg ggcagccacg ggaaccccag gtgtatacat tgccccatc tagagacgag 1080
 ctgaccaaga accaggtgag tctcacttgt ctggccaagg ggttttaccc ttctgacatt 1140
 gctgtagagt gggagtctaa cggacagcca gaaaacaact acaagacaac tccccagtg 1200
 ctggacagcg acgggagctt cttcctctac tccaagttga ctgtagacaa gtctagatgg 1260
 cagcaaggaa acgttttctc ctgctcagta atgcatgagg ctctgcacaa tcaactatacc 1320
 cagaaatcac tgtcccttag cccaggg 1347

<210> 49

<211> 792

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de EcoRI a XbaI de ADN del huFoIR1

<400> 49

gaattcgcca ccatggcaca ggcgatgacc actcagctcc tgcttctgtt ggtttgggtg 60
 gcagtcgtgg gagaggccca gaccaggatt gcttgggcac gcacagagct gcttaatggt 120
 tgcatgaacg caaagcacca taaagagaaa cccggccccg aggataagtt gcacgaacag 180
 tgccgccctt ggagaaagaa tgcatgctgt agcacgaaca cctctcagga ggcgcataaa 240
 gacgtaagct atttgtatag atttaactgg aaccattgcg gtgaaatggc acctgcctgt 300
 aaacggcact ttatocagga tacttgcttg tacgagtgta gcccgaaatc cgggccctgg 360
 attcagcaag ttgatcagag ttggcgcaaa gagaggggtgc tgaacgttcc gctttgcaag 420
 gaggactgcg agcaatgggt ggaagactgt agaaccagct acacctgtaa gtctaactgg 480
 cacaaaggat ggaactggac atccgggttt acaaatgcg ctgtcggcgc tgcctgccag 540
 ccatttcatt tctactttcc aactcccact gtccctgtgta acgagatttg gacgcattca 600
 tataaagtca gcaactacag ccggggctcc ggccgctgca ttcagatgtg gttcgaccct 660
 gcacagggca accctaacga ggaggtcgca cgcttctacg ctgcagcaat gtctggagcc 720
 ggtccttggg ctgcttggcc atttctcctt agcctcgccc tcatgcttct ctggctgttg 780
 tcataatcta ga 792

10 <210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador EcoMH1

<400> 50

ES 2 617 283 T3

Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys Ser Ala Arg Gly

1 5 10 15

Thr Asn Met Ala Gly Cys Thr Gly Ser Ala Gly Ser Ala Gly Thr Cys
20 25 30

<210> 51

<211> 35

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador EcoMH2

<400> 51

Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys Ser Ala Arg Gly
1 5 10 15

Thr Asn Met Ala Gly Cys Thr Gly Ser Ala Gly Ser Ala Gly Thr Cys
20 25 30

10 Trp Gly Gly
35

<210> 52

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Cebador BamIlg1

<400> 52

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Thr Ala Gly Ala Cys Ala
1 5 10 15

Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Thr Gly Thr Cys Gly Thr Thr Thr
20 25 30

Thr Gly Gly Cys
35

<210> 53

20 <211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SacIMK

25 <400> 53

ES 2 617 283 T3

Gly Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Met Thr Ser Ala Cys Met Cys Ala Arg Trp Cys Thr Met Cys Ala
 20 25 30

<210> 54

5 <211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HindKL

10 <400> 54

Thr Ala Thr Ala Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly
 20 25 30

Gly Ala Thr Ala Cys Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Gly Cys
 35 40 45

<210> 55

<211> 39

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cd37-1Lclead

<400> 55

tttgaattc gccaccatga agtttccttc tcaactct 39

20 <210> 56

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Compuesto CDR2 vHC Mov19 humano y quimérico

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (14)..(14)

<223> Xaa1 = Q, H, K, o R

30 <220>

- <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa2 = R, Q, H, o N
 <220>
- 5 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa3 = E, T, S, G, A, o V
 <220>
 <221> características diversas
- 10 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (21).. (21)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 56
 Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Ala Ala
 1 5 10 15
 Phe Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala
 20
 <210> 57
 <211> 11
- 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR1-48vL CDR1
 <400> 57
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10
- 25 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> FR1-48vL CDR2
 <400> 58
 Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 1 5

<210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> FR1-48vL CDR3
 <400> 59
Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 60
 10 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR1-48vH CDR1
 15 <400> 60
Thr Asn Tyr Trp Met Gln
 1 5
 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR1-48vH CDR2
 <400> 61
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg
 1 5 10
 25 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> FR1-48vH CDR3
 <400> 62
Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr
 1 5
 <210> 63
 <211> 11
 35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR1-49vL CDR1
 <400> 63
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn Leu Ala
 5 1 5 10
 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> FR1-49vL CDR2
 <400> 64
Thr Ala Ser Asn Leu Ala Asp
 1 5
 <210> 65
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR1-49vL CDR3
 20 <400> 65
Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 66
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR1-49vH CDR1
 <400> 66
Thr Asn Tyr Trp Met Tyr
 1 5
 30 <210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> FR1-49vH CDR2

<400> 67

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr
1 5 10

<210> 68

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-49vH CDR3

10 <400> 68

Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vL CDR1

<400> 69

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn Leu His
1 5 10

20 <210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> FR1-57vL CDR2

<400> 70

Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser
1 5

<210> 71

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vL CDR3

<400> 71

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His Tyr Thr
 1 5 10

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vH CDR1

<400> 72

Ser Ser Phe Gly Met His
 1 5

10 <210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> FR1-57vH CDR2

<400> 73

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser
 1 5 10

<210> 74

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vH CDR3

<400> 74

Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr
 1 5

25 <210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> FR1-65vL CDR1

<400> 75

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> FR1-65vL CDR2
 <400> 76
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5
 <210> 77
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR1-65vL CDR3
 15 <400> 77
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 78
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR1-65vH CDR1
 <400> 78
Thr Ser Tyr Thr Met His
 1 5
 25 <210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> FR1-65vH CDR2
 <400> 79
Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn
 1 5 10
 <210> 80
 <211> 11
 35 <212> PRT

ES 2 617 283 T3

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> FR1-65vH CDR3
<400> 80
5 Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> muFR1-48 de Kabat definido CDR2 de cadena pesada (HC)
<400> 81
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly
<210> 82
15 <211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> huFR1-48 de Kabat definido CDR2 de cadena pesada (HC)
20 <400> 82
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly
<210> 83
<211> 17
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> huFR1-49 de Kabat definido CDR2 de cadena pesada (HC)
<400> 83
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly
30 <210> 84

ES 2 617 283 T3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> muFR1-57 de Kabat definido CDR2 de cadena pesada (HC)

<400> 84

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57 de Kabat definido CDR2 de cadena pesada (HC)

<400> 85

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

15 Gly

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-65 de Kabat definido CDR2 de cadena pesada (HC)

<400> 86

Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

25

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> huFR1-65 de Kabat definido CDR2 de cadena pesada (HC)

ES 2 617 283 T3

<400> 87

Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 88

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-48vL

<400> 88

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Glu Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr
85 90 95

10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 89

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> muFR1-48vH

<400> 89

ES 2 617 283 T3

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

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

Trp Met Gln Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-49vL

<400> 90

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

ES 2 617 283 T3

<210> 91

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-49vH

<400> 91

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Leu Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Lys Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 92

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> muFR1-57vL

<400> 92

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly

ES 2 617 283 T3

<210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> muFR1-65vL

<400> 94

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Glu Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Ala Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

10 <210> 95

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> muFR1-65vH

<400> 95

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

ES 2 617 283 T3

50

55

60

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

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

Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48vL

<400> 96

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

10 <210> 97

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> huFR1-48vH

<400> 97

ES 2 617 283 T3

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

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

Trp Met Gln Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 98

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49vL

<400> 98

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

ES 2 617 283 T3

<210> 99

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49vH

<400> 99

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Lys Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 100

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> huFR1-57vL

<400> 100

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

ES 2 617 283 T3

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 101

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57vH

<400> 101

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

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 617 283 T3

<220>

<223> huFR1-65vL

<400> 102

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

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

5 <210> 103

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> huFR1-65vH

<400> 103

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

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

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

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

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

ES 2 617 283 T3

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

Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-48LC

<400> 104

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Glu Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr
85 90 95

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

ES 2 617 283 T3

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 105

<211> 441

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-48HC

<400> 105

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

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

Trp Met Gln Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
145 150 155 160

ES 2 617 283 T3

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser
 165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Met Arg
 180 185 190

Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
 210 215 220

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
 260 265 270

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
 305 310 315 320

Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
 325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
 340 345 350

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro
 355 360 365

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
 370 375 380

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
 405 410 415

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 106

<211> 214

<212> PRT

ES 2 617 283 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-49LC

<400> 106

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr
85 90 95

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

5 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 107

<211> 448

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 617 283 T3

<220>

<223> muFR1-49HC

<400> 107

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Leu Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Lys Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr
180 185 190

ES 2 617 283 T3

Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 245 250 255

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 275 280 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 290 295 300

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 340 345 350

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
 355 360 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
 370 375 380

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
 405 410 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
 420 425 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 108

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-57LC

ES 2 617 283 T3

<400> 108

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

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
 85 90 95

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

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
 115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
 130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
 145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 109

5 <211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-57HC

10 <400> 109

ES 2 617 283 T3

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Leu
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr
 180 185 190
 Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 210 215 220

ES 2 617 283 T3

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
245 250 255

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
275 280 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
290 295 300

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
340 345 350

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
355 360 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
370 375 380

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
405 410 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
420 425 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 110

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-65LC

<400> 110

ES 2 617 283 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Glu Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Ala Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 111

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-65HC

<400> 111

ES 2 617 283 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val

ES 2 617 283 T3

245

250

255

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
340 345 350

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser
385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 112

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48LC

<400> 112

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

ES 2 617 283 T3

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 113

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48HC

<400> 113

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

ES 2 617 283 T3

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

Trp Met Gln Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

ES 2 617 283 T3

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49LC

<400> 114

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45

ES 2 617 283 T3

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 115

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49HC

<400> 115

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Leu Ile
35 40 45

ES 2 617 283 T3

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

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

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

Thr Lys Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

ES 2 617 283 T3

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 116

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57LC

<400> 116

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

ES 2 617 283 T3

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 117

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57HC

<400> 117

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

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Leu

ES 2 617 283 T3

65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

ES 2 617 283 T3

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 118

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65LC

<400> 118

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

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

ES 2 617 283 T3

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 119

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65HC

<400> 119

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

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

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

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

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

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

ES 2 617 283 T3

Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

ES 2 617 283 T3

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 120

<211> 396

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48_VL

<400> 120

gaattcgcca ccatgggatg gagttgtatc atcctgtttc ttgtggctac agccacaggg 60

gtacactocg atattcaaat gacacagtcc ccttcatccc tgtccgtcag tgtgggggaa 120

agggttacca tcacctgccg tgcacagag aacatctatt ccaacctcgc ctggtaccaa 180

cagaaacctg gcaagtcccc taagctgttg gtctacgccg ctacaaacct cgccgatggg 240

gtgccttccc gtttcagtgg gtcagagtoa ggcaccgact attctctgaa gatcaactcc 300

ctccagcctg aggatttcgg ctctatttac tgtcagcaact tctgggctag tccatatact 360

ttcggccagg gaaccaaact tgaaattaa cgtacg 396

10 <210> 121

<211> 437

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> huFR1-48_VH

<400> 121

ES 2 617 283 T3

aagcttgcca ccatggggtg gagctgcac atcctttttc tggtagccac tgccaccggc 60
 gtgcactctc aggtccaact tgtgcagagc ggagccgagg tggccaaacc cggagctagt 120
 gttaagctct catgtaaagc atctggctac acctttacta actactggat gcagtggatc 180

aagcaacggc caggccaggg cctggagtgg attggtgcta tttatcccgg aaacggggat 240
 agcaggtaca ctcagaaatt tcagggaaag gctaccctta ccgccgataa gagttcttcc 300
 acagcatata tgcaagtctc ctctctgacc tcagaggata gtgctgtcta ttactgagct 360
 cgccgggatg gcaactatgc agcctattgg ggtcaaggca cccttgtgac tgtatccgca 420
 gcaagcacca agggccc 437

<210> 122

5 <211> 396

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49_VL

10 <400> 122

gaattcgcca ccatggggtg gtcattgcatt atcctgtttc tggtagcaac agcaacaggt 60
 gtgcacagtg acattcagat gacccaaagc ccctccagtc tgagcgtttc cgtgggggaa 120
 cgtgtcacta tcacatgcag agcttccgag aatatttaca ctaacctcgc atggtaccag 180
 cagaaacccg ggaagtctcc aaaacttctc gtatatacag ccagcaactt ggcagatggg 240
 gtgccagacc ggttagcgg atctggttca ggcaccgact attctttgaa aattaattcc 300
 ctgcagcctg aggatcttg tacctactat tgccagcatt tttgggtatc accatacact 360
 tttggacagg gaacaaagct ggagatcaag cgtacg 396

<210> 123

<211> 440

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hur1-49_VH

<400> 123

ES 2 617 283 T3

aagcttgcca ccatgggctg gtcttgatt attctttttc ttgtggccac agccacagga 60
 gtccattcac aggtacagct ccaacagtct ggcgcagttg tcgccaagcc cggcgcctct 120
 gtgaagatga gttgcaagc ctctggctac accttcaacta attattggat gtactggatc 180
 aaacaacgcc cgggccaggg tctggaactc attggagcca totaccagc caactcgcac 240
 acaacataca atcagaagtt tcagggcaaa gcaaccctga ccgctgtaac ctcagctaat 300
 accgtgtaca tggaggttaag tagcttgact agtgaagatt ccgcagtata ctattgcacc 360
 aagcgcctatg attacggcgc catggattac tggggccaag gtaccagtgt gaccgtgtct 420
 tccgcttcca ccaagggccc 440

<210> 124

<211> 399

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57_VL

<400> 124

gaattcgcca ccatgggctg gtcattgatt attttgttcc tggtcgccac cgcaaccggc 60
 gttcattccg aaattgttct tactcagagc cctgcaacct tgagtgtgac acccggcgat 120
 cgggtctcac tgagttgcag agcttcccag aatatcaaca ataactctgca ctggtatcag 180
 cagaagcctg gccagctctc tcgcttgctg attaagtatg tctcacagag cgtgtcaggt 240
 atccctgacc gtttctccgg gtcaggttca ggcaccgact tcacactgtc catttctagc 300
 gtggagcctg aggatttcgg aatgtacttt tgccagcaga gcaatagctg gcctcactac 360
 acctttggcc aagggaccaa gctggagatc aagcgtacg 399

10 <210> 125

<211> 440

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> huFR1-57_VH

<400> 125

ES 2 617 283 T3

aagcttgcca ccatgggctg gagctgtatc atcttgttcc ttgtggccac agctactggc 60
 gtgcactccg aggtgcagct ggtcgaatcc ggcggaggcc tgggtgcagcc tggggggagt 120
 agacggctgt cctgogctgc ctctgggttt actttctcaa gtttcggtat gcaactgggtg 180
 cgtcaggccc cggggaaggc cctggaatgg gttgcttata tatcatctgg cagctocacc 240
 atttcttatg ctgattccgt taagggacgc ttcaccattt ccagagacaa cagtaagaaa 300
 accctctgc tgcagatgac ctctctccgc gccgaagaca ccgcaatgta ttattgtgct 360
 agagaggcct acggcagtag tatggaatac tgggggcagg ggaccctggt gaccgtgtct 420
 tccgcatcta ctaagggccc 440

<210> 126

<211> 396

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65_VL

<400> 126

gaattcgcca ccatgggctg gtcttgcatc attctgttcc tggttgcaac agccactggc 60
 gtccattccg aaatcgtgat gacccaatct cccgccacca tgtctacctc tcccggggac 120
 cgggtgtctg tgacctgcaa ggcctctcag aatggtggcc caaacgtggc atggtatcaa 180
 cagaaaccag ggcagtcacc cagagccctg atttactccg cttcttacag atattcagga 240
 gttcccggcc ggttcacagg tagtgggtcc ggcactgact ttaccttgac catttccaac 300

10

atgcaatccg aggacctggc cgaatacttc tgtcagcagt acaattcata tcctataca 360
 ttcggccagg ggaccaagct ggaaataaag cgtacg 396

<210> 127

<211> 446

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65_VH

<400> 127

ES 2 617 283 T3

aagcttgcca ccatgggctg gtcatgcata atcctgttcc tggtcgcaac cgctacaggt 60
 gtacactccc aggtgcagtt ggtgcagagc ggggccgaag ttgctaagcc cggtgcaagt 120
 gtaaaaatgt cctgcaaagc tagcgggtac acattcacat cctatactat gcattgggta 180
 aaacagcgcc caggacaggg gctcgcctgg ataggctata ttaacccaat atcaggatac 240
 acaaactaca atcagaaatt tcagggaaag gcaaccctga cgcgcgacaa gtcctcttct 300
 accgcatata tgcagctcaa ctccctgacc agtgaagata gcgcagtgta ttactgtgcc 360
 tccggcgggtg cttatggccg gaaaccatg gattactggg gacaaggcac ctccgtcaca 420
 gtgagtagcg cctcaaccaa gggccc 446

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Kabat definido Mov19 HC CDR2 Murino

<400> 128

Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Asn	Phe	Lys
1				5					10					15	

Asp

10 <210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Kabat definido Mov19 HC CDR2 Humano

<400> 129

Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 130

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-49 de Kabat definido CDR2 de cadena pesada (HC)

<400> 130

ES 2 617 283 T3

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

REIVINDICACIONES

1. Un inmunocombinado que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde:

- (A) es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno;
 (L) es un conector; y
 (C) es un maitansinoide o un análogo de maitansinoide,

en donde dicho conector (L) liga (A) a (C),
 en donde (A) se selecciona del grupo que consiste en:

i) un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende:

- (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y
 (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSF AGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9),

ii) un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11,

iii) un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 12 o 13, o

iv) un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una cadena pesada codificada por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene el depósito en ATCC n.º PTA-10772 y una cadena ligera codificada por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene el depósito en ATCC n.º PTA-10773 o 10774.

2. El inmunocombinado de la reivindicación 1, caracterizado además por que (L) es un conector seleccionado del grupo que consiste en un conector escindible, un conector no escindible, un conector hidrófilo y un conector basado en ácido dicarboxílico.

3. El inmunocombinado de la reivindicación 2, en donde el conector se selecciona del grupo que consiste en 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB), 4-(2-piridiltio)-butanoato de N-succinimidilo (SPDB), éster de N-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol]-(NHS-PEG4-maleimida), 4-(2-piridiltio)-pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPP), 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de N-sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) y 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB).

4. El inmunocombinado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho maitansinoide es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina o N(2') desacetil -N (2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina.

5. El inmunocombinado de la reivindicación 1, que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde:

(A) es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende:

- (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y
 (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9);

en donde

(L) es 4-(2-piridilditio)-butanoato de N-succinimidilo (SPDB) o 4-(2-piridiltio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB) y

(C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina o N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina,

en donde dicho conector (L) liga (A) a (C).

6. El inmunocombinado de la reivindicación 1, que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde

i)

(A) es un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11;
 (L) es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); y
 (C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina,

ii)

(A) es un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11;
 (L) es éster de N-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol]-(NHS-PEG4-maleimida); y
 (C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina,

iii)

(A) es un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11;
 (L) es 4-(2-piridilditio) butanoato de N-succinimidilo (SPDB); y
 (C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina,

iv)

(A) es un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11;
 (L) es 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPP); y
 (C) es N(2')-desacetil-N (2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, o

v)

(A) es un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11;
 (L) es 4-(2-piridilio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP); y
 (C) es N(2')-desacetil-N (2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina,

en donde dicho enlace (L) enlaza (A) a (C), en particular en donde

(A) es un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11;
 (L) es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); y
 (C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina;

en donde (L) liga (A) a (C).

7. El inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además 2-6 (C), en particular

i) que comprende además una segunda (C),

ii) que comprende además una segunda y una tercera (C), o

iii) que comprende además una segunda, una tercera y una cuarta (C), comprendiendo además preferiblemente 3-4 (C).

8. Inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un Fv de cadena sencilla o scFv, un Fv unido a disulfuro, un intracuerpo, un IgG-CH₂, un minicuerpo, un F(ab')₃, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, un (scFv)₂ o un scFv-Fc.

9. El inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a un receptor 1 de folato humano con una K_d de 1,0 a 10 nM, preferiblemente se une a un receptor 1 de folato humano con una K_d de 1,0 nM o mejor, en particular en donde la afinidad de unión se mide por citometría de flujo, Biacore o radioinmunoensayo.

10. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en donde los inmunoconjugados tienen un promedio de 3 a 4 (C) por (A), en particular en donde los inmunoconjugados tienen un promedio de 3,5 ± 0,5 (C) por (A).

11. Un reactivo de diagnóstico que comprende el inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,

en donde dicho reactivo de diagnóstico comprende además un marcador, preferiblemente en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste en un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de

imágenes y un ión metálico.

12. Un inmunoc conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

5 13. El inmunoc conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso de la reivindicación 12, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de peritoneo y cáncer de pulmón, en particular en donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer de peritoneo o un cáncer de pulmón, más en particular en donde el cáncer es cáncer de ovario.

10 14. Un inmunoc conjugado para uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde el inmunoc conjugado tiene la fórmula (A) -(L) - (C), en donde:

(A) es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11;

15 (L) es el conector 4-(2-piridiltio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); y
(C) es la citotoxina N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina,

20 en donde (L) liga (A) a (C), en particular en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer del peritoneo y cáncer de pulmón, en particular en donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer de peritoneo o un cáncer de pulmón.

15. El inmunoc conjugado de la reivindicación 14 para uso de la reivindicación 14, en donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de endometrio o cáncer del peritoneo.

Figura 1A

Cadena Ligera				
Kabat #	muMov19	DPK19	huMov19v1.00	huMov19v1.60
1	D	D	D	D
3	E	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>V</i>
5	T	T	T	T
9	A	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>L</i>
15	L	L	L	L
17	Q	Q	Q	Q
18	R	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
40	P	P	P	P
41	G	G	G	G
42	Q	Q	Q	Q
45	K	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
57	G	G	G	G
60	T	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
67	S	S	S	S
70	D	D	D	D
74*	N	K	N	<i>T*</i>
76	H	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
80	E	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>
81	E	E	E	E
100	G	G	G	G
103	K	K	K	K
105	E	E	E	E
107	K	K	K	K
108	R	R	R	R

Figura 1B

Cadena Pesada			
Kabat #	muMov19	8m27	huMov19
1	Q	Q	Q
3	Q	Q	Q
5	Q	<i>V</i>	<i>V</i>
9	A	A	A
11	L	<i>V</i>	<i>V</i>
13	K	K	K
14	P	P	P
19	K	K	K
23	K	K	K
28	S	<i>T</i>	<i>T</i>
41	II	<i>P</i>	<i>P</i>
42	G	G	G
43	K	<i>Q</i>	<i>Q</i>
61	Q	Q	Q
62	N	<i>K</i>	<i>K</i>
64	K	<i>Q</i>	<i>Q</i>
65	D	<i>G</i>	<i>G</i>
73	K	K	K
74	S	S	S
82B	S	S	S
84	S	S	S
85	E	E	E
105	Q	Q	Q
112	S	S	S
113	S	S	S

Figuras 1C y 1D

C

FR1-21 V _L		
Posición Kabat	Resto murino	Resto humano
1	D	D
3	V	V
9	S	S
10	Y	S
15	L	V
18	R	R
40	P	P
41	G	G
42	N	K
45	R	K
57	G	G
60	S	S
67	S	S
80	Q	Q
81	T	P
100	S	Q
103	K	K
105	E	E
107	K	K
108	R	R

D

FR1-21 V _H		
Posición Kabat	Resto murino	Resto humano
1	E	E
3	K	Q
11	L	V
13	K	K
14	P	P
17	S	S
19	K	K
41	P	P
42	D	G
43	K	K
44	R	G
60	P	S
61	D	P
63	V	F
64	K	Q
65	G	G
73	N	K
74	A	S
75	K	K
83	K	K
84	S	A
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

Figura 2

A

	1		60
muMov19 LC	DIELTQSPASLAVSLGQRRAIISCKASQSVSEFACTSLMHWHQKPGQCPKLLIYRASNLEA		
huMov19LCv1.00	--V-----L-----P-----R-----		
huMov19LCv1.60	--V-----L-----P-----R-----		
	61		112
muMov19 LC	GVPTRESGSGSKTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKL		
huMov19LCv1.00	---D-----N-S--A-----EIKR		
huMov19LCv1.60	---D-----T-S--A-----EIKR		

B

	1		60
muMov19 HC	QVQLQQSGAELVKPGASVKISKASGYSFTGYFMNWKQSHGKLEWIGRIHPYDGDIFY		
huMov19 HC	----V----V-----T-----P-Q-----		
	61		118
muMov19 HC	<u>NONFKDKATLTVDKSSNTAHMELLSLTS</u> EDFAVY YCTRYDGSRAMDYWGQGTITVTVS		
huMov19 HC	--K-QG-----S		

C

	1		60
muFRL-21 LC	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLEFGVPS		
huFRL-21 LC	-----S---V-----K--K-----		
	61		108
muFRL-21 LC	RPSGSGSGKDYTLS ISSLQTEDEVATYYCQQYWSTPPTFGSGTKLEIKR		
huFRL-21 LC	-----P-----Q-----		

D

	1		60
muFRL-21 HC	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMWVROTPDKRLECVATISSGGSYTTY		
huFRL-21 HC	--Q-----V-----G-G-----		
	61		120
muFRL-21 HC	<u>PDGVKGRFTISRDN</u> AKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARDGEGGLYAMDYWGQGTSTVTVS		
huFRL-21 HC	SP-FQ-----KS-----A-----		

Figura 3

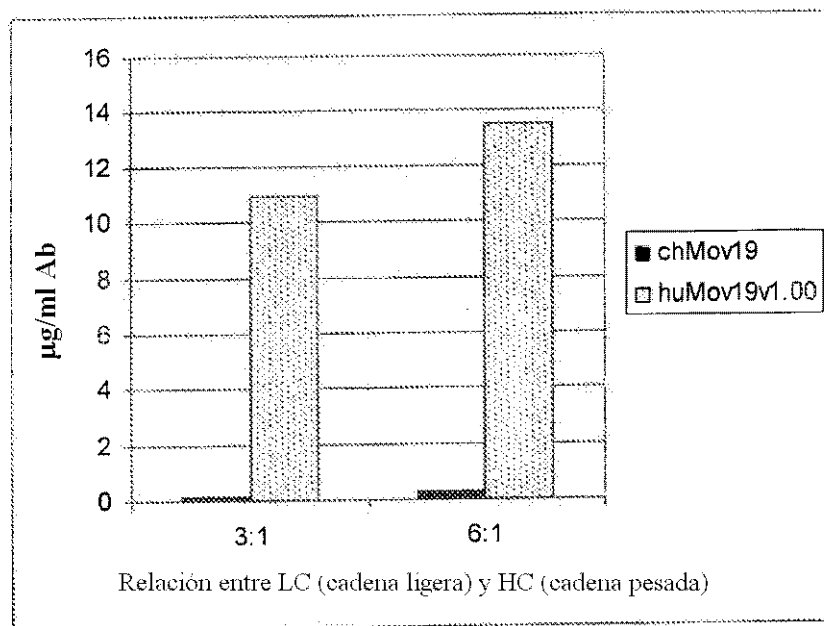


Figura 4

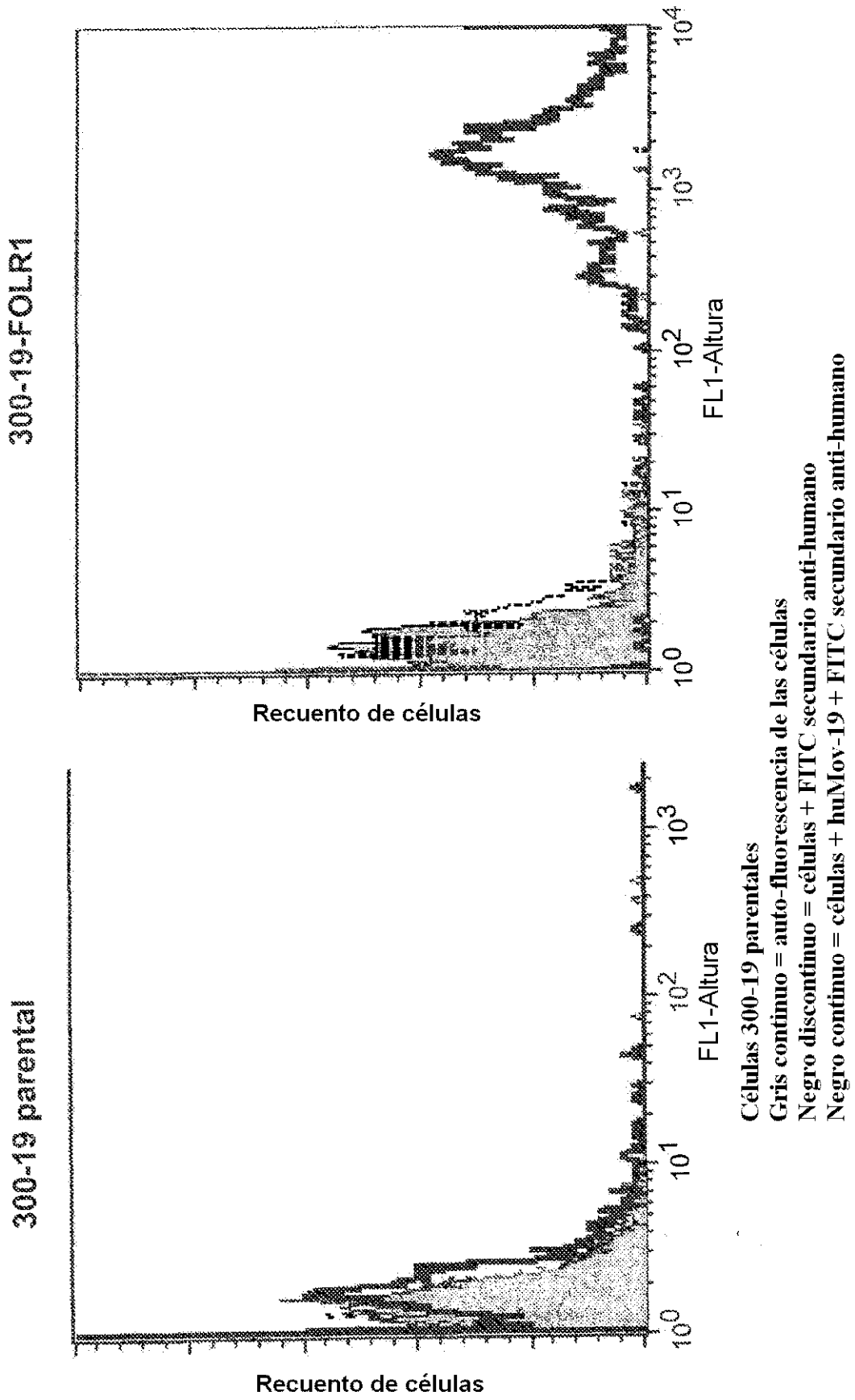


Figura 5

Clon	Isotipo	Afinidad sobre células SKOV3, Kd, nM	Actividad citotóxica de conjugados PEG4-mal-DM4 sobre células KB, IC50, nM (exposición continua)
HuMov19	IgG1	0,07	0,15
muFR1-9	IgG1	0,03	0,22
muFR1-13	IgG2b	0,66	0,15
muFR1-22	IgG2a	0,69	0,14
muFR1-23	IgG2a	0,55	0,13
huFR1-23	IgG1	0,60	
muFR1-21	IgG2b	0,07	0,10
huFR1-21	IgG1	0,07	0,10

Figura 6

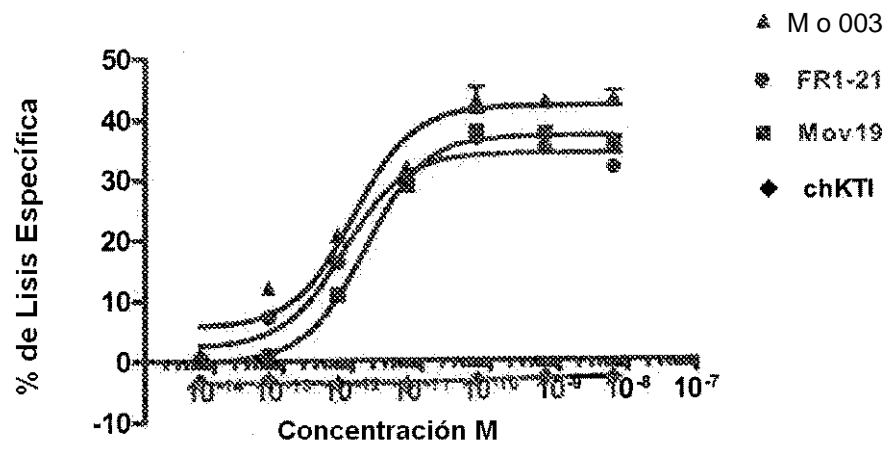


Figura 7

**Actividad citotóxica de
huFR1-21-PEG4-mal-DM4 y huMov19-PEG4-mal-DM4
en Células KB
exposición continua, WST8**

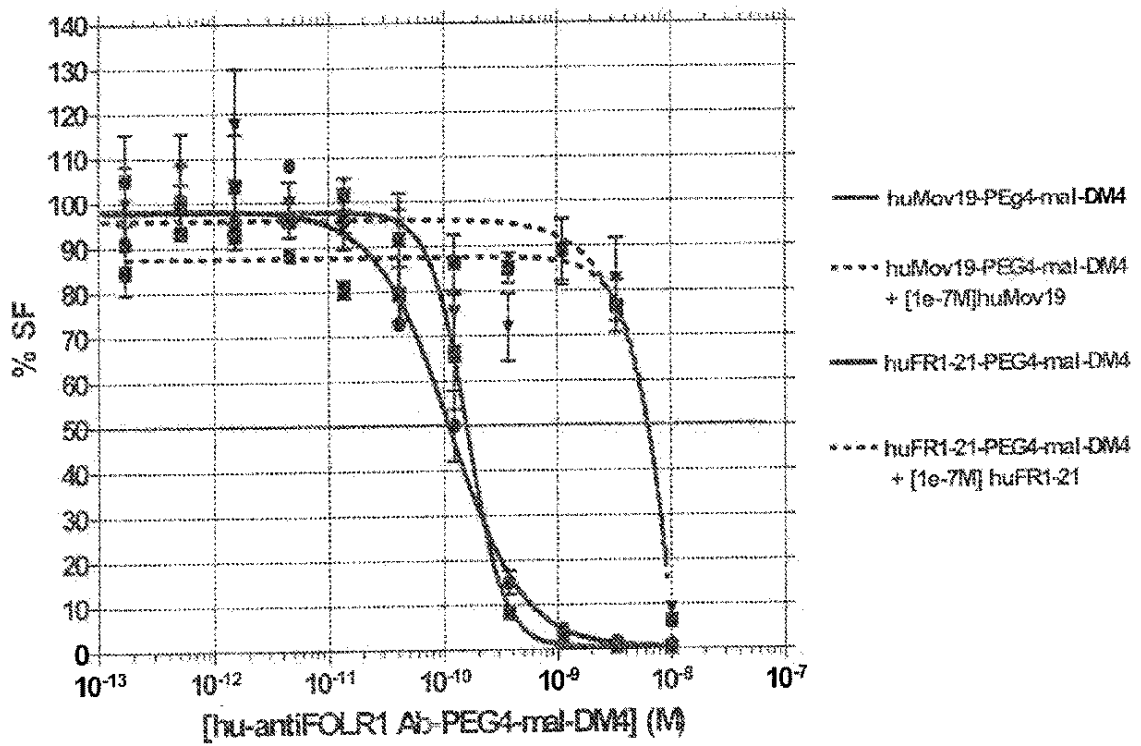


Figura 8

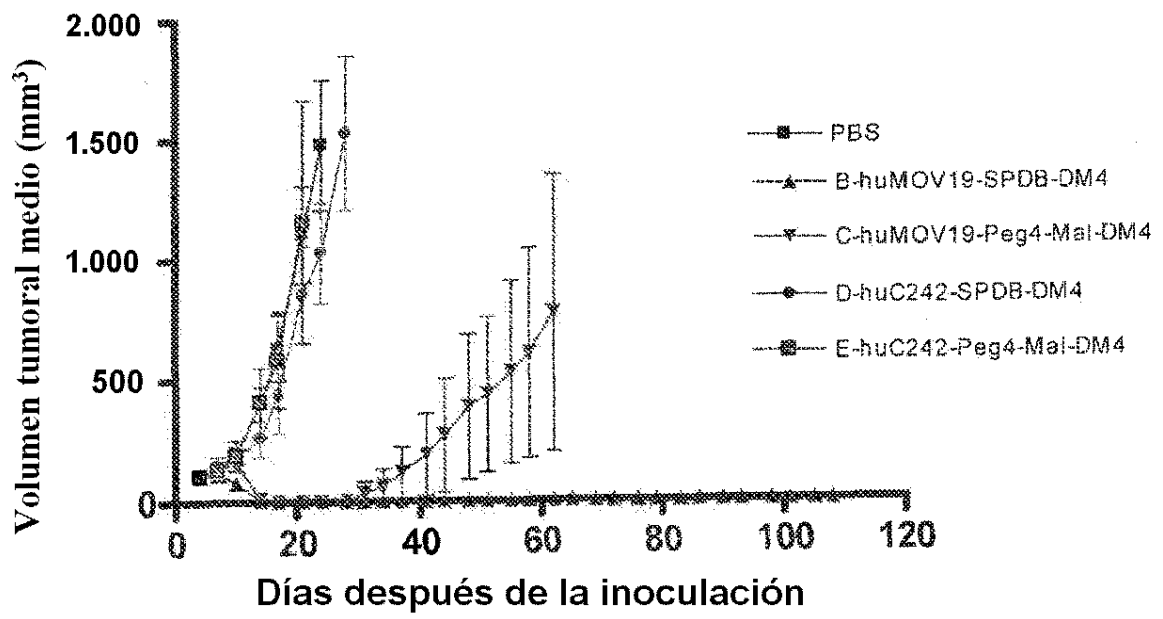


Figura 9

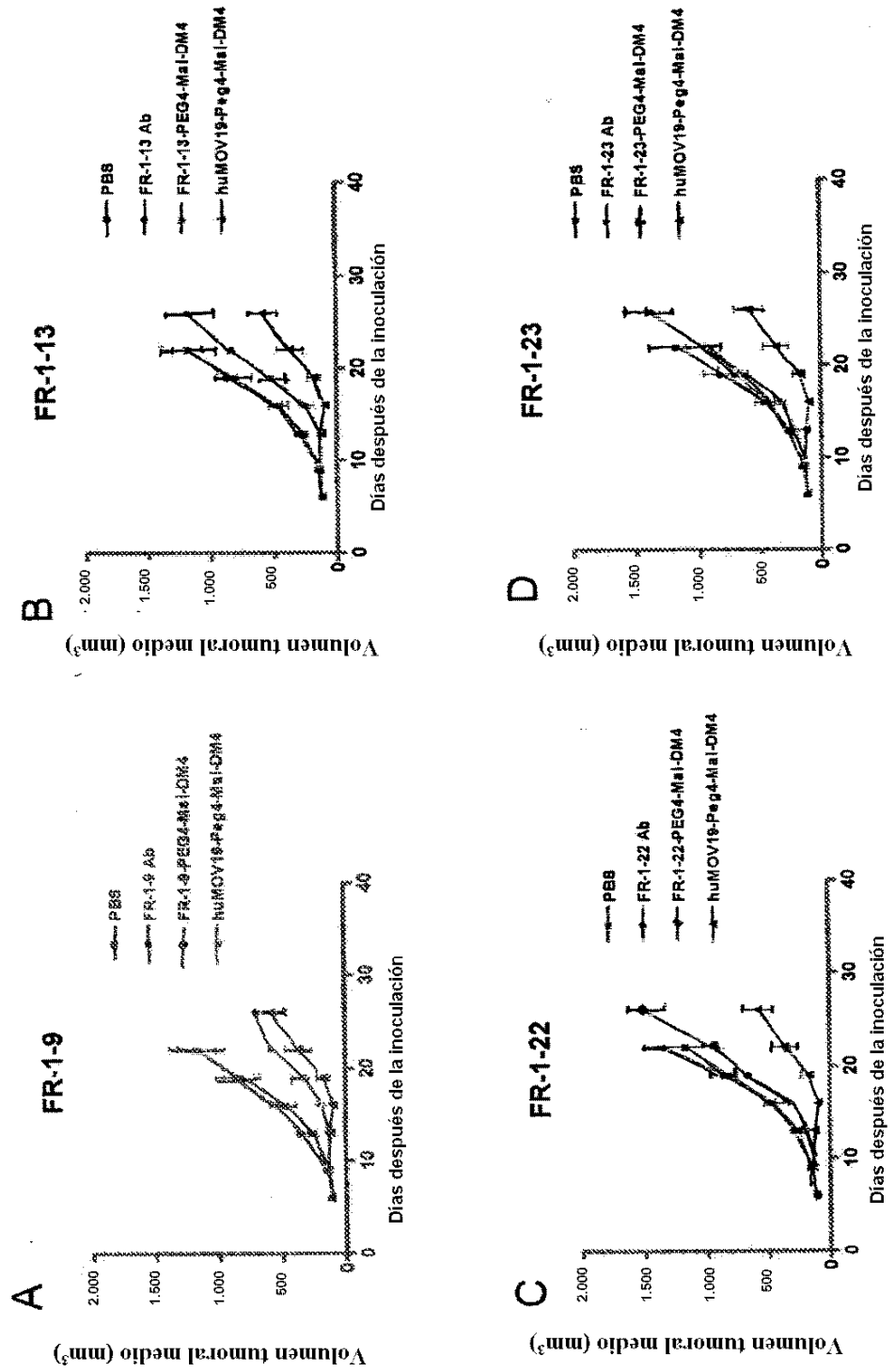
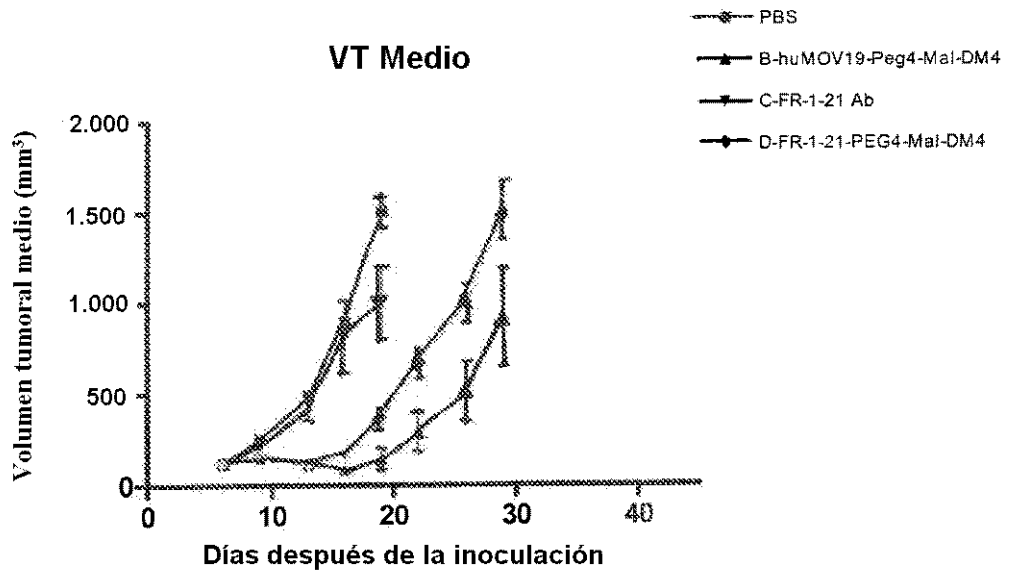


Figura 10



Una sola inyección de 10 mg/kg el día 6 después de la inoculación, modelo KB

Figura 11

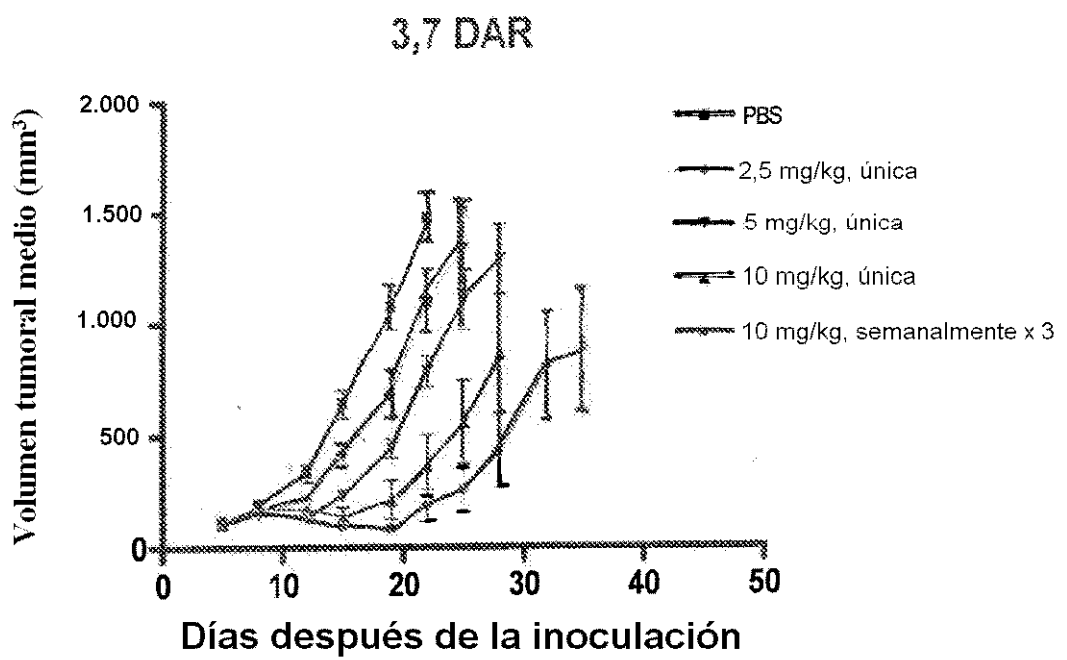


Figura 12

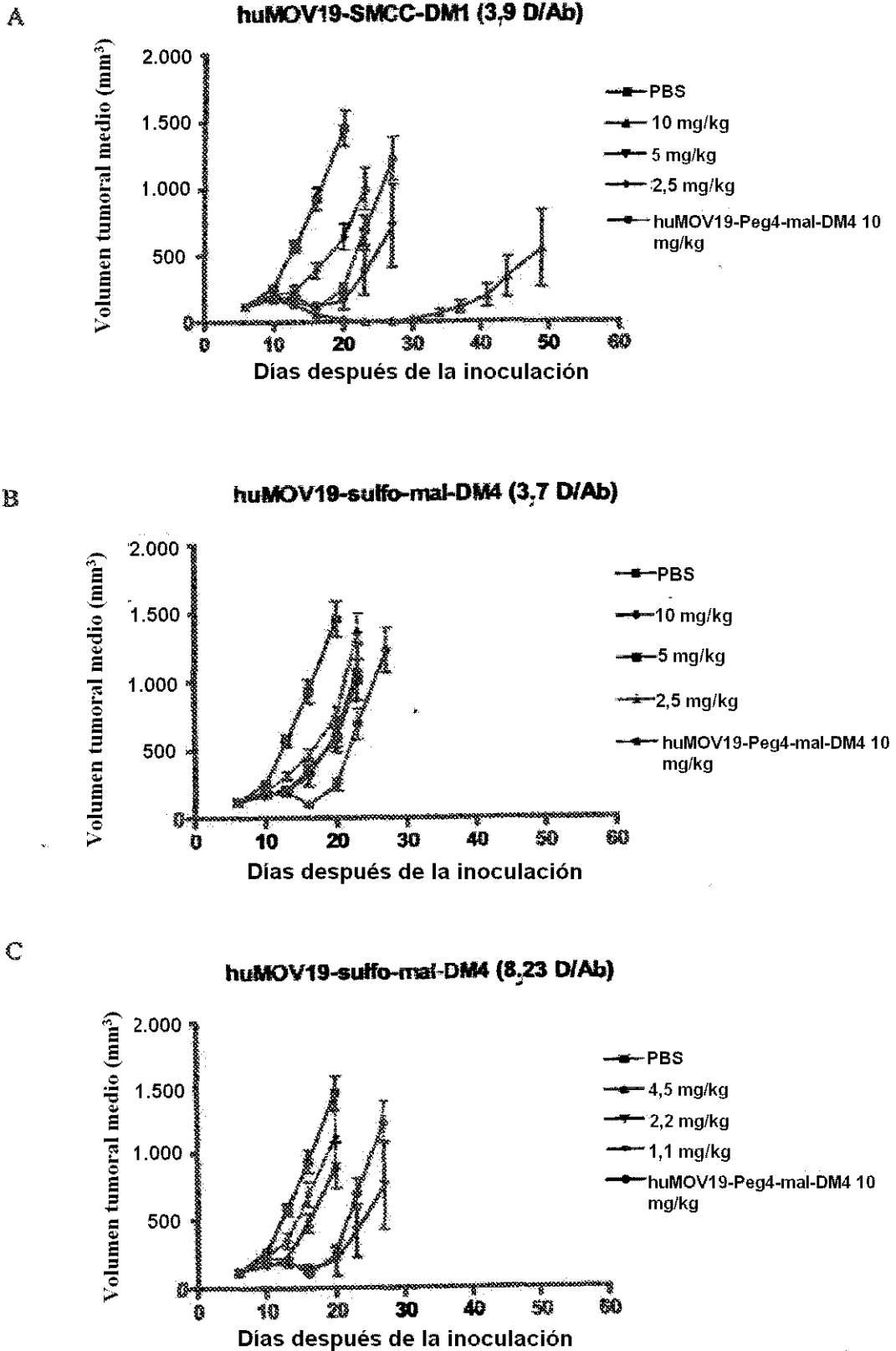
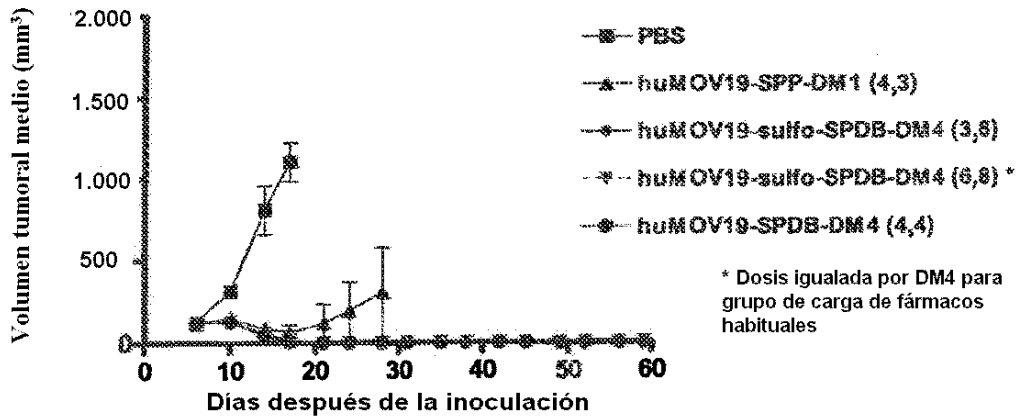


Figura 13

A. Una sola inyección de 5 mg/kg



B. Una sola inyección de 2,5 mg/kg

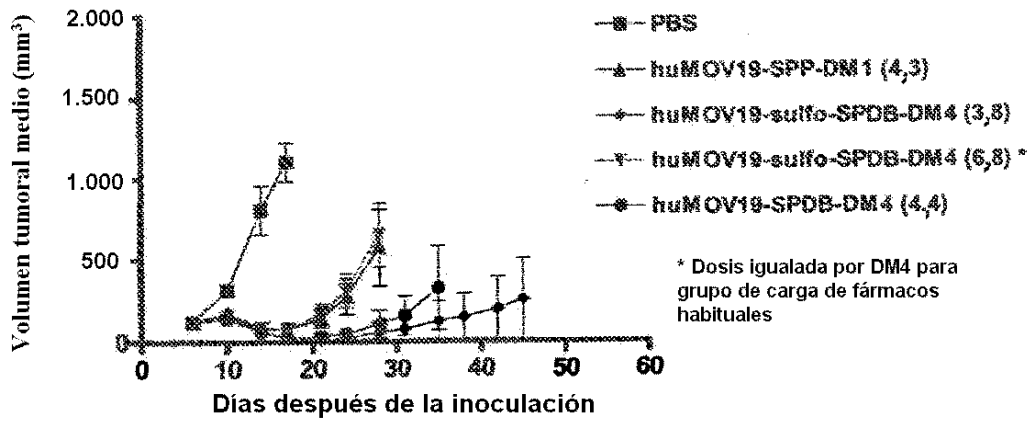
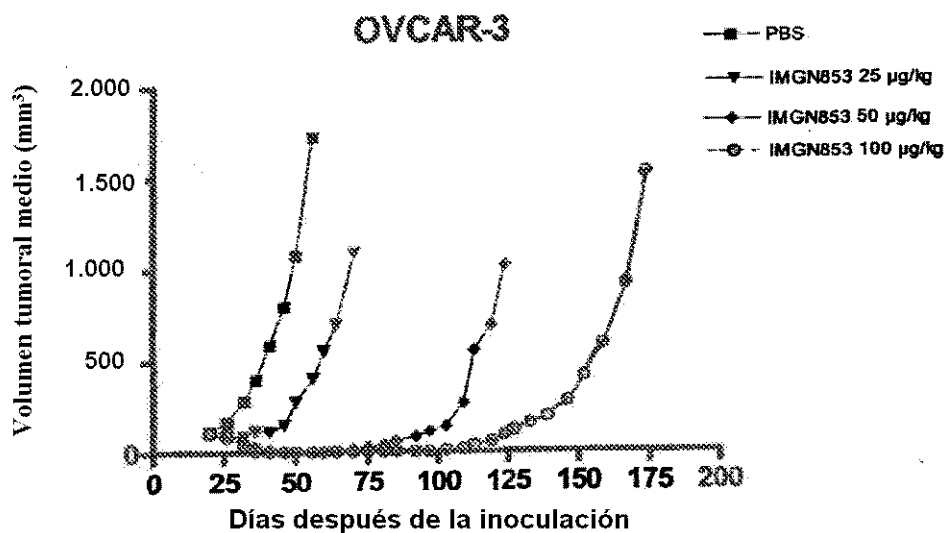
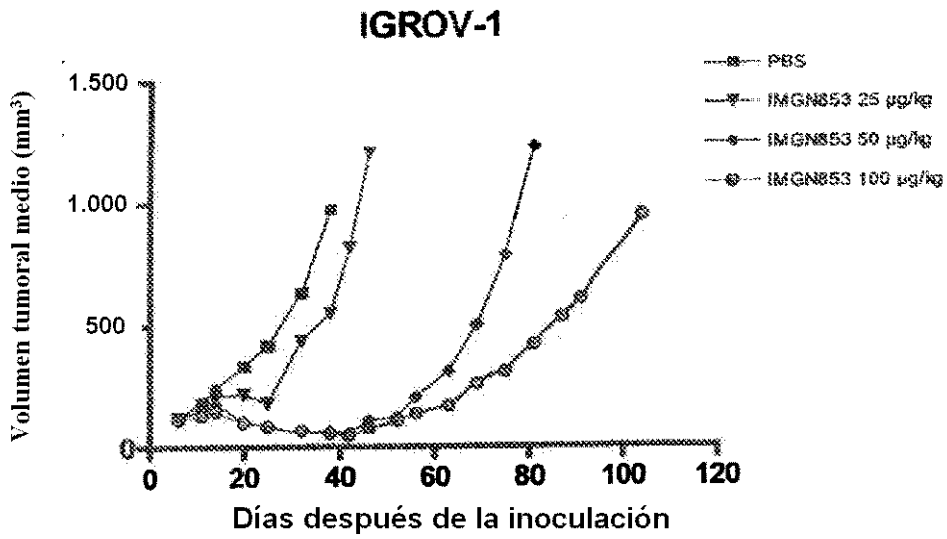


Figura 14



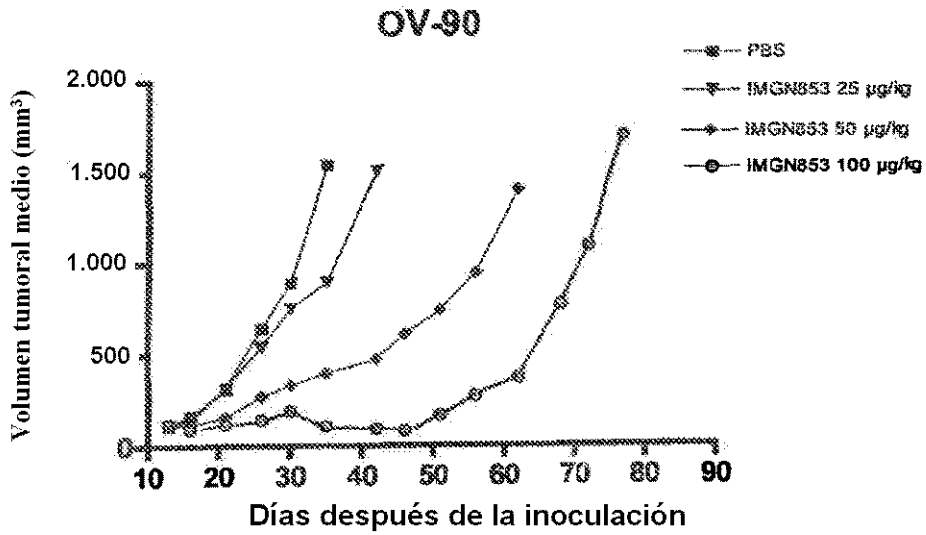
MODELO	Dosis por inyección	T/C (%)	(T-C) en días	log de destrucción de células	Regresiones		Sobrevivientes sin tumor día 208	Comentarios
					Parcial	Completa		
OVCAR-3	25 µg/kg	18	21,0	0,7	2/6	1/6	0/6	activo
	50 µg/kg	0	74,5	2,4	6/6	4/6	0/6	muy activo
	100 µg/kg	0	120,0	3,9	6/6	6/6	0/6	muy activo

Figura 15



MODELO	Dosis por inyección	T/C (%)	(T-C) en días	log de destrucción de células	Regresiones		Sobrevivientes sin tumor día 120	Comentarios
					Parcial	Completa		
IGROV-1	25 µg/kg	55	6,0	0,2	0/6	0/6	0/6	activo
	50 µg/kg	7	41,0	1,1	5/6	0/6	0/6	muy activo
	100 µg/kg	5	67,0	1,8	6/6	0/6	0/6	muy activo

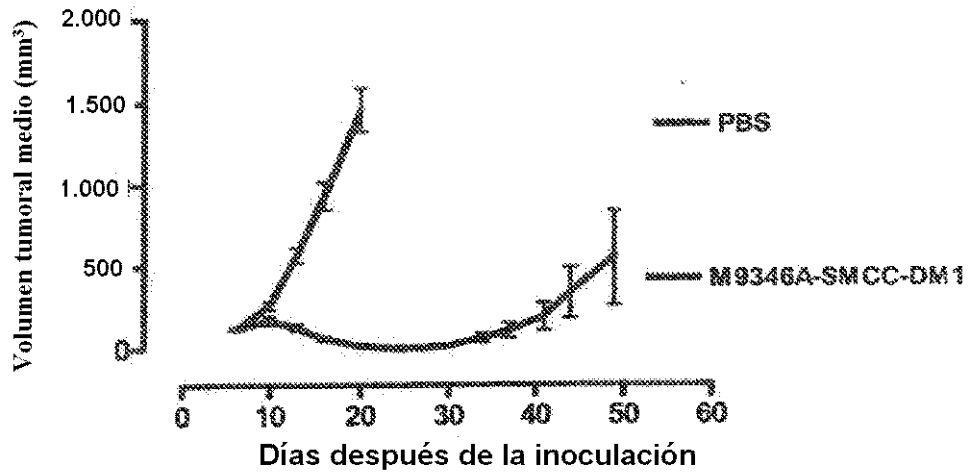
Figura 16



MODELO	Dosis por inyección	T/C (%)	(T-C) en días	log de destrucción de células	Regresiones		Sobrevivientes sin tumor día 92	Comentarios
					Parcial	Completa		
OV-90	25 µg/kg	77	5,0	0,2	0/6	0/6	0/6	inactivo
	50 µg/kg	36	26,0	1,2	0/6	0/6	0/6	activo
	100 µg/kg	18	40,0	1,9	2/6	0/6	0/6	activo

Figura 17

10 mg de conjugado/kg, una sola inyección



5 mg de conjugado/kg, una sola inyección

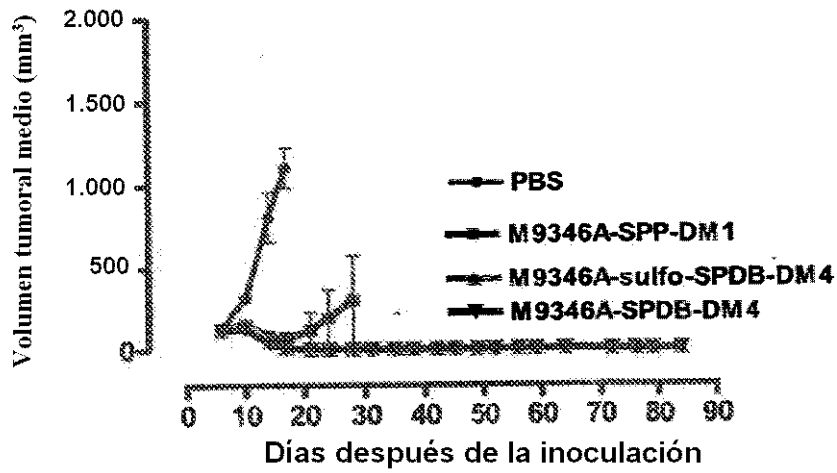


Figura 18

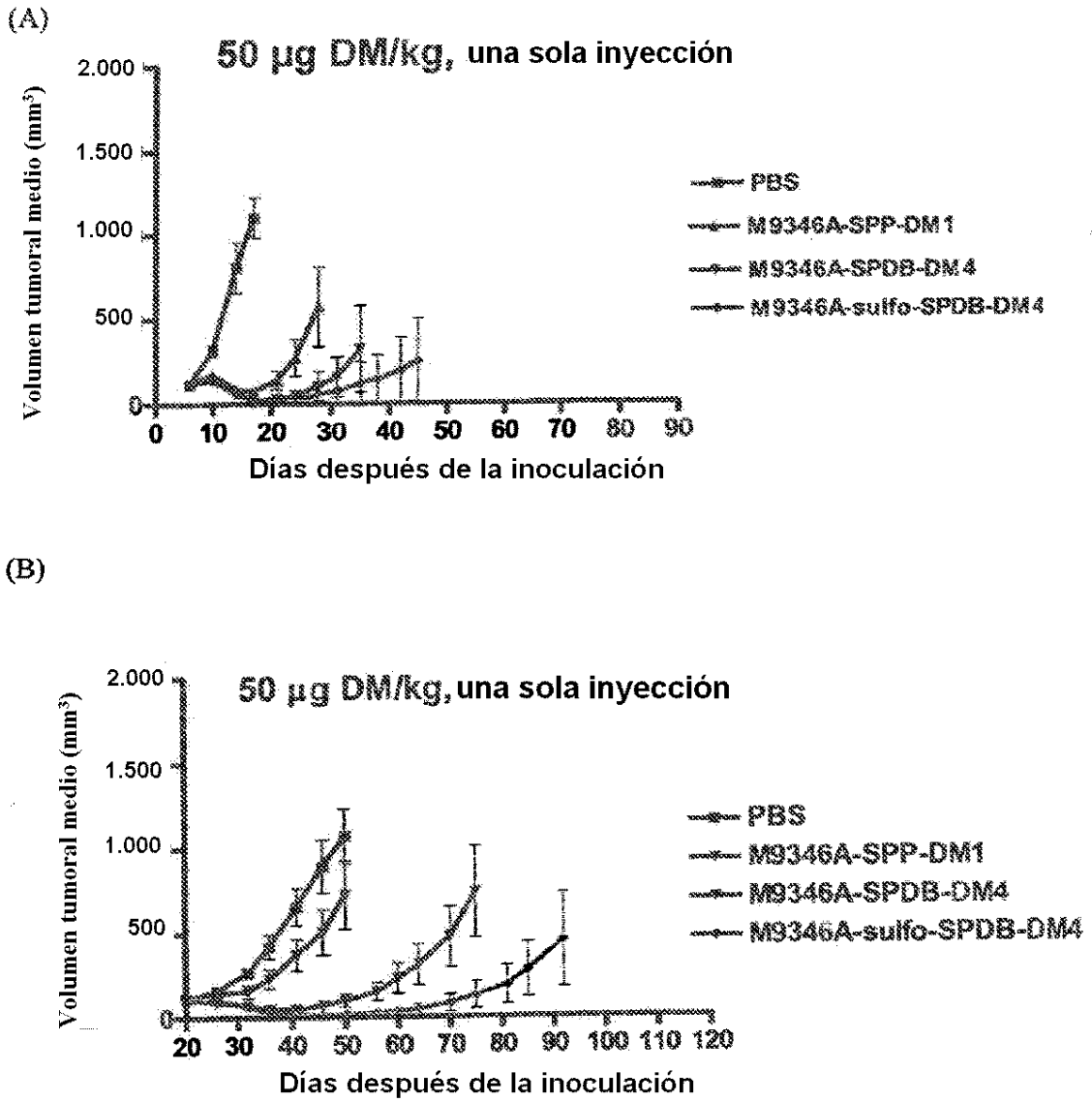
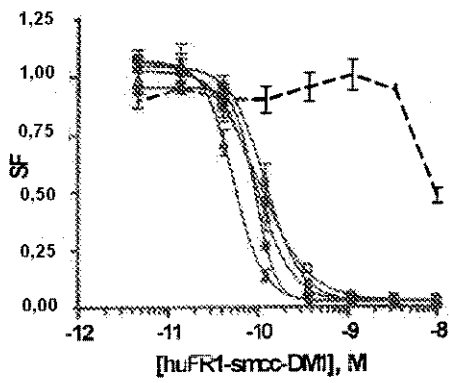


Figura 19

In Vitro

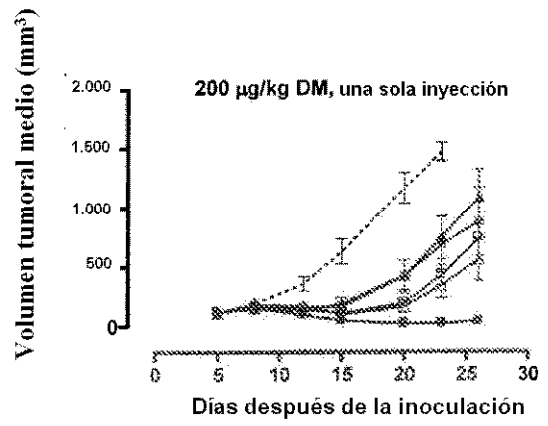
Línea de células de KB



- * huMov19-smcc-DM1
- ▲ huFR1-48-smcc-DM1
- huFR1-49-smcc-DM1
- △ huFR1-57-smcc-DM1
- * huFR1-65-smcc-DM1
- Ab - smcc-DM1 irrelevante

In Vivo

Modelo de xenoinjerto de KB



- huMov19-SMCC-DM1
- huFR1-48-SMCC-DM1
- huFR1-49-SMCC-DM1
- huFR1-57-SMCC-DM1
- huFR1-65-SMCC-DM1
- PBS