

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 423**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2007 PCT/EP2007/007944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2008 WO08031577**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2007 E 07802280 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2061813**

54 Título: **Anticuerpos humanos anti-receptor alfa de folato y fragmentos de anticuerpo para radioinmunoterapia de carcinoma de ovario**

30 Prioridad:

15.09.2006 EP 06019399

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

28.11.2017

73 Titular/es:

**ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS S.A.
(50.0%)**

20 rue Diesel

01630 Saint Genis Pouilly, FR y

**FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE DEI
TUMORI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTIN, FRANCK;
CATTOZZO, MARGHERITA;
MAURIZI, GIOVANNI;
DI CIOCCIO, VITO;
FIGINI, MARIANGELA y
CANEVARI, SILVANA**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 644 423 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

Anticuerpos humanos anti-receptor alfa de folato y fragmentos de anticuerpo para radioinmunoterapia de carcinoma de ovario

5

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos humanos de alta afinidad y a fragmentos de anticuerpo, particularmente fragmentos Fab, específicos para el receptor alfa humano de folato. La invención también se refiere a métodos para producir dichos anticuerpos y fragmentos, y a su uso en entornos terapéuticos y de diagnóstico, tales como radioinmunoterapia, particularmente en cáncer de ovario. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos y los fragmentos.

10

[0002] El cáncer epitelial de ovario (EOC) es la neoplasia ginecológica más mortífera en los países industrializados y en Europa. A pesar de la incidencia relativamente baja (aproximadamente 1/100 000 casos nuevos cada año), EOC presenta una alta relación de mortalidad por casos y la supervivencia global de 5 años ha permanecido en aproximadamente un 44 % ^{(1), (2)}. Las mujeres con tumores confinados en el órgano tienen un excelente pronóstico, pero la mayoría de los cánceres en fase temprana son asintomáticos y más de dos tercios de los pacientes se diagnostican con enfermedad avanzada. EOC en fase temprana generalmente es asintomático y la mayoría de las mujeres (70-75 %) presentan enfermedad avanzada, que a menudo se propaga como depósitos tumorales de pequeño volumen difusos. La cirugía inicial es casi siempre necesaria en el tratamiento de cáncer de ovario sospechoso para la confirmación histológica, la estadificación y citorreducción del tumor. La cirugía citorréductora eficaz en el momento del diagnóstico, que se puede conseguir principalmente en la enfermedad en fase temprana, se ha correlacionado con supervivencia mejorada. Sin embargo, debido a las dificultades en el diagnóstico prematuro y la propensión a enfermedad difusa de pequeño volumen, la inmensa mayoría de los pacientes con EOC requiere tratamiento adyuvante en un intento por erradicar la enfermedad residual.

15

20

25

[0003] La quimioterapia ha desempeñado una función cada vez más importante en el tratamiento eficaz del carcinoma de ovario ^{(3), (4)}. Se considera que EOC es un tumor quimiosensible; de hecho, un 70-80 % de los pacientes con EOC que reciben quimioterapia de primera línea muy activa entran en remisión clínica. Sin embargo, a pesar del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y la supervivencia global media mejorada, se produce recidiva en la mayoría de los pacientes en fase avanzada después de una respuesta completa a los tratamientos iniciales, y al menos un 70-90 % de estos pacientes finalmente mueren con cánceres resistentes a fármacos (tratamiento), mostrando solamente un 10-30 % supervivencia a largo plazo.

30

[0004] Por tanto, existe una gran necesidad de métodos de tratamiento alternativos para cáncer de ovario. Uno de estos tratamientos alternativos es radioinmunoterapia. El carcinoma de ovario puede tratarse con radioinmunoterapia adyuvante para erradicar las metástasis que son quimiorresistentes. La radioinmunoterapia consiste en marcar un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo canceroso con un componente radiactivo. El anticuerpo monoclonal radiomarcado después se inyecta *in vivo* y su especificidad dará lugar a su acumulación en la masa cancerosa. Esta técnica permite la concentración del agente terapéutico, en este caso el componente radiactivo, en las células cancerosas y, contrario a la quimioterapia, que no es específica de sitio, tiene menos toxicidad y efectos secundarios debido a su dirección selectiva y un posible mecanismo diferente de acción, y la menor dosificación de agente terapéutico usada en el tratamiento global.

35

40

[0005] Para carcinoma de ovario, hasta ahora se han identificado varios marcadores diferentes y se han generado muchos anticuerpos diferentes. Entre ellos, los mejor caracterizados son anticuerpos anti-CA125 ^{(5), (6)} y anti-MUC-1, y anticuerpos anti-receptor de folato tales como Mov28 ⁽⁷⁾. El último presenta varias ventajas significativas.

45

[0006] El receptor alfa de folato (α FR) es una proteína unida a glucosil fosfatidilinositol con una alta afinidad por ácido fólico y algunos folatos reducidos tales como 5-metil tetrahidrofolato y tetrahidrofolato. También está presente en una cantidad limitada de células epiteliales, especialmente el riñón, la placenta y el plexo coroideo, pero se expresa en su superficie apical volviéndolo inaccesible para los anticuerpos. La sobreexpresión del α FR por células de carcinoma de ovario y su distribución restringida en tejidos normales proporciona una oportunidad para el desarrollo de anticuerpos anti- α FR para radioinmunoterapia. MOv18 es un anticuerpo monoclonal que es específico para el receptor alfa de folato que es una diana ideal para radioinmunoterapia ya que se sobreexpresa en un 90 % de los carcinomas de ovario. MOv18 radiomarcado con ¹³¹I ya se ha llevado, con algún éxito, a ensayo clínico en fase I/II. Otros anticuerpos monoclonales murinos generados contra α FR incluyen MOv19.

50

55

[0007] En Figini et al. "Panning Phage Antibody Libraries on cells: isolation of human Fab fragments against ovarian carcinoma using guided selection" Cancer research, American Association For Cancer Research, Baltimore, MD, US vol. 58, n.º 5, 1 de marzo de 1998 (1998-03-01), páginas 991 - 996 ISSN: 0008-5472 se describe la producción de un fragmento de Fab humano llamado C4 que se une específicamente a FR α .

60

[0008] Otros varios mAb, incluyendo MOV18, han mostrado eficacia en diferentes ensayos clínicos, pero se han visto limitados en su desarrollo clínico por su origen murino. Para evitar su inmunogenicidad, algunos anticuerpos se han modificado por ingeniería para formar anticuerpos quiméricos o humanizados antes o durante su desarrollo clínico, siendo la última generación completamente humanos y estando en desarrollo clínico.

65

5 [0009] Una limitación que a menudo encuentra la radioinmunoterapia es la larga semivida de los anticuerpos que puede ser de varios días. Por un lado, esta propiedad puede representar una ventaja, dando una cantidad adecuada de tiempo al anticuerpo para abordar el tumor. Sin embargo, por otro lado, esto también significa que el paciente puede tener varios días, dependiendo del marcador, un componente radioactivo descomponiéndose en las venas en todo el organismo. En este caso, la relación de tumor a sangre u órgano excedería por poco un logaritmo en las condiciones más favorables ya que el anticuerpo se elimina lentamente del organismo del paciente. Desde este punto de vista, reducir la semivida del anticuerpo disminuiría la toxicidad del tratamiento reduciendo los efectos secundarios debido a la acumulación de radiaciones inespecíficas en tejidos sanos.

10 [0010] Un punto adicional a considerar es la penetración en el tumor. La impedancia estérica de las moléculas mAb no tiene influencia siempre que la diana sea una célula aislada en el torrente sanguíneo, pero llega a ser crítica cuando se consideran los tumores sólidos como en el caso de carcinoma de ovario^{(8), (9)}. La penetración en el tumor sólido también se ve influenciada por la afinidad del anticuerpo por su ligando y se ha demostrado previamente que una afinidad demasiado baja evita la localización del tumor mientras que una afinidad demasiado alta limita la unión del anticuerpo a la periferia del tumor⁽¹⁰⁾, describiéndose este último fenómeno como la barrera de antígeno.

15 [0011] En vista de las consideraciones anteriores (origen, tamaño, semivida y afinidad) se ha propuesto el uso de fragmentos de anticuerpos (Fab) humanos para la radioinmunoterapia de carcinoma de ovario. De hecho, una molécula más pequeña que un anticuerpo completo probablemente favorece la penetración en el tumor y su origen humano debe eliminar las reacciones inmunogénicas. Además, se acortará la semivida. La afinidad de dichas moléculas tiene que abordarse específicamente como una función del fragmento de anticuerpo seleccionado. Otra ventaja del formato Fab es que este tipo de molécula no requiere ninguna glucosilación para ser funcional. Esto es compatible con la producción de microorganismos y las ventajas asociadas.

20 [0012] Dicho fragmento de anticuerpo se ha generado en el pasado usando selección guiada partiendo de MOv19, un anticuerpo monoclonal (mAb) seleccionado de la misma fusión de la que se generó MOv18, que reconoce un epítipo que no tiene reacción cruzada en el mismo antígeno diana, es decir, α FR. El fragmento Fab seleccionado, llamado C4⁽¹¹⁾, se ha descrito como capaz de unirse específicamente a α FR por ensayos *in vitro*. C4 mostró una K_{aff} estimada de 200 nM, por un análisis de Scatchard realizado sobre células EOC completas.

25 [0013] Se ha previsto, por lo tanto, el desarrollo de un fragmento C4-Fab adecuado para uso clínico *in vivo* en el tratamiento y el diagnóstico de cáncer de ovario. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que la afinidad relativamente baja del fragmento Fab del anticuerpo C4 y su semivida *in vivo* son incompatibles con las necesidades para el desarrollo clínico. De hecho, los experimentos *in vivo* realizados por los inventores con el fragmento C4-Fab mostraron que:

30 - la afinidad del fragmento C4-Fab era demasiado baja para una localización tumoral eficaz;
 - la semivida *in vivo* de C4-Fab era muy corta que, junto con su baja afinidad, evitaba cualquier localización tumoral; fue casi imposible detectar el fragmento Fab en sangre de animales incluso justo una hora después de la administración intravenosa. Esta eliminación demasiado rápida evitaba la acumulación del fragmento de anticuerpo en el tumor sólido que da lugar a resultados incoherentes de biodistribución.

35 [0014] Además, los inventores descubrieron que la producción del C4-Fab recombinante en *E. coli*, y su posterior purificación, se veía enormemente impedida por la producción simultánea de un homodímero de cadena ligera no funcional contaminante (L_2) que es difícil de eliminar durante las etapas de purificación.

40 [0015] Los inventores, por lo tanto, decidieron investigar la posibilidad de producir un fragmento Fab dimérico adecuado para la radioinmunoterapia de carcinoma de ovario. El cambio de formato de Fab al formato $F(ab)_2$ proporciona varias ventajas, tales como bivalencia, que aumenta la avidéz del fragmento y, por lo tanto, su afinidad global, duplica su peso molecular con respecto al fragmento Fab correspondiente, que a su vez disminuye la excreción en orina que protege los riñones y por consiguiente prolonga su semivida *in vivo*⁽¹²⁾.

45 [0016] Los inventores, sin embargo, descubrieron sorprendentemente que no era posible dimerizar de forma eficaz el fragmento C4-Fab. Ni los métodos de dimerización naturales ni los métodos de dimerización química dieron lugar a rendimientos aceptables del dímero C4; cualquier pequeña cantidad de producto dimérico correcto estaba enormemente contaminada por especies diméricas sucedáneas incorrectas que no podían eliminarse por purificación por cromatografía de filtración en gel. Los inventores descubrieron que la producción de un dímero Fab requería modificación extensa del fragmento C4-Fab original, incluyendo el remplazo de la cadena ligera lambda C4 con una cadena ligera kappa. Esto se hizo usando un procedimiento de selección guiado. El nuevo fragmento Fab que comprende la cadena ligera kappa así seleccionada se llamó AFRA y dio lugar a un Fab que tiene afinidad de unión mejorada. La nueva cadena ligera kappa también evitaba el problema de la formación de homodímeros de cadena ligera y mejoraba la estabilidad, que es ventajoso para la radioinmunoterapia⁽¹³⁾. Un beneficio adicional es el hecho de que las cadenas kappa se expresan más fácilmente en *Escherichia coli*⁽¹⁴⁾ que es particularmente ventajosa en el caso de una aplicación industrial. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa AFRA de la invención se ilustra en las figuras 1 y 7 (SEQ ID NO: 1). Para una comparación, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera C4 también se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 12).

[0017] La presente invención, por tanto, se refiere a un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une específicamente al receptor alfa de folato (FRa), donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo es un fragmento Fab que comprende una cadena ligera cuya región variable (VL) comprende:

5 - las regiones determinantes de complementariedad (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

RASESVSFLGINLIH, (SEQ ID NO: 3)

QASNKDT, (SEQ ID NO: 4)

10 LQSKNFPPYT, (SEQ ID NO: 5)

- la región variable (Vh) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la primera región constante (Ch1) de una cadena pesada

15 y donde la región constante de dicha cadena ligera es una región constante kappa.

[0018] En el contexto de la presente invención, se usa la siguiente terminología:

20 - Las expresiones "anticuerpos y fragmentos de la invención" o "anticuerpos AFRA" o "fragmentos de anticuerpos AFRA", salvo que se indique de otro modo, significan anticuerpos o fragmentos que comprenden una cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la ilustrada en las figuras 1 y 7 (SEQ ID NO: 1), o una secuencia de aminoácidos que es funcionalmente equivalente a la ilustrada en las figuras 1 y 7.

25 - La expresión "anticuerpo derivado de AFRA" o "fragmento de anticuerpo derivado de AFRA" se usa para indicar anticuerpos o fragmentos que comprenden una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es funcionalmente equivalente a la ilustrada en las figuras 1 y 7 (SEQ ID NO: 1).

- La expresión "cadena ligera AFRA" significa la cadena ligera ilustrada en las figuras 1 (AFRA) y 7 (SEQ ID NO: 1). La expresión "cadena ligera derivada de AFRA" significa una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es funcionalmente equivalente a la ilustrada en las figuras 1 (AFRA) y 7 (SEQ ID NO: 1).

30 - El término "anticuerpo" se usa como sinónimo del término "inmunoglobulina" (o "Ig"). Salvo que se especifique de otro modo, el término "anticuerpo" o el término "inmunoglobulina", significa una molécula de anticuerpo intacta (o completa). Los fragmentos se denominan como tales.

35 - La numeración de las posiciones de los aminoácidos dentro de la molécula de anticuerpo se hace usando el sistema de numeración de Kabat (Kabat, H. A., et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5.^a Ed. (U.S. Dept. Health and Human Services, Bethesda, Md., 1991), salvo que se indique lo contrario.

[0019] En la naturaleza, los anticuerpos son moléculas glucoprotéicas producidas por los linfocitos B. Los anticuerpos de la invención pueden producirse por linfocitos B, por hibridoma, por expresión del anticuerpo recombinante en una célula hospedadora procarionota o eucariota o por técnicas sintéticas tales como ingeniería de anticuerpos a partir de anticuerpos existentes. Pueden estar glucosilados o no. Hablando en líneas generales, los anticuerpos se unen a antígenos con un alto grado de especificidad, y pueden subdividirse basándose en las propiedades físicas y funcionales en cinco clases (o isotipos), denominadas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Estos diferentes tipos de anticuerpos comparten una unidad estructural básica común que tiene un peso molecular de aproximadamente 150 000 Dalton (150 kDa) y está compuesta por dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas, unidas covalentemente mediante enlaces disulfuro (S-S) intercatenarios entre restos de cisteína. Los anticuerpos intactos de la invención también tienen esta estructura. Preferiblemente, son del tipo IgG.

[0020] En el contexto de la presente invención, un "fragmento de anticuerpo" significa cualquier parte de un anticuerpo, preferiblemente una parte de unión a antígeno e incluye variantes de dichas partes. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la invención son fragmentos Fab; fragmentos Fab'; fragmentos F(ab)₂ y minicuerpos. Las variantes de dichos fragmentos incluyen dímeros y trímeros de los fragmentos, y fusiones entre fragmentos, obtenidas por el uso de secuencias de bisagra naturales, secuencias de bisagra sintéticas, conectores peptídicos o conjugados químicos. Los fragmentos de la invención pueden ser monovalentes (por ejemplo, fragmentos Fab), bivalentes (por ejemplo, fragmentos F(ab)₂) o multivalentes (por ejemplo, un conjugado químico que comprende un fragmento Fab trimérico).

[0021] El antígeno al que se unen específicamente los anticuerpos AFRA y los fragmentos de la invención es el receptor alfa humano de folato (αFR). El receptor de folato tiene tres isoformas, alfa, beta y gamma, que muestran aproximadamente un 70 % de identidad en la secuencia de aminoácidos. Estas diferentes isoformas presentan diferencias significativas en sus afinidades relativas por ácido fólico y son específicas de tejido de forma diferencial y están elevadas de forma diferencial en varias neoplasias. La isoforma alfa está normalmente unida a la superficie celular por un anclaje a membrana de glucosil fosfatidilinositol⁽¹⁵⁾. Tiene una alta afinidad por el ácido fólico, mediando la internalización de los compuestos de folato unidos al receptor y los conjugados de folato. El receptor alfa de folato tiene una distribución muy restringida en tejidos normales (es decir, está presente en una cantidad limitada de células epiteliales normales), pero se sobreexpresa en carcinoma de tejidos ginecológicos, por ejemplo,

en carcinoma de ovario. De acuerdo con la invención, la expresión "receptor alfa de folato" es sinónimo de los siguientes términos: FR-alfa; FR α ; receptor 1 de folato; receptor de folato adulto; proteína adulta de unión a folato; FBP; antígeno MOv18 asociado a tumor de ovario. En el contexto de la invención, la expresión abarca el receptor expresado en la superficie de una célula y también su forma soluble. La secuencia primaria de aminoácidos del receptor alfa humano de folato se muestra en la figura 10A y una forma soluble en la figura 10B.

[0022] Una característica importante de los anticuerpos y de los fragmentos de la invención es que su unión al receptor alfa de folato es específica. Como los anticuerpos y los fragmentos de la invención tienen una reactividad superponible a la de C4 y Mov19, no se unen a las isoformas beta y gamma del receptor de folato. La expresión "se unen específicamente" significa que los anticuerpos y los fragmentos de la invención se unen con alta afinidad (preferiblemente con una K_D de al menos 100 nM y más preferiblemente con una K_D de al menos 20 nM) a FR α , que se expresa sobre la superficie de una célula de mamífero, y no se une a proteínas que tienen, en la misma región epitópica, menos de un 90 % de identidad, preferiblemente menos de un 95 % de identidad y mucho más preferiblemente menos de un 98 % de identidad. El epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser un epítipo continuo o puede ser un epítipo discontinuo (conformacional), formado por el receptor cuando adopta su configuración nativa en la superficie de una célula humana, preferiblemente en la superficie de una célula humana de carcinoma de ovario. Por ejemplo, los anticuerpos y los fragmentos de la invención no se unen a proteínas que tienen menos de un 90 % de identidad global, preferiblemente menos de un 95 % de identidad global, y mucho más preferiblemente menos de un 98 % de identidad global. Por tanto, es posible que los anticuerpos y los fragmentos de la invención se unan a proteínas que tienen un grado muy elevado de identidad con el receptor alfa humano de folato mostrado en las figuras 10A y B, tales como variantes alélicas que tienen entre una y cinco diferencias de aminoácidos con respecto a las secuencias de la figura 10, y que son idénticas sustancialmente a las secuencias de la figura 10 con respecto a la región o regiones epitópicas reconocidas por los anticuerpos de la invención.

[0023] Como se indica anteriormente, aunque FR α se sobreexpresa en células de carcinoma de ovario, también se expresa en ciertos tipos de células epiteliales normales. Sin embargo, la expresión en células normales es en la superficie apical, haciendo que el receptor sea inaccesible para los anticuerpos de la invención en un contexto *in vivo*. Por consiguiente, *in vivo*, los anticuerpos y los fragmentos de la invención se unen específicamente a FR α expresado en células de carcinoma de ovario donde, como consecuencia de la transformación, las células pierden su polaridad y entonces el receptor alfa de folato se expresa en toda la superficie de la célula (u otro carcinoma) y no puede unirse al receptor expresado en la superficie de células humanas epiteliales normales. Por el contrario, en el caso de que los anticuerpos y los fragmentos de la invención se ensayen por ensayos *in vitro*, en células o tejidos epiteliales humanos normales aislados (tales como células epiteliales de la pituitaria, endometrio, tiroides o páncreas) o líneas celulares que expresan bajos niveles de FR α , puede detectarse una unión específica.

[0024] Los anticuerpos AFRA y los fragmentos de anticuerpos AFRA de la invención se caracterizan por una cadena ligera específica, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la figura 1 (SEQ ID NO: 1). La cadena ligera AFRA ilustrada tiene una estructura que es típica de una cadena ligera de inmunoglobulina (L). De hecho, hablando en líneas generales, las cadenas ligeras (L) son de aproximadamente 220 aminoácidos de longitud y tienen un dominio variable (" V_L ") en el extremo amino-terminal de la cadena ligera (de aproximadamente 110 aminoácidos) y un dominio constante (" C_L ") que consiste en la mitad carboxilo restante de la cadena L. La cadena ligera AFRA de la invención comprende 218 aminoácidos, componiendo los 113 aminoácidos N-terminales y la región variable (" V_L ") y componiendo los restantes 105 aminoácidos del extremo carboxi-terminal la región constante (" C_L "). La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera es única para el anticuerpo AFRA de la invención. Junto con la región variable de una cadena pesada asociada, forma el sitio de unión a antígeno del anticuerpo. La región constante de la cadena ligera AFRA es una cadena ligera kappa típica.

[0025] Aunque la cadena ligera de los anticuerpos AFRA y fragmentos de la invención es habitualmente idéntica a la ilustrada en las figuras 1 y 7, no obstante, pueden hacerse ciertos cambios en esta secuencia sin alejarse de la invención. De hecho, la invención también se refiere a "anticuerpos derivados de AFRA" o "fragmentos de anticuerpo derivados de AFRA" que comprenden una cadena ligera que es funcionalmente equivalente a la ilustrada en las figuras 1 y 7 (SEQ ID NO: 1). Dicha cadena ligera funcionalmente equivalente es una secuencia de aminoácidos que:

comprende una cadena ligera cuya región variable comprende las regiones de la cadena ligera AFRA ilustrada en las figuras 1 y 7 que determinan la especificidad por el receptor alfa de folato y una región constante kappa. Las regiones que determinan la especificidad corresponden a las regiones "hipervariables" de la cadena V_L , también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR). Estas CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 o como alternativa L1, L2 y L3. Las regiones determinantes de complementariedad, confirmadas por la estructura cristalina de Fab, de la secuencia AFRA (SEQ ID NO: 1) son:

RASESVSFLGINLIH (SEQ ID NO: 3),
 QASNKDT (SEQ ID NO: 4),
 LQSKNFPPYT (SEQ ID NO: 5).

Estas regiones se ilustran en la figura 7 en negrita, subrayadas. Por tanto, la invención se refiere al anticuerpo derivado de AFRA o fragmento de anticuerpo derivado de AFRA, se une específicamente al receptor alfa de folato (FR α) y comprende una cadena ligera cuya región variable comprende las secuencias de aminoácidos:

5 CDR1: RASESVSFLGINLIH (SEQ ID NO: 3),
 CDR2: QASNKDT (SEQ ID NO: 4),
 CDR3: LQSKNFPPYT (SEQ ID NO: 5).

10 **[0026]** Las secuencias de CDR enumeradas anteriormente están presentes en la cadena ligera derivada de AFRA en las mismas posiciones que aquellas en la cadena ligera AFRA original, es decir, CDR1: 24-38; CDR2: 54-60; CDR3: 93-102 (usando el sistema de numeración de Kabat). La secuencia restante de la región variable de dicha cadena ligera derivada de AFRA puede ser cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, una secuencia flanqueante que difiere de la secuencia de las figuras 1 y 7 (SEQ ID NO: 1) por la sustitución, eliminación o inserción de hasta diez o veinte aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos y que, cuando se usa para reemplazar la secuencia flanqueante de la cadena ligera AFRA ilustrada en la figura 1, en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene las CDR AFRA, no modifica cualitativamente la especificidad del anticuerpo o fragmento del mismo por el receptor alfa humano de folato. La región variable (V_H) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la primera región constante (C_{H1}) de una cadena pesada.

20 **[0027]** La región constante de dicha cadena ligera derivada de AFRA es una región constante kappa clásica, por ejemplo, idéntica a los aminoácidos 114 a 219 de la secuencia AFRA de la figura 7 (doble subrayado). Preferiblemente, estos anticuerpos derivados de AFRA o fragmentos de anticuerpo derivados de AFRA se unen al receptor α de folato (FR α) con una afinidad (K_D) de menos de 50 nM, preferiblemente menos de 20 nM.

25 **[0028]** La especificidad de los anticuerpos derivados de AFRA o fragmentos de anticuerpo derivados de AFRA como se define anteriormente, por el receptor α de folato, puede ensayarse *in vitro* y/o *in vivo* usando medios experimentales convencionales para mostrar la reactividad con el FR α , y la ausencia de reactividad cruzada con proteínas receptoras que tienen menos de un 90 % de identidad de secuencia, preferiblemente menos de un 95 % de identidad de secuencia.

30 **[0029]** Independientemente de si la cadena ligera (L) es una secuencia AFRA inalterada de la SEQ ID NO: 1 o un derivado de la misma como se describe anteriormente, el anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención comprende la primera región constante, habitualmente denominada C_{H1}. Otras partes de la cadena pesada que pueden estar asociadas con la cadena ligera de la invención son fragmentos de cadena pesada que comprenden la región variable (V_H), la primera región constante (C_{H1}) y todo o parte de la región bisagra. Como alternativa, la cadena pesada puede estar intacta, que comprende en secuencia: V_H, C_{H1}, la región bisagra, C_{H2}, C_{H3} y opcionalmente C_{H4}. La asociación entre la cadena pesada y la cadena ligera es normalmente covalente, mediante enlace disulfuro que implica una cisteína en el extremo carboxi-terminal de la cadena ligera.

40 **[0030]** La región variable de la cadena pesada contiene tres regiones hipervariables, llamadas de nuevo "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), denominadas H1, H2 y H3 o, como alternativa, CDR 1, CDR2 y CDR3. Las CDR de la cadena pesada tienen una longitud de aproximadamente 3 a 25 aminoácidos y desempeñan una función importante en la especificidad del anticuerpo.

45 **[0031]** Existen cinco cadenas H diferentes en la naturaleza, denominadas alfa (α), gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) y mu (μ), que difieren entre sí en la secuencia de aminoácidos. El isotipo de un anticuerpo dado (es decir, si pertenece a la clase IgA, IgG, IgD, IgE o IgM) se determina por la cadena H del anticuerpo en cuestión, definiendo la cadena H alfa el isotipo IgA, definiendo la cadena H gamma el isotipo IgG y así sucesivamente. Dentro de la clase IgG existen cuatro subclases denominadas IgG1 a IgG4. De acuerdo con la invención, la cadena pesada del anticuerpo AFRA o fragmento o derivado del mismo puede ser uno cualquiera de estos isotipos, pero el isotipo IgG es particularmente preferido, por ejemplo, IgG1.

50 **[0032]** Preferiblemente, la cadena ligera y la cadena pesada se unen covalentemente juntas por un enlace disulfuro que implica la cisteína carboxi-terminal en la cadena ligera. Los fragmentos Fab de la invención típicamente tienen un tamaño de aproximadamente 55 kDa.

55 **[0033]** La invención, por lo tanto, se refiere a un fragmento Fab donde la región variable de la cadena pesada (V_H) tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 8 (SEQ ID NO: 2) y la primera región constante de la región de cadena pesada (C_{H1}) es la región C_{H1} de una cadena pesada gamma, particularmente una cadena pesada gamma1. Un ejemplo de una cadena pesada C_{H1} típica se ilustra en la figura 9 (SEQ ID NO: 9).

60 **[0034]** Por consiguiente, un fragmento Fab de la invención comprende o consiste en los siguientes elementos de secuencia:

65 una cadena ligera cuya región variable (V_L) que comprende:

- las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

RASESVSFLGINLIH, (SEQ ID NO: 3)
 QASNKDT, (SEQ ID NO: 4)
 LQSKNFPPYT, (SEQ ID NO: 5)

- la región variable (Vh) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la primera región constante (Ch1) de una cadena pesada.

y donde la región constante de dicha cadena ligera es una región constante kappa.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento Fab'. En el contexto de la invención, un fragmento Fab' es un fragmento Fab en que la cadena pesada comprende adicionalmente la región bisagra natural en su extremo carboxi-terminal, adecuado para la unión covalente a un segundo fragmento de anticuerpo. La bisagra contiene uno o más restos de aminoácido o grupos químicos que son adecuados para la formación de enlace covalente, por ejemplo, una cisteína libre, permitiendo de ese modo la dimerización del fragmento Fab'. La región bisagra puede ser al menos parte de una región bisagra natural de anticuerpo, por ejemplo, una región bisagra de origen natural en una cualquiera de las cadenas pesadas alfa (α), gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) y mu (μ). Son particularmente preferidas las regiones bisagra, o partes de las mismas, que corresponden a la secuencia natural de la subclase gamma, particularmente gamma1, tal como el pentapéptido DKTSC, o el hexapéptido DKHTC. La parte de la región bisagra usada para la creación del fragmento Fab' típicamente contiene al menos un resto libre de cisteína, por ejemplo, en el extremo carboxi-terminal, pero puede modificarse por ingeniería para que contenga dos o tres restos libres de cisteína.

[0035] Como alternativa, el fragmento Fab' puede dimerizarse de forma artificial por, por ejemplo, un resto no proteínico tal como un conector químico que confiere a resistencia a la hidrólisis en un entorno *in vivo*. Un ejemplo de dicho conector artificial es bismaleimida etano (BMOE) pero se ha informado de otros varios conectores en la bibliografía^{(16), (17)}.

[0036] La ventaja de usar fragmentos Fab' es que pueden dimerizarse para formar fragmentos $F(ab')_2$ que tienen dos dominios de unión a antígeno. Los fragmentos $F(ab')_2$ son, por lo tanto, divalentes, lo que aumenta la avidéz de unión con respecto a un monómero Fab. Los dos fragmentos Fab' que componen el dímero se unen juntos por enlace entre cada una de las dos regiones bisagra, de las dos cadenas pesadas de Fab'. Los monómeros Fab' pueden dimerizarse por la oxidación natural de las cisteínas libres en los extremos C-terminales de las cadenas pesadas. Los fragmentos $F(ab')_2$ típicamente tienen un tamaño de aproximadamente 100 a 110 kDa.

[0037] Si se dimerizan por un conector artificial no proteínico, los dos monómeros Fab' que componen el dímero $F(ab')_2$ se unen covalentemente en sí a través de este conector químico. Por ejemplo, un bismaleimida etano (BMOE) da lugar a un enlace maleimida que es no hidrolizable y, por lo tanto, confiere estabilidad al dímero en un entorno *in vivo*.

[0038] De acuerdo con este aspecto de la invención, los dos dominios de unión a antígeno del dímero $F(ab')_2$ pueden tener especificidades idénticas, ambas se unen específicamente a un epítipo dado del receptor alfa de folato. Como alternativa el dímero $F(ab')_2$ puede ser biespecífico, siendo específico uno de los dominios de unión a antígeno por un primer epítipo del receptor alfa de folato y siendo específico el otro por un segundo epítipo del receptor alfa de folato. Una posibilidad adicional es que el segundo dominio de unión a antígeno se una a un antígeno completamente distinto del receptor alfa de folato, tal como un segundo antígeno de carcinoma o a un marcador citolítico natural de células efectoras.

[0039] Los anticuerpos y fragmentos de la invención son preferiblemente humanos completamente. La cadena ligera AFRA de la invención es de origen humano. Por lo tanto, es ventajoso combinar la cadena ligera con una cadena pesada de origen humano. Como alternativa, la cadena ligera AFRA puede combinarse inicialmente con una cadena pesada de origen no humano, por ejemplo, murino y después pueden usarse técnicas de ingeniería de anticuerpos para humanizar la cadena pesada.

[0040] Los anticuerpos y fragmentos de la invención se caracterizan por una alta afinidad de unión y avidéz por el receptor alfa humano de folato. La afinidad de unión es la fuerza de la interacción entre un único sitio de unión a antígeno en un anticuerpo, o fragmento del mismo, y su epítipo antigénico específico. Cuanto mayor sea la afinidad, más fuerte será la asociación entre el antígeno y el anticuerpo o fragmento, y mayor probabilidad habrá de que el antígeno permanezca en el sitio de unión. El término "avidéz" se usa para describir la fuerza global de la interacción entre un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y depende tanto de la afinidad como de la valencia de las interacciones. Cuantos más sitios de unión a antígeno tenga una molécula de anticuerpo individual, mayor será la avidéz por el antígeno.

5 [0041] La afinidad puede expresarse como una constante de afinidad K_A que es la relación entre las constantes de velocidad para la asociación ($k_{\text{asociación}}$) y disociación ($k_{\text{disociación}}$) del anticuerpo y el antígeno. La K_A se mide en M^{-1} ; cuanto mayor sea la afinidad, mayor será la K_A . Como alternativa la afinidad puede expresarse como una constante de disociación K_D , donde $K_D = 1/K_A$. Las unidades de K_D M, y cuanto mayor sea la afinidad, menor será la K_D . En el contexto de la invención, las afinidades normalmente se expresan como K_D . Como la mayoría de los métodos de medición de la afinidad tienen en cuenta la cantidad de sitios de unión de un anticuerpo o fragmento, los valores de afinidad K_A y K_D , de hecho, puede considerarse que reflejan la afinidad para anticuerpos o fragmentos monovalentes, y la avidéz para anticuerpos o fragmentos multivalentes.

10 [0042] Los anticuerpos AFRA y fragmentos de la invención preferiblemente se unen al receptor alfa de folato (FR α) con una afinidad (K_D) en el intervalo de 100 nM a 1 pM. Más particularmente, tienen una afinidad (K_D) de menos de 75 nM, preferiblemente de menos de 50 nM, más preferiblemente de menos de 30 nM y mucho más preferiblemente de menos de 5 nM. A modo de ejemplo, los fragmentos monovalentes de la invención, tales como fragmentos Fab típicamente muestran una K_D de menos de 50 nM. Esta afinidad representa una mejora considerable sobre el fragmento C4 Fab monomérico conocido. Los fragmentos divalentes de la invención tales como F(ab') $_2$ o un Di Fab Maleimida (DFM) típicamente muestran una K_D de menos de 30 nM, por ejemplo, de menos de 5 nM. Estos valores pueden obtenerse usando el receptor soluble o el receptor expresado en superficie celular como antígeno.

20 [0043] De acuerdo con la invención, la afinidad de unión puede medirse por varias técnicas convencionales, tales como diálisis en equilibrio, con análisis de Scatchard de los datos, de acuerdo con el cual:

$$r/c = K(n-r),$$

donde:

- 25
- r = moles de ligando unido/moles de anticuerpo en equilibrio;
 - c = concentración de ligando libre en equilibrio;
 - K = constante de asociación en equilibrio; y
 - n = número de sitios de unión a antígeno por molécula de anticuerpo (valencia)
- 30

[0044] También pueden usarse ensayos de unión competitiva de ELISA para la determinación de la K_A , de nuevo usando análisis de Scatchard. Como alternativa, la K_D relativa puede determinarse como la concentración a la que se obtiene la mitad de la señal estable de ELISA.

35 [0045] Una técnica adicional que puede usarse para medir la afinidad de unión es la resonancia de plasmón superficial (SPR), por ejemplo, usando tecnología Biacore (Pharmacia). Con este método, es posible medir la cinética de unión, así como las constantes de afinidad. De acuerdo con esta técnica, $K_D = k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$ donde $k_{\text{disociación}}$ es la constante de velocidad de disociación (también denominada k_{off}) y la $k_{\text{asociación}}$ es la constante de velocidad de asociación (también denominada k_{on}).

40 [0046] De acuerdo con la invención, el antígeno usado en los análisis de afinidad puede ser el receptor alfa de folato que se expresa en la superficie de células completas, particularmente células humanas, por ejemplo, células de carcinoma de ovario humano tales como OVCAR3 (ATCC), IGROVI (aportación proporcionada por Dr. J. Bénard, Institut Gustave Roussy, Villejuif, Francia) o células transfectadas con el receptor alfa humano de folato tal como células A431-Fr⁽¹⁸⁾. Como alternativa, el antígeno puede estar en forma de un receptor soluble, por ejemplo, FR α recombinante como se muestra en la figura 10. El uso de receptor soluble es particularmente ventajoso para análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) y puede usarse para predecir la unión *in vivo* en seres humanos.

50 [0047] Los anticuerpos AFRA y fragmentos de la invención pueden usarse en varias aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de imágenes. La invención, por tanto, se refiere a un anticuerpo AFRA o fragmento de acuerdo con la invención para el tratamiento de trastornos que implica la sobreexpresión de receptor alfa de folato (FR α). En particular los anticuerpos AFRA y fragmentos de la invención pueden usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer humano. Un aspecto de la invención, por tanto, se refiere a un método para tratar cáncer humano, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo AFRA o fragmento de acuerdo con la invención.

55 [0048] Para muchas de las aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de imágenes, el anticuerpo o fragmento se conjuga a un resto efector tal como un agente citotóxico o marcador. Este es el caso para el tratamiento de trastornos tales como carcinoma, por ejemplo, carcinoma ginecológico.

60 [0049] Un uso terapéutico particularmente preferido de los anticuerpos AFRA y fragmentos es en radioinmunoterapia de carcinoma de ovario en seres humanos. Para dicha aplicación, los anticuerpos y fragmentos se conjugan a un radionúclido citotóxico, tal como ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}RE . Un radionúclido mucho más preferido es ^{131}I . Además, pueden usarse otros radionúclidos tales como ^{99}Tc , por ejemplo, en un entorno de diagnóstico o de imágenes.

65

5 [0050] Los anticuerpos AFRA y fragmentos son particularmente muy adecuados para radioinmunoterapia en vista de su bajo valor K_D para el receptor alfa de folato, significativamente mejorado sobre el C4 Fab conocido. La mayor afinidad de los anticuerpos AFRA y fragmentos con respecto a la afinidad de C4 representa una ventaja real para radioinmunoterapia, ya que esto influye directamente en la localización del tumor y la dosificación del anticuerpo. En este caso particular, la mayor afinidad de los anticuerpos AFRA y fragmentos refleja directamente la cantidad de anticuerpo unido al tumor. En otras palabras, como los anticuerpos AFRA y fragmentos tienen un valor de K_D muy inferior a C4, las moléculas AFRA alcanzarán, a la misma dilución, una concentración mayor en tejidos tumorales de lo que lo haría C4. Esto reduce el fondo y por consiguiente también reduce los efectos secundarios del tratamiento que se deben principalmente a la unión inespecífica del anticuerpo. La radioinmunoterapia se basa de forma eficaz en la acumulación específica de radiactividad en el tumor, y la mayor relación de tejidos tumorales/sanos obtenida con los anticuerpos AFRA y fragmentos proporciona un indicador claro para un efecto terapéutico mejorado.

15 [0051] La conjugación del radionúclido a los anticuerpos o fragmentos de la invención puede hacerse usando cualquier técnica convencional tal como el uso de un conector entre el anticuerpo y el radioisótopo. Preferiblemente, el radioinmunoconjugado tiene una actividad específica de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 mCi/mg, dependiendo del radionúclido, y puede administrarse por vía intravenosa u otra vía. Dependiendo de la duración deseada y la eficacia del tratamiento, los conjugados de radionúclido-anticuerpo de la invención pueden administrarse una vez o varias veces, en combinación con otros fármacos terapéuticos o agentes radiosensibilizantes. La cantidad del radioinmunoconjugado aplicado depende de la naturaleza precisa del carcinoma. La dosis de radiactividad para administración debe ser suficientemente alta para ser eficaz, pero debe estar por debajo de la toxicidad limitante de la dosis (DLT). Se prefieren administraciones individuales; también son posibles múltiples administraciones. En general, la dosis de radiactividad por administración estará entre 20 y 80 mCi/m² de área superficial corporal (BSA).

25 [0052] De acuerdo con una realización preferida de la invención, el fragmento de anticuerpo AFRA usado para radioinmunoterapia es un fragmento dimérico, por ejemplo, F(ab')₂ o un dímero Fab químico tal como F(ab')₂-DFM. Los dímeros de Fab AFRA típicos para aplicaciones de radioinmunoterapia comprenden la cadena ligera AFRA en asociación con una cadena pesada de IgG, que tiene una región variable tal como la ilustrada en la figura 8, o una región variable que comprende las CDR de la secuencia de la figura 8 en una secuencia flanqueante diferente.

30 [0053] Los anticuerpos y fragmentos de la invención pueden usarse como agentes terapéuticos individuales en el tratamiento de trastornos tales como cáncer, particularmente cáncer de ovario. Como alternativa, pueden usarse en asociación con otros agentes terapéuticos, en tratamiento combinado que implica múltiples fármacos y/o métodos de tratamiento. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de la invención pueden usarse junto con quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica.

40 [0054] Esta realización de la invención, por tanto, se refiere a un producto que contiene un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención y al menos un agente terapéutico adicional, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en tratamiento. Un agente terapéutico adicional se selecciona típicamente del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico y un agente radioterapéutico. Dichos productos para tratamiento combinado son particularmente adecuados para el tratamiento de cáncer humano, por ejemplo, cáncer de ovario.

45 [0055] En el contexto de dicho tratamiento de combinación, los anticuerpos o los fragmentos de la invención pueden usarse como el tratamiento principal en asociación con un tratamiento secundario adecuado, que se administra simultáneamente con o sucesivamente a los anticuerpos AFRA o fragmentos. Como alternativa, los anticuerpos o los fragmentos de la invención pueden usarse como tratamiento secundario para ayudar al tratamiento principal, tal como quimioterapia. Este aspecto de la invención, por tanto, incluye un método para tratar el cáncer humano, comprendiendo dicho método la administración a un sujeto que necesita dicho tratamiento, una cantidad eficaz de un primer agente terapéutico y una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico, donde el primer y el segundo agente terapéutico se administra al sujeto simultáneamente, secuencialmente o por separado, y el primer o el segundo agente terapéutico comprende un anticuerpo AFRA o un fragmento de acuerdo con la invención.

55 [0056] Los anticuerpos o los fragmentos de la invención, por tanto, pueden usarse para realizar un tratamiento complementario o adyuvante con un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, para el tratamiento de cáncer humano, particularmente cáncer de ovario.

60 [0057] De acuerdo con un aspecto adicional, los anticuerpos AFRA o los fragmentos pueden estar presentes junto con otros anticuerpos o fragmentos, en forma de un cóctel o mezcla. Estos otros anticuerpos o fragmentos pueden ser anticuerpos AFRA adicionales o fragmentos, específicos para el receptor alfa de folato, o pueden ser anticuerpos o fragmentos que tienen especificidad por un antígeno diferente. Los cócteles o mezclas también incluyen mezclas de anticuerpos AFRA o fragmentos que comprenden diferentes formatos de anticuerpo AFRA tales como mezclas de fragmentos AFRA monoméricos y diméricos o fragmentos que tienen al menos una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de AFRA ilustrada en la figura 1 o 7 (SEQ ID NO: 1) o el equivalente funcional de dicha cadena ligera.

65

[0058] La invención, por tanto, incluye mezclas de anticuerpos AFRA o fragmentos, comprendiendo dicha mezcla una composición heterogénea de fragmentos de anticuerpo que comprende o que consisten en:

5 i) fragmentos de anticuerpos divalentes que se unen específicamente al receptor alfa humano de folato, comprendiendo dichos fragmentos divalentes dos fragmentos Fab' unidos covalentemente que tienen cada uno una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de AFRA ilustrada en la figura 1 o 7 (SEQ ID NO: 1) o el equivalente funcional de dicha cadena ligera, y

10 ii) fragmentos de anticuerpos adicionales que comprenden al menos una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de AFRA ilustrada en la figura 1 o 7 (SEQ ID NO: 1) o el equivalente funcional de dicha cadena ligera,

comprendiendo el fragmento de anticuerpo divalente (i) al menos un 50 %, preferiblemente al menos un 60 % y mucho más preferiblemente al menos un 70 % de la composición. Preferiblemente, los fragmentos (ii) representan menos de un 20 % de la composición, mucho más preferiblemente menos de un 10 %.

[0059] Las especies bivalentes pueden ser dímeros naturales, unidos por enlaces de disulfuro entre las regiones bisagra de los fragmentos Fab' o pueden ser dímeros químicos tales como DFM-AFRA.

[0060] Por ejemplo, en condiciones de dimerización natural, aproximadamente un 80 % del producto de dimerización de AFRA se encuentra que es $F(ab')_2$ después de la purificación. La alta proporción de dímeros de unión a antígeno formados por los fragmentos AFRA de la invención constituye una ventaja adicional en comparación con el C4-Fab conocido. Los inventores han observado que se forma un pseudodímero durante la dimerización. Este pseudodímero está compuesto de dos cadenas ligeras unidas covalentemente a una cadena pesada y una segunda cadena pesada se mantiene en la estructura a través de interacciones hidrófobas. Como este pseudodímero puede resolverse en SDS-PAGE en dos especies, una de 75 kDa (L_2H) y otra de 25 kDa (cadena pesada), se llamó L_2H por motivos de simplificación. Durante la dimerización "natural" del C4-Fab', el dímero correcto, L_2H_2 , solamente representa aproximadamente un 30 % del producto de reacción mientras que el 70 % restante del material corresponde al dímero L_2H . No es posible purificar cromatográficamente el dímero C4 de su sucedáneo y como el porcentaje de pseudodímero es mucho mayor que el del dímero correcto, no es factible el desarrollo de la molécula C4 para radioinmunoterapia.

[0061] Para dímeros obtenidos por dimerización química, los fragmentos AFRA dan lugar a mezclas de producto de dimerización que tiene al menos un 50 % de $F(ab')_2$. Puede haber una especie L_2H presente, que representa menos de un 20 % de la composición, mucho más preferiblemente menos de un 10 % y existe una composición heterogénea en forma purificada si las dos formas no pueden separarse por métodos cromatográficos. A pesar de la presencia de la especie L_2H , las mezclas AFRA-DFM heterogéneas han demostrado tener alta afinidad de unión por el receptor alfa humano de folato, por ejemplo, con una KD de menos de 50 nM, preferiblemente de menos de 30 nM y mucho más preferiblemente de menos de 5 nM.

[0062] La fuerte tendencia de la cadena ligera C4 a reaccionar durante la formación de dímeros "naturales" es incluso más pronunciada durante la síntesis de dímeros químicos (DFM) y casi evita cualquier ensamblaje de dímeros, incluso cuando se ensayan varias condiciones de pH y temperatura. La reacción de dimerización química de C4 da un rendimiento de menos de un 5%, del cual solamente un 30 % aproximadamente es el dímero correcto. El porcentaje global de dímero obtenido al final de la reacción es, por tanto, diez veces inferior que para AFRA. Esta propiedad peculiar junto con la baja afinidad del C4-Fab, que no puede usarse como monómero, evita el desarrollo del fragmento de anticuerpo C4 para radioinmunoterapia.

[0063] Un aspecto adicional de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al receptor alfa de folato (FR α), donde dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o un equivalente funcional de la misma. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN; y puede ser bicatenario o monocatenario.

[0064] Esta invención también se refiere a un vector de expresión que comprende dicha secuencia de ácido nucleico, donde dicha secuencia codificante de ácido nucleico está unida de forma funcional a señales reguladoras de la transcripción, que permiten de ese modo la expresión de la cadena ligera AFRA en una célula hospedadora adecuada. El ácido nucleico puede comprender además una secuencia que codifica una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma, por ejemplo, en una disposición bicistrónica, que facilita la asociación natural de las cadenas ligera y pesada en la célula hospedadora.

[0065] La invención también se amplía a células hospedadoras que contienen un ácido nucleico que codifica la cadena ligera AFRA, por ejemplo, una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la invención. Las células hospedadoras pueden ser procariontas o eucariotas. Como un ejemplo de células hospedadoras procariontas, *Escherichia coli* es particularmente preferida. El ejemplo de células eucariotas adecuadas incluye células humanas, de primate, murinas o de levadura.

[0066] Una célula particularmente preferida es la cepa de *E. coli* depositada en el CNCM el 15 de marzo de 2006 según los términos del tratado de Budapest con el número de acceso CNCM I-3586. Este microorganismo (*Escherichia coli* cepa BW25113 Δ *PyrC::kan* (*lacI^f*, *rmB_{T14}*, Δ *lacZ_{WJ16}*, *hsdR514*, Δ *rhaBAD_{AH33}*, Δ *rhaBAD_{LD78}*)) contiene el plásmido DoB0134 y produce un Fab AFRA de la invención. El fragmento Fab AFRA que se puede obtener de esta cepa depositada también está dentro del alcance de la invención.

[0067] La invención también se refiere a un método para producir anticuerpos humanos de alta afinidad o fragmentos de los mismos, uniéndose específicamente dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos al receptor alfa de folato (FR α), donde dicho método comprende las etapas de:

- transfectar un vector de expresión como se describe anteriormente en una célula hospedadora adecuada;
- recuperar el anticuerpo AFRA expresado o el fragmento del mismo;
- opcionalmente mutar y/o dimerizar el anticuerpo recuperado o el fragmento del mismo.

[0068] La mutación del anticuerpo o del fragmento así expresado puede realizarse para añadir partes de bisagra o restos de cisteína, o puede usarse para ajustar o modular la afinidad y la especificidad del anticuerpo/fragmento.

[0069] En una realización, el vector de expresión se co-expresa en la célula con un segundo vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de anticuerpo o fragmento de la misma, estando dicho ácido nucleico unido de forma funcional a señales reguladoras de la transcripción.

[0070] Un método alternativo para producir los anticuerpos de la invención comprende las etapas de:

- construcción del repertorio V_HC_H humano; el repertorio humano se construye preferiblemente a partir de linfocitos B humanos, obtenidos de médula ósea, ganglios linfáticos, bazo o sangre periférica de pacientes con carcinoma de ovario, pero que están preferiblemente libres de la enfermedad en el momento de la construcción del repertorio o, como alternativa, de donantes sanos. El repertorio también puede generarse por síntesis.
- selección de una cadena pesada de anticuerpo humano que tiene la capacidad de unirse específicamente al receptor alfa de folato (FR α), realizándose dicha selección por selección guiada usando un fragmento de anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 como molde de guía sobre un repertorio V_HC_H humano, seguido por selección en células humanas que sobreexpresan α FR o en la proteína α FR soluble.
- expresión de un gen que codifica la cadena pesada de anticuerpo humano seleccionada junto con un gen que codifica la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en una célula hospedadora adecuada en condiciones que permiten el ensamblaje de dichas cadenas ligera y pesada.

En una realización, el gen que codifica la cadena pesada de anticuerpo humano seleccionada y el gen que codifica la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se expresan en la célula por un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de anticuerpo humano seleccionada y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 unidas de forma funcional a señales reguladoras de la transcripción.

[0071] En una realización alternativa, el gen que codifica la cadena pesada de anticuerpo humano seleccionada se expresa en la célula por un primer vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de anticuerpo humano seleccionado unida de forma funcional a señales reguladoras de la transcripción y el gen que codifica la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en la célula se expresa por un segundo vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera AFRA unida de forma funcional a señales reguladoras de la transcripción.

[0072] Este método permite la selección de diferentes cadenas pesadas que crean dominios de unión específicos para el receptor alfa de folato cuando se combinan con la cadena ligera AFRA. Se proporcionan detalles específicos de este tipo de método en los ejemplos a continuación.

[0073] Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de la invención, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En dicha composición, el anticuerpo o el fragmento del mismo puede conjugarse con un resto efector tal como un agente citotóxico, por ejemplo, un radionúclido tal como ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁸Re o con una toxina, o con un agente quimioterapéutico o con un profármaco o con una enzima, habitualmente usados unidos a anticuerpos. Puede usarse ⁹⁹Tc en aplicaciones de diagnóstico.

[0074] La invención también se refiere a un método para el diagnóstico o la formación de imágenes de carcinoma de ovario o metástasis del mismo, que comprende, por ejemplo, poner en contacto un tejido, o una muestra del mismo, de un sujeto con un anticuerpo o un fragmento de acuerdo con la invención, estando dicho anticuerpo o fragmento conjugado con un marcador adecuado tal como un radionúclido. El proceso de diagnóstico o de formación de imágenes puede realizarse *in vivo*, donde la detección de unión significativa del anticuerpo al tejido indica la presencia de sobreexpresión de receptor alfa de folato, lo que sugiere transformación maligna de las células. Como

alternativa, el proceso de diagnóstico o de formación de imágenes puede realizarse fuera del organismo, por ejemplo, *in vitro*, sobre una muestra biológica tal como una muestra tisular, obtenida del sujeto. En este último caso, la comparación del nivel de unión de los anticuerpos o los fragmentos de la invención con el nivel de unión observado con una muestra de tejido normal se recomienda para justificar la detección de cualquier expresión apical de receptor alfa de folato en células normales no transformadas de dicho tejido.

[0075] Se ilustran diversos aspectos de la invención en las figuras:

Figura 1: alineación de las secuencias de aminoácidos de cadena ligera C4 (SEQ ID NO: 12) y AFRA (SEQ ID NO: 1). La cadena ligera AFRA comprende 218 aminoácidos, de los cuales los primeros 113 aminoácidos constituyen la región variable kappa, y los 105 aminoácidos restantes representan la región constante kappa. Las diferencias principales entre los anticuerpos C4 y AFRA recaen en las CDR.

Figura 2: representación esquemática del vector de expresión bicistrónico DoB0134, adecuado para expresar Fab AFRA en *E. coli*. Este vector, que contiene las secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera AFRA ilustrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) y la cadena pesada AFRA (que incluye una mutación Q1N), contenida en *E. coli*, se depositó el 15 de marzo de 2006 en el CNCM con el número de acceso CNCM I-3586. BW25113 Δ PyrC::Kan (*lacI^f*, *rmBT14*, Δ *lacZ_{WJ16}*, *hsdR514*, Δ *rhaBA-D_{AH33}*, Δ *rhaBAD_{LD78}*).

Figura 3: (unión BIAcore): determinación de parámetros de unión de fragmentos de anticuerpo en el receptor alfa de folato. Para esto, se hicieron fluir varias concentraciones de monómero Fab (de 3 a 200 nM) en la celda del chip detector previamente recubierta con el receptor recombinante y se registró la unión durante 30 minutos. Después de este periodo de tiempo, se controló el lavado durante otros veinte minutos. Para AFRA la K_D se determinó en 43,9 nM con un χ^2 de 1,85 (panel A) mientras para C4 la K_D determinada fue 168 nM con un χ^2 de 2,19 (panel B).

Figura 4 (dimerización natural): el Fab AFRA y C4 se redujeron levemente y se oxidaron suavemente para obtener dímeros naturales. Los productos de reacción se analizaron por SDS-PAGE y los resultados se presentan en panel A superior para AFRA con su análisis de densitometría relativa, mientras que el panel B corresponde a C4. La generación de la especie L₂H se presenta en el dibujo del panel C.

Figura 5 (inmunohistoquímica): el anticuerpo monoclonal anti-CA125 se sondeó como control positivo interno en una biopsia humana correspondiente a un carcinoma de ovario (panel A). De la misma manera, se evaluó AFRA-DFM (0,5 μ g/ml) en el mismo tejido (panel B). Ambos anticuerpos se estimaron por FITC y el fondo en el portaobjetos C.

Figura 6 (biodistribución de AFRA-DFM-¹³¹I): el Di-Fab-maleimida radiomarcado con ¹³¹I se inyectó iv en ratones que albergaban tumor. Los animales se sacrificaron 1, 3, 6, 15, 24 y 48 horas después de la inyección. Se aisló el tumor, sangre y órganos predefinidos, se pesaron y se contaron para determinar la concentración del AFRA-DFM. El resultado de la biodistribución se presenta en la figura de abajo como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo.

Figura 7: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa AFRA (SEQ ID NO: 1) que muestra:

- la región variable (Vk) que se extiende entre los aminoácidos 1 a 113;
- regiones hipervariables confirmadas a partir de la estructura cristalina: CDR1 (aminoácidos 24 a 38), CDR2 (aminoácidos 54 a 60) y CDR3 (aminoácidos 93 a 102) (negrita, subrayado);
- región constante kappa (Ck) que se extiende entre los aminoácidos 114 a 219 (doble subrayado).

Figura 8: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (región variable) AFRA (SEQ ID NO: 2):

- región variable (Vk) que se extiende entre los aminoácidos 1 a 120;
- regiones hipervariables: CDR1 (aminoácidos 31-35), CDR2 (aminoácidos 50-66) y CDR3 (aminoácidos 99-110) (negrita, subrayado).

Figura 9: cadena pesada AFRA (región constante: IgG1 CH1) (SEQ ID NO: 8)

Figura 10: (receptor alfa de folato):

A: secuencia de aminoácidos del receptor alfa de folato (SEQ ID NO: 10):

- Secuencia señal: aminoácidos 1 a 24
- Secuencia receptora madura: aminoácidos 25 a 234
- Secuencia propep: aminoácidos 235 a 237, eliminada en la forma madura
- Sitios de glucosilación: aminoácidos 69, 161 y 201.

B: receptor alfa de folato soluble recombinante con la marca de purificación His6 (SEQ ID NO: 11).

Figura 11: eficacia *in vivo* de AFRA-DFM radiomarcado en tumores xenoinjertados en ratones a una dosis promedio de 1 mCi/ratón. Barras negras: tumor de células A431 transfectadas con receptor alfa humano de folato (A431 FR). Barras sombreadas de forma diagonal: tumor de células A431 no transfectadas con receptor alfa humano de folato (A431). Barras abiertas: control.

Figura 12: localización *in vivo* después de administración i.p. El AFRA-DFM radiomarcado con ¹³¹I se inyectó i.p. (dosis promedio = 0,074 mCi/ratón) en ratones que albergaban células tumorales IGROV1 que crecen i.p. Los animales se sacrificaron 1, 3, 6, 15 y 24 horas después de la inyección. Se aisló el líquido ascítico, masas tumorales i.p. sólidas, sangre y órganos predefinidos, se pesaron y se contaron para determinar la concentración de la AFRA-DFM. El resultado de la biodistribución se presenta como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo.

Figura 13: eficacia *in vivo* de AFRA-DFM radiomarcado en células de cáncer de ovario xenoinjertadas en ratones. A: supervivencia global de ratones a los que se ha inyectado i.p. células IGROV1, que sobreexpresan de forma natural

el receptor alfa humano de folato, y tratados i.p. en el día +2 con 1 mCi/ratón de ^{131}I -DFM AFRA o solución salina (control). B: supervivencia global de ratones a los que se ha inyectado i.p. células OVCAR3, que sobreexpresan de forma natural el receptor alfa humano de folato, y tratados i.p. en el día +2 o +4 con 1 mCi/ratón de ^{131}I -DFM-AFRA o solución salina (control).

5

Ejemplos

1. Producción de un fragmento Fab humano de alta afinidad específico por el receptor alfa de folato

10 [0076] Se hicieron modificaciones significativas al fragmento C4 Fab para obtener un fragmento Fab humano con características de unión mejoradas, incluyendo afinidad de unión aumentada. Estas modificaciones se describen a continuación:

a) Reordenamiento de cadena: selección de una cadena ligera kappa específica para el receptor alfa de folato

15

[0077] Primero se decidió sustituir la cadena ligera lambda C4 con una kappa. La sustitución de la cadena ligera Fab se realizó como se describe previamente para el fragmento C4 por selección guiada de presentación en fagos (¹¹).

20 [0078] Específicamente, se generó una biblioteca de cadenas ligeras kappa de anticuerpo (VkCk) a partir de linfocitos B humanos.

[0079] La biblioteca se obtuvo de ARNm combinado de linfocitos de sangre periférica obtenidos de cuatro mujeres que habían tenido previamente carcinoma de ovario, pero que estaban libres de enfermedad en el momento de la extracción de la sangre. Las mujeres habían tenido un estado libre de enfermedad durante varios años antes de la recogida de sangre. Tres de las mujeres habían tenido carcinoma de isotipo seroso, diagnosticadas en la fase III o IV de la enfermedad. La cuarta paciente había tenido carcinoma de ovario de isotipo endometriode, diagnosticado en fase III. Se recogieron entre $2,0 \times 10^7$ y $5,0 \times 10^7$ PBMC de cada paciente para la preparación de la biblioteca. Cada familia de cadenas se había amplificado por separado por pares de cebadores apropiados para compensar la eficacia específica de PCR de acuerdo con la temperatura de hibridación de los cebadores.

25

30

[0080] El repertorio VkCk único así obtenido no era un repertorio virgen, ya que las pacientes habían estado expuestas previamente a sobreexpresión del antígeno del receptor alfa de folato. Contenía potencialmente genes de anticuerpos desarrollados contra el tumor específico y posiblemente contra el receptor alfa de folato expresado en mujeres con dicha enfermedad.

35

[0081] La biblioteca así obtenida se usó para seleccionar una nueva cadena ligera compatible con la pesada C4. Como los inventores estaban buscando un fragmento de anticuerpo que compartiera la misma especificidad por el receptor alfa de folato que la molécula C4, se aplicó un protocolo de selección guiada. Después de tres pases de paneo sobre células de carcinoma de ovario (células OVCAR-3), usando la cadena pesada C4 como molde de guía para seleccionar una nueva cadena ligera kappa, se recogieron varios fagos de forma aleatoria y se evaluaron para su capacidad de unión en estas células. El de mejor unión se identificó y se llamó AFRA (anti receptor alfa de folato) y se secuenció su cadena ligera.

40

[0082] La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa seleccionada se presenta en la figura 1. AFRA y el fragmento C4 tiene la misma cadena pesada, con la excepción de una mutación Q1N introducida en el primer aminoácido de la cadena pesada AFRA, como se presenta en el ejemplo 1C.

45

b) Expresión de Fab en *E. coli*

50

[0083] Después se prepararon construcciones de expresión adecuadas para la expresión del fragmento AFRA Fab y el fragmento C4 Fab en *E. Coli*: se clonaron los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de AFRA o C4 en fase con secuencias líder (líder de StII derivado de la enterotoxina II termoestable de *E. Coli*) para dirigir la síntesis de fragmentos al compartimento periplásmico de *Escherichia coli*. El vector de expresión se diseñó especialmente para fermentación, que contiene una construcción bicistrónica que codifica tanto la cadena ligera como la pesada bajo el control del promotor de arabinosa araP junto con un marcador de selección pyrC que codifica la dihidroorotasa (el casete de expresión básico se describe en la solicitud de patente europea EP 05109274.0 presentada en nombre de Dompe S.p.a. el 6 de octubre de 2005 y en el documento WO 2007/039632). El vector bicistrónico se diseñó para que expresara un ligero exceso de la primera cadena (ligera), en comparación con la expresión de la segunda cadena (pesada) porque en el presente caso, la cadena pesada, cuando se expresa en solitario puede ser tóxica para *Escherichia coli*.

55

60

[0084] El vector que expresa AFRA se denomina DoB0134 (véase la figura 2) y se ha depositado en el CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 París Cedex 15, el 15 de marzo de 2006, en *Escherichia coli* cepa BW25113 Δ PyrC::Kan (*lac^f*, *rmB_{T14}*, Δ *lacZ_{WJ16}*, *hsdR514*, Δ *araBA-D_{AH33}*, Δ *rhaBAD_{LD78}*)) con el número de acceso CNCM I-3586. Esta cepa expresa la cadena

65

ligera AFRA con la modificación N-terminal descrita en el Ejemplo 1c y una cadena pesada que incluye la región bisagra natural.

[0085] El vector de expresión DoB0134 se transformó en *Escherichia coli* y el fragmento de anticuerpo AFRA se expresó y se purificó. Con fines comparativos, se realizaron experimentos análogos usando la construcción correspondiente que expresa el C4 Fab conocido.

[0086] Durante la producción de C4, se observó acumulación significativa de homo dímero de cadena ligera (L_2), que representa hasta un 50 % de la síntesis de proteína recombinante. Esto puede deberse parcialmente al diseño del vector de expresión que expresa un ligero exceso de la primera cadena, en comparación con la expresión de la segunda cadena. Sin embargo, este vector de expresión se ha usado para producir varios Fab diferentes y nunca se ha observado producción de homo dímero de cadena ligera con otras secuencias. Este homo dímero L_2 es un subproducto inservible del microorganismo que representa una desventaja considerable en el proceso de producción. De hecho, influye mucho sobre el metabolismo del hospedador, es difícil de separar del Fab' útil, no tiene ninguna capacidad de unión diana y se produce en lugar del fragmento deseado.

[0087] Por el contrario, el AFRA Fab de la invención no produce ningún homo dímero detectable de cadena ligera a partir del mismo vector de expresión y a partir de la misma cepa de *Escherichia coli*. Por lo tanto, el rendimiento de producción global se aumenta artificialmente y se reducen fuertemente las capacidades de la columna cromatográfica ya que no hay competición por la unión a la resina entre el fragmento Fab' de interés y el homo dímero de cadena ligera.

[0088] Se evaluó la especificidad del AFRA Fab usando FACS. Se registró desplazamiento de la fluorescencia solamente con células que expresaban el receptor alfa humano de folato.

c) Modificación del AFRA con mutación Q1N N-terminal:

[0089] Como resultado del protocolo de selección guiada inicial usando la cadena pesada de C4 como molde de guía, AFRA y el fragmento C4 originalmente tenían la misma cadena pesada, cuyo primer aminoácido era una glutamina. Sin embargo, se sabe que la glutamina en esta posición puede estar sometida a conversión en un ácido piroglutámico⁽¹⁹⁾ que genera heterogeneidad de producto. La glutamina N-terminal, por lo tanto, se sustituyó con asparagina usando mutagénesis dirigida al sitio. Dicho reemplazo reduce la longitud de la cadena lateral del aminoácido en un carbono, evitando su ciclación. Se realizó una mutagénesis dirigida al sitio para modificar el codón de triplete de ADN correspondiente al primer aminoácido de la cadena pesada AFRA y convertirlo en el resto de asparagina deseado.

[0090] La mutación dirigida al sitio se confirmó secuenciando el gen completo para verificar que, con la excepción de esta mutación, no se habían insertado otras mutaciones inesperadas durante la amplificación por PCR. La proteína correspondiente se produjo y purificó hasta homogeneidad. Este análisis de HPLC en fase inversa en el tiempo sobre una columna de difenilo reveló un único pico a cualquier pH correspondiente a una especie única. Esto se confirmó por análisis de masas por electronebulización donde el peso molecular de AFRA estaba de acuerdo con el calculado a partir de su estructura primaria.

2. Características de unión del fragmento AFRA Fab al receptor alfa humano de folato:

[0091] Se evaluó el nuevo fragmento Fab humano AFRA para su capacidad de unirse al receptor alfa humano de folato y se comparó su unión a la unión de C4. Se realizó el análisis cinético por resonancia de plasmón con equipo BIAcore (Pharmacia) usando receptor alfa humano de folato recombinante soluble como proteína diana (véase la figura 8).

a) Purificación de la isoforma alfa soluble del receptor de folato (α FR)

[0092] Se construyó una línea celular de ovario de hamster chino (CHO-K1) que expresaba la isoforma alfa del receptor de folato (α FR). Para facilitar la purificación, se subclonó el gen de α FR soluble en el vector de expresión pIRESneo para expresar la isoforma alfa marcada con His soluble de la glucoproteína receptora de folato. Para generar una proteína soluble y por la técnica de PCR usando pares de cebadores oportunos, se diseñó una forma acortada de α FR, que termina en la posición del aminoácido 234, para eliminar la parte carboxi-terminal del receptor que mediaba el anclaje de la proteína a la membrana plasmática (anclaje GPI).

[0093] Los cebadores de PCR se diseñaron para que poseyeran el sitio de restricción, la mitad de EcoRV en el cebador directo y EcoRI en el cebador inverso, que son compatibles con los sitios de restricción de clonación múltiple del vector pIRES-neo. Los productos de PCR se purificaron usando el kit de extracción de gel Quiaex (Quiagen) y se digirieron con EcoRI. Después, los productos de digestión se purificaron y ligaron durante una noche al vector pIRES-neo digerido con EcoRI y EcoRV y desfosforilado usando el sistema de ligamiento T4 (Biolabs). Las muestras ligadas se transformaron en *Escherichia coli* DH5 α y se sembraron en las placas de LB-agar ampicilina.

[0094] Se recogieron varias colonias amp^R y se comprobaron usando la técnica de PCR. Se seleccionó un clon que mostraba el patrón correcto para la extracción de ADN y estudios de expresión. La secuencia de ADN del vector de expresión se confirmó usando secuenciación automática.

5 [0095] El vector de expresión entonces se transfeció en células CHO y se seleccionaron los clones estables a través de resistencia a neomicina. Entre ellos, el mejor clon productor se confirmó por análisis de transferencia de Western del sobrenadante de cultivo y la producción se aumentó en escala hasta 1 litro. El sobrenadante de cultivo se aclaró por centrifugación a 10 000 x g durante 15 min para separar el sobrenadante de las células y se filtró a 0,22 µm y se realizó la purificación a 4 °C mientras todos los tampones contenían Tween-20 al 0,05 %.

10 [0096] La proteína receptora de folato se purificó del sobrenadante del siguiente modo. En la primera etapa, se concentró la glucoproteína marcada con His con cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) usando Sepharose Fast Flow quelante de Ni⁺⁺ cargada (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) según se describe. El sobrenadante de cultivo de células CHO se aplicó a la columna preequilibrada con fosfato 20 mM, NaCl 0,15 M pH 7,0 al caudal de 5 ml/min. Después de todo, el sobrenadante se aplicó a la columna, que se lavó con el tampón de inicio hasta que la $A_{280\text{ nm}}$ en el eluyente volvió a la medida inicial. La proteína se eluyó con el mismo tampón que contenía 0,5 M de imidazol. El pico de $A_{280\text{ nm}}$ se recogió para la siguiente etapa. En este punto, la molécula de folato endógena se disoció del αFR disminuyendo el pH hasta 3,0 por adición gota a gota de HCl 1 M y se agitó en un baño de hielo durante 1 h. A continuación, la muestra se sometió a intercambio de tampón en una columna G-25 Sephadex (HiPrep 26/10 desalting Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) con fosfato 20 mM, NaCl 0,15 M pH 7,0. Finalmente, la muestra se pasó lentamente (0,5 ml/min) a través de una columna de 2 ml de ácido fólico-Sepharose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) equilibrada con 5 CV de fosfato 20 mM, NaCl 0,15 M pH 7,0. El flujo directo se recogió para el análisis. Después de lavar la columna con el tampón de equilibrado, el αFR se eluyó de la resina de afinidad con glicina 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 2,8.

25 [0097] Las fracciones se recogieron en un tubo de ensayo de polipropileno que contenía 50 ml de fosfato sódico 1 M pH 7,0 para elevar el pH del eluyente hasta 7,0. La pureza del αFR en esta preparación se determinó por electroforesis en gel de SDS (15 %) poliacrilamida (PAGE) en condiciones no reductoras de acuerdo con el método de Laemmli (13) y el gel se tiñó para las proteínas con azul brillante de *Coomassie*. Las fracciones que parecían un 100 % puras se combinaron y se sometieron a una determinación de concentración de proteínas usando el kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad Richmond, CA) usando BSA como patrón (14). El αFR purificado se almacenó a -25 °C en pequeñas alícuotas.

b) Medición de afinidad

35 [0098] La proteína diana se recubrió sobre un chip detector C5 BIAcore y se usaron varias concentraciones de ambos fragmentos de anticuerpo para determinar la cinética de unión. En particular, el FR recombinante se unió covalentemente a un chip detector CM5 usando el kit de acoplamiento de amina (Pharmacia) con una concentración de antígeno de 0,6 µl en acetato de sodio 10 mM, pH 4,8 produciendo una superficie de 280 UR. Los grupos activados residuales se bloquearon por inyección de 35 µl de etanolamina (1,0 M pH 8,5). Las constantes de velocidad de disociación cinética aparentes (K_{off}) se calcularon en condiciones de saturación de anticuerpo de 200 nM a 3.125 nM, con un caudal de tampón de 50 µl/min usando el programa asistente. La evaluación se realizó durante al menos 30 minutos. Posteriormente, se realizó el desprendimiento del anticuerpo residual unido al chip detector con tampón glicina 100 mM pH 2,7.

45 [0099] Las afinidades respectivas se dedujeron a partir de las curvas de unión. Tanto C4 como AFRA fueron capaces de unirse al antígeno inmovilizado. Sin embargo, la K_D calculada (43,9 nM) de AFRA fue más de 3 veces inferior a la de C4 (168 nM), lo que indica una mayor afinidad. Los resultados se presentan en la figura 3. La cinética de unión del monómero AFRA muestra una velocidad de asociación muy elevada pero también una constante de disociación elevada, que a veces puede ser una desventaja para un anticuerpo destinado a radioinmunoterapia, ya que, una vez que el anticuerpo se une al tumor, su efecto de larga duración es esencial para una eficaz irradiación del tumor.

3. Producción de dímero natural F(ab')₂ y características de unión *in vitro* de F(ab')₂

a) dimerización natural

60 [0100] Para ralentizar la velocidad de disociación de AFRA Fab, y para aumentar adicionalmente la avidéz del fragmento, se decidió dimerizar el fragmento Fab. Para hacerlo, se añadió el pentapéptido DKTSC, correspondiente a la secuencia bisagra natural de la familia de Gamma1 humana, al extremo carboxi-terminal de ambas cadenas pesadas AFRA y C4, dando lugar a un fragmento denominado Fab' (es decir, Fab con una cisteína libre adicional en el extremo carboxi-terminal que pertenece a la región bisagra). A partir de este formato Fab' entonces fue posible obtener un dímero F(ab')₂ por la oxidación natural del resto de cisteína libre intencionadamente añadido al extremo carboxi-terminal de la cadena pesada del anticuerpo⁽²⁰⁾ y correspondiente a la primera cisteína de la región bisagra del anticuerpo de longitud completa natural.

65

[0101] Ambos fragmentos AFRA y C4 se incubaron en TCEP (clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina) en condiciones suaves para reducir la cisteína de la cadena pesada carboxi-terminal, se intercambiaron los tampónes para eliminar el agente reductor y se ajustó el pH a 8, en el que se sabe que está químicamente favorecida la formación de enlace disulfuro.

5

[0102] Los dímeros se separaron de la mezcla de reacción por cromatografía de filtración en gel donde se resolvieron como un pico único. El análisis de SDS-PAGE reveló que las preparaciones de dímero no eran tan homologas como las que se esperarían y los picos originaban varias bandas en el gel:

- 10 - Para el fragmento AFRA la banda principal, que representa un 80 % del material, migraba como se esperaba en el intervalo de 100 kDa y se asignó al dímero AFRA. Otra banda, que representa un 16 % del material completo, con un peso molecular aparente de 75 kDa podía detectarse y se atribuyó a un "dímero" compuesto de un monómero normal unido covalentemente a otra cadena ligera Fab (L₂H). Este "dímero" se producía por el ataque inusual de la cisteína carboxi-terminal del primer monómero en la cisteína carboxi-terminal de la cadena ligera de un segundo monómero Fab. Esta cisteína de la cadena ligera es el normalmente implicado en el enlace disulfuro con la cadena pesada y, por lo tanto, no puede estar disponible para la formación de ningún otro enlace disulfuro. Como en el dímero resultante la cadena pesada Fab ya no está unida covalentemente al resto de la molécula, y solamente interactúa a través de interacciones de Van der Waals e hidrófobas con la cadena ligera, esta entidad eluye como un dímero normal durante la purificación de filtración en gel que se ejecuta en condiciones nativas, pero se resuelve como dos bandas durante el análisis de SDS-PAGE donde la concentración de detergente (SDS) es suficiente para descomponer la molécula (figura 4). De hecho, en este carril, junto con L₂H, puede detectarse otra banda correspondiente a la cadena pesada no unida covalentemente extraída del dímero sucedáneo en la parte inferior del gel y representa un 4 % del material global.
- 15
- 20
- 25 - En el caso del C4 Fab, la situación fue sorprendentemente incluso peor, ya que esta vez en SDS-PAGE la banda principal (un 43 % del material completo) correspondía al compuesto L₂H o, en otras palabras, la impureza de la reacción AFRA ahora se había convertido en el producto más abundante de la reacción de dimerización de C4. El dímero unido covalentemente representaba solamente un 29 % del material completo y la cadena pesada separada en SDS un 25 % de la mezcla.
- 30 Este análisis se confirma adicionalmente por investigación de CL de masas que era capaz de identificar de forma inequívoca todas las especies presentes en el material obtenido después de la purificación de filtración en gel.

En condiciones acuosas nativas, las diferencias en el comportamiento cromatográfico entre el dímero correcto y la impureza, correspondiente al "dímero" con la cadena pesada no unida covalentemente, pueden usarse para separar las dos especies. Los inventores intentaron de forma insatisfactoria separar ambas especies por cromatografía de intercambio iónico o interacciones hidrófobas para intentar obtener un dímero puro. Los inventores también intentaron, sin éxito, eliminar la impureza del dímero por desnaturalización térmica selectiva.

35

b) ELISA: unión directa al receptor alfa de folato de F(ab')₂

40

[0103] Después se ensayaron los dos dímeros F(ab')₂ para la unión, en un formato ELISA, directamente en una línea celular A431 transfectada con el receptor alfa humano de folato, y en líneas de carcinoma de ovario humano OVCAR3 y células IGROVI.

45

[0104] Se sembraron 4 x 10⁴ células (líneas celulares de carcinoma de ovario humano OVCAR3 e IGROVI (una aportación del Dr. J. Bénard, Institut Gustave Roussy, Villejuif, Francia) y células A431-FR⁽¹⁷⁾ que son células de carcinoma epidermoide humano transfectadas con receptor alfa de folato) en cada pocillo de una placa de formato de 96 pocillos, y se cultivaron hasta que se obtuvo una monocapa confluyente. Las células se fijaron, durante 5 minutos, a temperatura ambiente con glutaraldehído al 0,1 % en PBS. Las placas se lavaron dos veces con PBS, después una vez (5 minutos) con glicina 0,1 M en PBS + NaN₃ al 0,02 %, sucesivamente cinco veces con PBS y finalmente con PBS que contenía BSA al 1 % y NaN₃ al 0,02 %.

50

Se permitió que las diluciones en serie de los fragmentos de anticuerpo (C4 o AFRA) se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS + BSA al 0,03 % y se lavaron tres veces con PBS.

55

Se usó un anticuerpo anti-IgG humana (específico de Fab, Sigma) conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 en PBS + BSA al 0,03 % para revelar la unión de los fragmentos de anticuerpo. La placa ELISA se reveló con la adición de 100 µl de solución TMB (Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se detuvo por la adición de 50 µl de solución H₂SO₄ (1 M) y se leyó a 450 nm.

60

[0105] Como no pudo detectarse ninguna señal en las células simuladas A431 que son células transfectadas con el vector vacío, en comparación con las células transfectadas con FR-alfa, ambos anticuerpos AFRA y C4 se consideraron específicos para el receptor alfa de folato. Ambos fragmentos mostraron casi las mismas afinidades globales en el intervalo nanomolar bajo, potencias compatibles con un uso en radioinmunoterapia (obsérvese, sin embargo, que el C4 F(ab')₂ está tan altamente contaminado con el pseudodímero L₂H que sus usos prácticos, particularmente en radioinmunoterapia, no son factibles). La tabla I presenta la determinación por ELISA de los valores K_D de F(ab')₂ de fragmentos de anticuerpos C4 y AFRA. La K_D se determinó como la concentración a la que se obtiene la mitad de la señal estable de ELISA.

65

TABLA I

| F(ab') ₂ | K _D (nM) | | |
|---------------------|---------------------|-----------|----------|
| | OVCAR3 | A431-FR | IGROV1 |
| C4 | 11 ± 2 | 1,2 ± 0,1 | 118 ± 64 |
| AFRA | 26 ± 10 | 2,5 ± 0,7 | 57 ± 21 |

4. Dimerización química de Fab' y característica de unión *in vivo*:

5 [0106] Se realizaron ensayos *in vivo* para verificar la especificidad y localización tumoral. Sin embargo, *in vivo*, el puente disulfuro que mantiene juntas las dos mitades de la molécula F(ab')₂ se hidroliza rápidamente y el F(ab')₂ se reconvierte rápidamente en un fragmento Fab' y se elimina del torrente sanguíneo. La dimerización química, como se describe a continuación, se realiza, por lo tanto, para mantener el formato F(ab')₂ *in vivo*.

10 a) Dimerización del factor Fab' con bismaleimida (BMOE)

15 [0107] Para conservar el formato F(ab')₂ *in vivo*, se usó un conector hidrolizable que conecta los dos Fab' que forman el F(ab')₂⁽²¹⁾. Más específicamente, se identificó un conector de bismaleimida etano (BMOE) para dimerizar el fragmento Fab'⁽²²⁾ en un Di Fab' maleimida (DFM). Ambos fragmentos AFRA y C4 Fab' se sometieron a este tratamiento y se ensayaron en un experimento de biodistribución *in vivo* para identificar el mejor candidato para desarrollo clínico.

20 [0108] La dimerización química de Fab' en DFM ya se ha informado en la bibliografía. Esta reacción química se basa en la capacidad única de los restos de cisteína de reaccionar específicamente con el heterociclo maleimida. La reacción química da lugar a la formación de un enlace químico entre los restos de cisteína y la maleimida. En el presente caso, la cisteína libre única en la proteína Fab' estaba en el extremo carboxi-terminal de la cadena pesada de Fab'. Por lo tanto, el ataque de maleimida era específico de sitio y en el lado opuesto del sitio de unión al receptor de folato.

25 [0109] La proteína se incubó con 70 moles de TCEP (clorhidrato de Tris(2-carboxietil fosfina)) por mol de Fab' durante 5 horas a temperatura ambiente para reducir el resto de cisteína carboxi-terminal de la cadena pesada. El TCEP se eliminó por cromatografía de desalación HiPrep 26/10 (General Electrics) previamente equilibrada en MES 40 mM pH 6,0. La proteína se concentró hasta 8 mg/ml y se incubó con agitación suave a TA durante 2,5 horas para permitir que el enlace disulfuro presente entre las cadenas Fab' se reoxide. La cinética de la reacción se controló por análisis de RP-HPLC. El conector BMOE (Sigma) se añadió a la solución de proteína (1 mg/ml en DMSO) en una relación molar de 0,35 conector/proteína y se incubó durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave.

30 [0110] Para eliminar el F(ab')₂ natural, la mezcla de reacción se redujo de nuevo con 70 moles de TCEP por mol de Fab' durante 3,5 horas a temperatura ambiente. El dímero se purificó en columna HiPrep Sephacryl S100 HR, previamente equilibrada con MES 40 mM pH 6,0. La proteína se analizó por SDS-PAGE y se cuantificó por Bradford.

35 [0111] Con esta estrategia se obtuvo AFRA-DFM con casi la misma cantidad de impureza L₂H. Sorprendentemente, sin embargo, fue prácticamente imposible obtener ningún C4-DFM correcto. Se estimó, por filtración en gel después de reducción de disulfuro para desprenderse del dímero "natural", que solamente un 4 % de las moléculas C4 reacciona con el conector para formar el DFM. El protocolo se repitió varias veces con el C4 Fab' y se usaron diferentes condiciones, pero los inventores nunca consiguieron obtener concentraciones mayores de dímero. La reacción se siguió etapa por etapa por análisis de masas y se demostró que la reacción no continuaba después de la adición de una molécula BMOE en el Fab'. El conector probablemente estaba reaccionando de una manera inesperada, probablemente debido a la cadena ligera lambda de C4 que constituye la única diferencia entre los fragmentos AFRA y C4 Fab'. Por el contrario, en las mismas condiciones siempre se observó dimerización para el resto AFRA (tabla II).

TABLA II

| Fragmento de anticuerpo | % global de dimerización | Porcentaje de producto del pico de dímero analizado por SDS-PAGE | | | | | |
|---------------------------|--------------------------|--|--------------------------------------|------------------|--------|------|----------------|
| | | PM alto | Dímero L ₂ H ₂ | L ₂ H | 60 kDa | Fab' | Cadena libre H |
| F(ab') ₂ -C4 | 65 | - | 29 | 43 | - | - | 25 |
| F(ab') ₂ -AFRA | 61 | - | 80 | 16 | - | - | 4 |
| DFM-C4 | 4 | 3 | 34 | 17 | 17 | 14 | 15 |
| DFM-AFRA | 44 | 10 | 48 | 17 | - | 17 | 8 |

50 [0112] A partir de esta tabla puede observarse que con C4 puede caracterizarse un producto inesperado a 60 kDa, pero que el resto de la reacción de dimerización da lugar a casi los mismos productos en las mismas cantidades. Puede observarse una diferencia significativa entre AFRA y C4 con respecto al porcentaje de dímero obtenido al final de la reacción con más de un factor 10 entre las dos moléculas a favor de AFRA.

55

b) Ensayo de inmunohistoquímica en muestras de biopsia

[0113] Los ensayos presentados anteriormente se realizaron *in vitro* sobre células transfectadas o líneas celulares de carcinoma de ovario. Sin embargo, las diferentes líneas celulares pueden expresar cada una diferentes cantidades y diferentes variantes de glucosilación del receptor. Por lo tanto, es importante ensayar los dímeros Fab en un contexto *in vivo*. Se ensayó AFRA en un ensayo de inmunohistoquímica para su capacidad de reconocer *in situ* el receptor alfa de folato expresado a partir de un carcinoma de ovario.

[0114] El dímero AFRA-DFM se marcó con FITC *in vitro*, y se prepararon muestras de biopsia para la tinción. Específicamente, se cortaron secciones congeladas de muestras de biopsia, de 5 mm de grosor, se secaron y se fijaron en acetona fría durante 5 minutos. El exceso de acetona se eliminó lavando los portaobjetos en PBS (pH 7,4) y después secando al aire. Las secciones de criostato se bloquearon con BSA al 3 %, suero humano al 10 % en leche desnatada al 3 % durante 60 minutos a temperatura ambiente. El fragmento de anticuerpo DFM-AFRA marcado con FITC se incubó primero, durante una noche a 4 °C, a tres diluciones diferentes.

[0115] Se realizó lavado con tampón de autotinción. Se añadió un mAb anti-FITC (de conejo, dilución 1:200) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron sucesivamente con un tampón de autotinción. Después, se añadió un mAb de cerdo anti-Ig de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:80) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con un tampón de autotinción. Sucesivamente, se añadió tampón Red (proporcionado por Vector), se lavó, y el último lavado se hizo en agua destilada. Se añadió hematoxilina, durante 15 segundos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron en agua corriente, se deshidrataron, se aclararon y se montaron para la observación en microscopio.

[0116] AFRA-DFM de nuevo fue capaz de localizarse en el área tumoral y no teñir ningún tejido sano adyacente (figura 5), lo que confirma la especificidad del dímero AFRA-DFM en un contexto *in vivo*.

c) Biodistribución *in vivo*

[0117] Habiendo demostrado la especificidad de AFRA-DFM, se realizó un experimento de biodistribución. Para este objetivo, la macromolécula se radiomarcó con yodo¹³¹ por los tubos de yodación recubiertos previamente con yodogen usando el método de Chizzonite, esencialmente como se describe por el fabricante (Pierce) usando reactivos de calidad clínica libres de pirógenos⁽¹⁷⁾. El método de Chizzonite posibilita conservar mejor la integridad de la funcionalidad de la molécula; de hecho, el producto radiomarcado final, a una actividad específica de 5 mCi/mg, mostró una inmunorreactividad media de al menos un 65 %. El AFRA-DFM marcado con ¹³¹I se inyectó en sangre animal.

[0118] En varios momentos predeterminados después de la inyección se sacrificaron los animales, se aislaron los órganos, se pesaron y se contaron para determinar la cinética de la acumulación de radiactividad y la eliminación en cada uno de ellos. Los tejidos normales se usaron como referencias frente al tumor que se había implantado previamente bajo la piel del animal.

[0119] Más específicamente, se obtuvieron ratones CD1 *nu/nu* (atímicos) hembra a las 5-6 semanas de edad de Charles River Laboratories (Calco, Italia). Después de 1 semana de aclimatación, los ratones se xenoinjertaron por vía subcutánea con 3,4 x 10⁶ células A431 transfectadas con el receptor alfa humano de folato o con células A431t simuladas en 0,1 mL de NaCl al 0,9 %. De dos a tres semanas después de la inyección de las células tumorales, los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos y se les inyectó por vía intravenosa en la vena lateral de la cola el fragmento de anticuerpo radiomarcado (¹³¹I-DFM-AFRA5.3). El experimento se realizó con este radioisótopo y los detalles se presentan en la tabla III a continuación:

Tabla III

| Tumor xenoinjertado examinado | A431 FR |
|---|-------------------------------------|
| Tamaño del grupo por tiempo | 4 |
| Actividad específica (mCi/mg) | 5,0 |
| Dosis inyectada total (μCi)/animal | 30,0 |
| Dosis inyectada total (μg)/animal | 6,0 |
| Puntos temporales evaluados d.i. para biodistribución (h) | 1, 3, 6, 15, 24, 48 |
| Puntos temporales evaluados d.i. para farmacocinética (h) | 10 min, 30 min, 1, 3, 6, 15, 24, 48 |

d) Radiolocalización

[0120] Después de la disección, los tumores y otros tejidos/órganos (bazo, riñón, hígado, vejiga con orina, esternón, corazón y músculo) se recogieron y se pesaron en húmedo. Se evaluó la radiactividad asociada con cada tejido con un contador gamma con patrones internos (5 y 10 μl de la solución inyectada).

[0121] Los resultados se presentan en la figura 6 y se expresan como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) y se compensan para la extinción de la radiactividad. De esta manera, la normalización permite la comparación directa de órganos o de animales. Para radioinmunoterapia, la molécula ideal tendrá una alta acumulación con un tiempo duradero en el tumor y el fondo más bajo posible en tejidos sanos.

[0122] El resultado de este experimento de biodistribución demuestra que AFRA-DFM se acumula específicamente en el tumor. Los valores elevados correspondientes a vejiga y a orina se corresponden bien con la excreción esperada de DFM y validan la ruta de desintoxicación. Como se esperaba, DFM se acumula en el tumor donde, seis horas después de la inyección, su concentración empieza a ser superior a la concentración medida en otros órganos.

Demostración preliminar de la eficacia *in vivo* de AFRA-DFM radiomarcado

[0123] Habiendo demostrado que el fragmento de anticuerpo radiomarcado ¹³¹I-DFM-AFRA se acumulaba específicamente en el tumor que expresa de forma ectópica FR (A431FR), se evaluó su capacidad de controlar el crecimiento del tumor. La dosis inyectada total se definió de acuerdo con la farmacocinética.

[0124] La macromolécula se radiomarcó con yodo¹³¹ y se inyectó en el torrente sanguíneo en animales que albergaban células tumorales implantadas por vía subcutánea.

[0125] Más específicamente, se obtuvieron ratones CD1 *nu/nu* (atímicos) hembra a las 7 semanas de edad de Charles River Laboratories (Calco, Italia). Después de una semana de aclimatación, los ratones se xenoinjertaron por vía subcutánea con $3,5 \times 10^6$ células A431 transfectadas con receptor alfa humano de folato (A431 FR) o con células A431t simuladas en 0,1 mL de NaCl (solución salina) al 0,9 %. Una semana después de la inyección de las células tumorales, los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos y se les inyectó por vía intravenosa en la vena lateral de la cola 0,3 mL del AFRA-DFM radiomarcado en solución salina o solución salina solamente como control. El crecimiento del tumor se controló cada 2-3 días y se midió por un calibre; el volumen del tumor se determinó de la siguiente manera: $D \times d^2 \times 1/6 \times \pi$ donde D = diámetro mayor, d = diámetro menor. Se realizaron tres experimentos independientes y los detalles se presentan en la tabla IV a continuación:

Tabla IV

| Tumor xenoinjertado examinado | A431 FR y A431 simulado |
|---|-------------------------|
| Número de experimentos independientes | 3 |
| Tamaño del grupo por tratamiento | 6-7 |
| Actividad específica media (mCi/mg) | $4,87 \pm 0,57$ |
| Dosis radiactiva inyectada total (μ Ci)/animal | 1002 ± 80 |
| Proteína inyectada total (μ g)/animal | 211 ± 35 |

[0126] Los resultados se presentan en la figura 11 y se expresan como el porcentaje de crecimiento del tumor respecto al control tratado con solución salina solamente. El AFRA-DFM radiomarcado con ¹³¹I se inyectó en ratones que albergaban tumor a una dosis promedio de 1 mCi/ratón. El crecimiento del tumor se controló cada 2-3 días después de la inyección. Los resultados del retardo del crecimiento del tumor, registrados en tres experimentos independientes, se presentan en la figura 11 como el porcentaje medio de crecimiento del tumor respecto al control respectivo. En cada experimento, se comparó el volumen medio en cada grupo tratado, es decir, A431FR o A431 simulado, con el volumen medio del grupo de control respectivo. Los resultados de estos experimentos de eficacia demuestran que AFRA-DFM radiomarcado retarda específicamente el crecimiento de los tumores que expresan el antígeno diana de interés (A431 FR) pero no de tumores irrelevantes (A431 simulado) y que el porcentaje de reducción del tumor era significativo tanto a los 11 como a los 16 días después del tratamiento ($p=0,006$ y $p=0,05$, respectivamente).

Localización de AFRA-DFM radiomarcado en células de carcinoma de ovario que crecen como tumores *i.p.*

[0127] Habiendo demostrado que el fragmento de anticuerpo radiomarcado ¹³¹I-DFM-AFRA después de inyección *i.v.*, era capaz de acumularse específicamente y controlar el crecimiento del tumor que expresa de forma ectópica FR (A431 FR), se evaluó su capacidad de localizarse en células de carcinoma de ovario, que sobreexpresan de forma natural el receptor de folato. Se inyectó ¹³¹I-DFM-AFRA en la cavidad peritoneal en animales que albergaban células de carcinoma de ovario implantadas por vía intraperitoneal, un modelo que imita el crecimiento natural y la diseminación del cáncer epitelial de ovario humano.

[0128] Más específicamente, se obtuvieron ratones CD1 *nu/nu* (atímicos) hembra a las 7 semanas de edad de Charles River Laboratories (Calco, Italia). Después de 1 semana de aclimatación, los ratones se xenoinjertaron por vía intraperitoneal con $8-10 \times 10^6$ células IGROV1, que sobreexpresan el receptor alfa humano de folato, en 0,3 mL de NaCl (solución salina) al 0,9 %. Cuando llega a ser evidente la formación de líquido ascítico (14-20 días después de la inyección de células tumorales), se administró AFRA-DFM radiomarcado por vía intraperitoneal en 0,3 mL de solución salina, los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos y diferentes puntos temporales, se recogió el

líquido ascítico, las masas tumorales sólidas, el crecimiento adherente al peritoneo y otros tejidos/órganos (sangre, riñones, hígado y músculo) y se pesaron en húmedo. El líquido ascítico se centrifugó, las células tumorales ascíticas sedimentadas se separaron del líquido y se contaron por separado. Se evaluó la radiactividad asociada con cada tejido con un contador gamma con patrones internos (5 y 10 µl de la solución inyectada). Se realizaron tres experimentos independientes y los detalles se presentan en la tabla V a continuación:

Tabla V

| | |
|---|-----------------|
| Tumor xenoinjertado examinado | IGROV1 |
| Número de experimentos independientes | 3 |
| Tamaño del grupo por tiempo | 3-4 |
| Intervalo de actividad específica (mCi/mg) | 3,9-9,7 |
| Dosis radiactiva inyectada total µCi/animal (intervalo) | 30-158 |
| Proteína inyectada total µg/animal (intervalo) | 3,6-40 |
| Puntos temporales evaluados para biodistribución (h) | 1, 3, 6, 15, 24 |

[0129] Los resultados se presentan en la figura 12 y se expresan como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) y se compensan para la extinción de la radiactividad. De esta manera, la normalización permite la comparación directa de órganos o animales. Los resultados de estos experimentos demuestran que AFRA-DFM radiomarcado se unía específicamente a la superficie de células de cáncer de ovario presentes en el líquido ascítico (IGROV1) y que AFRA-DFM radiomarcado persistía sobre la superficie celular y masas de tumores sólidos durante hasta 15 horas.

Eficacia de AFRA-DFM radiomarcado contra células de carcinoma de ovario que crecen como tumores i.p.

[0130] Habiendo demostrado que ¹³¹I-DFM-AFRA era capaz de acumularse específicamente en tumores que expresan de forma natural FR ((IGROV1) después de administración i.p., se evaluó su capacidad de controlar la diseminación tumoral intraperitoneal de carcinoma de ovario. Se inyectó ¹³¹I-DFM-AFRA en la cavidad peritoneal en animales que albergaban células de carcinoma de ovario intraperitoneal implantadas 2-4 días antes de la administración del fragmento de anticuerpo.

[0131] Más específicamente, se obtuvieron ratones CD1 *nu/nu* (atímicos) hembra a las 7 semanas de edad de Charles River Laboratories (Calco, Italia). Después de 1 semana de aclimatación, los ratones se xenoinjertaron por vía intraperitoneal con 8-10 x 10⁶ células de carcinoma de ovario, que sobreexpresan el receptor alfa humano de folato (IGROV1 u OVCAR3) en 0,3 mL de NaCl (solución salina) al 0,9 %. De 2 a 4 días después de la inyección de células tumorales, los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos y se les inyectó por vía intraperitoneal en la cola 0,3 mL del AFRA-DFM radiomarcado en solución salina o solución salina solamente como control. Se controló el crecimiento del tumor cada 2-3 días, se pesó y se controló para la formación de líquido ascítico o desarrollo de masas sólidas i.p.. Se registró la supervivencia del animal. Se realizaron dos experimentos independientes y los detalles se presentan en la tabla VI a continuación:

Tabla VI

| | |
|---|-----------------|
| Tumor xenoinjertado examinado | IGROV1 u OVCAR3 |
| Número de experimentos independientes | 2 |
| Tamaño del grupo por tratamiento | 8-9 |
| Actividad específica media (mCi/mg) | 4.3 |
| Dosis radiactiva inyectada total (µCi/animal) | 1,004 |
| Proteína inyectada total (µg/animal) | 250 |

[0132] Los resultados se presentan en la figura 13 y se expresan como curvas de supervivencia. El aumento en la supervivencia se evaluó por ensayo de rango logarítmico. Los resultados de estos experimentos demuestran que AFRA-DFM radiomarcado, cuando se inyecta hasta 4 días después del implante del tumor en la cavidad peritoneal, era capaz de retardar significativamente el crecimiento del tumor y por consiguiente de prolongar la supervivencia del animal en ambos modelos de tumor ortotópico (p=0,0014 y p<0.0001 en modelos IGROV1 y OVCAR3, respectivamente).

Bibliografía

[0133]

1 Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10-30.

2 Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004; 351:2519-29.

3 Harries M, Gore M. Part I: chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment at first diagnosis. *Lancet Oncol* 2002; 3:529-36.

- 4 Vasey PA. Resistance to chemotherapy in advanced ovarian cancer: mechanisms and current strategies. *Br J Cancer* 2003;89 Supl. 3:S23-S28.
- 5 Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 13 de octubre de 1983; 309(15):883-7.
- 6 Lavin PT, Knapp RC, Malkasian G, Whitney CW, Berek JO, Bast RC Jr. CA 125 for the monitoring of ovarian carcinoma during primary therapy. *Obstet Gynecol.* Febrero de 1987; 69(2):223-7.
- 10 7 Miotti S, Canevari S, Menard S, Mezzanzanica D, Porro G, Pupa SM, Regazzoni M, Tagliabue E, Colnaghi MI. Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity. *Int J Cancer.* 15 de marzo de 1987; 39(3):297-303.
- 15 8 Netti PA, Baxter LT, Boucher Y, Skalak R, Jain RK Time-dependent behavior of interstitial fluid pressure in solid tumors: implications for drug delivery. *Cancer Res.* 15 de noviembre de 1995; 55(22):5451-58.
- 20 9 Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res.* 1 de febrero de 1990; 50(Supl. 3):814s-819s.
- 20 10 Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD, Weiner LM. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res.* 15 de junio de 2001; 61(12):4750-5.
- 25 11 Figini M et al., *Cancer Res.* 1 de marzo de 1998; 58 (5): 991-6.
- 30 12 King DJ, Turner A, Farnsworth AP, Adair JR, Owens RJ, Pedley RB, Baldock D, Proudfoot KA, Lawson AD, Beeley NR, et al., Improved tumor targeting with chemically cross-linked recombinant antibody fragments. *Cancer Res.* 1 de diciembre de 1994; 54(23):6176-85.
- 30 13 Willuda, J., Honegger, A., Waibel, R., Schubiger, P. A., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U. y Pluckthun, A. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: Engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. (1999) *Cancer Res.* 59, 5758-5767.
- 35 14 Ewert, S., Huber, T., Honegger, A. y Pluckthun, A. Biophysical properties of human antibody variable domains *J. Mol. Biol.* 3(2003) 5, 531-553.
- 40 15 Tomassetti et al., *J. Cellular Biochemistry*, 1999 72:111-118.
- 40 16 Stalteri MA, Mather SJ. A cross-linked monoclonal antibody fragment for improved tumor targeting. *Bioconjug Chem.* marzo-abril de 1995; 6(2):179-86.
- 45 17 Sharkey RM, McBride WJ, Karacay H, Chang K, Griffiths GL, Hansen HJ, Goldenberg DM. A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody. *Cancer Res.* 15 de enero de 2003; 63(2):354-63.
- 18 Coliva A et al., *Cancer Immunol. Immunotherap.* Diciembre de 2005; 54 (12); 1200-13.
- 50 19 Adamczyk M, Gebler JC, Wu J, Yu Z. Complete sequencing of anti-vancomycin Fab fragment by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry with a combination of database searching and manual interpretation of the MS/MS spectra. *J Immunol Methods.* 1 de febrero de 2002; 260(1-2):235-49.
- 55 20 Humphreys DP, Vetterlein OM, Chapman AP, King DJ, Antoniw P, Suitters AJ, Reeks DG, Parton TA, King LM, Smith BJ, Lang V, Stephens PE. F(ab')₂ molecules made from *Escherichia coli* produced Fab' with hinge sequences conferring increased serum survival in an animal model. *J Immunol Methods.* 1 de agosto de 1998; 217(1-2):1-10.
- 60 21 Casey JL, Napier MP, King DJ, Pedley RB, Chaplin LC, Weir N, Skelton L, Green AJ, Hope-Stone LD, Yarranton GT, Begent RH. Tumor targeting of humanised cross-linked divalent-Fab' antibody fragments: a clinical phase I/II study. *Br J Cancer.* 6 de mayo de 2002; 86(9):1401-10.
- 65 22 DeSilva BS, Wilson GS. Synthesis of bifunctional antibodies for immunoassays. *Methods.* septiembre de 2000; 22(1):33-43.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0134]

- 5 <110> Dompé pha.r.ma s.p.a. Istituto Nazionale per lo studio e la Cura dei Tumori
<120> ANTICUERPOS HUMANOS ANTI-RECEPTOR ALFA DE FOLATO Y FRAGMENTOS DE ANTICUERPO PARA RADIOINMUNOTERAPIA DE CARCINOMA DE OVARIO
- 10 <130> B6671A-CA/SR/FJ
<150> EP 06 019 399.2
<151> 15-09-2006
- 15 <160> 12
<170> PatentIn versión 3.1
- 20 <210> 1
<211> 219
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1

ES 2 644 423 T3

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

<210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 644 423 T3

<400> 2

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115           120

```

5
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10
 <400> 3

```

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His
1           5           10           15

```

15
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <400> 4

```

Gln Ala Ser Asn Lys Asp Thr
1           5

```

25
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

ES 2 644 423 T3

Leu Gln Ser Lys Asn Phe Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

5 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

10 Asp Tyr Ala Met Ile
1 5

15 <210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

20 Gly

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 8

Glu Arg Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Met Asp Val
1 5 10

30 <210> 9
<211> 97
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 9

ES 2 644 423 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys

<210> 10
 <211> 257
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

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

10

ES 2 644 423 T3

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

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> 11
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala
 1 5 10 15

Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln
 20 25 30

10

ES 2 644 423 T3

Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln
 35 40 45

Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His
 50 55 60

Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr
 65 70 75 80

Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val
 85 90 95

Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys
 100 105 110

Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys
 115 120 125

Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys
 130 135 140

Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr
 145 150 155 160

Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser
 165 170 175

Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro
 180 185 190

Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala
 195 200 205

His His His His His His
 210

5 <210> 12
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente al receptor alfa de folato (FRa), en el que dicho anticuerpo es un fragmento Fab que comprende una cadena ligera cuya región variable (VL) comprende:
- 5 - las regiones determinantes de complementariedad (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:
- RASESVSFLGINLIH, (SEQ ID NO: 3)
 QASNKDT, (SEQ ID NO: 4)
 10 LQSKNFPPYT, (SEQ ID NO: 5) y la región variable (Vh) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 2 y la primera región constante (Ch1) de una cadena pesada y en que la región constante de dicha cadena ligera es una región constante kappa.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 1 (SEQ ID NO: 1).
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y 2 que es completamente humano.
4. El anticuerpo de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es monoclonal.
- 20 5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que es un fragmento Fab', en el que la cadena pesada comprende adicionalmente una región bisagra adecuada para la unión covalente a un segundo fragmento de anticuerpo.
- 25 6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y 2 que está conjugado a un resto efector seleccionado de un agente citotóxico o un marcador.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente citotóxico es un radionúclido.
- 30 8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re .
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el resto efector es el agente marcador ^{99}Tc .
- 35 10. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un dímero F(ab')₂ que comprende dos fragmentos Fab' unidos covalentemente.
11. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo como se define en las reivindicaciones 1 o 2.
- 40 12. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11, estando dicho ácido nucleico unido de forma funcional a señales reguladoras de la transcripción.
13. Una célula hospedadora transformada con el vector de la reivindicación 12.
- 45 14. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 13 que es *Escherichia coli*.
15. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 16. Un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como medicamento para el tratamiento o la prevención de cáncer humano.
17. Un anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el trastorno es carcinoma de ovario en seres humanos.
- 55 18. Un producto que contiene un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un agente terapéutico adicional, como una preparación combinada para uso simultaneo, separado o secuencial en tratamiento.
- 60 19. El producto de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico y un agente radioterapéutico.
- 65 20. El producto de acuerdo con la reivindicación 18 o 19 como una preparación combinada para uso simultaneo, separado o secuencial en tratamiento de cáncer de ovario.

Alineación de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera C4 y AFRA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-------|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C4 | (1) | -QSALIQPASVSGSPGQSI | T | I | S | C | T | G | - | T | S | S | D | V | G | S | N | L | V | S | W | Y | Q | H | P | G | K | A | P | K | L | | | | | |
| AFRA | (1) | EIVLTQSPASLAVSPGQRATI | T | C | R | A | S | E | S | V | S | F | L | G | I | N | L | I | H | W | Y | Q | Q | K | P | G | Q | P | P | K | L | | | | | |
| C4 | (49) | MIYEGSKRPSGVSNRFS | G | S | K | S | G | N | A | A | S | L | T | I | S | G | L | Q | A | E | D | E | A | D | Y | C | Q | S | Y | D | S | S | L | | | |
| AFRA | (51) | LIYQASNKDTGVPARFSG | S | G | S | G | T | F | T | L | T | I | N | P | V | E | A | N | T | A | N | Y | C | L | Q | S | K | N | F | P | P | | | | | |
| C4 | (99) | VVFGGTKLTVLGQPKA | P | S | V | T | L | F | P | S | S | E | L | Q | A | N | K | A | T | L | V | C | L | I | S | D | F | F | P | G | A | | | | | |
| AFRA | (101) | YTFGQGTKLEIKR | - | T | V | A | A | P | S | V | F | I | F | P | S | D | E | Q | L | K | S | G | T | A | S | V | V | C | L | L | N | N | F | P | R | E |
| C4 | (149) | TVAWKADSSPVKAG | - | V | E | T | T | P | S | K | Q | S | N | N | K | Y | A | A | S | S | L | S | L | T | P | E | Q | W | K | S | H | R | G | Y | S | |
| AFRA | (150) | KVQWKVDNALQSGNS | Q | E | S | V | T | E | Q | D | S | K | D | S | T | Y | S | L | S | T | L | L | S | K | A | D | Y | E | K | H | K | V | Y | A | | |
| C4 | (198) | QVTHEGSTVEKTV | A | P | T | - | - | E | C | S | - | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AFRA | (200) | EVTHQGLSSPVTKS | F | N | R | G | E | C | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 1

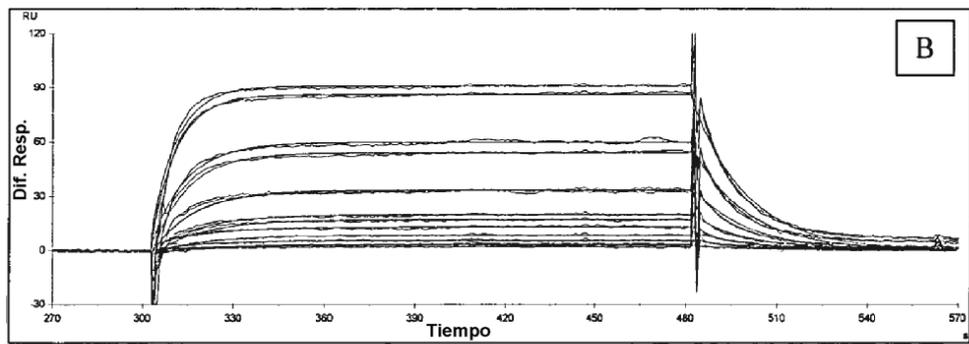
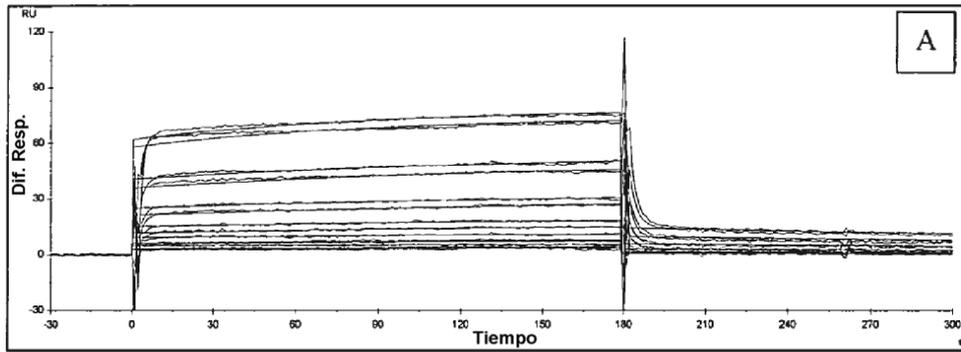


Figura 3

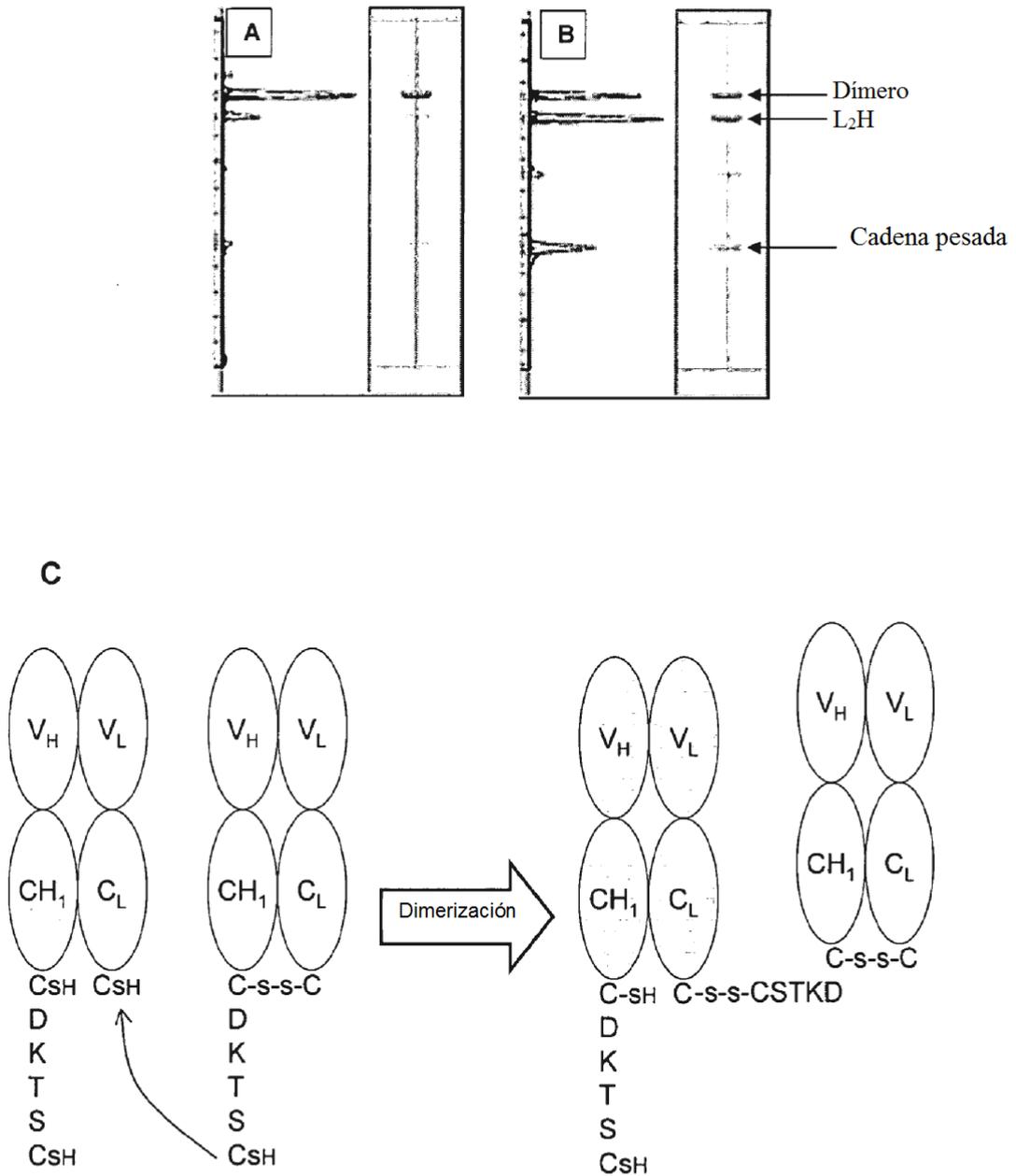


Figura 4

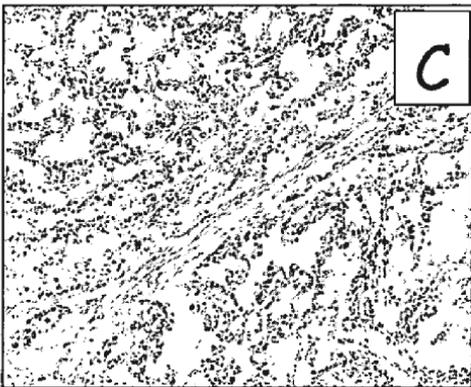
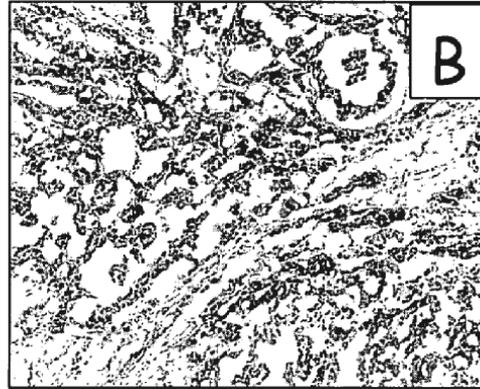


Figura 5

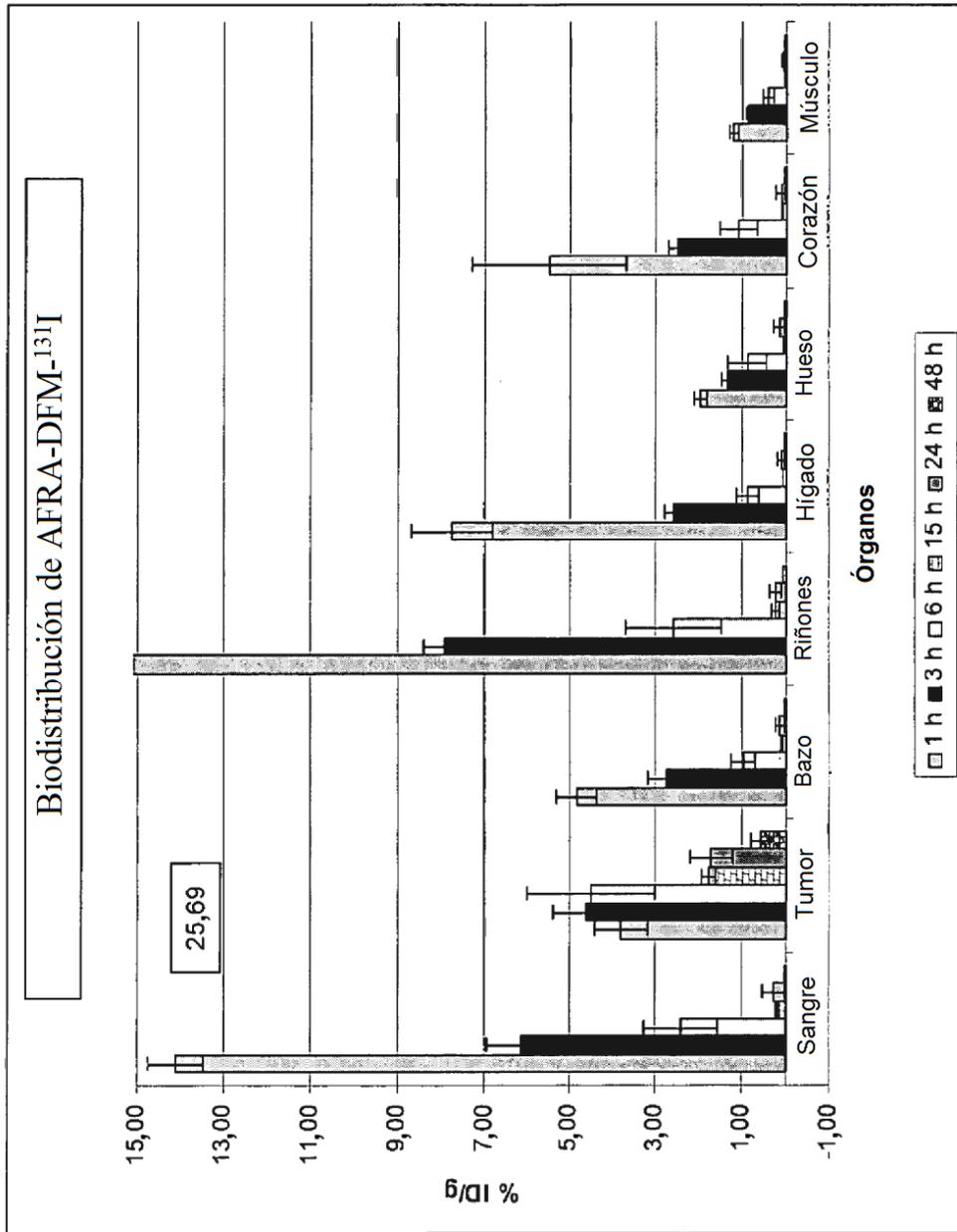


Figura 6

ES 2 644 423 T3

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa (Vκ Cκ) AFRA

AFRA (1) EIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQPPKL

AFRA (51) LIYQASNKDTGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCLQSKNFPP

AFRA (101) YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPREA

AFRA (150) KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC

AFRA (200) EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 7

V_H de AFRA

NVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTTSGFTFGDYAMIWARQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTIS
RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREERYDFWSGMDVWGKGTTVTVSS

FIGURA 8

Ejemplo de C_H1 de AFRA

1 ASTKGPSVFP LAFSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPVAVLQSS
61 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHHKPS NTKVDKK

FIGURA 9

ES 2 644 423 T3

A: Receptor alfa de folato

```
MAQRMTTQLL LLLVWVAVVG EAQTRIAWAR TELLNVCMNA KHHKEKPGPE 50
DKLHEQCRPW RKNACCSTNT SQEAHKDVSY LYRFNWNHCG EMAPACKRHF 100
IQDTCLYECS PNLGPWIIQQV DQSWRKERVL NVPLCKEDCE QWVEDCRTSY 150
TCKSNWHKGW NWTSGFNKCA VGAACQPFHF YFPTPTVLCN EIWTHSYKVS 200
NYSRGSGRCI QMWFDPAQGN PNEEVARFYA AAMSGAGPWA AWPFLLSLAL 250
MLLWLLS 257
```

B: Receptor alfa de folato soluble recombinante con marca de purificación His6

```
RIAWAR TELLNVCMNA KHHKEKPGPE 26
DKLHEQCRPW RKNACCSTNT SQEAHKDVSY LYRFNWNHCG EMAPACKRHF 76
IQDTCLYECS PNLGPWIIQQV DQSWRKERVL NVPLCKEDCE QWVEDCRTSY 126
TCKSNWHKGW NWTSGFNKCA VGAACQPFHF YFPTPTVLCN EIWTHSYKVS 176
NYSRGSGRCI QMWFDPAQGN PNEEVARFYA AAHHHHHH 214
```

FIGURA 10

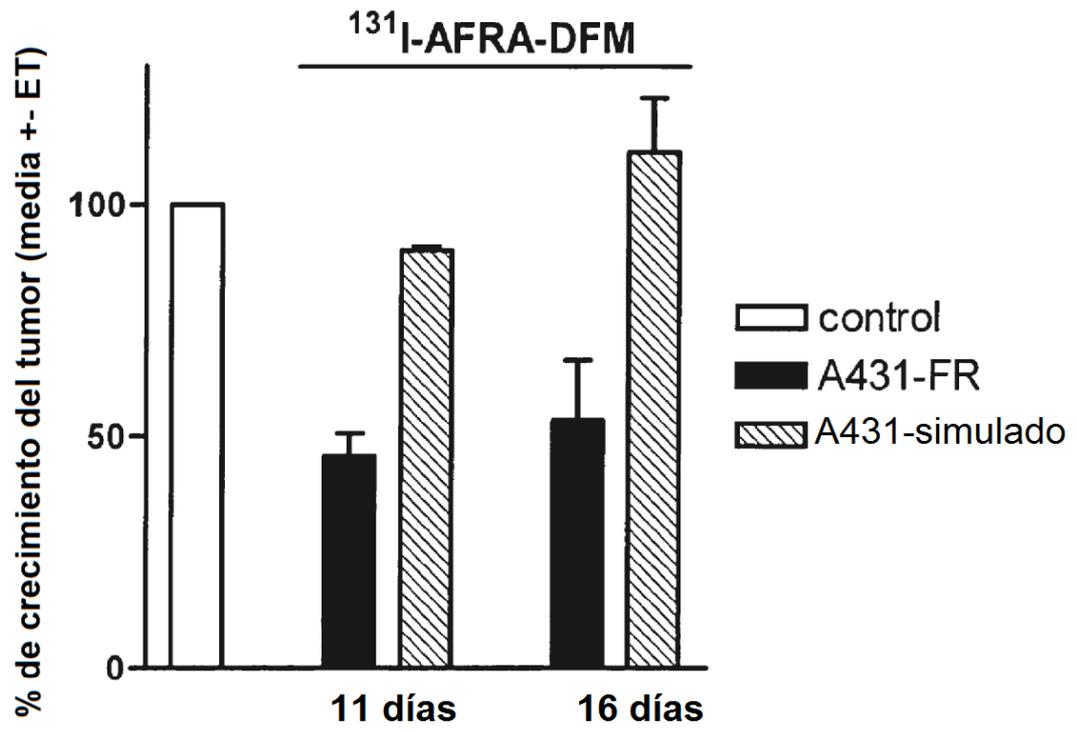


FIGURA 11

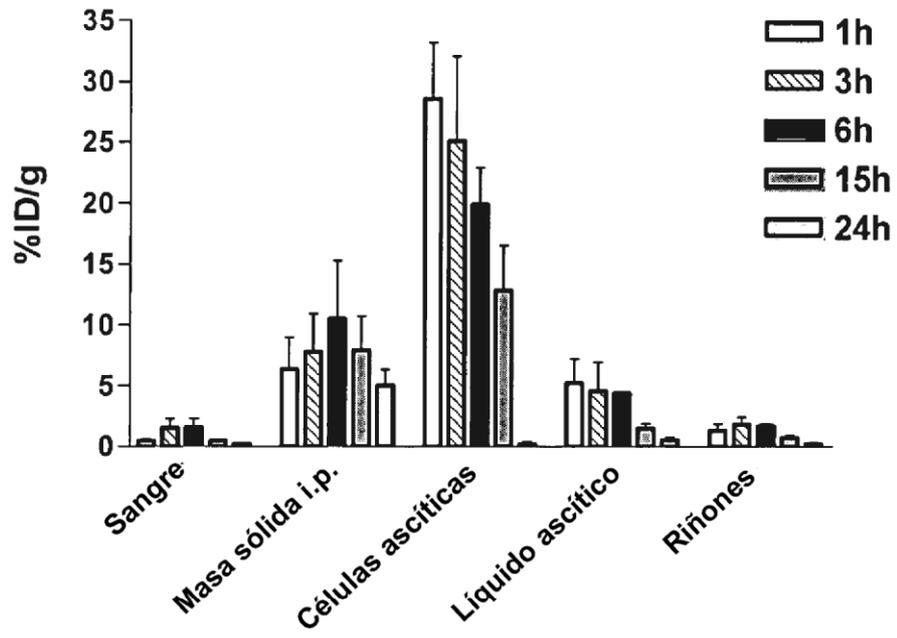


FIGURA 12

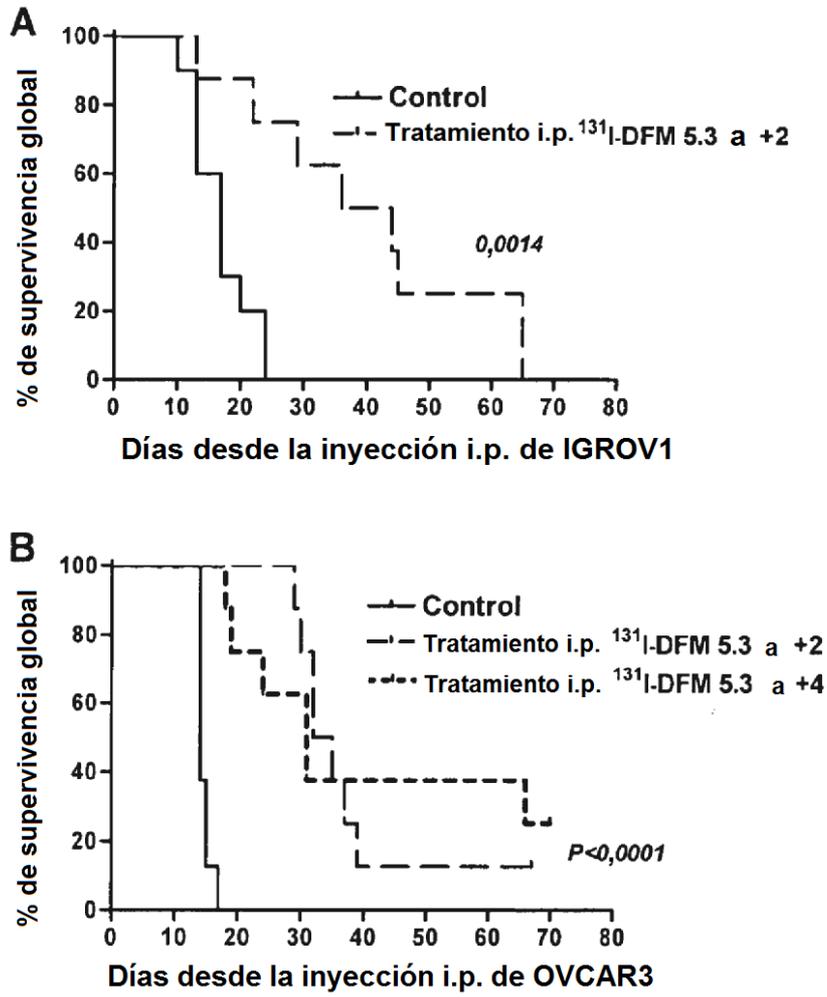


FIGURA 13