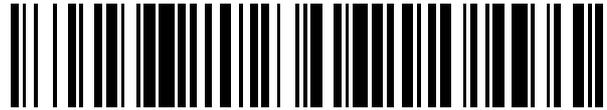


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 466**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/US2012/031544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135675**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12764885 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2694106**

54 Título: **Métodos para aumentar la eficacia de la terapia contra el cáncer con FOLR1**

30 Prioridad:

01.04.2011 US 201161471007 P

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

02.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CARRIGAN, CHRISTINA, N.;
WHITEMAN, KATHLEEN, R.;
PAYNE, GILLIAN y
LADD, SHARRON**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 466 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

Métodos para aumentar la eficacia de la terapia contra el cáncer con FOLR1

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente invención reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 61/471.007, presentada el 1 de abril de 2011.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 El campo de la invención generalmente se refiere a aumentar la eficacia del tratamiento de cánceres caracterizados por la sobreexpresión del receptor 1 de folato (FOLR1) humano. Más específicamente, la invención se refiere a un tratamiento más eficaz de pacientes susceptibles a o a los que se le ha diagnosticado cáncer, donde las células tumorales sobreexpresan el FOLR1 según se determinó mediante un ensayo de expresión, con un antagonista del FOLR1, por ejemplo, un inmunoconjugado del FOLR1.

Antecedentes de la técnica

15 El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo desarrollado, con más de un millón de personas a las que se les diagnostica cáncer y 500.000 muertes por año solo en los Estados Unidos. En general, se calcula que más de 1 de 3 personas desarrollará alguna forma de cáncer durante su vida. Existen más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro de los cuales —de mama, de pulmón, colorrectal y de próstata—explican más de la mitad de todos los casos nuevos (Jemal et al., 2003, *Cancer J. Clin.* 53:5-26).

20 El receptor 1 de folato (FOLR1), también conocido como receptor de folato alfa o proteína de unión a folato, es una proteína N-glicosilada expresada en la membrana plasmática de las células. El FOLR1 tiene una alta afinidad por ácido fólico y por varios derivados reducidos de ácido fólico. El FOLR1 media la administración del folato fisiológico, 5-metiltetrahidrofolato, al interior de las células.

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

30 Debido a que el cáncer de ovario es típicamente asintomático hasta la etapa avanzada, a menudo se diagnostica en una etapa tardía y tiene pronósticos desfavorables cuando se trata con procedimientos disponibles actualmente, típicamente fármacos quimioterapéuticos después de cirugía citorréductora (von Gruenigen V et al., *Cancer* 112: 2221-2227 (2008); Ayhan A et al., *Am J Obstet Gynecol* 196: 81 e81-86 (2007); Harry VN et al., *Obstet Gynecol Surv* 64: 548-560 (2009)). Por lo tanto, existe una clara necesidad médica no cubierta de terapéuticos más eficaces para los cánceres de ovario.

Sumario de la invención

35 La presente invención se basa en el descubrimiento de un rango dinámico de expresión del FOLR1 en el tejido tumoral y el descubrimiento de que los tumores con niveles aumentados de expresión del FOLR1 responden más al tratamiento con anticuerpos anti-FOLR1 o inmunoconjugados anti-FOLR1. La presente invención permite de forma ventajosa el tratamiento de pacientes que tienen una mayor probabilidad de responder al tratamiento mediante la administración de agentes terapéuticos, es decir, anticuerpos anti-FOLR1 o inmunoconjugados anti-FOLR1, a pacientes que han demostrado tener un nivel de expresión del FOLR1 aumentado.

40 La presente invención proporciona un anticuerpo anti-receptor 1 de folato (FOLR1) o un inmunoconjugado anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer en un sujeto, en el que una expresión aumentada del gen o la proteína FOLR1 en una muestra de cáncer de dicho sujeto se ha detectado usando un método de detección que distingue entre intensidad de tinción o uniformidad de tinción en una muestra de cáncer que expresa FOLR1 en comparación con intensidad de tinción o uniformidad de tinción en una o más muestras de referencia, en el que la efectividad de la terapia de cáncer con un anticuerpo anti-FOLR1 o un inmunoconjugado anti-FOLR1 se ha aumentado de esa manera;

50 en el que el anticuerpo anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer comprende:

- (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (huMov19 vHC) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (huMov19 vLCv1.00) o

(ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (huMov19 vHC) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (huMov19 vLCv1.60); y

5 en el que el inmunoc conjugado anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer comprende un anticuerpo anti-FOLR1, un conector y una citotoxina, en el que el anticuerpo anti-FOLR1 del inmunoc conjugado anti-FOLR1 comprende:

i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (huMov19 vHC) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (huMov19 vLCv1.00) o

10 (ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (huMov19 vHC) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (huMov19 vLCv1.60).

Las realizaciones adicionales de la invención se definen por las reivindicaciones 2 a 17.

15 La presente invención describe un método para identificar a un sujeto predispuesto a responder favorablemente a un terapéutico anti-cáncer dirigido al Receptor 1 de Folato (FOLR1), el método comprende detectar la expresión del FOLR1 en una muestra de tejido del sujeto.

La presente invención también describe un método para aumentar la probabilidad de eficacia de un tratamiento contra el cáncer, el método comprende administrarle una dosis terapéuticamente eficaz de un terapéutico anti-cáncer dirigido al FOLR1 a un sujeto, donde se ha demostrado que la expresión de FOLR1 en una muestra de tejido del sujeto se ve aumentada.

20 La presente invención también describe un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer de dosis baja, el método comprende administrarle una dosis terapéuticamente eficaz de un terapéutico anti-cáncer dirigido al FOLR1 a un sujeto, donde dicho sujeto ha demostrado tener expresión aumentada de FOLR1 en una muestra.

25 En una realización, los métodos se dirigen a cáncer de ovario, adenocarcinoma pulmonar no microcítico (incluyendo carcinoma bronquioloalveolar), carcinomas renales y carcinomas endometriales.

30 En una realización, la medida y uniformidad de la expresión del FOLR1 se detecta mediante inmunohistoquímica (IHC), citometría de flujo o hibridación de ácido nucleico. En otra realización, el nivel de la expresión del FOLR1 se detecta mediante inmunohistoquímica. Los ejemplos no limitantes de IHC incluyen métodos de IHC que se distinguen entre niveles variantes del FOLR1 y métodos de IHC calibrados, tales como los que se describen en el presente documento. La expresión del FOLR1 se puede puntuar usando un sistema de puntuación adecuado, incluyendo de forma no limitante, los métodos de puntuación descritos en el presente documento. Por ejemplo, la expresión del FOLR1 se puede puntuar usando un método de IHC calibrado que incluye un rango de 0, 1, 2, 3 y 3+ para la intensidad de tinción, donde 0 es el nivel más bajo de intensidad de tinción y 3+ es el nivel más alto de intensidad de tinción. De manera alternativa o adicional, la expresión del FOLR1 se puede puntuar usando un método de IHC calibrado que incluye una uniformidad de tinción que varía de focal (<25 % de las células teñidas), a heterogénea (25-75 % de las células teñidas), a homogénea (>75 % de las células teñidas), donde la tinción focal es la menos uniforme y la homogénea es la tinción más uniforme.

35 En una realización adicional, la expresión del FOLR1 en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral) se mide y se compara con una o más muestras de referencia y la expresión del FOLR1 en la muestra de tejido del tumor de un sujeto, tumor de xenoinjerto o línea celular tiene un valor específico del FOLR1 que se correlaciona con la medida y uniformidad de expresión en comparación con la una o más muestras de referencia. En varios ejemplos, se considera que una muestra de tejido o célula con un nivel de 1, 2, 3 o 3+ de intensidad de tinción del FOLR1 con un patrón de tinción homogéneo, tiene expresión del FOLR1 aumentada; se considera que una muestra de tejido o célula con un nivel de 3 de intensidad de tinción del FOLR1 con patrones de tinción heterogénea o focal, tiene expresión del FOLR1 aumentada. En otra realización, la expresión del FOLR1 en una muestra se mide y se compara con una o más muestras de referencia para identificar un nivel de tinción comparable. En una realización, la muestra de referencia tiene un valor de IHC previamente asignado y/o un antígeno predeterminado por número de célula (o ABC) y el antígeno o número ABC para el tejido de muestra se puede determinar con base en la comparación.

40 En una realización, la expresión del FOLR1 en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral) se mide y se compara con una o más muestras de control y la expresión del FOLR1 en la muestra de tejido del tumor de un sujeto, tumor de xenoinjerto o línea celular tiene un valor específico del FOLR1 que se correlaciona con la medida y uniformidad de expresión en comparación con la una o más muestras de control. En una realización, la expresión del FOLR1 en la muestra se compara con una muestra de control negativa que demuestra expresión de FOLR1 detectable baja o nula. En otra realización, la expresión del FOLR1 en la muestra se compara con una muestra de control positiva que tiene expresión de FOLR1 aumentada (nivel 1, 2, 3 o 3+). En algunas realizaciones, las muestras de control incluyen, de forma no limitante, células Namalwa, SW2, SW620, T47D, IGROV-1, 300.19 FR1, HeLa o KB. En realizaciones particulares, las muestras de control incluyen células o sedimentos celulares de células

transfectadas con el receptor de folato (por ejemplo, 300.19 FR1).

En una realización, el terapéutico anti-cáncer dirigido a FOLR1 es un inmunoconjugado de FOLR1. En una realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-FOLR1, un conector y una citotoxina.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-FOLR1 es huMOV19. En otra realización, el conector se selecciona del grupo que consiste en un conector escindible, un conector no escindible, un conector hidrófilo y un conector basado en ácido dicarboxílico. En otra realización, el conector se selecciona del grupo que consiste en: 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPP); 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC); 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N-sulfosuccinimidilo (sulfoSMCC); N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB); y éster de N-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] (NHS-PEG4-maleimida). En otra realización, el conector es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB). En otra realización, el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide, análogo de maitansinoide, benzodiazepina, taxoide, CC-1065, análogo de CC-1065, duocarmicina, análogo de duocarmicina, calicheamicina, dolastatina, análogo de dolastatina, auristatina, derivado de tomamicina y derivado de leptomicina o un profármaco del agente. En otra realización, el agente citotóxico es un maitansinoide. En otra realización, el agente citotóxico es N(2')-deacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina o N(2')-deacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina. En otra realización, el agente citotóxico es N(2')-deacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4). En una realización adicional, el inmunoconjugado comprende el anticuerpo HUMOV19, sulfo-SPDB y DM4 (IMGN853).

La invención también describe un kit para medir la expresión del FOLR1 en un sujeto que comprende un reactivo de detección del FOLR1 e instrucciones de uso. En una realización, el reactivo de detección del FOLR1 comprende un péptido, proteína o sonda molecular de unión a FOLR1 (es decir, ácido nucleico). En otra realización, el reactivo de detección del FOLR1 es un anticuerpo anti-FOLR1. En otra realización, el kit comprende adicionalmente un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo anti-FOLR1. En una realización, el anticuerpo se incluye a una concentración de 0.5 a 7.5 µg/ml, preferentemente de 0,9 a 3,8 +/- 0,5 µg/ml. En varias realizaciones, el anticuerpo se incluye a una concentración de 1,0 +/- 0,5 µg/ml, 1,5 +/- 0,5 µg/ml, 1,9 +/- 0,5 µg/ml, 2,5 +/- 0,5 µg/ml, 3,0 +/- 0,5 µg/ml, 3,5 +/- 0,5 µg/ml, 3,8 +/- 0,5 µg/ml o hasta 42 µg/ml. En otra realización, el anticuerpo se incluye en una solución concentrada con instrucciones de diluciones para lograr una concentración final de 0.9 a 3.8 +/- 0.5 µg/ml. En otra realización, el kit comprende adicionalmente un reactivo de detección que se selecciona del grupo que consiste en: una enzima, un fluoróforo, una etiqueta radioactiva y un luminóforo. En otra realización, el reactivo de detección se selecciona del grupo que consiste en: biotina, digoxigenina, fluoresceína, tritio y rodamina.

El kit también puede incluir instrucciones para la detección y puntuación de la expresión del FOLR1. El kit también puede incluir muestras de control o de referencia. Los ejemplos no limitantes de muestras de control o de referencia incluyen muestras de tejido, sedimentos celulares o células. Las muestras de control o de referencia pueden derivar de muestras de líneas celulares de cultivo de tejido (normales o tumorales), de tejido normal (control normal) o de tejidos tumorales (control positivo). Las líneas celulares de ejemplo incluyen SW620, T47D, IGROV-1, HELA, KB, JEG-3 y líneas celulares transfectadas de manera estable o transitoria con un vector de expresión que expresa FOLR1 (por ejemplo, 300.19FR1). Los tejidos de ejemplo que pueden utilizarse como tejidos de referencia normales en los métodos de detección de la expresión del FOLR1 se describen en el presente documento e incluyen tejidos de pulmón, de glándula salival y de páncreas normales.

La invención también describe un método para identificar un cáncer que probablemente responda a un anticuerpo anti-FOLR1 o un inmunoconjugado anti-FOLR1 que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células de dicho cáncer con un agente que se une a la proteína del FOLR1 en la superficie celular; (b) detectar la unión de dicho agente que se une a la proteína del FOLR1 en la superficie celular de dicha muestra biológica de (a); (c) asignar una puntuación a dicha unión de la etapa (b), donde dicha puntuación se asigna en función de la comparación con una o más muestras de referencia; y (d) comparar dicha puntuación de la etapa (c) con la puntuación de un tejido o célula de referencia, donde una puntuación de dicho nivel del FOLR1 canceroso que es mayor que la puntuación para una muestra de referencia que expresa FOLR1 normal o bajo o una puntuación de dicho nivel del FOLR1 canceroso que es igual a o mayor que la puntuación para una muestra de referencia que expresa FOLR1 alto, identifica dicho cáncer como un cáncer que probablemente responda a un anticuerpo anti-FOLR1 o un inmunoconjugado anti-FOLR1. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de ovario o cáncer de pulmón.

La invención también describe un método para identificar un tumor sensible al tratamiento con un anticuerpo anti-FOLR1 o un inmunoconjugado anti-FOLR1, dicho método comprende: (a) medir el nivel de la expresión del FOLR1 en una muestra de tejido tumoral obtenida de dicho tumor, donde dicha medición comprende el uso de un método de detección que distingue entre la intensidad de tinción o uniformidad de tinción en una muestra de cáncer que expresa el FOLR1 en comparación con la intensidad de tinción o uniformidad de tinción en una o más muestras de referencia; (b) determinar una puntuación de intensidad de tinción de FOLR1 para dicha muestra de tejido tumoral; y (c) comparar la puntuación de intensidad de tinción de FOLR1 determinado en la etapa (b) con un valor relativo determinado al medir la expresión proteica del FOLR1 en al menos una muestra de referencia, donde dicha al menos una muestra de referencia es una muestra de tejido, de célula o de sedimento que no es sensible al

tratamiento con un anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1, y donde una puntuación de intensidad de tinción de FOLR1 para dicha muestra determinado en la etapa (b) que es mayor que dicho valor relativo, identifica dicho tumor como un tumor sensible al tratamiento con un anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1. En determinadas realizaciones, el método de detección se realiza manualmente o mediante el uso de un sistema automatizado. En una realización, el método de detección es IHC. En otra realización, la IHC es IHC calibrada que puede distinguir entre diferentes niveles de expresión del FOLR1.

La invención también describe un método para optimizar un régimen terapéutico con un anticuerpo anti-FOLR1 o un inmunoconjugado anti-FOLR1 para un sujeto que tiene cáncer de pulmón o de ovario, dicho método comprende: (a) poner en contacto dicha muestra de dicho sujeto con un anticuerpo que se une específicamente al FOLR1 de superficie celular; (b) medir la unión de dicho anticuerpo en (a) a dicho FOLR1 de superficie celular en dicha muestra usando un método de detección que puede distinguir entre la intensidad de tinción o uniformidad de tinción en una muestra de cáncer que expresa FOLR1 en comparación con la intensidad de tinción o uniformidad de tinción en una o más muestras de referencia y asignarle una puntuación de tinción a dicha muestra; y (c) administrar una dosis alta de un inmunoconjugado anti-FOLR1 cuando la puntuación en la etapa (b) es menor que o igual a la puntuación para una muestra de referencia que expresa FOLR1 normal o bajo o administrar una dosis baja de un inmunoconjugado anti-FOLR1 cuando la puntuación es mayor que la puntuación para una muestra de referencia que expresa FOLR1 normal o bajo.

La invención también describe un método para detectar la expresión del FOLR1 de superficie celular en células cancerosas en una muestra de tejido tumoral de un sujeto, dicho método comprende: (a) obtener una muestra de tejido tumoral, donde dicha muestra de cáncer está incrustada en parafina y fijada con formalina; (b) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo que se une específicamente al FOLR1 de superficie celular; (c) medir la unión de dicho anticuerpo en (b) a dicho FOLR1 de superficie celular en dicha muestra de tejido tumoral usando un método de detección que puede distinguir entre la intensidad o uniformidad de tinción en una muestra de cáncer que expresa el FOLR1 en comparación con la intensidad o uniformidad de tinción en una o más muestras de referencia; y (d) asignar una puntuación de expresión del FOLR1 a dicho FOLR1 luego de comparar el nivel de la intensidad o uniformidad de tinción del FOLR1 de superficie celular en dicha muestra de tejido con una o más muestras de referencia.

La invención también describe un método para identificar un sujeto que tiene un cáncer de pulmón o de ovario que probablemente responda a un régimen de tratamiento de dosis baja con un anticuerpo anti-FOLR1 o un inmunoconjugado anti-FOLR1, dicho método comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células de cáncer de ovario o de pulmón con un agente que se une a la proteína del FOLR1 de superficie celular; (b) detectar la unión de dicho agente a dicha muestra biológica de (a); (c) asignar una puntuación a dicha unión de la etapa (b), donde dicha puntuación se asigna en función de la comparación con una o más muestras de referencia; y (d) comparar dicha puntuación de la etapa (c) con la puntuación de un tejido o célula de referencia, donde una puntuación de dicho nivel del FOLR1 en cáncer de ovario o pulmón que es mayor que la puntuación para una muestra de referencia que expresa FOLR1 normal o bajo o una puntuación para dicho nivel del FOLR1 en cáncer de ovario o pulmón que es igual a o mayor que la puntuación para una muestra de referencia que expresa FOLR1 alto, identifica dicho en cáncer de ovario o pulmón como un cáncer que probablemente responda a un anticuerpo anti-FOLR1 o un inmunoconjugado anti-FOLR1 de dosis baja. En determinadas realizaciones, el método comprende adicionalmente administrarle una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-FOLR1 humanizado o un inmunoconjugado anti-FOLR1 a dicho sujeto.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Método de tinción manual: Los anticuerpos anti-FOLR1 detectan la expresión del FOLR1 en células transfectadas. Se transfectaron células 300.19 con un polinucleótido que codifica el FOLR1 humano. Se detectó la expresión proteica del FOLR1 usando el anticuerpo murino BN3.2. *Smith AE et al, Hybridoma (Larchmt). Octubre 2007;26(5):281-8.*

Figura 2. Método de tinción manual: Los anticuerpos anti-FOLR1 pueden distinguir diferentes niveles de expresión de FOLR1. Se utilizó el anticuerpo BN3.2 para detectar la expresión del FOLR1 en varias células de xenoinjerto. El límite de detección del anticuerpo BN3.2 fue de aproximadamente 4000 anticuerpos unidos por célula (ABC).

Figura 3. Método de tinción manual: Los anticuerpos anti-FOLR1 pueden distinguir diferentes niveles de expresión de FOLR1 en muestras de tejido. Se utilizó el BN3.2 para detectar la expresión del FOLR1 tanto en tumores de ovario (A), como en tumores de cáncer de pulmón no microcítico (B).

- Figura 4. Método de tinción manual: Expresión del FOLR1 uniforme en tumores de ovario y de NSCLC (cáncer de pulmón no microcítico). La expresión del FOLR1 fue elevada en muchos de los cánceres de ovario, así como también en los adenocarcinomas de pulmón y los carcinomas bronquioloalveolares sometidos a prueba. La mayoría de las muestras de cánceres de ovario tuvieron la intensidad de tinción más elevada en células serosas o endometrioides. En los tumores de NSCLC, los valores de ABC más elevados se encontraron en el carcinoma bronquioloalveolar y el adenocarcinoma papilar.
- Figura 5. Método de tinción manual: La expresión del FOLR1 generalmente se limita a la membrana de las células de NSCLC. La microscopía de alta resolución reveló que la mayoría de la tinción del FOLR1 se restringe a la membrana en los tumores de NSCLC.
- Figura 6. Método de tinción manual: La expresión del FOLR1 generalmente se limita a la membrana de las células de cáncer de ovario. La microscopía de alta resolución reveló que la mayoría de la tinción del FOLR1 se restringe a la membrana en los tumores de ovario.
- Figura 7. Eficacia *in vivo* de conjugados dirigidos a huMov19 en un modelo de xenoinjerto KB. El conjugado escindible dirigido a FOLR1, huMov19-SPDB-DM4 (B) en comparación con huC242-SPDB-DM4 (D) no dirigido a FOLR1, y el conjugado no escindible huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C) en comparación con huC242-PEG4Mal-DM4 (E) no dirigido se sometieron a prueba usando un modelo de xenoinjerto establecido de células KB implantado de forma subcutánea en ratones SCID. El direccionamiento de FOLR1 mediante huMov19 dio como resultado una reducción significativa del volumen tumoral medio.
- Figura 8. Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento de IMGN853 en xenoinjertos de cáncer de ovario humano OVCAR-3. Se trataron ratones con una única inyección intravenosa de IMGN853 a 1,2, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS.
- Figura 9. Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento con IMGN853 en xenoinjertos de cáncer de ovario humano IGROV-1. Se trataron ratones con una única inyección intravenosa de IMGN853 a 1,2, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS.
- Figura 10. Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento con IMGN853 en xenoinjertos de cáncer de ovario humano OV-90. Se trataron ratones con una única inyección intravenosa de IMGN853 a 1,2, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS.
- Figura 11. Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento con IMGN853 en xenoinjertos de cáncer de ovario humano SKOV-3. Se trataron ratones con una única inyección intravenosa de IMGN853 a 1,2, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS.
- Figura 12. Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento con IMGN853 en xenoinjertos de adenocarcinoma del cuello uterino KB. Se trataron ratones con una única inyección intravenosa de IMGN853 a 1,0, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS.
- Figura 13. Métodos de tinción automatizados: Fotografías Representativas e Histogramas que ilustran la Expresión del FOLR1 en Líneas Celulares mediante IHC y Citometría de Flujo. Las células SW620, T47D, Igrov-1, 300.19/FR1, HeLa y KB se puntuaron con respecto a intensidad y uniformidad de tinción de FOLR1. Las células SW630 y IGROV-1 se puntuaron 1-3 hetero, T47D se puntuó 1-2 hetero, HeLa se puntuó 2-3 hetero, mientras que 300.19/FR1 y KB se puntuaron 3 homo.
- Figura 14. Métodos de tinción automatizados: Tinción de FOLR1 Representativa en Cáncer de Ovario Seroso. Los patrones de tinción que demostraron tinción 3 homo, 2-3 homo, 2 homo y 2 hetero se muestran para las secciones de tejido de cáncer de ovario seroso mediante IHC.
- Figura 15. Métodos de tinción automatizados: Tinción de FOLR1 Representativa en Cáncer de Ovario Endometriode. Los patrones de tinción que demostraron tinción 3 homo, 2-3 homo, 3 focal y 1-2 hetero se muestran para las secciones de tejido de cáncer de ovario endometriode mediante IHC.
- Figura 16. Métodos de tinción automatizados: Tinción de FOLR1 Representativa en NSCLC del subtipo adenocarcinoma (excluyendo carcinomas bronquioloalveolares). Los patrones de tinción que demostraron tinción 3 homo, 2-3 homo, 2 hetero, 2 homo y 1-2 hetero se muestran para las secciones de tejido de cáncer de pulmón no microcítico del subtipo adenocarcinoma mediante IHC.
- Figura 17. Métodos de tinción automatizados: Tinción de FOLR1 Representativa en Adenocarcinoma Endometrial. Los patrones de tinción que demostraron tinción 3 hetero, 2 hetero y 1 hetero se muestran para las secciones de tejido de adenocarcinoma endometrial mediante IHC.
- Figura 18. Métodos de tinción automatizados: Tinción de FOLR1 Representativa en Carcinoma de Células Renales Claras. Los patrones de tinción que demostraron tinción 2 homo, 2 hetero y 1 hetero se muestran para las secciones de tejido de cáncer de células renales mediante IHC.

Figura 19. La actividad citotóxica de IMGN853 in vitro. Cinco líneas celulares FOLR1 positivas (KB, IGROV-1, JEG-3, SKOV-3 y OVCAR-3) y dos líneas celulares FOLR1 negativas (Namalwa y SW2) se analizaron para determinar su sensibilidad a los efectos citotóxicos de IMGN853. Las células se expusieron a IMGN853 (línea continua) o a IMGN853 más huMov19 no conjugado (M9346A) 0.5 μ M (línea punteada) durante 5 días, y se determinó la supervivencia celular mediante un ensayo basado en WST-8. Se muestran los datos representativos. El porcentaje de células sobrevivientes se graficó en función del algoritmo en base 10 de la concentración de IMGN853.

Figura 20. La sensibilidad de las líneas celulares FOLR1 positivas con respecto a IMGN853 en función del nivel de expresión del FOLR1. Se analizó la potencia y la especificidad de IMGN853 en función de líneas celulares FOLR1 positivas con un amplio rango de expresión del FOLR1. Se incubaron líneas celulares con IMGN853 y KB, Igrov-1, y Jeg-3 fueron específicamente sensibles a IMGN853 mientras el huMov19 no conjugado (M9346A) mostró actividad disminuida del conjugado. Skov-3 y Ovar-3 no fueron sensibles a IMGN853 y el huMov19 no conjugado (M9346A) no cambió la actividad del conjugado.

Figura 21. Métodos de tinción automatizados: Modelos de eficacia de xenoinjerto de cáncer de ovario teñidos para determinar el FOLR1. Se muestran los patrones de tinción que demostraron 1-3 hetero (Ovar 3), 1-3 homo (Igrov 1), 1-2 hetero (Ov 90) y negativo (SKOV 3) para las secciones de tejido de xenoinjertos de cáncer de ovario mediante IHC.

Figura 22. Métodos de tinción automatizados: Modelos de xenoinjerto de ratón. Se muestran los patrones de tinción para determinar el FOLR1 en xenoinjertos para las líneas celulares de NSCLC (A), Carcinoma de Endometrio(B) y Carcinoma del Cuello uterino (C). Las muestras de NSCLC demostraron tinción 2-3 homo o 2 homo, el carcinoma de endometrio demostró tinción 2 hetero/3 focal, y el carcinoma de cuello uterino demostró tinción 3 homo.

Figura 23. Guía de tinción automatizada de ensayo de tejidos de control. Se muestran patrones de tinción para muestras de control negativo (esófago 0) y positivo (glándula salival 1-2 hetero, pulmón 2 homo, páncreas 3 homo) tal como se determinó mediante IHC automatizada.

Figura 24. Guía de tinción automatizada de tejidos tumorales. Se muestran patrones de tinción representativos para la tinción de nivel 3, nivel 2 y nivel 1 en tejido de control, tal como se determinó mediante IHC automatizada.

Figura 25. Guía de tinción automatizada de tejidos tumorales. Se muestran patrones de tinción representativos para la tinción de nivel 3, nivel 2 y nivel 1/negativo en tejido de control, tal como se determinó mediante IHC automatizada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe métodos para aumentar la eficacia de o la probabilidad de respuesta al tratamiento de cánceres caracterizados por la sobreexpresión del FOLR1. La presente invención se basa en el descubrimiento de un rango dinámico de expresión del FOLR1 en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal y el descubrimiento de que los tumores con niveles aumentados de expresión del FOLR1 responden más al tratamiento con anticuerpos anti-FOLR1 o inmunoconjugados anti-FOLR1. También hemos descubierto diferencias en la sensibilidad y detección de rangos dinámicos entre métodos automatizados y manuales. Se proporcionan adicionalmente kits que comprenden uno o más reactivos útiles para practicar los métodos de la invención.

I. Definiciones

Para facilitar el entendimiento de la presente invención, a continuación se define una serie de términos y frases.

La frase "receptor 1 de folato humano" o "FOLR1", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier FOLR1 humano natural, a menos que se indique lo contrario. El término "FOLR1" comprende FOLR1 "de longitud completa" no procesado, así como también cualquier forma de FOLR1 que resulte del procesamiento dentro de la célula. El término también comprende las variantes de FOLR1 de origen natural, por ejemplo, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos FOLR1 descritos en el presente documento pueden estar aislados de una variedad de fuentes, tal como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o preparados mediante métodos recombinantes o de síntesis. Los ejemplos de secuencias FOLR1 incluyen, de forma no limitante, los números de referencia NCBI, P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1 y NP_057936.1 y aquellas mostradas en las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2.

La frase "expresión elevada" de FOLR1 se refiere a una muestra que contiene niveles elevados de expresión del FOLR1. En un ejemplo, la expresión del FOLR1 se mide mediante IHC y se le da una puntuación de intensidad o uniformidad de tinción mediante comparación con los controles (por ejemplo, controles calibrados) que exhiben puntuaciones definidas (por ejemplo, se le da una puntuación de intensidad de 3 a la muestra de prueba si la intensidad es comparable con el control calibrado de nivel 3 o se le da una intensidad de 2 a la muestra de prueba si la intensidad es comparable con el control calibrado de nivel 2). Por ejemplo, una puntuación de 1, 2, 3 o 3+ o mayor mediante inmunohistoquímica indica una expresión aumentada del FOLR1. Una uniformidad de tinción que es

heterogénea u homogénea también es indicativa de expresión aumentada del FOLR1. Las puntuaciones de intensidad y uniformidad de tinción se pueden usar solos o en combinación (por ejemplo, 2 homo, 2 hetero, 3 homo, 3 hetero, etc.). En otro ejemplo, un aumento en la expresión del FOLR1 se puede determinar mediante la detección de un aumento de al menos 2 veces, al menos 3 veces o al menos 5 veces) con respecto a los valores de control (por ejemplo, el nivel de expresión en un tejido o célula de un sujeto sin cáncer o con un cáncer que no tiene valores de FOLR1 elevados).

Una "muestra de referencia" se puede usar para correlacionar y comparar los resultados obtenidos en los métodos de la invención a partir de una muestra de prueba. Las muestras de referencia pueden ser células (por ejemplo, líneas celulares, sedimentos celulares) o tejido. Los niveles del FOLR1 en la "muestra de referencia" pueden ser una cantidad absoluta o relativa, un rango de cantidad, una cantidad mínima y/o máxima, una cantidad promedio y/o una cantidad mediana de FOLR1. Los métodos de diagnóstico de la invención involucran una comparación entre niveles de expresión del FOLR1 en una muestra de prueba y un "valor de referencia". En algunas realizaciones, el valor de referencia es el nivel de expresión del FOLR1 en una muestra de referencia. Un valor de referencia puede ser un valor predeterminado y también se puede determinar a partir de muestras de referencia (por ejemplo, muestras biológicas de control) sometidas a prueba en paralelo con las muestras de prueba. Un valor de referencia puede ser un valor de corte individual, tal como un valor mediano, promedio o un rango de valores, tal como un intervalo de confianza. Los valores de referencia se pueden establecer para varios subgrupos de individuos, tales como individuos predispuestos al cáncer, individuos con cáncer en etapa temprana o tardía, individuos masculinos y/o femeninos o individuos sometidos a terapia contra el cáncer. Los ejemplos de muestras o valores de referencia normales o muestras o valores de referencia positivos se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, la muestra de referencia es una muestra de un tejido sano, en particular un tejido correspondiente que no está afectado por cáncer. Estos tipos de muestras de referencia se denominan muestras de control negativas. En otras realizaciones, la muestra de referencia es una muestra de un tejido tumoral que expresa el FOLR1. Estos tipos de muestras de referencia se denominan muestras de control positivas. Las muestras de control positivo también se pueden usar como un indicador comparativo para la uniformidad (hetero frente a homo) y/o grado (1, 2, 3, 3+) de la intensidad de tinción, que se correlaciona con el nivel de expresión del FOLR1. Las muestras comparativas de control positivo también se denominan muestras de referencia calibradas que muestran un rango dinámico de intensidad o uniformidad de tinción. Como se muestra en los Ejemplos 1-9, las muestras de referencia que no expresaban el FOLR1 incluyeron tejido de esófago humano; las referencias de FOLR1 bajo incluye tejido de la glándula salival (particularmente los conductos intercalares) y del pulmón (particularmente el epitelio respiratorio); y el tejido que expresa FOLR1 alto incluye el páncreas (particularmente las células ductales). Para las líneas celulares, las que tienen expresión baja incluyen, de forma no limitante, OVCAR3 y T47D, las que tienen expresión moderada incluyen, de forma no limitante, SW620, IGROV-1, JEG3, y las que tienen expresión alta incluyen, de forma no limitante KB e IGROV1. La referencia particularmente deseable del FOLR1 positivo alto es una línea celular transfectada de manera estable o transitoria con un el Receptor 1 de Folato (por ejemplo, 300.19/FR1). Se pueden determinar los niveles de referencia del FOLR1 positivos y negativos adecuados para un cáncer en particular al medir los niveles del FOLR1 en uno o más sujetos adecuados, y dichos niveles de referencia se pueden adaptar a poblaciones específicas de sujetos (por ejemplo, un nivel de referencia se puede relacionar con la edad, de modo que las comparaciones se pueden hacer entre niveles del FOLR1 en muestras de sujetos de una edad determinada y los niveles de referencia para un estado de enfermedad, fenotipo particulares o ausencia de estos en un grupo etario determinado). Dichos niveles de referencia también se pueden adaptar a técnicas específicas que se utilizan para medir los niveles del FOLR1 en muestras biológicas (por ejemplo, inmunoensayos, etc.), donde los niveles del FOLR1 pueden ser diferentes en función de la técnica específica que se utiliza.

El término "anticuerpo primario" en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno proteico diana en una muestra de tejido. Un anticuerpo primario es generalmente el primer anticuerpo usado en un procedimiento de inmunohistoquímica (IHC). En una realización, el anticuerpo primario es el único anticuerpo usado en un procedimiento de IHC. El término "anticuerpo secundario" en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo primario, formando así un puente entre el anticuerpo primario y el reactivo posterior, si lo hay. El anticuerpo secundario es generalmente el segundo anticuerpo usado en un procedimiento de inmunohistoquímica.

Una "muestra" o "muestra biológica" de la presente invención es de origen biológico, en realizaciones específicas, tal como de organismos eucariotas. En realizaciones preferidas, la muestra es una muestra humana, pero también pueden utilizarse muestras de animales en la práctica de la invención. Las fuentes no taxativas de una muestra para usar en la presente invención incluyen tejido sólido, aspirados de biopsia, ascitis, extractos fluidos, sangre, plasma, suero, líquido raquídeo, linfa, las secciones externas de la piel, de los tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, tumores, órganos, cultivos celulares y/o constituyentes de cultivos celulares, por ejemplo. La presente invención es particularmente útil para muestras de cáncer que generalmente comprenden muestras de tejidos sólidos u otros líquidos corporales, tales como ascitis, donde la cantidad de material disponible es pequeña. El método se puede utilizar para examinar un aspecto de la expresión del FOLR1 o un estado de una muestra incluyendo, de forma no limitante, la comparación de diferentes tipos de células o tejidos, la comparación de diferentes etapas de desarrollo y la detección o determinación de la presencia y/o tipo de enfermedad o anomalía.

Para los fines del presente documento, una "sección" de una muestra de tejido se refiere a una parte o porción individual de una muestra de tejido, por ejemplo, una rebanada fina de tejido o células cortadas de una muestra de tejido. Se entiende que se pueden tomar múltiples secciones de muestras de tejido y someterlas a análisis de acuerdo con la presente invención. En algunos casos, la parte o sección seleccionada de tejido comprende una población homogénea de células. En otros casos, la parte seleccionada comprende una región de tejido, por ejemplo, el lumen como un ejemplo no limitante. La parte seleccionada puede ser tan pequeña como una célula o dos células, o puede representar varios miles de células, por ejemplo. En la mayoría de los casos, la recolección de células es importante, y aunque la invención se ha descrito para el uso en la detección de componentes celulares, el método también se puede usar para detectar componentes no celulares de un organismo (por ejemplo, componentes solubles en la sangre como un ejemplo no limitante).

"Correlacionar" o "se correlaciona" significa comparar, de cualquier manera, el comportamiento y/o los resultados de un primer análisis con el comportamiento y/o los resultados de un segundo análisis. Por ejemplo, se pueden usar los resultados de un primer análisis para realizar el segundo análisis y/o se pueden usar los resultados de un primer análisis para determinar si se debería llevar a cabo un segundo análisis y/o se pueden comparar los resultados de un primer análisis con los resultados de un segundo análisis. En una realización, la expresión del FOLR1 aumentada se correlaciona con la probabilidad aumentada de la eficacia de una terapia anticáncer dirigida a FOLR1.

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" comprende anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación del antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de estas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de acuerdo a la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada a los que se hace referencia como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y conocidas. Los anticuerpos pueden ser no conjugados o conjugados con otras moléculas, tales como toxinas, radioisótopos, etc.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que une, tal como FOLR1. En determinadas realizaciones, los anticuerpos bloqueantes o antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. De manera ideal, la actividad biológica se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso un 100 %.

Las frases "anticuerpo anti-FOLR1" y "un anticuerpo que se une a FOLR1" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unir FOLR1 con suficiente afinidad, de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a FOLR1. El alcance de la unión de un anticuerpo anti-FOLR1 a una proteína no FOLR1 no relacionada es menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a FOLR1 tal como se midió, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se une a FOLR1 tiene una constante de disociación (K_d) de ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM o ≤0,1 nM. Los ejemplos de anticuerpos anti-FOLR1 se conocen en la técnica y se describen en la publicación de solicitud estadounidense N.º 2012/0009181, la cual se incorpora al presente documento mediante esta referencia.

La frase "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto y a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, de forma no limitante, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a la población homogénea de anticuerpos involucrada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de una única determinante o epítipo antigénico. Esto es en contraste con los anticuerpos policlonales que normalmente incluyen una mezcla de diversos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" comprende tanto anticuerpos monoclonales intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes monocatenarios (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a dichos anticuerpos creados mediante cualquier cantidad de técnicas que incluyen, de forma no limitante, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

Los términos "epítipo" o "determinante antigénico" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a la parte de un antígeno capaz de ser reconocida y de unirse específicamente a un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como

de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una proteína. Generalmente, los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen durante el proceso de desnaturalización de la proteína, mientras que los epítopos formados a partir de plegamiento terciario se pierden durante la desnaturalización de la proteína. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, y más generalmente al menos 5 u 8-10, aminoácidos en una conformación espacial excepcional.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X con su compañera Y puede estar representada generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede calcularse usando métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad por lo general se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras anticuerpos de alta afinidad por lo general se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos por más tiempo. Se conocen en la técnica una variedad de métodos para medir la afinidad de unión y cualquiera de ellos puede utilizarse a efectos de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

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

La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", tal como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/de comparación) de modo que el experto en la materia considerará si la diferencia entre los dos valores tendrá poca o ninguna importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de las características biológicas medidas por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es menor que alrededor de 50 %, menor que alrededor de 40 %, menor que alrededor de 30 %, menor que alrededor de 20 % o menor que alrededor de 10 %, como función del valor para el anticuerpo de referencia/de comparación.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está "aislado" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se encuentra en una forma no encontrada en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen aquellos que fueron purificados al grado que ya no se encuentran en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está aislada es sustancialmente pura.

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

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

Un "conector" es cualquier resto químico que es capaz de unir un compuesto, generalmente un fármaco, tal como un maitansinoide, a un agente de unión celular tal como un anticuerpo anti-FOLR1 o un fragmento de este en una forma estable y covalente. Los conectores pueden ser susceptibles a o ser prácticamente resistentes a la escisión inducida por ácido, escisión inducida por luz, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa y escisión de enlace de disulfuro, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanece activo. Los conectores adecuados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupo disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa y grupos lábiles a esterasa. Los conectores también incluyen conectores cargados y formas hidrófilas de estos tal como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen las condiciones fisiológicas en mamíferos donde una población de células se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, de forma no limitante, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer microcítico de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de la vulva,

cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

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

5 Los términos "célula cancerosa", "célula tumoral" y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células que surgen de un tumor o lesión precancerosa, que incluyen células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales, y células madre tumorigénicas (células madre cancerosas). Tal como se usa en el presente documento, el término "célula tumoral" se modificará por el término "no tumorigénico" al referirse únicamente a aquellas células tumorales que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse para distinguir aquellas células tumorales de células madre cancerosas.

10 El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye de forma no limitante, humanos, primates no humanos, roedores y similares, que será el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un sujeto humano.

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

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que es de forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se le administraría la formulación. Dicha formulación puede ser estéril.

20 Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo tal como se describe en el presente documento es una cantidad suficiente para realizar un objeto específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y en una manera rutinaria, en relación al propósito establecido.

25 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño de tumor; inhibir (es decir, disminuir hasta cierto punto y, en una realización determinada, detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, disminuir hasta cierto punto y en una realización determinada, detener) el crecimiento tumoral; inhibir, hasta cierto punto, uno o más síntomas asociados con el cáncer. Véase en el presente documento la definición de "tratar". En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, éste puede ser citoestático y/o citotóxico. En determinadas realizaciones, la identificación de niveles del FOLR1 aumentados permite la administración de cantidades disminuidas del terapéutico dirigido a FOLR1 para lograr el mismo efecto terapéutico que se ve con dosificaciones mayores. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, con dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Comúnmente, aunque no necesariamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

30

35

40 La expresión "responder favorablemente" generalmente se refiere a que causa un estado beneficioso en un sujeto. Con respecto al tratamiento contra el cáncer, el término se refiere a proporcionar un efecto terapéutico en el sujeto. Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer se pueden medir de varias maneras (véase W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). Por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral, la expresión de marcador molecular y las técnicas de imagenología molecular todas se pueden usar para evaluar la eficacia terapéutica de un terapéutico anticáncer. Con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral, de acuerdo con los estándares del NCI [Instituto Nacional del Cáncer] una T/C $\leq 42\%$ es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Una T/C $<10\%$ se considera como un alto nivel de actividad antitumoral, donde T/C (%) = volumen tumoral mediano de los tratados / volumen tumoral mediano del control $\times 100$.

45

50 El término "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, como para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable de por sí (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

55 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, de forma no limitante: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides antimitóticos de origen vegetal, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizantes e inhibidores de quinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en la "terapia dirigida" y en la quimioterapia convencional.

Los términos tales como "que trata" o "tratamiento" o "tratar" o "que alivia" o "para aliviar" se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, desaceleran, disminuyen los síntomas y/o detienen la evolución de una afección o trastorno patológico diagnosticado, como a 2) medidas profilácticas o preventivas que evitan y/o desaceleran el desarrollo de una afección o trastorno patológico dirigido. Por lo tanto, las personas que necesitan tratamiento incluyen aquellas que ya padecen el trastorno; las propensas a padecer el trastorno; y aquellas en las cuales se desea evitar el trastorno. En determinadas realizaciones, un sujeto es "tratado" exitosamente contra el cáncer de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: reducción de caquexia, aumento en tiempo de supervivencia, extensión del tiempo hasta el avance del tumor, reducción de la masa tumoral, reducción de la carga tumoral y/o una prolongación del tiempo de la metástasis tumoral, tiempo de la recidiva tumoral, respuesta tumoral, respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable, respuesta progresiva, supervivencia sin avance (SSA), supervivencia general (SG), cada una según se midieron por los estándares establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer y la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos para la aprobación de nuevos fármacos. Véase Johnson et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411.

"Supervivencia sin avance" (SSA), también denominada "tiempo hasta el avance del tumor" (YIP) indica el período de tiempo durante y después del tratamiento en el que el cáncer no creció. Supervivencia sin avance incluye la cantidad de tiempo en el que los pacientes experimentaron una respuesta completa o parcial, así como también la cantidad de tiempo en el que los pacientes experimentaron una enfermedad estable.

"Supervivencia sin enfermedad" (SSE) se refiere al período de tiempo durante y después del tratamiento en el que el paciente no tiene la enfermedad.

"Supervivencia general" (SG) se refiere a la prolongación en la expectativa de vida en comparación con individuos o pacientes no tratados.

Tal como se usa en la presente divulgación y reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Se entiende que donde sea que se describan las realizaciones en el presente documento con la expresión "comprende", también se proporcionan las realizaciones análogas descritas en términos de "consiste en" y/o "consiste esencialmente en".

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

II. Muestras biológicas

Las muestras biológicas a menudo se fijan con un fijador. Se usan típicamente los fijadores de aldehído tales como formalina (formaldehído) y glutaraldehído. Las muestras de tejido fijadas usando otras técnicas de fijación tal como inmersión en alcohol (Battifora y Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095) también son adecuadas. Las muestras usadas también pueden estar contenidas en parafina. En una realización, las muestras de tejido están fijadas con formalina y contenidas en parafina (FFPE). En otra realización, el bloque FFPE está teñido con hematoxilina y eosina previamente a seleccionar una o más partes para su análisis para seleccionar una o más áreas específicas para la muestra de núcleo FFPE. Los métodos para preparar bloques de tejido a partir de estas muestras particuladas se han usado en estudios de IHC previos de varios factores de pronóstico, y/o son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Abbondanzo et al., Am J Clin Pathol. 1990 May;93(5):698-702; Allred et al., Arch Surg. 1990 enero; 125(1):107-13).

En resumen, cualquier órgano o tejido intacto se puede cortar en porciones bastante pequeñas e incubar en varios fijadores (por ejemplo, formalina, alcohol, etc.) durante diversos períodos de tiempo hasta que el tejido se "fija". Las muestras pueden ser prácticamente cualquier tejido intacto extirpado quirúrgicamente del cuerpo. Las muestras se pueden cortar en uno o más porciones razonablemente pequeñas que entren en el equipo usado de manera rutinaria en los laboratorios de histopatología. El tamaño de las porciones cortadas típicamente varía de unos pocos milímetros a unos pocos centímetros.

III. Conjugados de anticuerpos de detección

La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos contra FOLR1, generalmente de tipo monoclonal, que están unidos a al menos un agente para formar un conjugado de anticuerpo de detección. Para aumentar la eficacia de las moléculas de anticuerpo como diagnóstico, se suele enlazar o unir o formar complejo covalentemente de al menos una molécula o resto deseado. Dicha molécula o resto puede ser, de forma no limitante, al menos una molécula informante. Una molécula informante se define como cualquier resto que se pueda detectar usando un ensayo. Los ejemplos no limitantes de moléculas informantes que se han conjugado con anticuerpos incluyen enzimas, radioetiquetas, haptenos, etiquetas fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas luminiscentes, moléculas de fotoafinidad, partículas y/o ligandos

coloreados, tal como biotina.

Cualquier agente de unión celular (por ejemplo, un anticuerpo o polipéptido) con selectividad, especificidad o afinidad suficiente se puede emplear como base para la detección del polipéptido FOLR1. Dichas propiedades se pueden evaluar usando metodología de análisis inmunológico convencional conocida por los expertos en la técnica.

5 Los sitios para la unión de moléculas biológicas activas en la molécula de anticuerpo, además de los sitios de unión a antígeno canónicos, incluyen sitios que residen en el dominio variable que pueden unirse al antígeno. Además, el dominio variable participa en la unión de anticuerpos a sí mismos (Kang et al., 1988) y contiene epítomos (idiótopos) reconocidos por anti-anticuerpos (Kohler et al., 1989).

10 Determinados ejemplos de conjugados de unión a proteínas (por ejemplo, anticuerpo) son aquellos conjugados en los que el agente de unión a proteína (por ejemplo, anticuerpo) está unido a una etiqueta detectable. Las "etiquetas detectables" son compuestos y/o elementos que pueden ser detectados debido a sus propiedades funcionales específicas, y/o características químicas, cuyo uso permite que el anticuerpo al que están unidos se detecte y/o se cuantifique adicionalmente, si se desea.

15 Se conocen en la técnica muchos agentes trazadores así como también métodos para su unión a anticuerpos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5.021.236; 4.938.948; y 4.472.509, que se incorporan al presente documento mediante esta referencia). Los restos trazadores usados pueden ser iones paramagnéticos; isótopos radioactivos; fluorocromos; sustancias detectables mediante NMR; y/o imagenología de rayos X, por ejemplo.

20 Las etiquetas fluorescentes de ejemplo contempladas para usar como conjugados de unión a proteínas (por ejemplo, anticuerpo) incluyen Alexa 350, Alexa 430, Alexa 488, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5.6-FAM, Dylight 488, Isotiocianato de Fluoresceína, proteína verde fluorescente (GFP), HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, ficoeritrina, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, tetrametil rodamina (TMR), Renografina, ROX, TAMRA, TET, Tetrametilrodamina, Texas Red, y derivados de estas etiquetas (es decir, análogos halogenados, modificados con isotiocianato u otros conectores para conjugar, etc.), por ejemplo. Una radioetiqueta de ejemplo es el tritio.

30 Los conjugados de detección de unión a proteína (por ejemplo, anticuerpo) contemplados en la presente invención incluyen aquellos para uso *in vitro*, donde el anticuerpo está unido a un ligando de unión secundario y/o a una enzima (una etiqueta de enzima) que generará un producto coloreado tras el contacto con un sustrato cromogénico. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen ureasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de hidrógeno (rábano picante) y/o glucosa oxidasa. Los ligandos de unión secundarios preferidos son compuestos de biotina y/o avidina y estreptavidina. El uso de dichas etiquetas es conocida por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses N.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241.

35 También se pueden usar moléculas que contienen grupos azido para formar enlaces covalentes con proteínas a través de intermedio de nitreno reactivos que se generan mediante luz ultravioleta de baja intensidad (Potter & Haley, 1983). En particular, se han utilizado los análogos 2- y 8-azido de nucleótidos de purina como fotosondas dirigidas al sitio para identificar las proteínas de unión a nucleótidos en extractos celulares crudos (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). Los nucleótidos 2- y 8-azido también se han utilizado para mapear los dominios de unión de nucleótidos de proteínas purificadas (Khatoun et al., 1989; King et al., 1989; y Dholakia et al., 1989) y se pueden usar como agentes de unión a anticuerpos.

40 En la técnica se conocen varios métodos para la unión o conjugación de un anticuerpo con su resto conjugado. Algunos métodos de unión implican el uso de un quelato metálico que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico tal como anhídrido del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); ácido etilentriaminotetraacético; N-cloro-p-toluenosulfonamida; y/o tetracloro-3 α -6 α -difenilglicouril-3 unido al anticuerpo (patente estadounidense N.º 4.472.509 y 4.938.948, que se incorporan al presente documento mediante esta referencia). También se pueden hacer reaccionar anticuerpos monoclonales con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento, tal como glutaraldehído o peryodato. Los conjugados de unión a proteínas (por ejemplo, anticuerpo) con marcadores de fluoresceína se preparan en presencia de estos agentes de acoplamiento o mediante la reacción con un isotiocianato. En la patente estadounidense N.º 4.938.948, el diagnóstico por imagen de tumores de mama, por ejemplo, se logra utilizando anticuerpos monoclonales, y los restos trazadores detectables se unen al anticuerpo usando conectores tales como metil-p-hidroxibenzimidato o N-succinimidil-3-(4-hidroxifenil)-propionato.

45 Se contempla la derivatización de inmunoglobulinas al introducir de manera selectiva grupos sulfhidrilo en la región Fc de una inmunoglobulina usando condiciones de reacción que no alteran el sitio de combinación del anticuerpo. Los conjugados de anticuerpo producidos de acuerdo con esta metodología se describen para que exhiban longevidad, especificidad y sensibilidad mejoradas (patente estadounidense N.º 5.196.066, incorporada al presente documento mediante esta referencia). La unión específica del sitio de las moléculas efectoras o informantes, donde la molécula efectora o informante se conjuga con un residuo de carbohidrato en la región Fc, también se ha descrito en la bibliografía (O'Shannessy et al., 1987).

Las inmunoglobulinas pueden estar radioetiquetadas con nucleidos, tales como el tritio. También, se emplean nanopartículas de oro (tamaños tales como de alrededor de 0,5 nm-40 nm) y/o puntos cuánticos (Hayward, Calif.).

IV. Enzimas y Sustratos (Cromógenos)

5 Se contempla el uso de sustrato e indicadores para la detección del FOLR1, tal como las realizaciones de ejemplo proporcionadas a continuación, por ejemplo.

10 La peroxidasa de rábano picante (HRP) es una enzima que primero forma un complejo con peróxido de hidrógeno y luego provoca que se descomponga, lo que resulta en agua y oxígeno atómico. Como muchas otras enzimas, la HRP y algunas actividades del tipo HRP se pueden inhibir mediante sustrato en exceso. El complejo formado entre la HRP y el peróxido de hidrógeno en exceso es catalíticamente inactivo y en ausencia de un donador de electrones (por ejemplo, sustancia cromogénica) se inhibe de manera reversible. Es el peróxido de hidrógeno en exceso y la ausencia de un donador de electrones lo que provoca la inactivación de las actividades de la HRP endógena.

15 Cuando se usa en sistemas de ensayos, la HRP también se puede usar para convertir un sustrato definido en su cromógeno activado, ocasionando así un cambio de color. La enzima HRP se puede conjugar con un anticuerpo, proteína, péptido, polímero u otra molécula mediante una cantidad de método. Dichos métodos se conocen en la técnica. La adición de glutaraldehído a una solución que contiene una mezcla de HRP y anticuerpo dará como resultado más moléculas de anticuerpo conjugadas entre sí en vez de con la enzima. En el procedimiento de dos etapas, la HRP reacciona primero con los reactivos bifuncionales. En la segunda etapa, solo la HRP activada se mezcla con el anticuerpo, lo que resulta en un etiquetado mucho más eficaz y sin polimerización. La HRP también se conjuga con (estrept)avidina usando el procedimiento de glutaraldehído de dos etapas. Esta forma se usa en procedimientos donde LAB y LSAB son el sustrato, por ejemplo. La conjugación con biotina también implica dos etapas, como la biotina primero se debe derivatizar en el éster de biotilil-N-hidroxisuccinimida o en la hidrazida de biotina antes de que pueda reaccionar con los grupos epsilonamino de la enzima HRP.

25 El 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) es un sustrato para enzimas tales como HRP que produce un producto final marrón que es altamente insoluble en alcohol y otros disolventes orgánicos. La oxidación de DAB también provoca la polimerización, lo que resulta en la capacidad de reaccionar con tetróxido de osmio, y aumenta por lo tanto su intensidad de tinción y densidad de electrones. De los varios metales y métodos usados para intensificar la densidad óptica del DAB polimerizado, el cloruro de oro en combinación con sulfuro de plata parece ser el más exitoso.

30 El 3-Amino-9-etilcarbazol (AEC) es un sustrato para enzimas tales como HRP. Tras la oxidación, forma un producto final rosado-rojo que es soluble en alcohol. Por lo tanto, las muestras procesadas con AEC no deben sumergirse en alcohol o en soluciones alcohólicas (por ejemplo, hematoxilina de Harris). En su lugar, se debería usar una contratinción acuosa y medio de montaje. Lamentablemente AEC es susceptible a oxidación adicional y, cuando se expone a la luz de manera excesiva, disminuirá en intensidad. Por lo tanto, se recomienda su almacenamiento en la oscuridad.

35 El 4-Cloro-1-naftol (CN) es un sustrato para enzimas tales como HRP y precipita como un producto final azul. Debido a que CN es soluble en alcohol y otros disolventes orgánicos, la muestra no debe estar deshidratada, expuesta a contratinciones alcohólicas o cubierta con medio de montaje que contiene disolventes orgánicos. A diferencia de DAB, CN tiende a dispersarse del sitio de precipitación.

40 El diclorhidrato de *p*-fenilendiamina/pirocatecol (reactivo de Hanker-Yates) es un sustrato donador de electrones para enzimas tales como HRP y proporciona un producto de reacción azul-negro que es insoluble en alcohol y otros disolventes orgánicos. Al igual que el DAB polimerizado, este producto de reacción se puede osmificar. Se ha logrado diversos resultados con el reactivo de Hanker-Yates en técnicas de inmunoperoxidasa.

La fosfatasa alcalina (AP) intestinal bovina (peso molecular 100 kD) es una enzima que retira (mediante hidrólisis) y transfiere los grupos fosfato de los ésteres orgánicos al romper el enlace P-O; se forma brevemente un enlace de intermedio enzima-sustrato. Los principales activadores metálicos para la AP son Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ y Ca⁺⁺.

45 La AP no se ha usado de manera extensiva en inmunohistoquímica hasta la publicación del procedimiento de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP) no etiquetado. Los complejos inmunes solubles utilizados en este procedimiento tienen pesos moleculares de aproximadamente 560 kD. La principal ventaja del procedimiento APAAP en comparación con la técnica PAP es la ausencia de interferencia que presenta la actividad de la peroxidasa endógena. Debido a la potencial desviación de la actividad de peroxidasa endógena en la tinción PAP, la técnica APAAP se recomienda para su uso en frotis de sangre y médula ósea. La actividad de la fosfatasa alcalina endógena de los huesos, riñón, hígado y algunos leucocitos se puede inhibir mediante la adición de levamisol 1 mM a una solución de sustrato, aunque 5 mM ha demostrado ser más eficaz. Las fosfatasas alcalinas intestinales no se inhiben adecuadamente con levamisol.

55 En el método de tinción de fosfatasa inmunoalcalina, la enzima hidroliza ésteres de fosfato de naftol (sustrato) en compuestos y fosfatos fenólicos. Los fenoles se acoplan a sales de diazonio incoloras (cromógeno) para producir tintes azo coloreados, insolubles. Se ha usado exitosamente varias combinaciones diferentes de sustratos y cromógenos.

El fosfato de naftol AS-MX se puede usar en su forma ácida o como la sal de sodio. Los cromógenos Fast Red TR y Fast Blue BB producen un producto final rojo o azul brillante, respectivamente. Ambos son solubles en disolventes alcohólicos y otros disolventes orgánicos, de modo que debe usarse el medio de montaje. Se prefiere Fast Red TR cuando se tiñen frotis celulares.

- 5 Los sustratos adicionales de ejemplo incluyen fosfato de naftol AS-BI, fosfato de naftol AS-TR y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo (BCIP). Otros cromógenos posibles incluyen Fast Red LB, Fast Garnet GBC, nitroazul de tetrazolio (NBT), violeta de yodonitrotetrazolio (INT), y derivados de las estructuras, por ejemplo.

V. Métodos de inmunodetección

10 La presente invención se refiere a métodos de inmunodetección para unir, purificar, retirar, cuantificar y/o generalmente detectar de otra manera componentes biológicos, tal como un ligando como se contempla por la presente invención. Los anticuerpos preparados de acuerdo con la presente invención se pueden emplear para detectar proteínas de ligando, polipéptidos y/o péptidos de tipo silvestre y/o mutantes. Como se describe a lo largo de la presente solicitud, se contempla el uso de anticuerpos específicos de ligando de tipo silvestre y/o mutantes. Algunos métodos de inmunodetección incluyen citometría de flujo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico, fluoroinmunoensayo, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente y transferencia Western para nombrar algunos. Las etapas de varios métodos de inmunodetección útiles se han descrito en la bibliografía científica, tal como, por ejemplo, Doolittle M H y Ben-Zeev O, *Methods Mol Biol.* 1999;109:215-37; Gulbis B y Galand P, *Hum Pathol.* 1993 dic;24(12):1271-85; y De Jager R et al., *Semin Nucl Med.* 1993 abr;23(2):165-79.

20 En general, los métodos de inmunounión incluyen obtener una muestra de la que se sospecha que comprende una proteína de ligando, polipéptido y/o péptido, y poner en contacto la muestra con un primer péptido de unión a ligando (por ejemplo, un anticuerpo anti-ligando) de acuerdo con la presente invención, según sea el caso, en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos.

25 En términos de detección de antígenos, la muestra biológica analizada puede ser cualquier muestra de la que se sospecha que comprende un antígeno específico de proteína de ligando de tipo silvestre o mutante, tal como una sección de tejido o muestra, un extracto homogenizado de tejido, aspirados de biopsia, una célula, formas separadas y/o purificadas de cualquiera de las composiciones que contienen FOLR1 de tipo silvestre o mutante, o incluso cualquier líquido biológico que entra en contacto con el tejido, incluyendo sangre y/o suero, aunque se prefieren las muestras o extractos de tejido.

30 Poner en contacto la muestra biológica elegida con el anticuerpo en condiciones eficaces y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes primarios) es generalmente una cuestión de simplemente añadir la composición de anticuerpo a la muestra e incubar la mezcla durante un período de tiempo suficiente para que los anticuerpos formen complejos inmunes con, es decir, se unan a, cualquier antígeno de proteína de ligando presente. Luego de este tiempo, la composición muestra-anticuerpo, tal como una sección de tejido, placa ELISA, transferencia dot o western, generalmente se lavará para retirar cualquier especie de anticuerpo no unido específicamente, permitiendo únicamente la detección de aquellos anticuerpos unidos específicamente dentro de los complejos inmunes primarios.

40 En general, la detección de la formación de inmunocomplejos es conocida en la técnica y se puede lograr a través de la aplicación de diversos enfoques. Estos métodos generalmente se basan en la detección de una etiqueta o marcador, tal como cualquier de esas etiquetas radioactivas, fluorescentes, biológicas y enzimáticas. Las patentes estadounidenses que se refieren al uso de dichas etiquetas incluyen las patentes estadounidenses N.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales mediante el uso de un ligando de unión secundario, tal como un anticuerpo secundario y/o una disposición de unión a ligando de biotina/avidina, como se conoce en la técnica.

45 El anticuerpo anti-ligando empleado en la detección puede estar unido por sí mismo a una etiqueta detectable, donde luego se detectaría simplemente esta etiqueta, permitiendo así que se determine la cantidad de complejos inmunes primarios en la composición. De manera alternativa, el primer anticuerpo que se une dentro de los complejos inmunes primarios se puede detectar por medio de un segundo agente de unión que tiene afinidad de unión para el anticuerpo. En estos casos, el segundo agente de unión puede estar unido a una etiqueta detectable. El agente de unión secundario es frecuentemente en sí mismo un anticuerpo, que por lo tanto se puede denominar anticuerpo "secundario" o un sistema de detección de polímeros. Los complejos inmunes primarios se ponen en contacto con el segundo agente de unión etiquetado o sistema de detección de anticuerpos/polímeros, en condiciones eficaces y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes secundarios. Los complejos inmunes secundarios luego se lavan generalmente para retirar cualquier anticuerpo o ligando secundario, etiquetado, no unido específicamente, y luego se detecta el resto de la etiqueta en los complejos inmunes secundarios.

Los métodos adicionales incluyen la detección de complejos inmunes primarios mediante un enfoque de dos etapas. Se usa un segundo agente de unión, tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión con el anticuerpo, para

formar complejos inmunes secundarios, tal como se describe anteriormente. Luego del lavado, los complejos inmunes secundarios se ponen en contacto con un tercer agente de unión o anticuerpo que tiene afinidad de unión para el segundo anticuerpo, en condiciones eficaces y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes terciarios). El tercer ligando o anticuerpo está unido a una etiqueta detectable, lo que permite la detección de los complejos inmunes terciarios formados de esta manera. El sistema puede proporcionar amplificación de señal, si se desea.

Puede usarse un anticuerpo monoclonal o policlonal biotinilado para detectar el o los antígenos diana y luego se usa un anticuerpo de la segunda etapa para detectar la biotina unida a la biotina en complejo. En ese método la muestra a analizar primero se incuba en una solución que comprende el anticuerpo de la primera etapa. Si el antígeno diana está presente, parte del anticuerpo se une al antígeno para formar un complejo anticuerpo/antígeno biotinilado. El complejo anticuerpo/antígeno luego se amplifica mediante incubación en soluciones sucesivas de estreptavidina (o avidina), ADN biotinilado y/o ADN biotinilado complementario, agregando en cada etapa sitios de biotina adicionales al complejo anticuerpo/antígeno. Las etapas de amplificación se repiten hasta que se logra un nivel adecuado de amplificación, momento en que la muestra se incuba en una solución que comprende el anticuerpo de la segunda etapa contra la biotina. Este anticuerpo de la segunda etapa se etiqueta, como por ejemplo con una enzima que se puede usar para detectar la presencia del complejo anticuerpo/antígeno mediante histoenzimología usando un sustrato cromógeno. Con amplificación adecuada, se puede producir un conjugado de unión a proteína (por ejemplo, anticuerpo) que es macroscópicamente visible.

Otro método conocido de inmunodetección se aprovecha de la metodología inmuno-PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El método PCR usa un complejo de ADN/biotina/estreptavidina/anticuerpo que se lava con un tampón de pH bajo o de sal elevada que libera el anticuerpo. La solución lavada resultante luego se usa para llevar a cabo una reacción PCR con cebadores adecuados con controles apropiados. La gran habilidad de amplificación y especificidad de la PCR se puede utilizar para detectar una molécula de antígeno único. Dicha detección puede llevarse a cabo en tiempo real. Por ejemplo, se contempla el uso de PCR cuantitativa en tiempo real.

En el diagnóstico y/o monitorización clínicos de pacientes con varias formas de enfermedad, la detección de un mutante del FOLR1, y/o una alteración en los niveles del FOLR1, en comparación con los niveles en una muestra biológica correspondiente de un sujeto normal es indicativa de un paciente con la enfermedad. Sin embargo, como es sabido por los expertos en la técnica, dicho diagnóstico clínico no se hará necesariamente sobre la base de este método aislado. Los expertos en la técnica están familiarizados con la diferenciación entre diferencias significativas en tipos y/o cantidades de biomarcadores, que representan una identificación positiva y/o bajo nivel y/o cambios de fondo en los biomarcadores. De hecho, los niveles de expresión de fondo se usan a menudo para formar un "valor de corte" por encima del cual la detección aumentada se calificará como significativa y/o positiva.

En una realización, la detección inmunológica (mediante inmunohistoquímica) del FOLR1 se puntúa tanto para la intensidad como para la uniformidad (porcentaje de células teñidas - solo en la membrana). Las escalas comparativas para la expresión del FOLR1 para la intensidad se correlacionan como 0 - Negativo, 0-1 - Muy Débil, 1 - Débil, 1-2 - Débil a Moderado, 2 - Moderado, 2-3 - Moderado a Fuerte, 3 - Fuerte. De manera cuantitativa, la puntuación 0 representa que no se observa tinción de la membrana en las células tumorales. Una puntuación de 1 representa una tinción leve/apenas perceptible de la membrana en las células tumorales. Para la puntuación 2, se observa una tinción moderada de la membrana en las células tumorales. Finalmente, la puntuación 3 o 3+ representa una tinción moderada a fuerte de la membrana en las células tumorales. Aquellas muestras con puntuación de 0 o 1 para la expresión de FOLR1 pueden caracterizarse como que no sobreexpresan el FOLR1, mientras que aquellas muestras con puntuaciones de 2 o 3 pueden caracterizarse como que sobreexpresan el FOLR1. Las muestras que sobreexpresan el FOLR1 también se pueden puntuar mediante puntuaciones inmunohistoquímicas que corresponden al número de copias de moléculas de FOLR1 expresadas por célula y se ha determinado bioquímicamente: 0=0-10.000 copias/célula, 1=al menos alrededor de 200.000 copias/célula, 2=al menos alrededor de 500.000 copias/célula, y 3=al menos alrededor de 2.000.000 copias/célula. Las escalas comparativas del porcentaje de FOLR1 en la uniformidad de tinción en la membrana celular se correlacionan de la siguiente manera: 0 - Negativo, Focal - <25 %, heterogéneo (hetero) - 25-75 %, y homogéneo (homo) - >75 %.

VI. Hibridación de ácido nucleico

La hibridación *in situ* generalmente se lleva a cabo en células o secciones de tejido fijados en láminas. La hibridación *in situ* se puede llevar a cabo mediante varias metodologías convencionales (Véase, por ejemplo, Leitch et al. *In situ Hybridization: a practical guide*, Oxford BIOS Scientific Publishers, *Microscopy handbooks* v. 27 (1994)). En un procedimiento *in situ*, se usan tintes fluorescentes (tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) que tiene una fluorescencia verde cuando se excita con un láser de iones de argón) para etiquetar una sonda de secuencia de ácido nucleico que es complementaria de una secuencia de nucleótidos diana en la célula. Cada célula que comprende la secuencia de nucleótidos diana se unirá a la sonda etiquetada, produciendo una señal fluorescente tras la exposición de las células a una fuente de luz con una longitud de onda adecuada para la excitación del fluorocromo específico utilizado.

Se pueden emplear diversos grados de rigurosidad de hibridación. A medida que las condiciones de hibridación se vuelven más rigurosas, se necesita un mayor grado de complementariedad entre la sonda y la diana para formar y

mantener un dúplex estable. La rigurosidad se aumenta al aumentar la temperatura, disminuir la concentración de sal o aumentar la concentración de formamida. Añadir sulfato de dextrano o aumentar su concentración también puede aumentar la concentración eficaz de la sonda etiquetada para aumentar el índice de hibridación e intensidad de señal final. Luego de la hibridación, las láminas se lavan en una solución que generalmente comprende reactivos similares a los encontrados en la solución de hibridación con tiempo de lavado que varía desde minutos a horas dependiendo de la rigurosidad necesaria. Los lavados más rigurosos o más extensos típicamente disminuyen el fondo no específico pero corren el riesgo de disminuir la sensibilidad general.

Las sondas usadas en el análisis de hibridación nucleica pueden ser oligonucleótidos o polinucleótidos de ARN o ADN y pueden contener no solo nucleótidos de origen natural sino también sus análogos, como digoxigenina dCTP, biotina dCTP 7-azaguanosina, azidotimidina, inosina o uridina, por ejemplo. Otras sondas útiles incluyen sondas de péptido y análogo de estos, ADN de genes ramificado, peptidomimético, ácido peptidonucleico (APN) y/o anticuerpos, por ejemplo.

Las sondas deberán tener complementariedad suficiente con respecto a la secuencia de ácido nucleico diana de interés de modo que ocurra una unión estable y específica entre la secuencia de ácido nucleico diana y la sonda. El grado de homología necesario para la hibridación estable varía con la rigurosidad del medio de hibridación y/o el medio de lavado. Preferentemente, se utilizan sondas completamente homólogas en la presente invención, pero los expertos en la técnica fácilmente comprenderán que las sondas que exhiban homología menor pero suficiente se pueden usar en la presente invención (véase, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, (1989)).

Las sondas también se pueden generar y elegir a través de varios medios incluyendo, de forma no limitante, mapeo mediante hibridación in situ, paneles híbridos de células somáticas o transferencia spot de cromosomas clasificados; análisis de unión cromosómica; o clonados y aislados de bibliotecas de cromosomas clasificados de líneas celulares humanas o híbridos de células somáticas con cromosomas humanos, híbridos de células somáticas de radiación, microdissección de una región cromosómica o de cromosomas artificiales de levadura (YAC) identificados por cebadores PCR específicos para un locus de cromosoma único u otros medios adecuados como un clon YAC adyacente. Las sondas pueden ser ADN genómico, ADNc o ARN clonado en un plásmido, fago, cósmidos, YAC, Cromosomas Artificiales Bacterianos (BAC), vector viral o cualquier otro vector adecuado. Las sondas se pueden clonar o sintetizar químicamente mediante métodos convencionales. Cuando se clonan, los fragmentos de sonda de ácido nucleico aislados típicamente se insertan en un vector, tal como fago lambda, pBR322, M13 o vectores que contienen el promotor SP6 o T7 y clonados como una biblioteca en un hospedador bacteriano. [Véase, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, (1989)].

Las sondas están preferentemente etiquetadas, tal como con un fluoróforo, por ejemplo. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, de forma no limitante, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, Lisamina, umbeliferona, ficocriterina, ficocianina o fluoróforos comercialmente disponibles tales como SPECTRUM ORANGE™ y SPECTRUM GREEN™ y/o derivados de cualquiera o más de los anteriores. Las múltiples sondas usadas en el ensayo se pueden etiquetar con más de un color fluorescente o pigmento distinguible. Estas diferencias de color proporcionan un medio para identificar las posiciones de hibridación de las sondas específicas. Además, las sonda que no están separadas espacialmente se pueden identificar con una luz o pigmento de color diferente que resulta de mezclar otros dos pigmentos (por ejemplo, azul+amarillo=verde) de colores (por ejemplo, rojo claro+verde=amarillo) o mediante el uso de un conjunto de filtros que deja pasar solo un color por vez.

Las sondas se pueden etiquetar directa o indirectamente con el fluoróforo, utilizando metodología convencional conocida por el experto en la materia.

VII. Kits y composiciones de detección

La invención también describe kits para utilizar en la práctica de la presente invención, como se describe en el presente documento. Dichos kits pueden comprender recipientes, cada uno con uno o más reactivos diversos (típicamente en forma concentrada) utilizados en los métodos, incluyendo, por ejemplo, uno o más agentes de unión (anticuerpos), ya unido a un marcador u opcionalmente con reactivos para acoplar un agente de unión a un anticuerpo o molécula de ácido nucleico (así como también el marcador en sí mismo); tampones, los trifosfatos de nucleótidos adecuados (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP, ATP, CTP, GTP y UTP), transcriptasa inversa, ADN polimerasa, ARN polimerasa y una o más cebadores específicos de la secuencia o redundantes para su uso en la detección de moléculas de ácido nucleico mediante amplificación; y/o reactivos e instrumentos para el aislamiento (opcionalmente mediante microdissección) para respaldar la práctica de la invención. También se incluirá típicamente una etiqueta o indicador que describa, o un conjunto de instrucciones de uso de, los componentes del kit en un método de detección de ligandos de la presente invención, donde las instrucciones se pueden asociar a un prospecto y/o el envase del kit o los componentes del mismo.

La presente invención describe kits de inmunodetección para su uso en los métodos de inmunodetección descritos anteriormente. Como los anticuerpos generalmente se usan para detectar proteínas, polipéptidos y/o péptidos de

tipo silvestre y/o mutantes, preferentemente estos anticuerpos se incluirán en el kit. Los kits de inmunodetección, por lo tanto, comprenderán en medios recipientes adecuados, un primer anticuerpo que se une a una proteína, polipéptido y/o péptido de tipo silvestre y/o mutante, y/u opcionalmente, un reactivo de inmunodetección y/o aún más opcionalmente, una proteína, polipéptido y/o péptido de tipo silvestre y/o mutante.

5 Los reactivos de inmunodetección del kit pueden adoptar una variedad de formas, incluyendo aquellas etiquetas detectables que se asocian a y/o están unidas al anticuerpo dado. También se contemplan las etiquetas detectables que se asocian y/o están unidas a un ligando de unión secundario. Los ligandos secundarios de ejemplo son aquellos anticuerpos o polímeros secundarios que tienen afinidad de unión para el primer anticuerpo.

10 Los reactivos de inmunodetección adecuados adicionales para su uso en el presente kit incluyen el reactivo de dos componentes que comprende un anticuerpo secundario que tiene afinidad de unión para el primer anticuerpo, junto con un tercer anticuerpo o polímero que tiene afinidad de unión para el segundo anticuerpo, donde el tercer anticuerpo está unido a una etiqueta detectable. Como se indicó anteriormente, una cantidad de etiquetas de ejemplo se conocen en la técnica y/o todas dichas etiquetas se pueden emplear de forma adecuada con respecto a la presente invención.

15 Los kits pueden comprender adicionalmente una composición en alícuotas adecuada de la proteína, polipéptido y/o polipéptido de tipo silvestre y/o mutante, ya sea etiquetada o no etiquetada, que se puede usar para preparar una curva patrón para un ensayo de detección. Los kits pueden comprender conjugados de anticuerpo- o polímero-etiqueta ya sea en forma totalmente conjugada, en forma de intermedios y/o como restos separados que serán conjugados por el usuario del kit. Los componentes de los kits se pueden empaquetar ya sea en medio acuoso y/o
20 en forma liofilizada.

Los medios recipientes de los kits generalmente incluirán al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa y/u otros medios recipientes, en el que se pueda colocar el anticuerpo y/o preferentemente, separar en alícuotas de manera adecuada. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener al anticuerpo, antígeno y/o cualquier otro recipiente de reactivo cerrado para su venta comercial. Dichos recipientes
25 pueden incluir recipientes de inyección y/o de plástico moldeado por soplado en los cuales se retienen los viales deseados.

Los kits pueden comprender adicionalmente uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer, tales como un inmunoconjugado del FOLR1 y/o un agente quimioterapéutico.

30 El kit puede comprender adicionalmente un reactivo de detección del FOLR1 usado para medir la expresión del FOLR1 en un sujeto que comprende un reactivo de detección del FOLR1 e instrucciones de uso. En una realización, el reactivo de detección del FOLR1 comprende un péptido, proteína o sonda molecular de unión a FOLR1 (es decir, ácido nucleico). El reactivo de detección del FOLR1 puede ser un anticuerpo anti-FOLR1. El kit puede comprender adicionalmente un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo anti-FOLR1. El anticuerpo específico de FOLR1 puede incluirse a una concentración de 0,5 a 7,5 µg/ml, preferentemente de 0,9 a 3,8 +/- 0,5 µg/ml. El anticuerpo
35 puede incluirse a una concentración de 1,0 +/- 0,5 µg/ml, 1,5 +/- 0,5 µg/ml, 1,9 +/- 0,5 µg/ml, 2,5 +/- 0,5 µg/ml, 3,0 +/- 0,5 µg/ml, 3,5 +/- 0,5 µg/ml, 3,8 +/- 0,5 µg/ml o hasta 4,2 µg/ml. El anticuerpo puede incluirse en una solución concentrada con instrucciones de diluciones para lograr una concentración final de 0,9 a 3,8 +/- 0,5 µg/ml. El kit puede comprender adicionalmente un reactivo de detección que se selecciona del grupo que consiste en: una enzima, un fluoróforo, una etiqueta radioactiva y un luminóforo. El reactivo de detección puede seleccionarse del
40 grupo que consiste en: biotina, digoxigenina, fluoresceína, tritio y rodamina.

El kit también puede incluir instrucciones para la detección y puntuación de la expresión del FOLR1. El kit también puede incluir muestras de control o de referencia. Los ejemplos no limitantes de muestras de control o de referencia incluyen sedimentos celulares o líneas celulares de cultivo celular derivadas de muestras normales (control normal) o tumorales (control positivo). Las líneas celulares de ejemplo incluyen KB, NCI-H2110, Igrov-1, Ishikawa, Jeg-3,
45 Skov-3, Hela, T47D, Caco2, SW620, OAW28, HCC827, Ovar-8, y Ovar-3, Ov-90, otras líneas celulares tumorales que se sabe que expresan el FOLR1 y líneas celulares transfectada de manera estable o transitoria con un vector de expresión que expresa el FOLR1. También se pueden encontrar ejemplos adicionales de tejidos de control positivo en los Ejemplos 9-11. El kit también puede comprender una guía de tinción que ilustra visualmente las muestras de referencia positivas y normales para la intensidad y uniformidad de tinción. Dichas guías de tinción pueden tener
50 muestras de referencia de pulmón, páncreas y/o glándula salival normales, y tumores teñidos con puntuaciones convencionales (por ejemplo, cánceres de ovario, de pulmón, renales y endometriales, así como aquellos descritos en los Ejemplos y en las Figuras 23-25).

VIII. Agentes de unión a FOLR1

55 Todo anticuerpo que se une a FOLR1 se puede utilizar en los métodos de detección de la presente invención. Los ejemplos de anticuerpos anti-FOLR1 terapéuticamente eficaces se pueden encontrar en la Pub. de sol. estadounidense N.º US 2012/0009181. Las secuencias de aminoácido (aa) y nucleótido (nt) de longitud completa para FOLR1 son conocidas en la técnica y también se proporcionan en el presente documento tal como se representan mediante las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Un anticuerpo específicamente útil para la detección

del FOLR1 es el clon BN3.2 anti-huFOLR1 monoclonal de ratón (Leica n.º NCL-L-FRalpha). Un ejemplo de un anticuerpo anti-FOLR1 terapéuticamente eficaz es huMov19 (MM9346A). Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 3-5 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huMov19 (M9346A), y el dominio variable de la cadena ligera versión 1.00, el dominio variable de la cadena ligera versión 1.60 de huMov19, respectivamente. En determinadas realizaciones, el anticuerpo huMov19 (M9346A) se codifica mediante los plásmidos depositados en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), sita en 10801, University Boulevard, Manassas, VA 20110 el 7 de abril de 2010 de conformidad con los términos del Tratado de Budapest y con los n.º ATCC de depósito PTA-10772 y PTA-10773 o 10774. Los ejemplos de inmunoconjugados FOLR1 útiles en los métodos terapéuticos de la invención se proporcionan a continuación.

IX. Inmunoconjugados FOLR1

La presente invención también describe métodos para aumentar la eficacia de los conjugados (también denominados en el presente documento como inmunoconjugados), que comprenden los anticuerpos anti-FOLR1, fragmentos de anticuerpo, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus aspectos tal como se describen en el presente documento, enlazados o conjugados con una citotoxina (fármaco) o profármaco. Los inmunoconjugados FOLR1 de ejemplo se pueden encontrar en la Pub. de sol. estadounidense N.º US 2012/0009181. Un inmunoconjugado terapéutico de la invención particularmente eficaz es el anticuerpo huMov19 que se describe anteriormente.

En la técnica se conocen fármacos y profármacos adecuados. En determinadas realizaciones, los fármacos o profármacos son agentes citotóxicos. El agente citotóxico utilizado en el conjugado citotóxico de la presente invención puede ser cualquier compuesto que dé como resultado la muerte de una célula o induzca la muerte celular o de alguna manera disminuye la viabilidad celular e incluye, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, benzodiazepinas, taxoides, CC-1065 y análogos de CC-1065, duocarmicina y análogos de duocarmicina, enedinas, tal como calicheamicinas, dolastatina y análogos de dolastatina, incluyendo auristatinas, derivados de tomamicina, derivados de leptomicina, metotrexato, cisplatino, carboplatino, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo y morfolino doxorubicina. En determinadas realizaciones, los agentes citotóxicos son maitansinoides y análogos de maitansinoides.

El fármaco o profármaco puede, por ejemplo, unirse al anticuerpo anti-FOLR1, tal como huMov19 o un fragmento de este a través de un enlace disulfuro. La molécula conectora o agente de reticulación comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el anticuerpo anti-FOLR1 o un fragmento de este. En determinadas realizaciones, los grupos químicos reactivos para su reacción con el agente de unión celular son ésteres de *N*-succinimidilo y ésteres de *N*-sulfosuccinimidilo. De manera adicional, la molécula conectora comprende un grupo químico reactivo, en determinadas realizaciones un grupo ditiopiridilo que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. En determinadas realizaciones, las moléculas conectoras incluyen, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson *et al.*, *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), 4-(2-piridilditio)butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4,563,304), 4-(2-piridilditio)2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 20090274713), 4-(2-piridilditio)2-pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP) (véase, por ejemplo, número de Registro CAS 341498-08-6), 2-iminotiolano o anhídrido acetilsuccínico.

También se pueden preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide con enlaces no escindibles. Dichos reticuladores se describen en la técnica (véase ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbook y la Publicación de la solicitud de patente estadounidense N.º 2005/0169933) e incluyen, de forma no limitante, 4-(maleimidometilo) ciclohexanocarboxilato de *N*-succinimidilo (SMCC), *N*-succinimidilo-4-(*N*-maleimidometilo)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de SMCC (LC-SMCC) de "cadena larga", éster de *N*-succinimidilo del ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster de *N*-succinimidilo del ácido β -maleimidopropanoico (BMPS), éster de *N*-succinimidilo del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster de *m*-maleimidobenzilo-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), éster de *N*-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(*p*-maleimidofenil)-butirato de *N*-succinimidilo (SMPB), y *N*-(*p*-maleimidofenil)isocianato (PMPPI), *N*-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de *N*-succinimidilo (SIA), bromoacetato de *N*-succinimidilo (SBA), y 3-(bromoacetamido)propionato de *N*-succinimidilo (SBAP). En determinadas realizaciones, el anticuerpo se modifica con reactivos de reticulación tales como 4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), sulfo-SMCC, éster de maleimidobenzilo-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS o succinimidil-yodoacetato, tal como se describe en la bibliografía, para introducir 1-10 grupos reactivos (Yoshitake *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 101:395-399 (1979); Hashida *et al.*, *J. Applied Biochem.*, 56-63 (1984); y Liu *et al.*, *Biochem.*, 18:690-697 (1979)).

La presente invención describe aspectos donde alrededor de 2 a alrededor de 8 moléculas del fármaco ("carga del fármaco"), por ejemplo, maitansinoide, están unidas a un anticuerpo anti-FOLR1 o un fragmento de este, el efecto anti-tumor del conjugado es mucho más eficaz en comparación con una carga del fármaco de menor o mayor cantidad de fármacos unidos al mismo agente de unión celular. "Carga del fármaco", según se emplea en el presente documento, se refiere a la cantidad de moléculas del fármaco (por ejemplo, un maitansinoide) que se puede unir a un agente de unión celular (por ejemplo, un anticuerpo anti-FOLR1 o un fragmento de este). El número de moléculas del fármaco que se pueden unir al agente de unión celular puede promediar entre alrededor de 2 y

alrededor de 8 (por ejemplo, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1). En determinadas realizaciones, el fármaco es N^2 -deacetil- N^2 -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N^2 -deacetil- N^2 -(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil) maitansina (DM4). El anticuerpo huMov19 puede conjugarse con DM1 o DM4. El anticuerpo FR-1-21 puede conjugarse con DM1 o DM4. El anticuerpo FR-1-48 puede conjugarse con DM1 o DM4. El anticuerpo FR-1-49 puede conjugarse con DM1 o DM4. El anticuerpo FR-1-57 puede conjugarse con DM1 o DM4. El anticuerpo FR-1-65 puede conjugarse con DM1 o DM4.

X. Correlación de la expresión y eficacia terapéutica del FOLR1

- 10 La invención describe un método para identificar sujetos con una alta probabilidad de respuesta a las terapias anti-cáncer dirigidas al FOLR1. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los niveles elevados de expresión del FOLR1 se correlacionan con la eficacia de las medidas terapéuticas anti-cáncer dirigidos al FOLR1.

15 La evaluación de muestras de pacientes y su correlación con la eficacia *in vivo* usando modelos de xenoinjertos demuestra el poder del análisis de expresión para la selección de sujetos que tienen más probabilidades de responder al tratamiento. La IHC proporciona una puntuación para la expresión del FOLR1 en células tumorales: 0 (sin expresión) a 3+ (niveles de expresión muy altos). Los datos *in vivo* usando modelos de xenoinjerto demuestran que las muestras con puntuaciones 1, 2, 3 o 3+ para la expresión del FOLR1, preferentemente una puntuación de 2, 3 o 3+, tienen una alta probabilidad de responder a las terapias anti-cáncer dirigidas al FOLR1 en dosis clínicamente importantes de inmunoconjugados del FOLR1 (por ejemplo, dosis de xenoinjerto de 5 mg/kg de un inmunoconjugado del FOLR1 se puede aproximar a 185 mg/m² en pacientes). Por lo tanto, la identificación de individuos que presentan una puntuación para el FOLR1 elevada ayudaría a identificar a aquellos individuos que podrían responder a una dosificación clínicamente importante. Tal como se describe con más detalle a continuación, la sensibilidad a las medidas terapéuticas del FOLR1 se correlaciona con la puntuación del FOLR1 de 2 o más alto, especialmente con una puntuación de nivel 3. Además, la expresión de más niveles uniformes del FOLR1 proporciona una mejor correlación con el beneficio terapéutico. Por lo tanto, se prefiere una uniformidad de tinción homogénea pero las combinaciones de la intensidad de tinción aumentada con la uniformidad de tinción heterogénea también son indicativas de una expresión aumentada del FOLR1. Por ejemplo, las puntuaciones mayores que 2 hetero son un criterio de selección del paciente para su tratamiento con un agente terapéutico del FOLR1.

25 El análisis de expresión del FOLR1 también identifica pacientes en quienes los niveles disminuidos de una terapia anti-cáncer dirigida al FOLR1 ("terapia de dosis baja) puede ser eficaz para provocar respuestas anti-tumor. Tal como se entiende en la técnica, los compuestos generalmente se administran en la menor dosificación que logre la respuesta terapéutica deseada. Esto es específicamente importante para las medidas terapéuticas que provocan efectos secundarios clínicos y comúnmente no deseados. La capacidad de reconocer esos sujetos con niveles de expresión del FOLR1 elevados permite minimizar la dosificación de la medida terapéutica dirigida al FOLR1, por lo tanto disminuye la posibilidad de efectos secundarios, mientras que mantiene la eficacia terapéutica.

30 Tal como se muestra en el presente documento, las puntuaciones de la expresión del FOLR1 de 2 hetero o mayores se correlacionan con un mayor grado de respuesta a los inmunoconjugados anti-FOLR1. En determinadas realizaciones, el mayor grado de respuesta es caquexia, aumento en tiempo de supervivencia, extensión del tiempo hasta el avance del tumor, reducción de la masa tumoral, reducción de la carga tumoral y/o una prolongación del tiempo de la metástasis tumoral, tiempo de la recidiva tumoral, respuesta tumoral, respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable, respuesta progresiva, supervivencia sin avance (SSA) o supervivencia general (SG). En determinadas realizaciones, las puntuaciones de la expresión del FOLR1 de 2 hetero o mayores se correlaciona con una mayor SSA, SSE u SG.

35 Los kits que se usan en los métodos de detección y correlación con muestras de referencia/control pueden comprender muestras de control (positivas y/o negativas) o de referencia. Las muestras de control positivas o de referencia positivas pueden derivar de líneas celulares de cultivo tisular, tejido normal o tejido tumoral. Las muestras de referencia positivas y negativas pueden derivar de líneas celulares que incluyen SW620, T47D, IGROV-1, HeLa, KB, JEG-3, otras líneas celulares tumorales, y líneas celulares transfectadas de manera estable y transitoria con un vector de expresión que codifica FOLR1. Las muestras de tejido normal y tumoral y líneas celulares de cultivo tisular también se pueden usar como muestras de referencia de control negativo. Por muestras adicionales, véanse los Ejemplos 9-11 y las Figuras 23-25.

XI. Composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos

40 Los agentes de unión a FOLR1 (que incluyen anticuerpos, inmunoconjugados y polipéptidos) son útiles en varias aplicaciones que incluyen, de forma no limitante, métodos de tratamiento terapéutico, tales como el tratamiento de cáncer. En determinadas realizaciones, los agentes son útiles para inhibir el crecimiento tumoral, inducir la diferenciación, reducir el volumen tumoral y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor. Los métodos de uso pueden ser métodos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En determinadas realizaciones, el agente de unión a FOLR1 o anticuerpo o inmunoconjugado o polipéptido es un antagonista del FOLR1 humano al que se une.

La enfermedad que se trata con el agente de unión a FOLR1 o su antagonista (es decir, el anticuerpo huMov19 o inmunoconjugado) es un cáncer. En determinadas realizaciones, el cáncer se caracteriza por células que expresan al receptor 1 de folato al que se une el agente de unión (por ejemplo, anticuerpo) a FOLR1.

5 La presente invención proporciona un anticuerpo anti-receptor 1 de Folato (FOLR1) o un inmunoconjugado anti-FOLR1 para su uso en un método de tratar un cáncer que comprende administrar a un sujeto (por ejemplo, un sujeto que necesite tratamiento) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FOLR1. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer que se selecciona del grupo que consiste de cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de ovario. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón. En determinadas realizaciones, el sujeto es un humano.

15 La presente invención describe además métodos para inhibir el crecimiento tumoral usando los anticuerpos u otros agentes descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el método para inhibir el crecimiento tumoral comprende poner en contacto la célula con un agente de unión a FOLR1 (por ejemplo, anticuerpo) *in vitro*. Por ejemplo, se cultiva una línea celular inmortalizada o una línea celular de cáncer que expresa FOLR1 en un medio al que se le agrega el anticuerpo u otro agente para inhibir el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, se aíslan las células tumorales de una muestra de un paciente, tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre, y se cultivan en un medio al que se le agrega un agente de unión a FOLR1 para inhibir el crecimiento tumoral.

20 En algunas realizaciones, el método para inhibir el crecimiento tumoral comprende poner en contacto el tumor o células tumorales con el agente de unión a FOLR1 (por ejemplo, anticuerpo) *in vitro*. En determinadas realizaciones, poner en contacto un tumor o célula tumoral con un agente de unión a FOLR1 se lleva a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, los agentes de unión a FOLR1 se pueden administrar a xenoinjertos que expresan uno o más FOLR1 que se han cultivado en ratones inmunodeprimidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) para inhibir el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, el agente de unión a FOLR1 se administra al mismo tiempo que la introducción de células tumorogénicas en el animal o poco después para prevenir el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, el agente de unión a FOLR1 se administra como medida terapéutica luego de que las células tumorogénicas se cultivaron hasta alcanzar un tamaño específico.

25 En determinadas realizaciones, el método para inhibir el crecimiento tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FOLR1. En determinadas realizaciones, el sujeto es un humano. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene un tumor o le han quitado un tumor.

30 En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste en tumor de cerebro, tumor colorrectal, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de ovarios, tumor del hígado, tumor de mamas, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor del cuello uterino, tumor de vejiga, glioblastoma y tumor de cabeza y cuello. En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor de ovarios.

35 En determinadas realizaciones, la invención describe métodos para inhibir el crecimiento tumoral usando dosis bajas de un agente de unión a FOLR1. El término "dosis baja" tal como se usa en el presente documento se refiere a la dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FOLR1 que es menor que la dosis usual o convencional requerida para producir el efecto terapéutico.

40 Por lo tanto, en determinadas realizaciones las invenciones proporcionan métodos para tratar cáncer usando anticuerpo e inmunoconjugados huMov19. En determinadas realizaciones, el inmunoconjugado huMov19 es huMov19-SPDB-DM4; huMov19-sulfo-SPP-DM1; huMov19-SPP-DM1; o huMov19-PEG4-Mal-DM4. En una realización determinada, el inmunoconjugado huMov19 es huMov19-SPDB-DM4, que también se denomina IMGN853.

45 Las formulaciones pueden prepararse para su almacenamiento y uso mediante la combinación de un anticuerpo o agente purificado de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, portador, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Edición Mack Publishing, 2000). Los vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables incluyen, de forma no limitante, tampones no tóxicos, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales, tales como, cloruro de sodio; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de alrededor de 10 residuos de aminoácidos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; carbohidratos, tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn) y

tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de varias formas, ya sea para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como a las membranas mucosas que incluyen la administración vaginal y rectal), tal como parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral o parenteral incluyendo inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o administración intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se puede combinar en una formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anticancerosas. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación tiene preferentemente actividades complementarias al ADC de la combinación de forma tal que no se afecten negativamente entre sí. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión a FOLR1 y el segundo agente anticanceroso.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo u agente de la presente invención depende del tipo de enfermedad a ser tratada, la gravedad y transcurso de la enfermedad, la respuesta de la enfermedad, si el anticuerpo o agente se administra con propósitos terapéuticos o preventivos, terapia anterior, historia clínica del paciente, etc., los que quedan a criterio del médico tratante. El anticuerpo o agente se puede administrar una sola vez o mediante una serie de tratamientos que pueden prolongarse de varios días a varios meses, o hasta que se logra la cura o disminución de la enfermedad (por ejemplo, reducción del tamaño del tumor). Los programas de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo o agente individual. El médico tratante puede determinar fácilmente las dosificaciones, metodologías de dosificación y tasas de repetición óptimas. En determinadas realizaciones, la dosificación es de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal y se puede administrar una o más veces al día, a la semana, al mes o al año. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el inmunoconjugado anti-FOLR1 se administra una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En determinadas realizaciones, la dosificación del anticuerpo o el inmunoconjugado es de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 20 mg por kg de peso corporal. El médico tratante puede calcular las tasas de repetición para las dosificaciones basadas en tiempos de residencia y concentraciones medidos del anticuerpo en fluidos o tejidos corporales.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y puede demostrar ser "sinérgica", es decir, el efecto que se logra cuando los ingredientes activos utilizados en conjunto son superiores a la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos de forma individual. Un efecto sinérgico puede lograrse cuando los ingredientes activos se: (1) co-formulan y administran simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) administran de manera alternada o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se administran en una terapia alternada, se puede alcanzar un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternada, se administra secuencialmente, es decir, en serie, una dosis eficaz de cada ingrediente activo, mientras que en la terapia combinada se administran a la vez dosis eficaces de dos o más ingredientes activos.

Las realizaciones de la presente descripción se pueden definir adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que describen en detalle la preparación de ciertos anticuerpos de la presente descripción y métodos para usar anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar muchas modificaciones, tanto a los materiales como a los métodos, sin desviarse del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento tienen fines meramente ilustrativos y que a los expertos en la materia se les podrán ocurrir varias modificaciones o cambios en vista de estos, los que deben incluirse dentro de la presente solicitud.

Se informa que el Receptor 1 de Folato (FOLR1) se encuentra altamente expresado en tumores de ovarios y expresado en niveles de alto a moderado en carcinomas cerebrales, de mama, de vejiga, endometrioide, de pulmón, pancreático y renal. Sin embargo, la expresión del FOLR1 está limitada en tejidos normales e incluye riñón, pulmón, plexos coroideos, páncreas, mama, tiroides, ovarios, próstata y pulmón.

Se han informado métodos que cuantifican FOLR1 usando homogenados de tejido fresco congelado. Los homogenados de tejido entero no pueden distinguir entre expresión citoplasmática y asociada a la membrana, y las muestras frescas congeladas no son susceptibles en el medio clínico. Sin embargo, las muestras incrustadas en parafina y fijadas con formalina (FFPE) se pueden archivar para los pacientes en la clínica.

Ejemplo 1

Tinción inmunohistoquímica del FOLR1 en muestra de células - métodos manuales de sedimentos y tejidos celulares incrustados en parafina y fijados con formalina se utilizaron como muestras de prueba con los siguientes reactivos y condiciones de tinción.

5

Anticuerpos IHC

Artículo de prueba
■ clon BN3.2 anti-huFOLR1 monoclonal de ratón (Leica n.º NCL-L-FRalpha)
InmunoGen: Proteína recombinante procarriota que corresponde a 189 aminoácidos del dominio externo de la molécula alfa del receptor de folato.
Artículo de control
■ clon mulgG1 (Coulter) Cat. N.º 6602872
Anticuerpo secundario
■ antirratón de caballo biotinilado (Vector, Cat. N.º PK-6100)

Condiciones de ensayo FFPE

Etapas	Condición
Recuperación de antígenos	Borg (Biocare) pH 9.0
Etapas de bloqueo	Avidina/Biotina; peróxido
Artículo de prueba o de control	2.0 µg/ml
Diluyente	PBS que contiene suero de caballo al 2 %
Anticuerpo secundario	10 µg/ml
Sistema de detección*	Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa; ABC (Vector Labs)
Cromógeno	DAB (Dako)
Tiempo de desarrollo de DAB	≥ 5 min

10 Las biopsias de tumores de ovario y xenoinjertos de tumores de ovario del paciente incrustadas en parafina y fijadas con formalina (FFPE) se tiñeron con el clon BN3.2 del anticuerpo anti-FOLR1 murino (Leica, Cat. n.º NCI-L-FRalpha) y un mulgG1 de control de Coulter. Después de la recuperación de antígenos en un tampón de pH 9.5, las láminas se bloquearon con suero de caballo al 2 % más avidina. Las láminas se lavaron en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos con el anticuerpo anti-FOLR1 o mulgG1 de control, después durante 30 minutos con IgG anti-ratón biotinilada y 40 minutos con el complejo avidina-biotina-peroxidasa para detectar el anticuerpo secundario unido. La incubación durante 5 minutos con DAB (tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobenzidina) da como resultado la señal de color. Las láminas se sometieron a contratinción con hematoxilina.

15 La intensidad de tinción del FOLR1 y los patrones de distribución se puntuaron con relación a la tinción de IgG de control (sin especificar). La intensidad se puntuó con una escala de 0 a 3 (0 = sin tinción, 1 = débil, 2 = moderada y 3 = fuerte) y la distribución se puntuó como focal (<25 % de las células teñidas), heterogénea (25-75 % de las células teñidas) y homogénea (>75 % de las células teñidas).

20 Las muestras de FFPE derivaron de micromatrices del tumor, así como también bloques de tejido humano de siete tumores diferentes, tal como se describe más adelante.

Muestras de prueba de FFPE

Micromatrices del tumor humano (TMA)	DESCRIPCIÓN	Fuente comercial
■ Tumor mixto	96 núcleos de 33 tipos de cáncer	Biomax Cat. n.º MC961

Micromatrices del tumor humano (TMA)	DESCRIPCIÓN	Fuente comercial
■Tumor de ovarios	64 núcleos	Biochain Cat. n.º T8235725
■NSCLC	80 núcleos	Biomax Cat. n.º LC806
■Carcinoma colorrectal	85 núcleos duplicados	Biomax Cat. n.º BC000110
Bloques de tejido humano	Cantidad	Fuente comercial
■Tumor de mama	4	CHTN
■Carcinoma colorrectal	4	
■Tumor de ovario	4	
■NSCLC	8	
■Tumor pancreático	1	
■Tumor renal	8	
■SCCHN	14	

5 El artículo de prueba del FOLR1, clon BN3.2 anti-FOLR1 murino se evaluó para determinar la especificidad de unión al antígeno huFOLR1. Con los métodos de tinción por IHC informados, las secciones FFPE de 300-19 y los sedimentos celulares de 300-19 transfectados con huFOLR1 (300-10/FOLR1) se tiñeron y se sometieron a prueba para determinar FOLR1. El artículo de prueba del FOLR1 tiñó específicamente 300-19/FOLR1+ células y no presentó tinción alguna en células 300-19 (3 homo y negativas, respectivamente). Estos resultados demuestran que el clon BN3.2 se dirige específicamente al antígeno huFOLR1. (Figura 1).

10 El anticuerpo BN3.2 también se usó para detectar la expresión del FOLR1 en las muestras de tejido. La inmunorreactividad de cada artículo de prueba y control con tejidos y sedimentos celulares se determinó mediante la consulta del patólogo, Dr. David Dorfman. En primera instancia se sometieron a prueba los controles de sedimentos celulares seguido de las muestras de tejido. Para cada tejido evaluado, se registró una descripción de la intensidad de tinción y de la uniformidad de tinción. La puntuación de la intensidad de tinción y las escalas de uniformidad se describen a continuación. La última puntuación que se registra para cada muestra de tejido evaluada es la puntuación del artículo de prueba menos la puntuación del artículo de control correspondiente. El nivel ABC de cada muestra se estimó mediante la comparación de la puntuación de tinción con los controles de sedimentos celulares calibrados.

Intensidad (cantidad de tinción)		Uniformidad (cantidad de células teñidas)	
0	Negativo		
1	Débil	0	Negativo
2	Moderado	Focal	<25 %
3	Fuerte	Heterogéneo (hetero)	25-75 %
3+	Muy fuerte	Homogéneo (homo)	>75 %

20 Los valores de anticuerpos unidos por célula (ABC) se determinaron por las líneas celulares de tumores FOLR1 positivas (KB, IGROV1, JEG3, y OVCAR3) usando anti-FOLR1-Ficoeritrina, perlas BD Quantibrite y citometría de flujo, y se demostró que tienen valores ABC diferentes. (Figura 2). Las condiciones de tinción se optimizaron para FOLR1 de modo que los sedimentos celulares preparados a partir de líneas celulares de tumores FOLR1 positivas exhibieron niveles variantes de intensidad de tinción mediante IHC. El sedimento celular KB exhibió una tinción homogénea muy fuerte (3+) con alta intensidad, el sedimento celular IGROV1 exhibió una tinción fuerte (3), el sedimento celular JEG3 exhibió una tinción heterogénea moderada (2-3), mientras que la tinción del sedimento celular OVCAR3 exhibió una tinción heterogénea de baja intensidad (1-2). Las tendencias de intensidad de tinción del FOLR1 que se observan a partir de los sedimentos celulares se corresponden con los valores ABC registrados, donde las células KB exhibieron el valor ABC más alto de 1.700.000, las células IGROV-1 exhibieron el siguiente

valor ABC más alto de 260.000, JEG-3 exhibió un valor ABC más bajo de 41.000 ABC, mientras que las células OVCAR3 exhibieron el valor ABC más bajo de 4.000. Los resultados de tinción y sus respectivos valores ABC se enumeran en la tabla a continuación.

5 Los valores ABC y sus respectivos resultados de tinción para huFOLR1 en las líneas celulares y sus respectivos sedimentos celulares.

Línea celular	FOLR1	
	ABC	Puntuación
KB	1.700.000	3+ homo
IGROV1	260.000	3 homo
JEG3	41.000	2-3 hetero
OVCAR3	4.000	1-2 hetero

10 Las líneas celulares adicionales, que incluyen Capan-1, Jar, Hec-1-A, Hec-1-B, Ishikawa, NCI H292, BT474EEI, PA-1, OV-90, CaOv-4, CaOv-3, A2780, Ovar-5, Ovar-4, HCT-15, 786-O, NCI H838, NCI H 522, NCI H2110, NCI H1734, NCI H228 y FU.OV-3, se sometieron a prueba y se descubrió que son FOLR1 positivo pero los niveles de expresión del FOLR1 y la sensibilidad a la actividad del inmunocombinado anti-FOLR1 variaban. A los efectos de referencia, se prefieren las líneas celulares que tienen una expresión del FOLR1y una sensibilidad a inmunocombinados anti-FOLR1 consistentes.

15 De particular importancia fue que el método IHC pudo detectar de manera confiable la expresión del FOLR1 en muestras de tejido de cánceres de ovario y cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Tal como se muestra en la Figura 3, la expresión del FOLR1 se podría detectar de manera confiable en muestras de cáncer de ovario y NSCLC con puntuación entre 2 hetero y 3 homo. Los valores ABC para estas muestras oscilaron entre aproximadamente 41.000 para las muestras con puntuación 2 hetero, y más que 260.000 para las muestras con puntuación 3 homo. Tal como se muestra en la Figura 4, también se observó alta intensidad de tinción y uniformidad de tinción en cánceres de ovario, adenocarcinomas de pulmón y carcinomas bronquioloalveolares. Además, se descubrió adicionalmente que la expresión del FOLR1 en muestras de NSCLC (Figura 5) y cánceres de ovarios (Figura 6) se ubican predominantemente en la membrana de los tejidos de muestra. Se detectó la expresión en múltiples muestras de estos así como también en diferentes muestras de tumor. Resulta interesante que ninguna de las muestras de tumores colorrectal, de mama o pulmón microcítico, tuvieron una puntuación mayor que 2 hetero.

25 Ejemplo 2

La eficacia *in vivo* de los conjugados huMov19-PEG4Mal-DM4 y huMov19-SPDB-DM4 en comparación con conjugados similares no dirigidos en un modelo de xenoinjerto KB.

30 El conjugado escindible dirigido al FOLR1, huMov19-SPDB-DM4 en comparación con huC242-SPDB-DM4 no dirigido, y el conjugado no escindible huMov19-PEG4-Mal-DM4 en comparación con huC242-PEG4Mal-DM4 no dirigido se sometieron a prueba usando un modelo de xenoinjerto establecido de células KB (expresión del FOLR1 muy alta, 3+ homocigotos mediante IHC manual) implantado de forma subcutánea en ratones SCID. Los ratones se separaron de forma aleatoria por peso corporal en grupos de tratamiento y se trataron ya sea solos (conjugados SPDB) en el día 3 después de la inoculación de células o tres veces por semana en los días 3, 10 y 17 después de la inoculación de células con 5 y 10 mg/kg de un conjugado, respectivamente. El volumen tumoral medio de los diferentes grupos de tratamiento se grafica en la Figura 7. Los tratamientos ya sea con huMov19-SPDB-DM4 o huMov19-PEG4Mal-DM4 dieron como resultado una disminución en el volumen tumoral medio cuando se compara con el control de PBS, mientras que los tratamientos con cualquiera de los conjugados no dirigidos correspondientes no produjeron ningún efecto significativo.

35 Ejemplo 3

40 Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento de IMG853 en xenoinjertos de cáncer de ovario humano OVCAR-3.

45 Se evaluó el efecto antitumoral de IMG853 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo establecido de cáncer de ovario. Los ratones SCID se inocularon con células de carcinoma de ovario OVCAR-3 (1×10^7 células/animal) inyectadas subcutáneamente en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron alrededor de 100 mm³ de tamaño (21 días después de la inoculación de células tumorales), los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (6 animales por grupo). Los ratones se trataron con una única inyección intravenosa de IMG853 a 1,2, 2,5 o

5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS. El crecimiento tumoral se monitorizó mediante la medición del tamaño tumoral dos veces por semana. El tamaño del tumor se calculó con la fórmula: longitud x ancho x altura x $\frac{1}{2}$.

5 El IMGN853 fue muy activo contra tumores OVCAR-3 (puntuación IHC de 3 homocigotos usando los métodos IHC manuales) en cuanto a la inhibición del crecimiento tumoral (T/C = 0 %) tanto en el nivel de dosis 2,5 como 5,0 mg/kg (Figura 8). Existieron regresiones completas del tumor (CR) en 6/6 ratones tratados con IMGN853 a 5,0 mg/kg. Existieron regresiones parciales del tumor (PR) en 6/6 ratones y CR en 4/6 ratones tratados con IMGN853 en el nivel de dosis de 2,5 mg/kg. El IMGN853 fue activo en el nivel de dosis de 1,2 mg/kg, que resulta en un T/C del 18 %, con 2/6 PR y 1/6 CR. De acuerdo con los estándares del NCI, los valores de T/C que oscilan entre 10 % y 42 % se consideran activos, los T/C menores al 10 % se consideran muy activos.

Ejemplo 4

Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento con IMGN853 en xenoinjertos de cáncer de ovario humano IGROV-1.

15 Se evaluó el efecto antitumoral de IMGN853 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo establecido de cáncer de ovario. Los ratones SCID se inocularon con células de carcinoma de ovario IGROV-1 (1×10^7 células/animal) inyectadas subcutáneamente en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron alrededor de 100 mm³ de tamaño (7 días después de la inoculación de células tumorales), los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (6 animales por grupo). Los ratones se trataron con una única inyección intravenosa de IMGN853 a 1,2, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS. El crecimiento tumoral se monitorizó mediante la medición del tamaño del tumor dos veces por semana. El tamaño del tumor se calculó con la fórmula: longitud x ancho x altura x $\frac{1}{2}$.

20 El IMGN853 fue muy activo contra tumores IGROV-1 (puntuación IHC de 3 homocigotos mediante métodos manuales) a niveles de dosis 2,5 y 5,0 mg/kg, dando como resultado valores de T/C del 5 % para ambos niveles de dosis (Figura 9). Existieron regresiones parciales del tumor en 5/6 y 6/6 ratones en los grupos de 2,5 y 5,0 mg/kg, respectivamente. El IMGN853 fue inactivo en la dosis de 1,2 mg/kg (T/C = 47 %).

Ejemplo 5

Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento con IMGN853 en xenoinjertos de cáncer de ovario humano OV-90.

30 Se evaluó el efecto antitumoral de IMGN853 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo establecido de cáncer de ovario. Los ratones SCID se inocularon con células de cáncer de ovario OV-90 (1×10^7 células/animal) inyectadas subcutáneamente en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron alrededor de 100 mm³ de tamaño (13 días después de la inoculación de células tumorales), los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (6 animales por grupo). Los ratones se trataron con una única inyección intravenosa de IMGN853 a 1,2, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS. Un grupo de control de animales recibió PBS administrado intravenosamente en el mismo programa. El crecimiento tumoral se monitorizó mediante la medición del tamaño tumoral dos veces por semana. El tamaño tumoral se calculó con la fórmula: longitud x ancho x altura x $\frac{1}{2}$.

40 El IMGN853 fue activo contra tumores OV-90 (puntuación IHC de 3 hetero-homo mediante métodos manuales) a niveles de dosis 2,5 y 5,0 mg/kg, dando como resultado valores de T/C del 36 % y 18 %, respectivamente (Figura 10). Dos animales experimentaron regresiones parciales del tumor en el grupo de 5,0 mg/kg; no hubo más regresiones del tumor en ninguno de los grupos de tratamiento. El IMGN853 fue inactivo en la dosis de 1,2 mg/kg (T/C = 77 %).

Ejemplo 6

45 Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento con IMGN853 en xenoinjertos de cáncer de ovario humano SKOV-3.

50 Se evaluó el efecto antitumoral de IMGN853 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo establecido de cáncer de ovario. Los ratones SCID se inocularon con células de cáncer de ovario SKOV-3 (1×10^7 células/animal) inyectadas subcutáneamente en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron alrededor de 100 mm³ de tamaño (26 días después de la inoculación de células tumorales), los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (6 animales por grupo). Los ratones se trataron con una única inyección intravenosa de IMGN853 a 1,2, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS. El crecimiento tumoral se monitorizó mediante la medición del tamaño tumoral dos veces por semana. El tamaño del tumor se calculó con la fórmula: longitud x ancho x altura x $\frac{1}{2}$.

El IMG853 fue inactivo contra tumores SKOV-3 (puntuación IHC de 1-3 focal mediante métodos manuales) en todas las dosis, con un crecimiento de los tumores tratados con IMG853 igualando al grupo de control de PBS (Figura 11). No se realizó un análisis de los datos, y el estudio se canceló antes basándose en la inactividad de IMG853 en este modelo.

5 Ejemplo 7

Actividad antitumoral de respuesta a la dosis del tratamiento con IMG853 en xenoinjertos KB de adenocarcinoma del cuello uterino.

10 Se evaluó el efecto antitumoral de IMG853 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo establecido de adenocarcinoma del cuello uterino. Los ratones SCID se inocularon con células KB de adenocarcinoma del cuello uterino (1×10^7 células/animal) inyectadas subcutáneamente en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron alrededor de 100 mm³ de tamaño (7 días después de la inoculación de células tumorales), los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (6 animales por grupo). Los ratones se trataron con una única inyección intravenosa de IMG853 a 1,0, 2,5 o 5,0 mg/kg. Un grupo de animales de control recibió una única inyección intravenosa de PBS. El crecimiento tumoral se monitorizó mediante la medición del tamaño del tumor dos veces por semana. El tamaño del tumor se calculó con la fórmula: longitud x ancho x altura x 1/2.

15 El IMG853 fue muy activo contra tumores KB en cuanto a la inhibición del crecimiento tumoral (T/C = 0 %) tanto en el nivel de dosis 2,5 como 5,0 mg/kg (Figura 12). Seis de seis ratones en el grupo de tratamiento de 5,0 mg/kg y cinco de seis ratones en el de 2,5 mg/kg experimentaron CR, y permanecieron libres de tumores hasta el final del estudio (día 120). La dosis de 1,0 mg/kg fue activa, resultando en un T/C del 37 %, pero no hubo regresiones parciales ni completas.

20 Ejemplo 8

Tinción inmunohistoquímica del FOLR1 en muestras incrustadas en parafina y fijadas con formalina (FFPE)-métodos automatizados.

25 El ensayo de tinción por IHC usa reactivos IVD de clase I incluyendo el anticuerpo Novocastra FOLR1 (Novocastra/Leica Cat n.º NCI-L-FRalpha, clon BN3.2) como el artículo de prueba y el sistema Leica Bond RX de tinción automática. La prueba de unión y el artículo de control se detectaron mediante incubación con el sistema de detección Leica Bond Refine que incluye un reactivo posprimario (IgG de conejo anti-ratón), seguido de un polímero reactivo (polímero de cabra anti-conejo) y cromógeno tetrahidrocloreuro de 3,3-Diaminobenzidina (DAB). Las muestras FFPE se tiñeron con la o las concentraciones especificadas del anticuerpo primario (preparadas mediante la dilución del FOLR1 en diluyente Leica) tal como se esboza a continuación.

Anticuerpos IHC

Artículo de prueba ¹⁾	Receptor de Folato Alfa (Novocastra/Leica Cat n.º NCI-L-FRalpha, Lote 159506), murino, clon BN3.2, concentrado líquido: 75 µg/ml
Artículo de control ¹⁾	IgG1 (Beckman Coulter Cat. N.º 6602872, Lotes 2S7SPS04-23 y 2S7SPS04-26) concentración de solución madre: 1 mg/ml, murino, clon 2T8-2F5

Método de ensayo FFPE usando Leica Bond RX

Etapa ¹⁾	Acción	Tiempo
Cocción	Temperatura: 60°C	30 minutos
Desparafinado	Solución de desparafinado Bond	Fijo
	100 % etanol	Fijo
Recuperación de antígenos	Bond ER2	20 minutos
Bloqueo de peroxidasa endógena	Peróxido (componente del kit Refine)	5 minutos
Artículo de prueba	1.9 µg/m del FOLR1 en diluyente Leica	15 minutos
Detección	Reactivo posprimario (kit Refine)	8 minutos
	Polímero (kit Refine)	8 minutos

Etapa ¹⁾	Acción	Tiempo
	DAB mixto (kit Refine)	10 minutos
Contratinción	Hematoxilina (kit Refine)	5 minutos

5 Todas las muestras teñidas se sometieron a prueba y se puntuaron. Las pruebas de control se evaluaron primero seguidas de las muestras de prueba (secciones enteras y núcleos individuales de los TMA). Para cada tejido tumoral o sedimento celular evaluado, se registró una descripción de la intensidad de tinción y proporción respectiva de células tumorales teñidas. La tinción asociada a la membrana se registró para cada muestra. Cuando se evaluaron las puntuaciones duplicados de un paciente, sólo se incluyó en el análisis la puntuación más alta. Si la puntuación describía únicamente tinción citoplasmática entonces la puntuación final se registraba como 0 (cero). La intensidad y uniformidad fueron dadas a cada muestra tal como se describe en la tabla que se esboza a continuación. La intensidad de tinción y los patrones de distribución se puntuaron con relación a la tinción de IgG de control (sin especificar). La intensidad se puntuó con una escala de 0 a 3 (0 = sin tinción, 1 = débil, 2 = moderada y 3 = fuerte) y la distribución se puntuó como focal (<25 % de las células teñidas), heterogénea (25-75 % de las células teñidas) y homogénea (>75 % de las células teñidas). En un tejido normal, sólo se evaluaron las subestructuras definidas al calcularse la intensidad y la proporción.

Sistema de puntuación IHC que consiste en escalas de intensidad y uniformidad

Intensidad (brillo de tinción)		
Intensidad observada	Categoría de intensidad	Intensidad registrada
0	Negativo	0
0-1	Muy débil	1
1	Débil	
1-2	Débil a moderado	2
2	Moderado	
2-3	Moderado a fuerte	3
3	Fuerte	

15

Uniformidad (porcentaje de células teñidas - únicamente en la membrana)	
0	Negativo
Focal	<25 %
Heterogéneo (hetero)	25-75 %
Homogéneo (homo)	>75 %

Las muestras de tumor FFPE derivaron de micromatrices del tumor, así como también bloques de tejido humano de siete tumores diferentes, tal como se describe más adelante.

Muestras de prueba de FFPE: TMA

Sitio anatómico	Vendedor	Catálogo N.º:	Código	Cantidad de núcleos por paciente	Cantidad total de pacientes
Riñón	Pantomics	KIC1501	P-T-ARR-KID-122711-1	2	69
Pulmón	Pantomics	LUC1501	P-T-ARR-LNG-122711-1	2	70

ES 2 661 466 T3

Sitio anatómico	Vendedor	Catálogo N.º:	Código	Cantidad de núcleos por paciente	Cantidad total de pacientes
Pulmón	Tristar	69571059/TA1249	P-T-ARR-OVA-122711-1	1	110
Ovario	Biochain	T8235725-5	P-T-ARR-OVA-122111-1	1	62
Ovario	Pantomics	OVC1501	P-T-ARR-OVA-122711-1	2	70
Ovario	Tristar	69571091/TA1322	P-T-ARR-OVA-010912-1	2	96
Útero (endometrio)	Pantomics	EMC1501	P-T-ARR-EME-122711-1	2	70
Varios	Pantomics	MTU481	P-T-ARR-122711-1	1	48

Muestras de prueba de FFPE: Secciones enteras

Órgano	Código	Fuente	Diagnóstico (por Documentación de fuente)
Ovario	1	Desconocida	adenocarcinoma endometriode
	2	Proteogenex	adenocarcinoma endometriode
	3	CHTN	adenocarcinoma mixto con características de endometriode, seroso y claro
	4	CHTN	adenocarcinoma de alto grado con áreas celulares mixtas papilares, serosas, endometrioides y claras
	5	CHTN	adenocarcinoma seroso papilar
	6	Proteogenex	adenocarcinoma seroso
	7	Proteogenex	adenocarcinoma seroso papilar
	8	Proteogenex	adenocarcinoma seroso papilar
	9	CHTN	adenocarcinoma seroso papilar
	10	Proteogenex	adenocarcinoma seroso papilar
Pulmón	1	CHTN	adenocarcinoma poco diferenciado
	2	CHTN	adenocarcinoma, acinar, bien diferenciado con características bronquioloalveolares
	3	CHTN	adenocarcinoma, características de mucinoso
	4	CHTN	adenocarcinoma
	5	CHTN	adenocarcinoma
	6	CHTN	adenocarcinoma (bronquioloalveolar) carcinoma
	7	CHTN	adenocarcinoma
	8	CHTN	adenocarcinoma, moderadamente diferenciado, con características de célula clara
	9	CHTN	adenocarcinoma

Órgano	Código	Fuente	Diagnóstico (por Documentación de fuente)
	10	CHTN	carcinoma de células escamosas

5 Las células (células tumorales o células transfectadas) se incrustaron en parafina y se fijaron con formalina (FFPE). Las muestras de sedimentos celulares FFPE que exhiben intervalos variantes de la expresión del FOLR1 mediante citometría de flujo y tejidos humanos normales se usaron en este estudio para caracterizar controles positivos y negativos y para el análisis de especificidad. Los sedimentos celulares que exhiben niveles variantes del FOLR1 y sus respectivas puntuaciones se informan a continuación. Existe una escasa correlación entre puntuaciones de tinción y sus respectivos niveles de expresión del FOLR1 (anticuerpos unidos por célula, ABC, determinados mediante citometría de flujo calibrada) en los sedimentos celulares. Por ejemplo, se otorga una puntuación de 1-3 hetero a SW620 e IGROV-1 que exhiben valores ABC de 40.098 y 565.481, respectivamente. De manera adicional, las células Hela que muestran un valor ABC de 1,5 millones dieron como resultado una puntuación de 2-3 hetero mientras que 300.19/FR1 que exhibe un ABC de 830.003 dio una puntuación más alto de 3 homo.

Las puntuaciones finales para los sedimentos celulares en una concentración del artículo de prueba de 1,9 µg/ml

Línea celular	Valor ^a ABC	Puntuación de tinción
SW620	40,098	1-3 hetero
T47D	97,576	1-2 hetero
IGROV-1	565,481	1-3 hetero
300.19/ FR1	830,003	3 homo
HELA	1,500,587	2-3 hetero
KB	4,000,000	3 homo

15 ^a El valor ABC registrado es un promedio de anticuerpos unidos por célula en la población celular y se determinó de la siguiente manera: se utilizó una concentración de 1.0×10^{-8} M de anti-FOLR1-PE (1:1) para determinar los valores ABC en su línea celular respectiva usando métodos de citometría de flujo y perlas Quantibrite™ (BD Biosciences).

20 Los histogramas de citometría de flujo representan la distribución de células contra la cantidad de anti-FOLR1 unidos por célula (nivel de expresión del FOLR1). Tanto los histogramas como los resultados de tinción por IHC correspondientes indican que cada una de estas líneas celulares contiene una población heterogénea de células que tienen un amplio intervalo de expresión del FOLR1. La excepción es la línea celular 300.19/FR1 que muestra tanto un histograma de citometría de flujo uniforme como una puntuación de tinción por IHC. Esta información sugiere que las líneas celulares, cada una expresando un nivel más uniforme del FOLR1, pueden proporcionar una mejor correlación entre los valores ABC y sus respectivas puntuaciones de tinción. Aunque el ensayo demostró tinción positiva en todos los controles de sedimento celular FOLR1 positivos, existe escasa correlación entre las puntuaciones de tinción y los respectivos niveles de expresión del FOLR1 de la mayoría de estos sedimentos celulares. Por lo tanto, los sedimentos celulares de este grupo no se pudieron identificar como controles de expresión alta, media y baja. Las fotografías representativas e histogramas que ilustran la expresión del FOLR1 en líneas celulares mediante IHC y citometría de flujo, se muestran en la FIGURA 13.

35 Para determinar las condiciones de ensayo, una variedad de diluciones del artículo de prueba y de control se sometieron a prueba para seleccionar las condiciones que exhiben un nivel adecuado de sensibilidad. Los experimentos se llevaron a cabo en un panel de muestras FFPE incluyendo sedimentos celulares del FOLR1 positivo y un TMA que consiste en tejidos normales del FOLR1 positivo y negativo (adrenal (corteza/médula), mama (conductos y lóbulos/tejido conjuntivo), trompas de Falopio (superficie epitelial/pared muscular), riñón (túbulos, glomérulos), pulmón (neumocitos de tipo I y II/tejidos conjuntivos interalveolares), páncreas (conductos/islotos de Langerhans), glándula salival (conductos/estroma), piel (glándulas ecrinas/epidermis), estómago (superficie epitelial/submucosa) y secciones enteras de tejidos del tumor (10 muestras de tumor de ovario y 10 muestras de tumor de pulmón). Cada muestra se tiñó con una dilución en serie de las concentraciones del artículo de prueba (0,25, 0,5, 0,9, 1,9, 3,8 y 7,5 µg/ml) o una concentración del artículo de control de 1,9 µg/ml o 3,8 µg/ml. Las intensidades de tinción relativas para cada dilución se compararon para cada muestra con el fin de identificar la dilución óptima. El criterio para determinar la dilución óptima fue una dilución 1) que no provocara tinciones de fondo en las muestras teñidas con control de isotipo, 2) que no provocara tinción negativa en controles de tejido negativo

teñido con el artículo de prueba y 3) diferenciada entre niveles variantes de la expresión del FOLR1 asociada a la membrana entre muestras de prueba que representan el indicio de interés (tumor de ovario, tumor endometrial, tumor NSCLC y tumor de riñón, tejidos FFPE). De las cinco diluciones del artículo de prueba evaluado, la concentración de 1,9 µg/ml mostró el mejor intervalo dinámico en los resultados de tinción usando los protocolos de Leica Bond RX automático (Protocolo de Cocción y Desparafinado, protocolo HIER usando el ER2 durante 20 minutos, y el protocolo de tinción por IHC F con enjuagues extra).

Ejemplo 9

Identificación y caracterización de controles que caracterizan el intervalo dinámico de los métodos de tinción para el ensayo automatizado.

Controles de calidad: Se identificaron los tejidos de glándulas salivales, pulmón y páncreas humanos normales como controles de tejido positivos a emplearse en cada ensayo para verificar que el procedimiento de tinción se llevó a cabo tal como se esperaba. Se identificó un tejido de esófago humano normal como control negativo. Estos controles se caracterizaron como a continuación: para establecer controles que cubran el intervalo dinámico del ensayo, se utilizó una micromatriz de tejido (TMA), que consiste en varias muestras de tejido normal FOLR1 positivo y negativo que se espera exhiban el intervalo dinámico del ensayo, como un ensayo de verificación de control durante las fases de optimización y validación. Cuatro tejidos normales con estructuras identificadas en esta TMA se identificaron como controles de ensayo adecuados de la siguiente manera: Epitelio respiratorio de pulmón humano normal (puntuación 2 homo); conductos del páncreas normal (puntuación 3 homo apical); conductos intercalados de la glándula salival humana normal (puntuación 1-2 hetero); y esófago humano normal (puntuación 0). En un total de 4 ensayos realizados, los controles de ensayo adecuados de esta TMA dieron resultados idénticos. Estos resultados indican que los controles seleccionados dan resultados consistentes y abarcan el intervalo dinámico del ensayo.

Estructuras en tejidos normales identificados como controles que abarcan el intervalo dinámico del ensayo

Órgano normal	Subestructura	Puntuación de tinción (artículo de control)	Puntuación de tinción (artículo de prueba)
Esófago	Todas las estructuras	0 (negativo)	0 (negativo)
Glándula salival	Conductos intercalados	0 (negativo)	1-2 hetero
Pulmón	Epitelio respiratorio	0 (negativo)	2 homo
Páncreas	Conductos	0 (negativo)	3 homo apical

La tinción apical se define como una tinción de membrana polarizada no uniforme.

Ejemplo 10

Análisis del rendimiento del método de tinción automática.

Se pretende que el uso de este ensayo sea para detectar específicamente la reproducibilidad del FOLR1 y, con la sensibilidad apropiada, diferenciar los niveles variantes y la uniformidad variante de la expresión del FOLR1 asociada a la membrana (intervalo de dinámica óptima) en tejidos de tumor FFPE de ovario, endometrio, NSCLC y riñón. Por lo tanto, la especificidad, reproducibilidad y sensibilidad se consideran criterios de rendimiento.

La especificidad y sensibilidad del ensayo de estudio se evaluaron mediante comparación de la tinción del tejido normal con el ensayo de estudio y los resultados registrados anteriormente. Los resultados de tinción de este estudio se comparan con los resultados de tinción correspondientes de Scorer et al 2010 (*A Full Immunohistochemical Evaluation of a Novel Monoclonal Antibody to Folate Receptor - alpha*. The Novocastra Journal of Histopathology, REAGENTS: 2010(3):8-12, que describe el mismo clon BN3.2 del anticuerpo) con tejido normal FFPE y a partir del estudio de reactividad cruzada del tejido (TCR) usando IMG853 (anticuerpo huMov19(M9346A)) en tejido normal fresco congelado (Informe ImmunoGen IMH28-003). La comparación de los resultados de tinción de cada método indica que los tres ensayos mostraron perfiles de tinción del tejido normal generalmente similares con sensibilidades relativas que difieren, siendo el ensayo Scorer el menos sensible, el ensayo de estudio (IMH28-011) con sensibilidad intermedia y el método de estudio de TCR el de mayor sensibilidad. Algunas estructuras mostraron una tinción positiva únicamente en los dos métodos más sensibles (ensayo de estudio y ensayo de TCR). No hubo ejemplos de tinción positiva en el ensayo menos sensible empleado por Scorer, los cuales tampoco fueron positivos en el ensayo de estudio y el método de TCR. Estos resultados demuestran que la especificidad y sensibilidad del ensayo de estudio es adecuado para la evaluación de la expresión del FOLR1 en tejidos normales.

La especificidad y sensibilidad del ensayo de estudio se caracterizó adicionalmente mediante la tinción y evaluación de un panel de TMA del tumor que consiste en tumores de ovario, endometrio, NSCLC y riñón (un conjunto de muestra representativo del uso clínico que pretende el ensayo). La tinción positiva se encontraba localizada de manera consistente en el tejido del tumor con componentes del tejido normal adyacentes que incluyen estroma, vasos sanguíneos, linfocitos y tejido de órgano normal con tinción negativa o positiva, según lo esperado. Para cada subtipo tanto del cáncer de ovarios como del NSCLC, la distribución de las puntuaciones de tinción entre las TMA de diferentes proveedores exhibía una distribución similar de puntuaciones lo cual sugiere que este método no es sensible a condiciones variadas de fijación y de procesos. Debido a que los patrones de distribución eran similares entre las TMA, se combinó la información de los diferentes conjuntos y se categorizaron las puntuaciones. Un resumen de estas puntuaciones para subtipos de tumor que contenían 20 o más muestras por subtipo se enumeran en las siguientes tablas. Tal como se resume en estas tablas, se observa un intervalo dinámico de puntuaciones para cada tipo de tumor e indica que este ensayo muestra la sensibilidad adecuada para diferenciar los niveles variantes y la uniformidad variante de la expresión del FOLR1 asociada a la membrana en tejidos de tumor FFPE de ovario, endometrio, NSCLC y riñón. En las Figuras 14-18 se proporcionan fotos representativas del carcinoma seroso de ovario, carcinoma endometriode de ovario, NSCLC, carcinoma de endometrio y carcinoma de células renales claras. En las Figuras 23-25 se muestran fotos representativas adicionales útiles, por ejemplo, en una guía de tinción o kit de diagnóstico. Estos estudios indican que el ensayo es específico y que tiene la sensibilidad adecuada para usarse como un diagnóstico o reactivo complementario del diagnóstico.

Resumen de las puntuaciones de tinción para los subtipos predominantes de tumores de ovario

Subtipo	Número (%) de muestra						
	Total	≥ 3 hetero^a	≥ 2 hetero^a	≥ 1 hetero^a	1-3 focal	Cualquier positividad	Negativo
Endometriode	35	15	18	20	6	26	9
Subtipo	Número (%) de muestra						
	Total	≥ 3 hetero^a	≥ 2 hetero^a	≥ 1 hetero^a	1-3 focal	Cualquier positividad	Negativo
	(100)	(43)	(51)	(57)	(17)	(74)	(26)
Mucinoso	29	2	4	5	0	5	24
	(100)	(7)	(14)	(17)	(0)	(17)	(83)
Seroso	129	44	92	92	8	100	29
	(100)	(34)	(71)	(71)	(6)	(78)	(22)
¹⁾ Se excluyeron los patrones de tinción focal							

20

Resumen de puntuaciones de tinción para tumores NSCLC

Tipo	Subtipo	Número de muestra							
		Total	≥3 hetero ^a	≥2 hetero ^a	≥1 hetero ^a	1-3 focal	Cualquier positividad	Negativo	
Adeno-carcinoma	Todos^b	67	17	39	42	5	47	20	
		(100)	(25)	(58)	(63)	(7)	70	30	
	Bronquioloalveolar especificado	7	2	5	5	0	5	2	
Carcinoma de células escamosas		(100)	(29)	(71)	(71)	(0)	(71)	(29)	
	Todos	74	1	4	6	6	12	62	
		(100)	(1)	(5)	(8)	(8)	(16)	(84)	

¹⁾ Se excluyeron los patrones de tinción focal

Se incluyeron todas las muestras de adenocarcinoma excepto las muestras de carcinoma bronquioloalveolar especificadas.

Resumen de puntuaciones de tinción para adenocarcinoma del endometrio y tumores renales de células claras

Tumor/Subtipo	Número de muestra (%)						
	Total	≥3 hetero^a	≥2 hetero^a	≥1 hetero^a	1-3 focal	Cualquier positividad	Negativo
Endometrio/Adenocarcinoma	58	5	23	30	10	40	18
	(100)	(9)	(40)	(52)	(17)	(69)	(31)
Riñón/Célula clara	34	0	9	23	6	29	5
	(100)	(0)	(26)	(68)	(18)	(85)	(15)
Se excluyeron patrones de tinción focal							

5

La precisión del ensayo de estudio se investigó mediante la evaluación de la reproducibilidad intraserial e interanalítica del ensayo haciendo uso de tres muestras de tejido de tumor FFPE de tumor de ovario, NSCLC o riñón donde cada muestra exhibe una puntuación ya sea alto, medio o bajo. Para la reproducibilidad intraserial, se colocaron nueve láminas, cada una con una parte del tumor de pulmón, ovario y renal, en nueve ubicaciones aleatorias en el Leica Bond RX. Para la reproducibilidad interanalítica, se tiñeron tres láminas que contenían partes de la misma muestra en tres días distintos. Se evaluaron todas las láminas, tanto del experimento intraserial como del interanalítico, y mostraron resultados de tinción iguales para cada muestra correspondiente: tumor de pulmón (alto: 3 homo), tumor de ovarios (medio: 2 hetero) y tumor renal (bajo: 1-2 hetero). Estos datos demostraron la reproducibilidad a través de tipos de tejido con niveles de expresión bajos, medios y altos.

10

15 Ejemplo 11

Una puntuación de la expresión del FOLR1 de ≥ 2 heterogéneo mediante IHC es un criterio de selección de pacientes para el tratamiento con IMG853.

Los niveles de expresión del FOLR1 en las líneas celulares tumorales se determinaron usando el conjugado anticuerpo-PE (FR1-24-PE) y el sistema QuantiBRITE. En el estudio se incluyeron tres líneas celulares de cáncer de ovario (Igrov-1, Skov-3 y Ovc3-3), una línea celular de coriocarcinoma Jeg-3 y una línea celular de carcinoma de cuello del útero KB. Para obtener valores ABC confiables, los experimentos de unión con un conjugado anticuerpo-PE deberían realizarse en una concentración saturante (concentración en la que todos los sitios de unión disponibles se ocupan con el conjugado). Para determinar dicha concentración para el conjugado FR1-24-PE, realizamos experimentos de unión en un panel de líneas celulares FOLR1 positivas con varias expresiones del FOLR1. Las células se incubaron en hielo con un amplio intervalo de concentración del conjugado FR1-24-PE durante dos horas, se lavaron con tampón FACS (PBS con BSA al 1 %), se fijaron con formaldehído al 1 % en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur. En una concentración de 1×10^{-8} M el conjugado saturó los sitios de unión de la superficie celular en todas las líneas celulares Igrv-1, Jeg-3, Skov-3, Ovc3-3 y KB que se sometieron a prueba. En experimentos de unión a ABC posteriores, el conjugado FR1-24-PE se utilizó en una concentración de 1×10^{-8} M. Cada muestra se analizó por triplicado; se realizaron varios experimentos independientes en cada línea celular. La expresión más alta se encontró en las células KB con el valor ABC aproximado de $4.000.000 \pm 300.000$, seguido por las líneas celulares Igrv-1 y Jeg-3 con los valores ABC de 400.000 ± 85.000 y 150.000 ± 75.000 , respectivamente. Dos líneas celulares, Skov-3 y Ovc3-3, tuvieron una expresión del FOLR1 baja, 20.000 ± 10.000 y 7.000 ± 4.000 ABC, respectivamente. Se observó una variación significativa de los valores ABC de experimento a experimento para las células Jeg-3, donde los valores ABC variaron de 40.000 a 300.000. Esta variabilidad posiblemente reflejó algunas propiedades biológicas de la línea celular antes que una variabilidad del ensayo, ya que los valores ABC obtenidos para las demás líneas celulares analizadas fueron mucho menos variables (véase la siguiente tabla).

20

25

30

35

40

Línea celular	ABC (Media ± DE. n) ¹⁾	Variación experimento a experimento	
		El ABC más alto registrado	El ABC más bajo registrado
KB	4.000.000 ± 300.000. 4	4.500.000	3.800.000
Igrov-1	400.000 ± 85.000. 5	480.000	280.000
Jeg-3	150.000 ± 75.000. 14	260.000	40.000
Skov-3	20.000 ± 10.000	28.000	10.000
Ovcar-3	7.000 ± 4.000	10.000	4.000

¹⁾ DE - Desviación estándar; n - cantidad de experimentos independientes

Los valores ABC se determinaron mediante un ensayo basado en FACS con un anticuerpo FR1-24 etiquetado con PE y el sistema QuantiBRITE. La media ± Desviación estándar (DE) se calculó para los experimentos independientes.

5 La potencia y especificidad de IMG853 se analizó frente a líneas celulares FOLR1 positivas con un amplio intervalo para la expresión del FOLR1 (los valores ABC de las líneas celulares se proporcionan anteriormente). Además, las líneas celulares FOLR1 negativas Namalwa y SW2 se incluyeron en los experimentos. El IMG853 fue altamente citotóxico frente a células KB con expresión del FOLR1 alta (4.000.000±300.000 ABC), Igrov-1 (400.000±85.000 ABC) y Jeg-3 (150.000±75.000 ABC), con los valores IC₅₀ de 0,10±0,01 nM, 0,50±0,07 nM y 1,00±0,05 nM, respectivamente. La actividad destructora de células frente a las tres líneas celulares dependió del FOLR1 ya que un exceso de anticuerpo huMov19 (M9346A) sin modificar (0,5 µM) disminuyó notablemente la potencia del conjugado con respecto a niveles típicos no específicos (de 10 a 20 veces). El IMG853 sólo fue marginalmente activo frente a las células Skov-3 y Ovcar-3 con baja expresión de FOLR1 (20.000±10.000 y 7.000±4.000 ABC, respectivamente), y frente a células FOLR1 negativas Namalwa y SW2 con valores IC₅₀ mayores que 2 nM. La actividad citotóxica de IMG853 frente a estas líneas celulares era baja y no dependía de FOLR1, ya que el bloqueo con huMov19 (M9346A) no le afectaba. Véanse las Figuras 19 y 20.

15 Las muestras FFPE preparadas a partir de modelos de xenoinjerto de tumor de ratón se evaluaron para determinar el FOLR1 positivamente usando el ensayo optimizado y validado que se describe anteriormente. No se observó tinción en las células tumorales de ninguna de las muestras de xenoinjerto teñidas con el artículo de control. Los tejidos de xenoinjerto FFPE de ratón derivados de las siguientes líneas celulares mostraron los siguientes patrones de tinción: Igrov-1, KB y NCI-H2110 mostraron patrones de tinción homogéneos con un nivel 3 de intensidad; Ishikawa y Ovcar 3 mostraron niveles de tinción heterogéneos con un nivel 3 de intensidad; LXFA737 mostró patrones de tinción homogéneos con un nivel de intensidad 2; OV-90 mostró patrones heterogéneos con un nivel de intensidad 2; y SKOV3 fue negativo. En las Figuras 21 y 22 se proporcionan fotos representativas de xenoinjertos de tumor.

Línea celular original o fragmento del tumor	Indicación de enfermedad	Puntuación final	Categoría de tinción
IGROV-1	Cáncer de ovario	1-3 homo	3 homo
		1-3 homo	
		1-3 homo	
Ishikawa	Cáncer de endometrio	2-3 hetero	3 hetero
		1-2 hetero/3 focal	
		2 hetero/3 focal	
		2 hetero/3 focal	
KB	Cáncer de cuello uterino	3 homo	3 homo
		3 homo	

Línea celular original o fragmento del tumor	Indicación de enfermedad	Puntuación final	Categoría de tinción
LXFA737	NSCLC	2 homo	2 homo
		2 homo	
NCI-H2110	NSCLC	2-3 homo	3 homo
		2 homo	
OV-90	Cáncer de ovario	1-2 hetero	2 hetero
		Negativo ^a	
OVCAR3	Cáncer de ovario	1-3 hetero	3 hetero
		1-3 hetero	
SKOV-3	Cáncer de ovario	Negativo	Negativo
		Negativo	

5 Un umbral de tinción (≥ 2 heterogéneo) requiere tanto un nivel mínimo de expresión (intensidad de tinción) como una distribución de tinción mínima (porcentaje de células tumorales que expresan el FOLR1). Los datos pre-clínicos proporcionan una justificación para este umbral en el carcinoma de ovario. Las muestras de xenoinjerto de tumor de ratón con puntuaciones IHC de ≥ 2 heterogéneo exhiben una sensibilidad a IMGN 853 in vivo. Las muestras FFPE preparadas a partir de modelos de xenoinjerto de tumor ovárico de ratón se evaluaron para determinar el FOLR1 positivamente usando el ensayo optimizado y validado que se describe anteriormente. Dos modelos de xenoinjerto de cáncer de ovario, OVCAR-3 e IGROV- 1, mostraron un patrón de tinción heterogéneo u homogéneo con un nivel 3 de intensidad. El modelo de xenoinjerto derivado de las células de cáncer de ovario OV-90 mostraron un patrón de tinción heterogéneo con un nivel 2 de intensidad; el modelo de cáncer de ovario Skov-3 fue FOLR1 negativo. El IMGN853 fue muy activo en los dos modelos de ovario con un nivel 3 de intensidad del FOLR1 y activa en el modelo OV-90 con un nivel 2 de intensidad del FOLR1. No se observó actividad alguna en el modelo SKOV-3. Los modelos de xenoinjerto también se evaluaron para otras indicaciones de enfermedad incluyendo tumores de pulmón, endometrio y cuello uterino y, aunque se detectaron correlaciones entre la actividad y las puntuaciones de tinción del FOLR1, muestras adicionales se deben someter a prueba.

La sensibilidad de los modelos de xenoinjerto de tumor ovárico con respecto a IMGN853 en función del nivel de expresión del FOLR1.

Xenoinjerto	Actividad <i>in vivo</i> (5 mg/kg IMGN853, dosis única)	Puntuación de intensidad, distribución
OVCAR3	Muy activa	3 heterogéneo
IGROV-1	Muy activa	3 homogéneo
OV-90	Activo	2 heterogéneo
SKOV-3	Inactivo	Negativo

20 La sensibilidad de otros modelos de xenoinjerto de tumor con respecto a IMGN853 en función del nivel de expresión del FOLR1.

Xenoinjerto	Tipo de tumor	Actividad <i>in vivo</i> (5 mg/kg de IMGN853, dosis única)	Puntuación de la intensidad, distribución
NCI-H2110	NSCLC	Muy activa	3 homogéneo
Ishikawa	Endometrio	Inactivo	2 homogéneo
KB	Cuello uterino	Muy activa	3 homogéneo

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 - receptor 1 de folato humano

MAQRMTTQLLLLLLVVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCR
PWRKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWI
QQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNWNTSGFNKCAVGA
ACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHTSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM
SGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

SEQ ID NO: 2 - secuencia de ácido nucleico del receptor 1 de folato humano

atggctcagcggatgacaacacagctgctgctccttctagtggtgggtgctgtagtaggggagggctcagacaaggattgcatgggcccaggact
gagcttctcaatgctgcatgaacgcccaagcaccacaaggaaaagccaggccccgaggacaagttgcatgagcagtgctgacctggagga
agaatgctgctgttctaccaacaccagccaggaagcccataaggatgttctctacctatagattcaactggaaccactgtggagagatggca
cctgctgcaaacggcatttcatecaggacacctgctctacgagtgtcccccaacttggggccctggatccagcaggtggatcagagctgg
cgcaaagagcgggtactgaacgtgccctgtgcaagaggactgtgagcaatggtgggaagattgtgcacctctacacctgcaagagcaa
ctggcacaagggctggaactggactcagggtttaacaagtgcgcagtgaggagctgctgccaaccttccatttctacttcccacacctg
ttctgtgcaatgaaatctggactcactcacaaggtcagcaactacagccgagggagtgccgctgcatccagatgtggttcgacctgagccca
gggeaaccccaatgaggaggtggcgagggttctatgctgcagccatgagtggggctgggcccctgggcagcctggccttctctgcttagcctgg
ccctaagtctgctgtggctgctcagc

5

SEQ ID NO: 3 - huMov19 vHC

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGTFYFMNWWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDIFY
NQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 4 - huMov19 vLCv1.00

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGQPRLLIYRASNLEAGV
PDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGKLEIKR

10

SEQ ID NO: 5 - huMov19 vLCv1.60

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGQPRLLIYRASNLEAGV
PDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGKLEIKR

REIVINDICACIONES

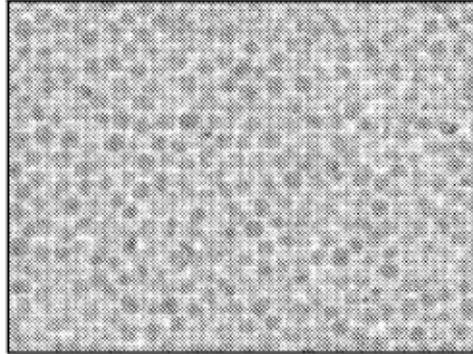
1. Un anticuerpo anti-receptor 1 de Folato (FOLR1) o un inmunoconjugado anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer en un sujeto, en el que se ha detectado el aumento de una expresión del gen o proteína FOLR1 en la muestra de cáncer de dicho sujeto usando un método de detección que diferencia la intensidad de tinción o la uniformidad de tinción en una muestra de cáncer que expresa el FOLR1 según se compara con la intensidad de tinción o la uniformidad de tinción en una o más muestras de referencia, en el que la efectividad de la terapia de cáncer con un anticuerpo anti-FOLR1 o un inmunoconjugado anti-FOLR1 se ha aumentado de esa manera;
- 5 en el que el anticuerpo anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer comprende:
- 10 (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (huMov19 vHC) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (huMov19 vLCv1.00) o
- (ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (huMov19 vHC) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (huMov19 vLCv1.60); y
- 15 en el que el inmunoconjugado anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer comprende un anticuerpo anti-FOLR1, un conector y una citotoxina, en el que el anticuerpo anti-FOLR1 del inmunoconjugado anti-FOLR1 comprende:
- 20 (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (huMov19 vHC) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (huMov19 vLCv1.00) o
- (ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (huMov19 vHC) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (huMov19 vLCv1.60).
2. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 1,
- 25 en el que el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (huMov19 vLCv1.60), particularmente en el que el anticuerpo anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer comprende (i) una cadena pesada que comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada codificada por el plásmido depositado con la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) como PTA-10772 y (ii) una cadena ligera que comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera codificada por el plásmido depositado con la ATCC como PTA-10774; y
- 30 en el que el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-FOLR1 del inmunoconjugado anti-FOLR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (huMov19 vLCv1.60), particularmente en el que el anticuerpo anti-FOLR1 del inmunoconjugado anti-FOLR1 para su uso en terapia de cáncer comprende (i) una cadena pesada que comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada codificada por el plásmido depositado con la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) como PTA-10772 y (ii) una cadena ligera que comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera codificada por el plásmido depositado con la ATCC como PTA-10774;
- 35 3. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 1, en el que el método de detección es inmunohistoquímica (IHC), particularmente en el que dicha IHC es una IHC calibrada que puede diferenciar distintos niveles de expresión del FOLR1.
4. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 3, en el que el método de detección produce un intervalo de uniformidad de tinción para muestras que tienen distribución de FOLR1 focal (<25 % de las células teñidas), heterogénea (25-75 % de las células teñidas) u homogénea (>75 % de las células teñidas).
- 45 5. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 1, en el que el método de detección distingue entre la intensidad de tinción y la uniformidad de tinción en una muestra de cáncer que expresa el FOLR1 en comparación con una muestra de referencia.
- 50 6. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 5, en el que la muestra de cáncer tiene una uniformidad de tinción que es heterogénea u homogénea y una puntuación de intensidad de tinción de 1, 2, 3 o 3+ para la expresión del FOLR1 por IHC, especialmente por IHC en una muestra embebida en parafina fijada con formalina.

7. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 5, en el que la muestra de cáncer tiene una puntuación de intensidad de tinción de 1 o mayor para la expresión del FOLR1 por IHC, particularmente
- 5 a) en el que la muestra de cáncer tiene una uniformidad de tinción para la expresión del FOLR1 que es heterogénea;
- b) en el que la muestra de cáncer tiene una uniformidad de tinción para la expresión del FOLR1 que es homogénea;
- c) en el que el 25-75 % de las células de la muestra de cáncer se tiñen para la expresión de FOLR1; o
- d) en el que más del 75 % de las células de la muestra de cáncer se tiñen para la expresión de FOLR1.
- 10 8. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 7, en el que la muestra de cáncer tiene una puntuación de intensidad de tinción de 2 o mayor para la expresión del FOLR1 por IHC, particularmente
- a) en el que la muestra de cáncer tiene una uniformidad de tinción para la expresión del FOLR1 que es heterogénea;
- 15 b) en el que la muestra de cáncer tiene una uniformidad de tinción para la expresión del FOLR1 que es homogénea;
- c) en el que el 25-75 % de las células de la muestra de cáncer se tiñen para la expresión de FOLR1; o
- d) en el que más del 75 % de las células de la muestra de cáncer se tiñen para la expresión de FOLR1.
- 20 9. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 1, en el que la IHC se realiza manualmente o se realiza usando un sistema automatizado.
10. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha muestra de referencia es una muestra de referencia positiva o una muestra de referencia negativa, particularmente en el que dicha muestra de referencia comprende células, sedimentos celulares o tejido.
- 25 11. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 1, en el que el método de detección comprende detectar la expresión de FOLR1 con el anticuerpo BN3.2.
12. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de ovarios, cáncer de endometrio, cáncer del peritoneo o cáncer de pulmón.
- 30 13. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el conector del inmunoconjugado anti-FOLR1 se selecciona del grupo que consiste en: un conector escindible, un conector no escindible, un conector hidrófilo y un conector basado en ácido dicarboxílico, especialmente cuando dicho conector se selecciona del grupo que consiste en: 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPP); 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB); 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC); 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N-sulfosuccinimidilo (sulfoSMCC); N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB); y éster de N-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] (NHS-PEG4-maleimida).
- 35 14. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 13, en el que el conector del inmunoconjugado anti-FOLR1 es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB).
- 40 15. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 13, en el que el agente citotóxico del inmunoconjugado anti-FOLR1 se selecciona del grupo que consiste en: un maitansinoide, análogo de maitansinoide, benzodiazepina, taxoide, CC-1065, análogo de CC-1065, duocarmicina, análogo de duocarmicina, calicheamicina, dolastatina, análogo de dolastatina, auristatina, derivado de tomamicina y derivado de leptomicina o un fármaco del agente,
- 45 especialmente en el que dicho agente citotóxico es un maitansinoide,
- en particular en el que dicho agente citotóxico es N²'-deacetil-N²'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N²'-deacetil-N²'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil) maitansina (DM4).
- 50 16. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 15, en el que el agente citotóxico del inmunoconjugado anti-FOLR1 es N²'-deacetil-N²'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil) maitansina (DM4).

17. El anticuerpo anti-FOLR1 o inmunoconjugado anti-FOLR1 para el uso de la reivindicación 15, en el que el conector del inmunoconjugado anti-FOLR1 es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB) y en el que el agente citotóxico del inmunoconjugado anti-FOLR1 es N2'-deacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil) maitansina (DM4).

5

A. Células 300-19



B. Células 300-19 transfectadas con FOLR1

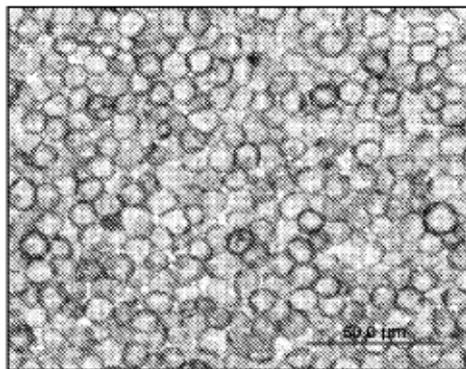


FIG. 1

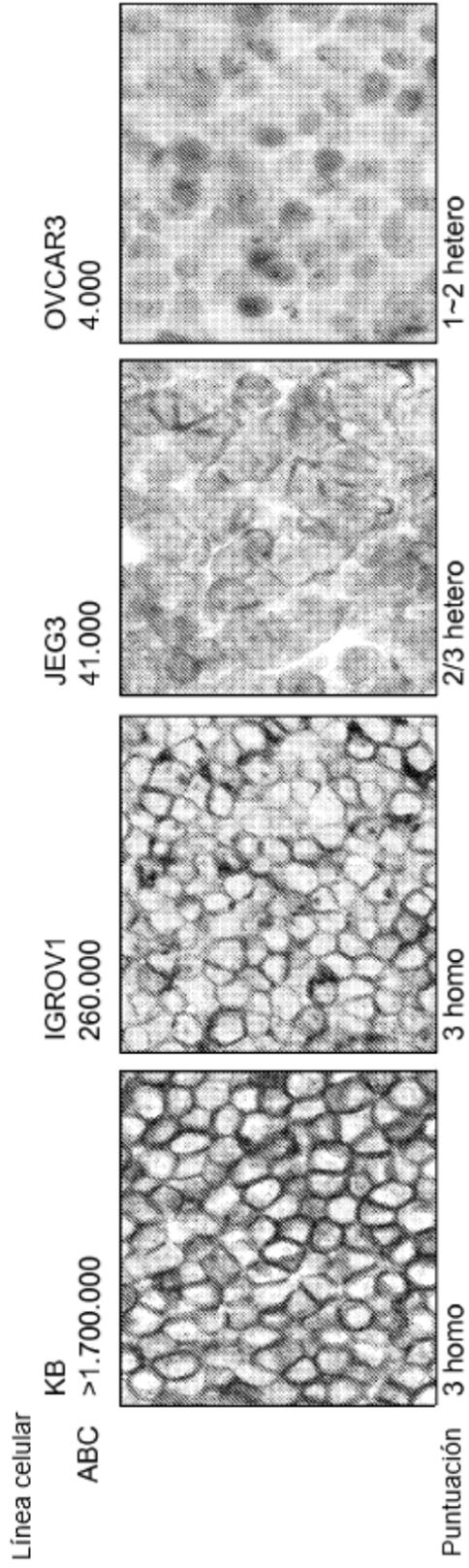


FIG. 2

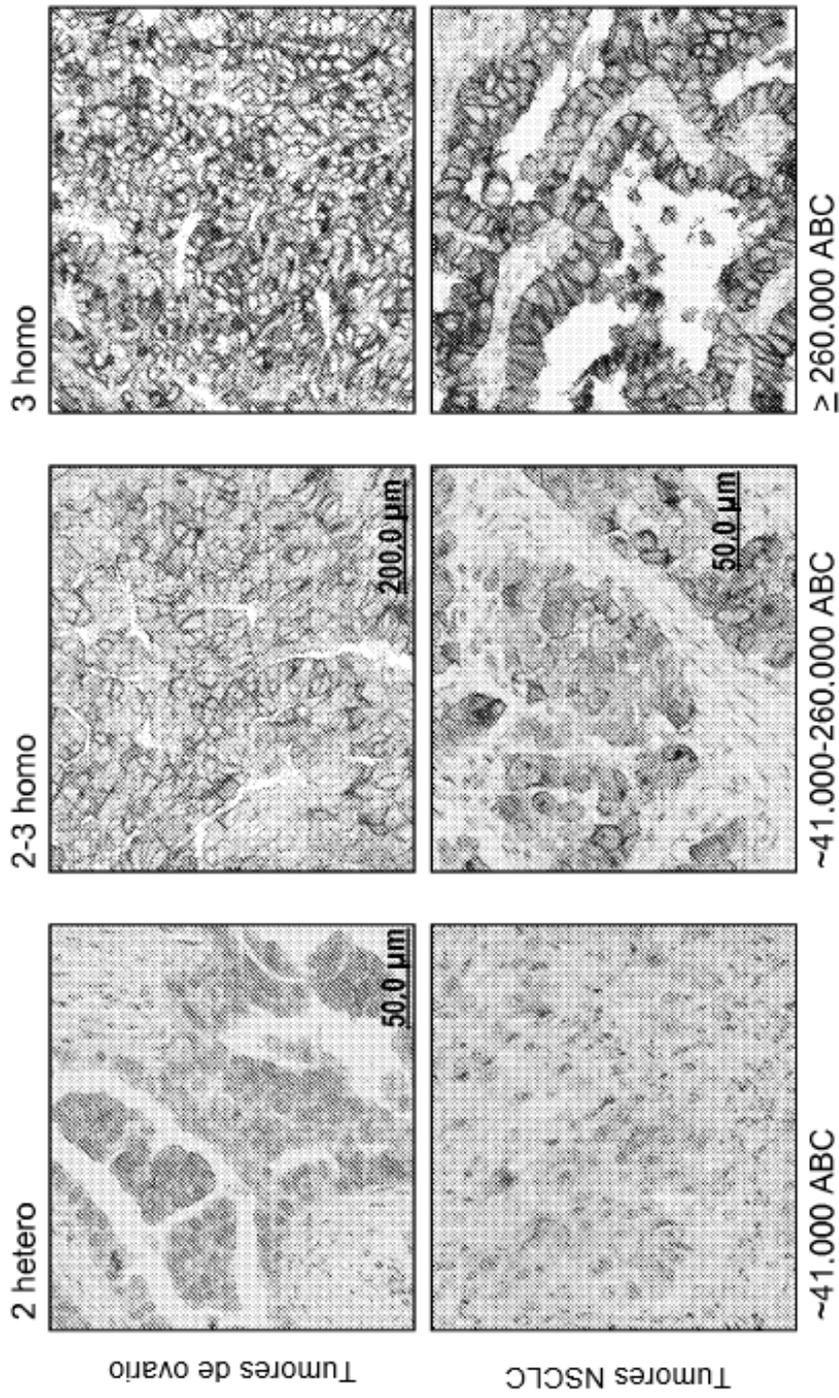


FIG. 3

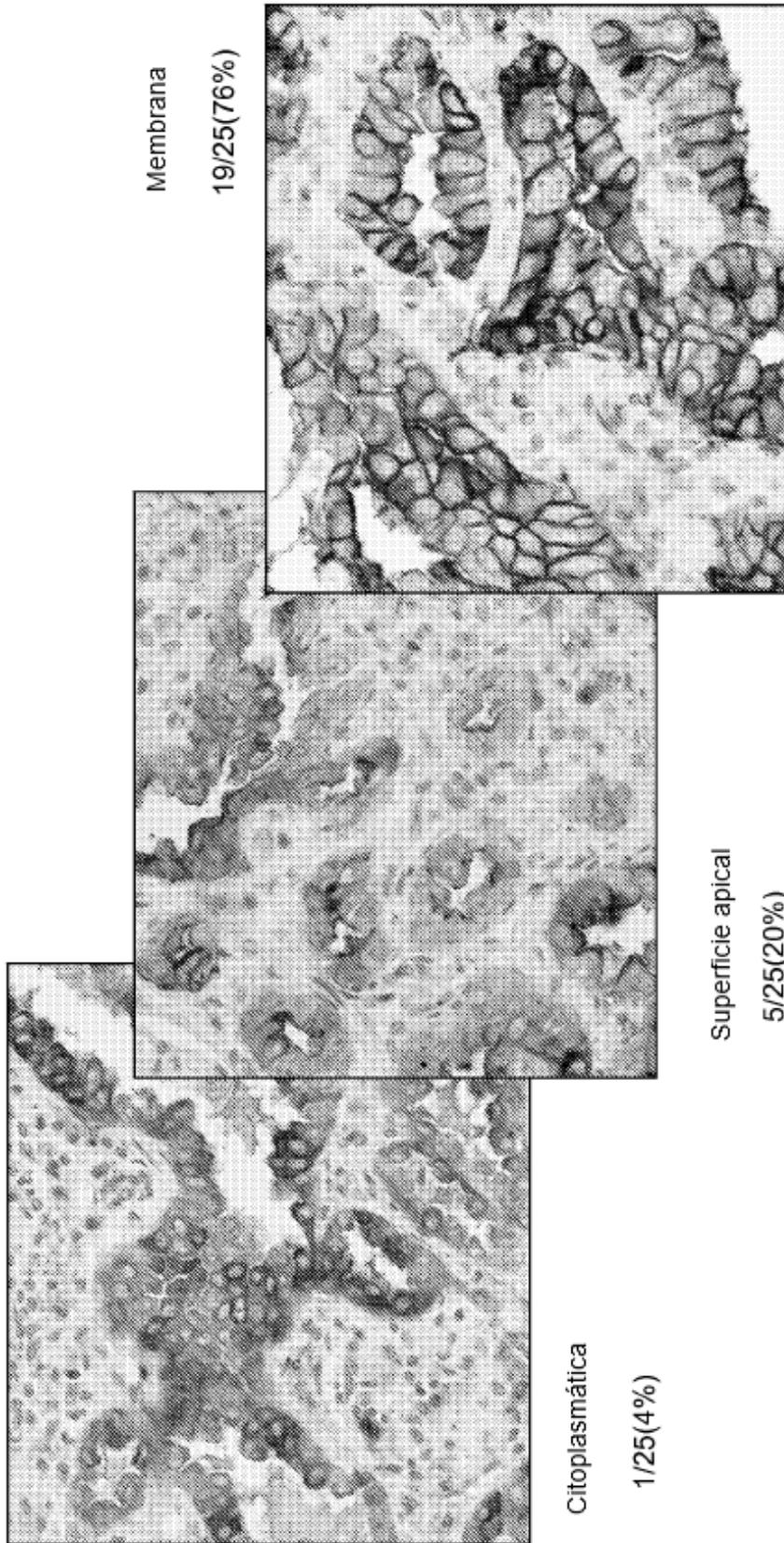


FIG. 5

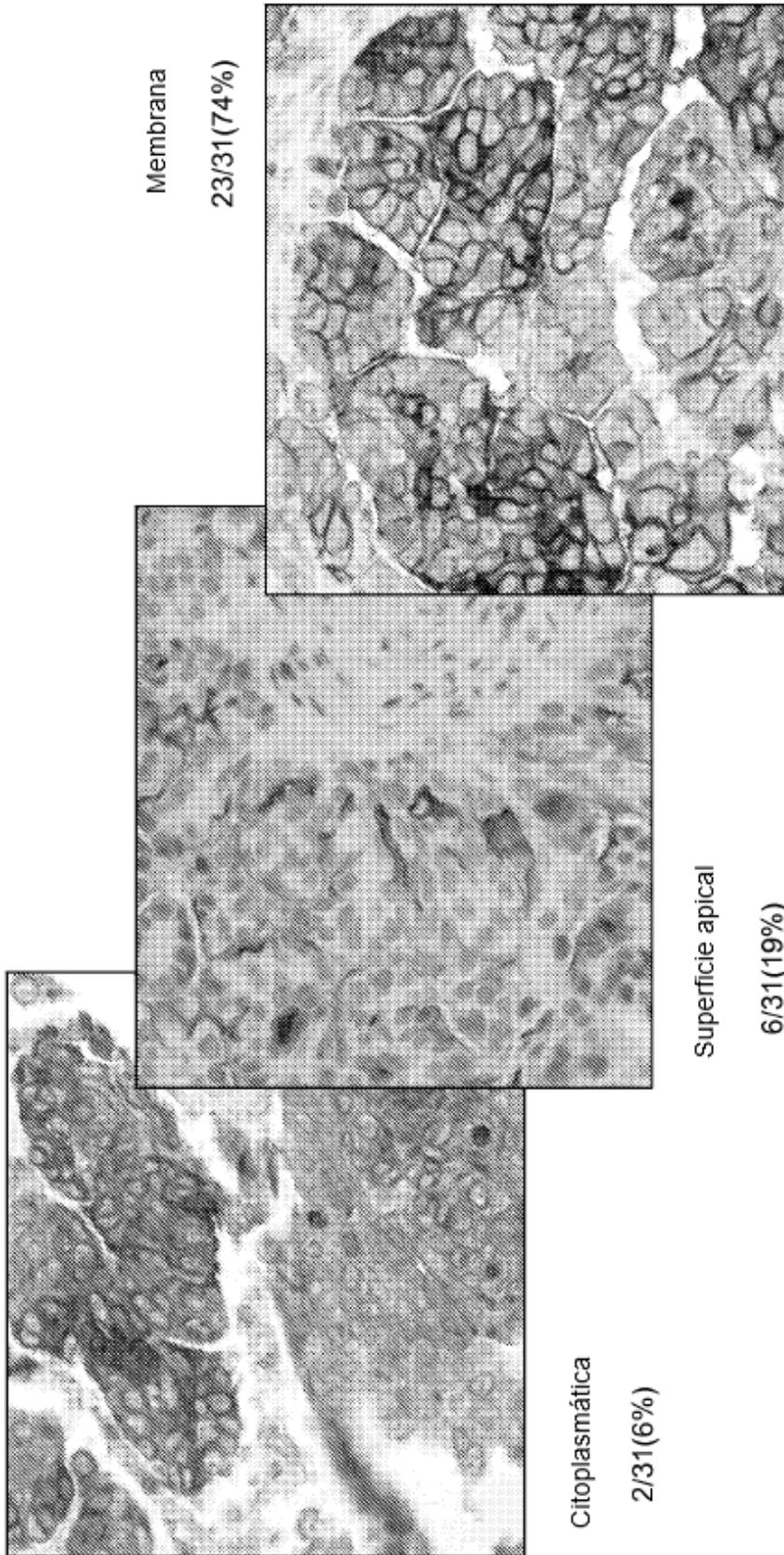


FIG. 6

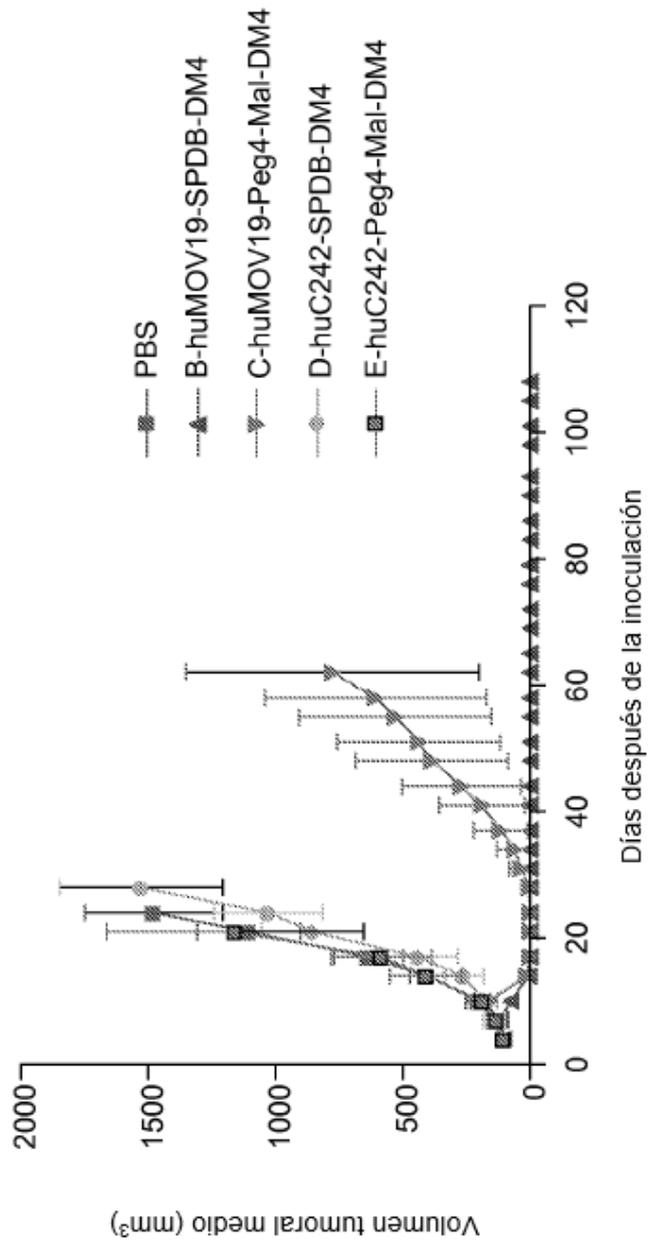


FIG. 7

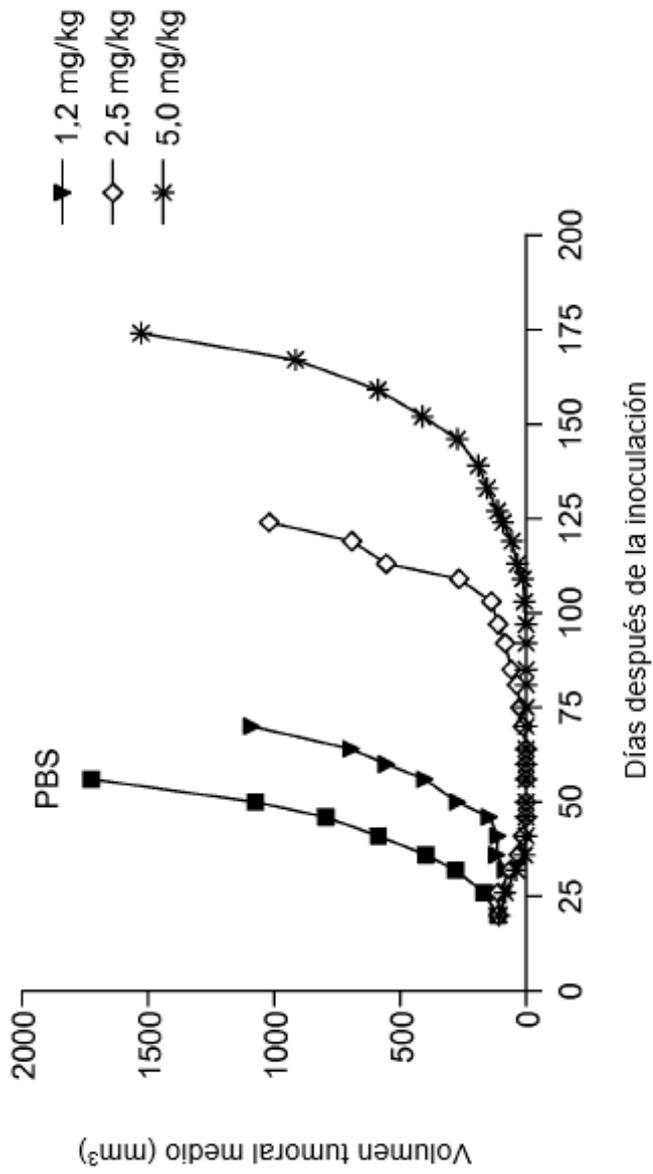


FIG. 8

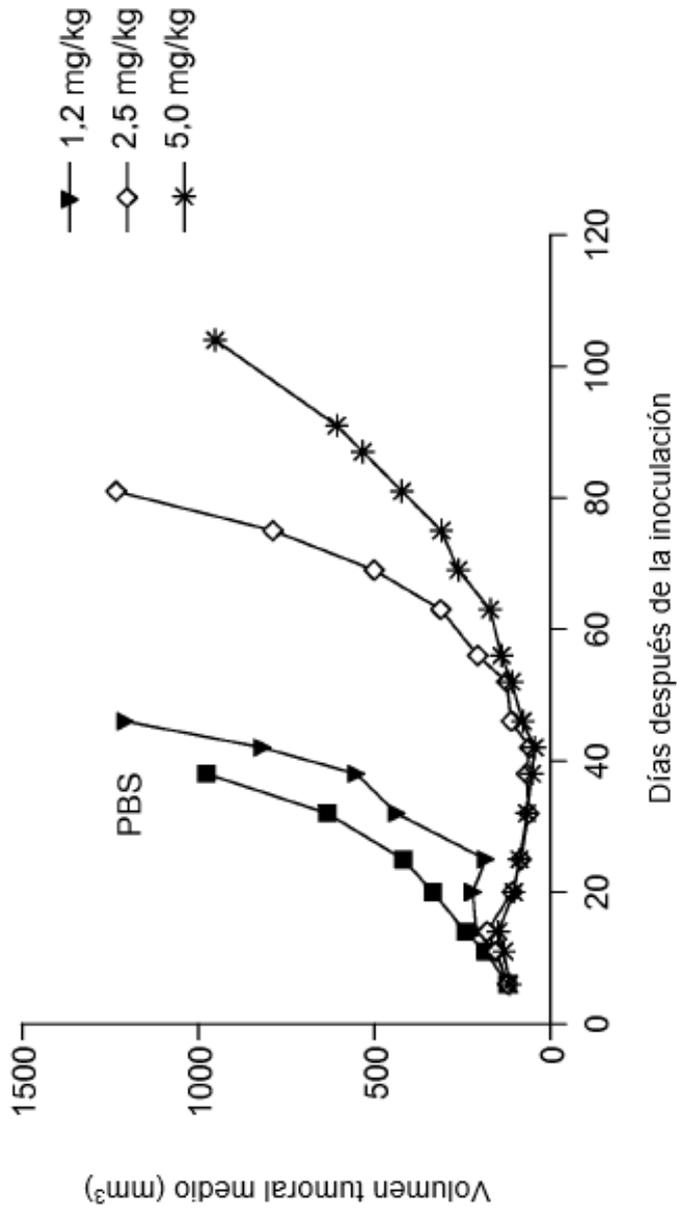


FIG. 9

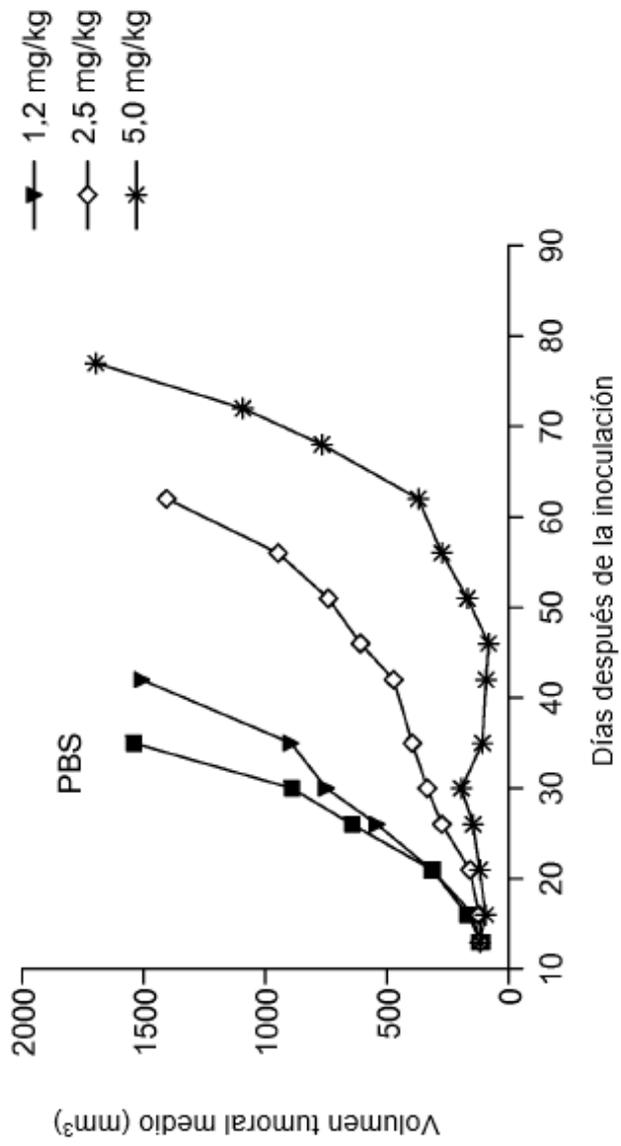


FIG. 10

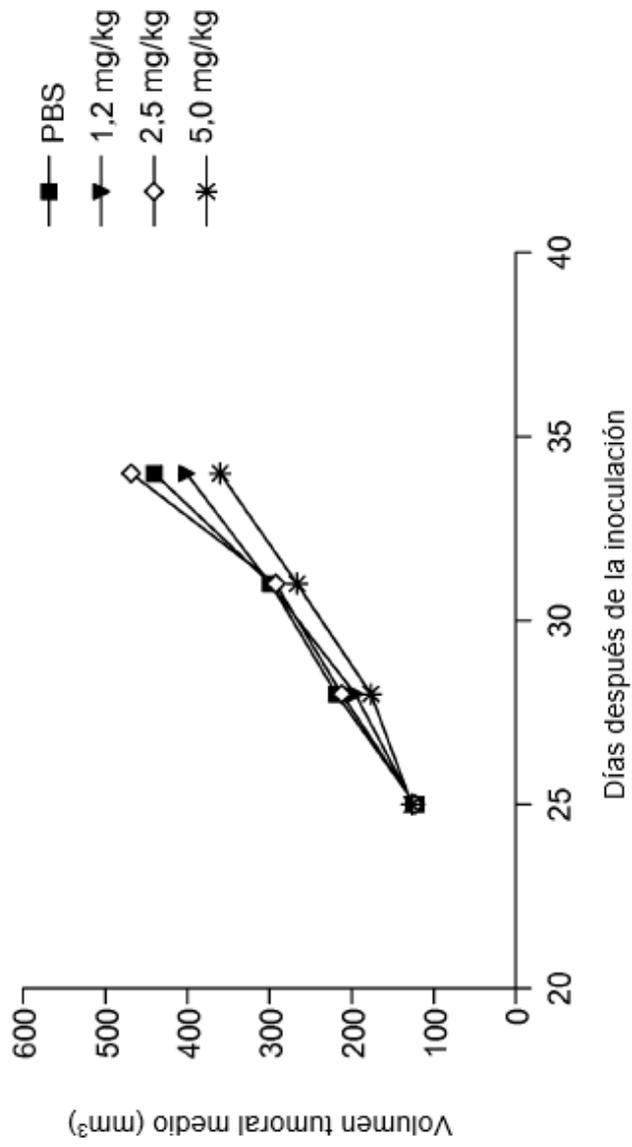


FIG. 11

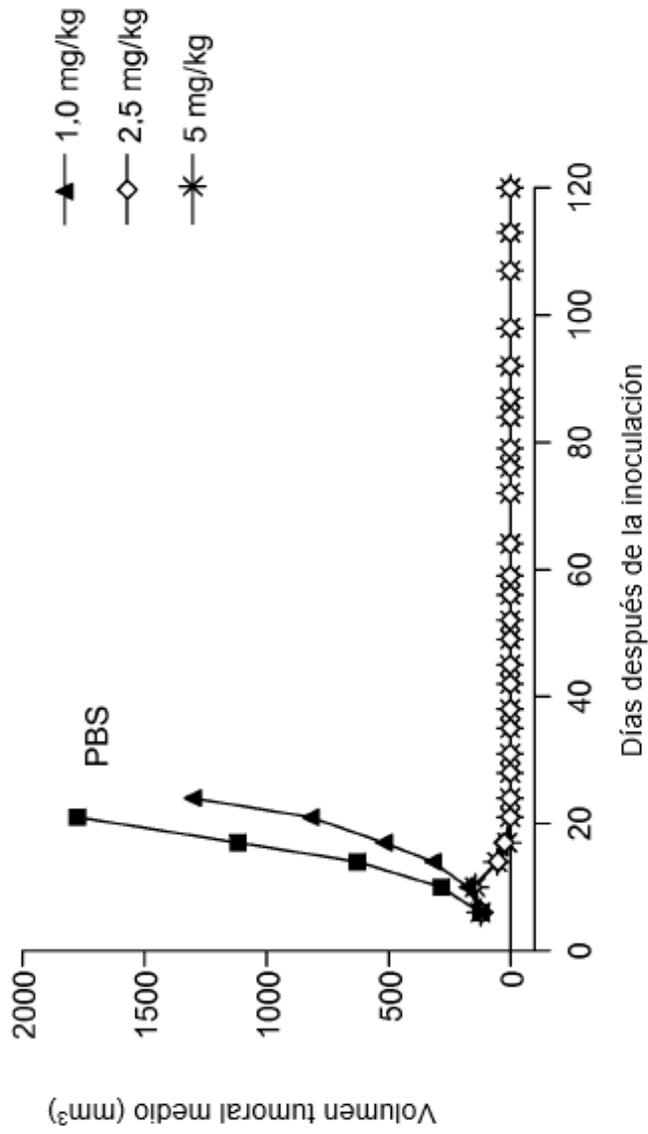


FIG. 12

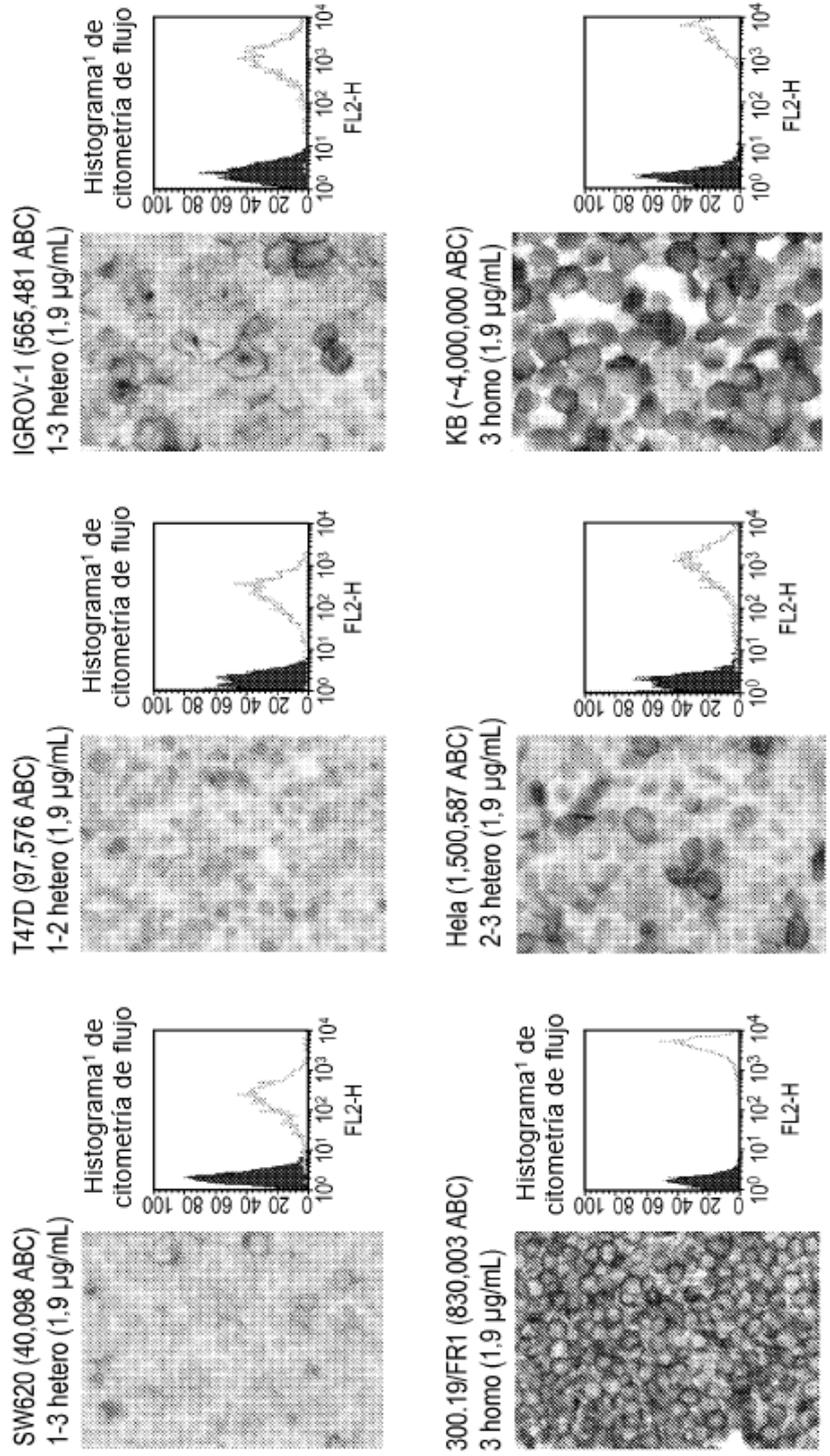


FIG. 13

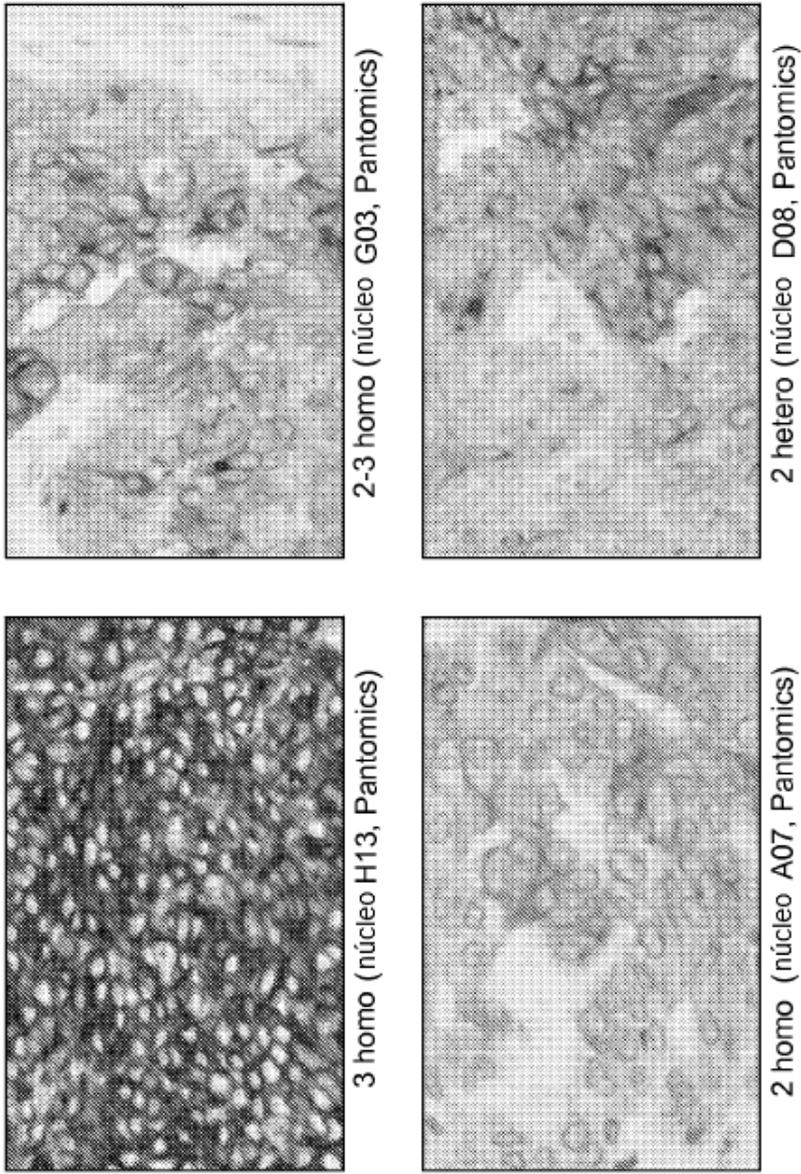
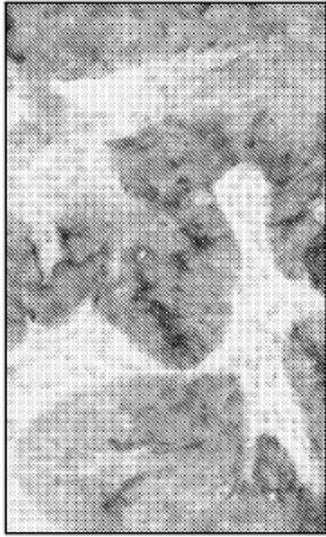
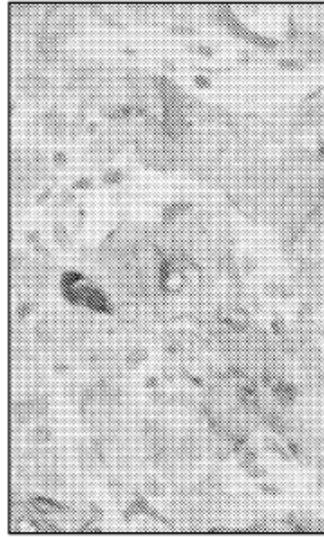


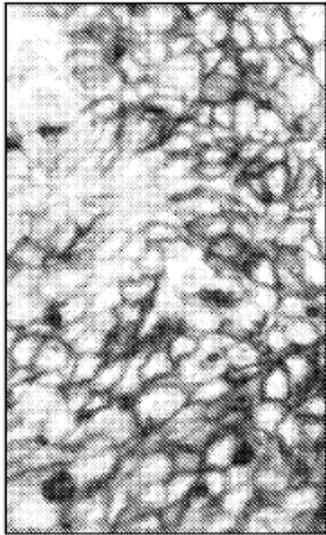
FIG. 14



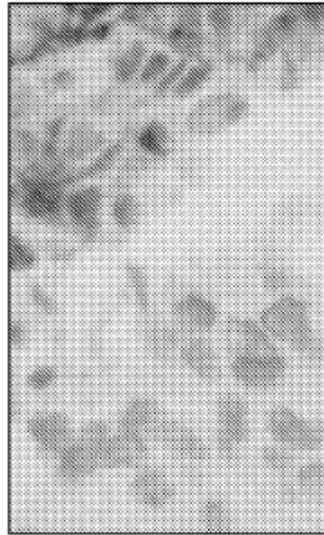
2-3 homo (P-T-OVA-032610-1)



1-2 hetero (núcleo G14, Pantomics)



3 homo (núcleo A12, Pantomics)



3 focal (núcleo E11, Pantomics)

FIG. 15

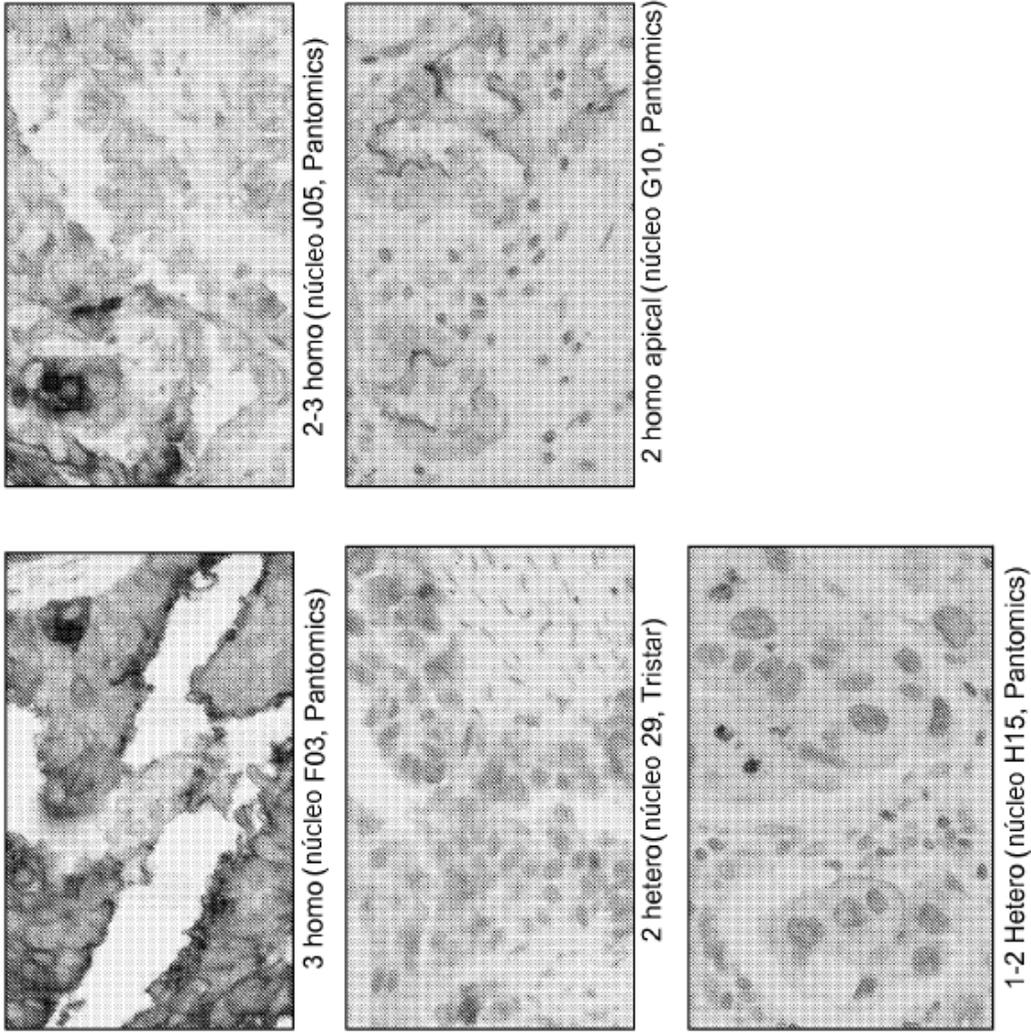
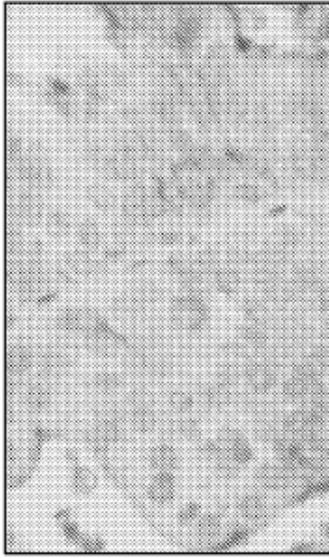
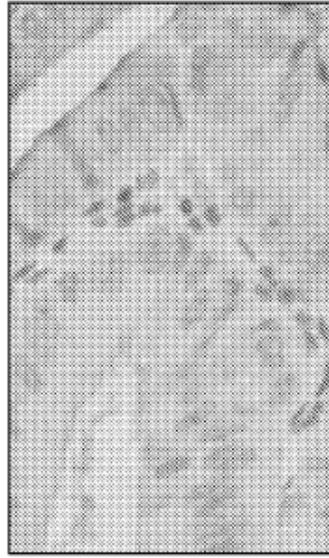


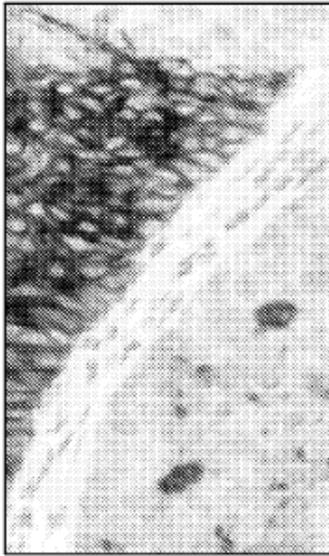
FIG. 16



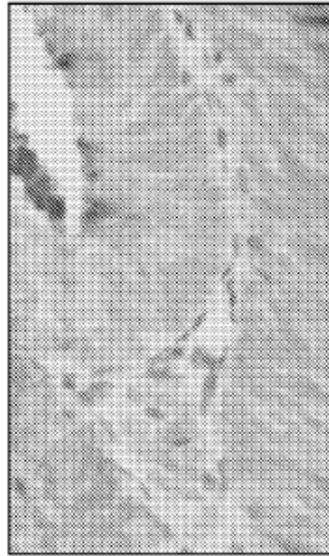
2 hetero (núcleo G08, Pantomics)



1 hetero (núcleo I11, Pantomics)

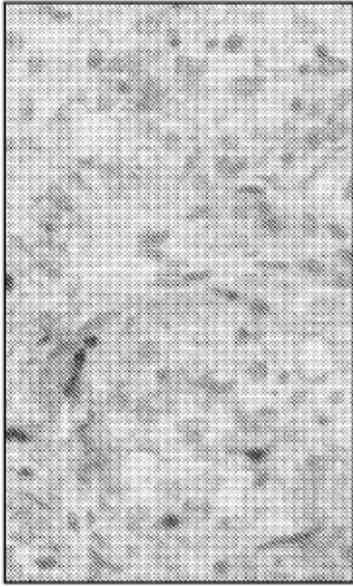


3 hetero (núcleo I04, Pantomics)

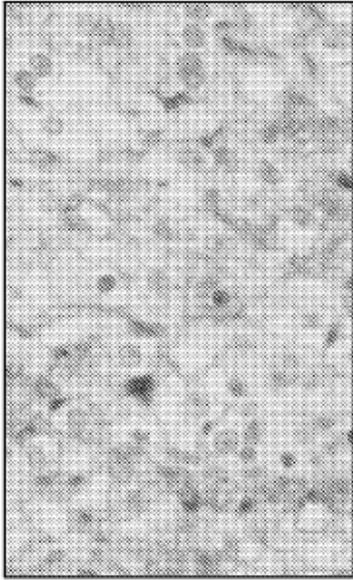


2 hetero (núcleo G10, Pantomics)

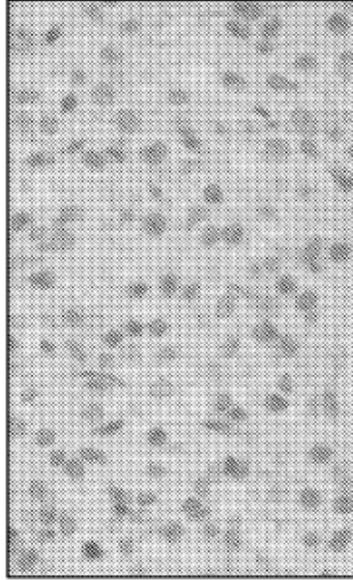
FIG. 17



2 hetero (núcleo G02, Pantomics)



2 homo (núcleo C05, Pantomics)



1 hetero (núcleo E05, Pantomics)

FIG. 18

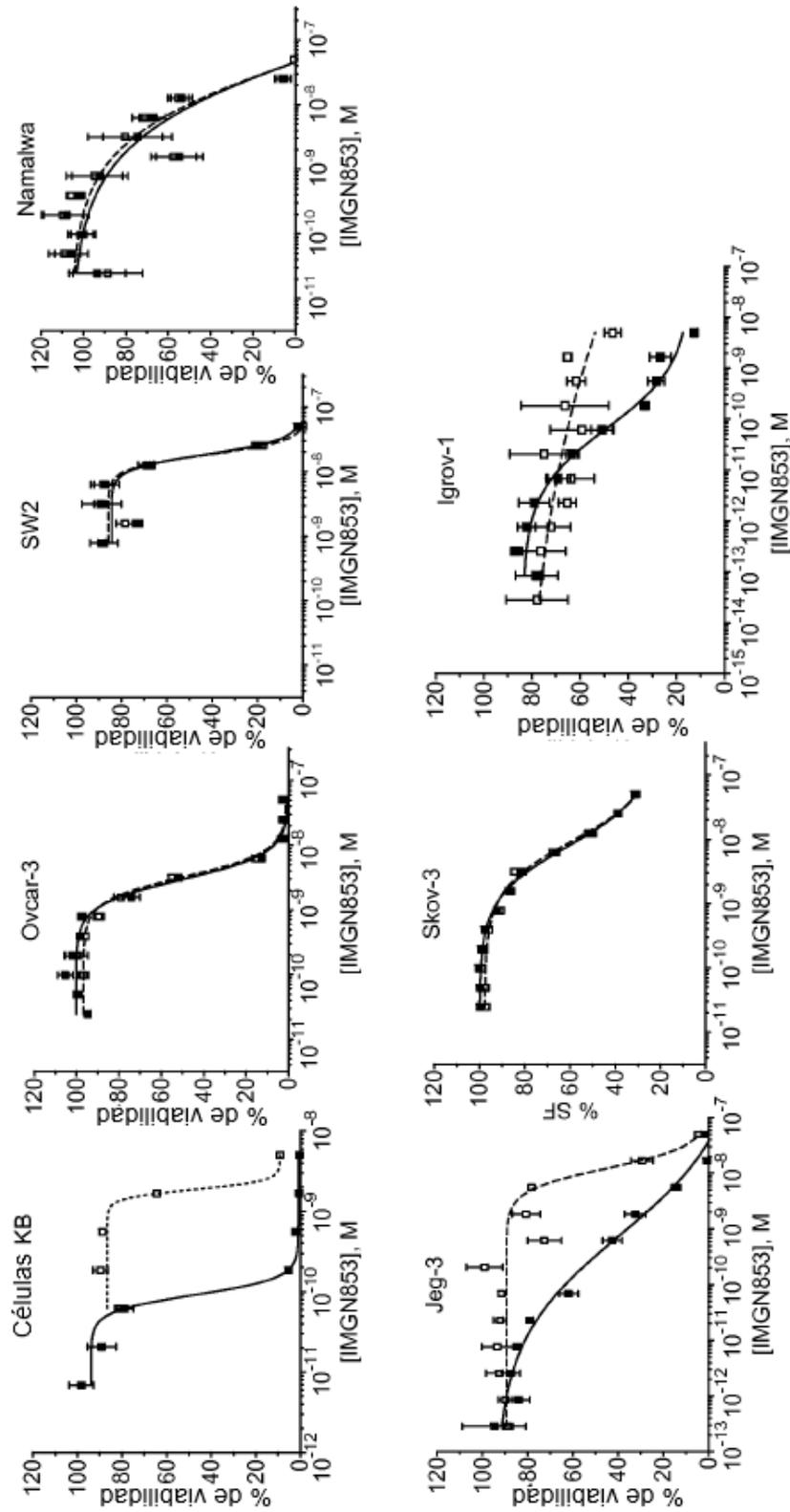


FIG. 19

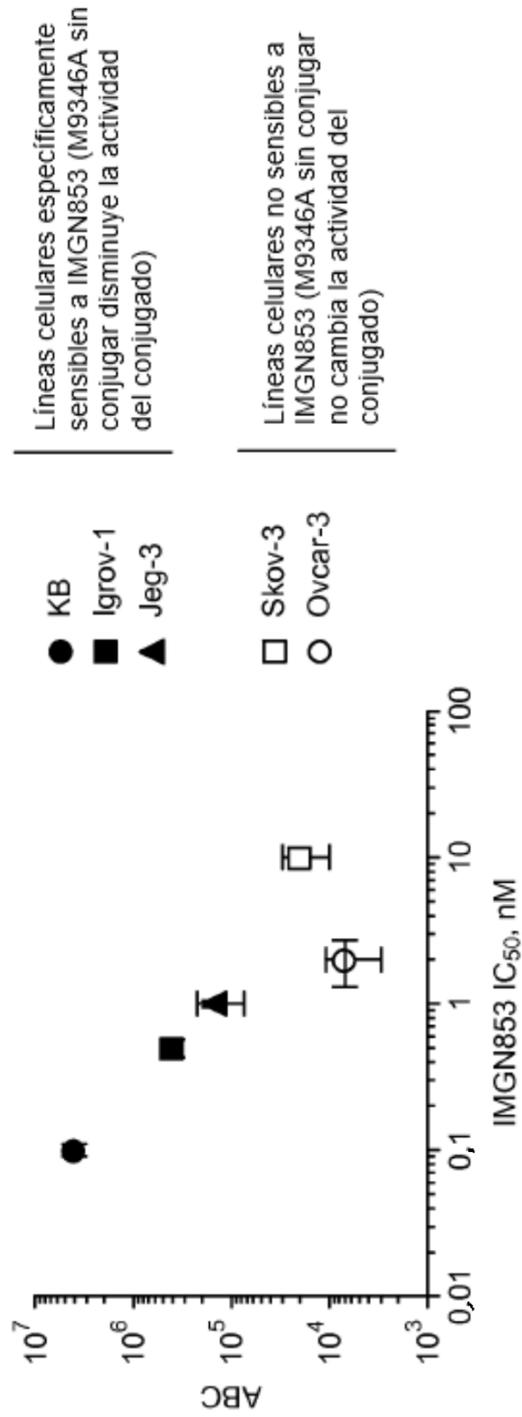


FIG. 20

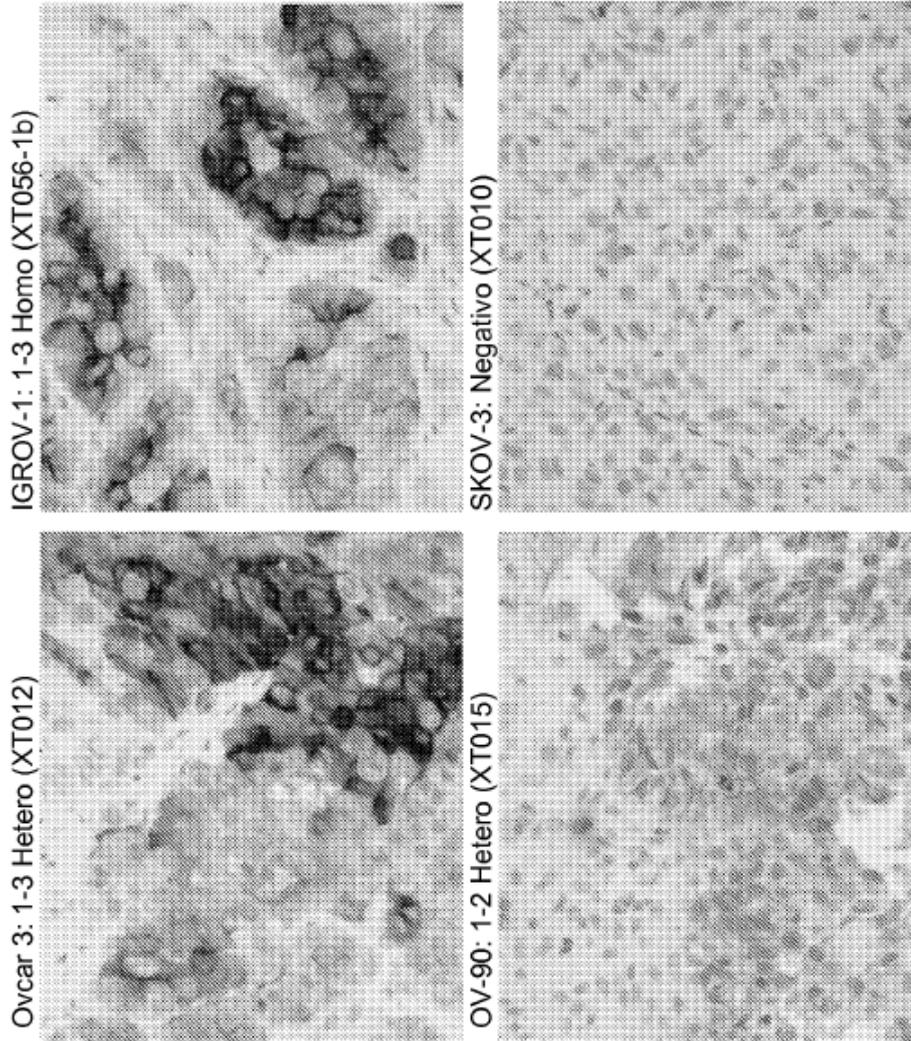


FIG. 21

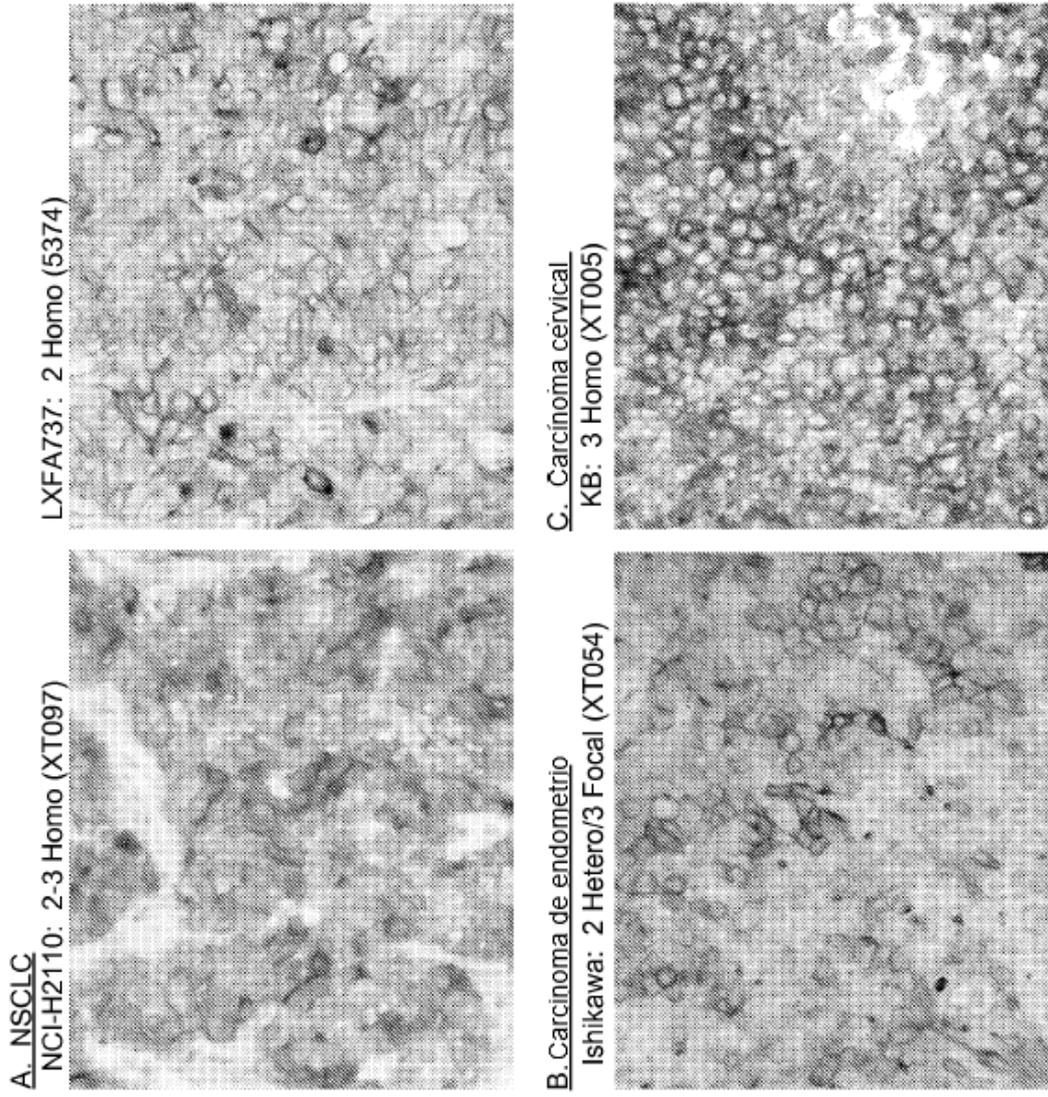


FIG. 22

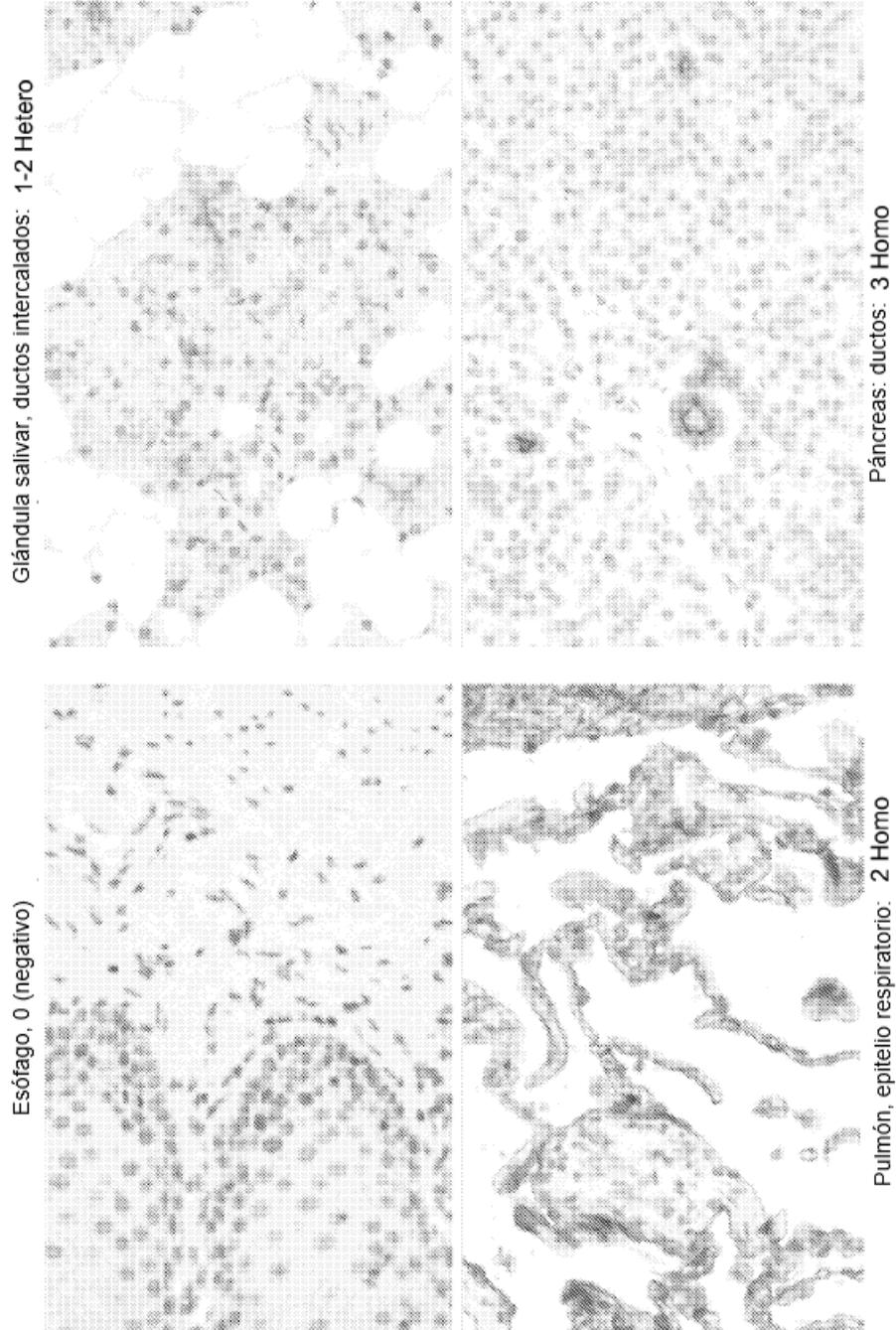


FIG. 23

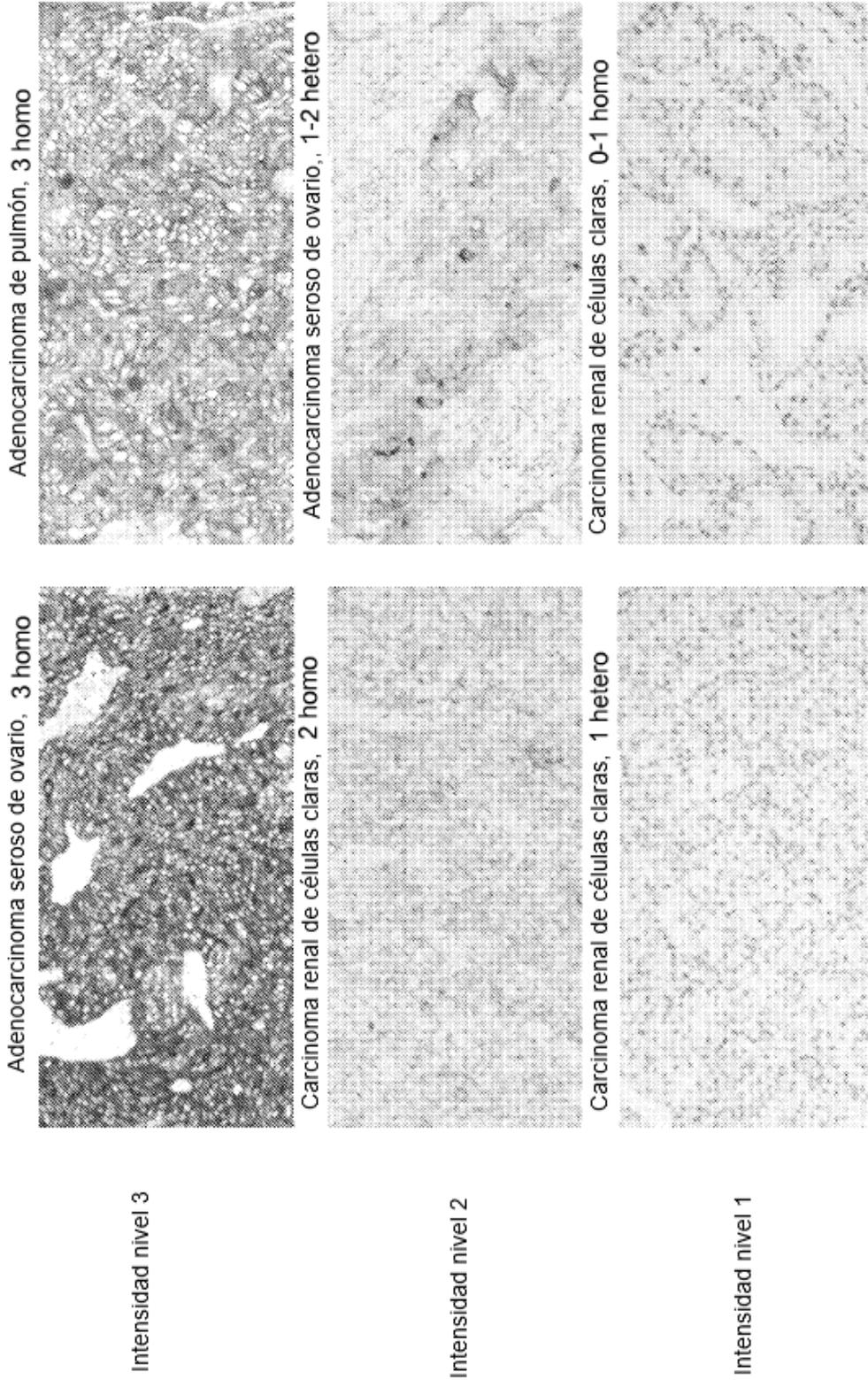


FIG. 24

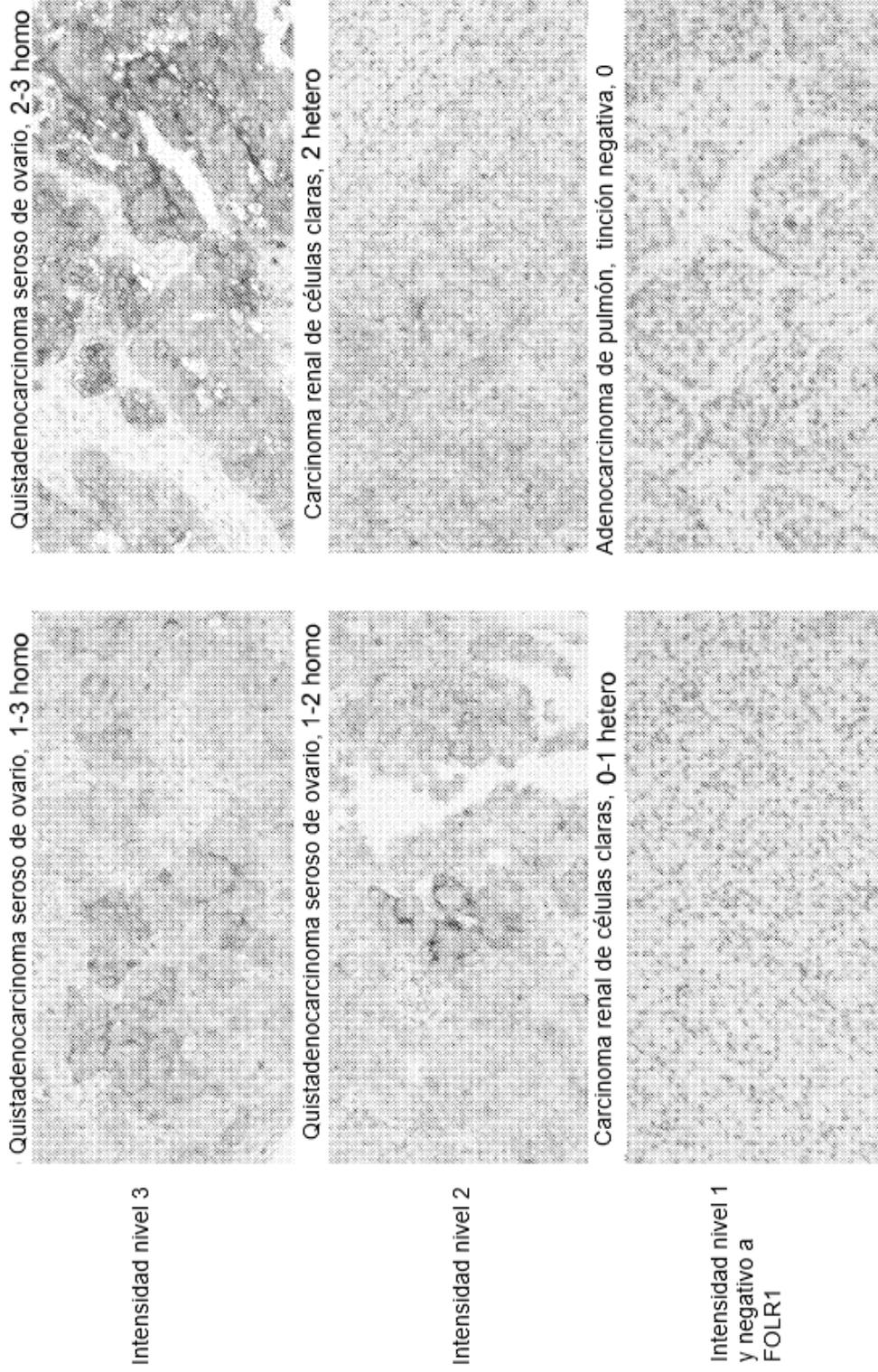


FIG. 25