

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 556**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/US2012/046672**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13012722**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12736054 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2731972**

54 Título: **Anticuerpos frente al receptor alfa del folato y usos de los mismos**

30 Prioridad:

15.07.2011 US 201161508444 P
28.02.2012 US 201261604412 P
29.02.2012 US 201261604954 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2018

73 Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es:

O'SHANNESY, DANIEL JOHN

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 663 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos frente al receptor alfa del folato y usos de los mismos.

5 CAMPO TÉCNICO

La materia dada a conocer en la presente memoria se refiere a anticuerpos específicos frente al receptor α del folato (FR α).

10 ANTECEDENTES

En los humanos, el receptor del folato de alta afinidad presenta cuatro isoformas: α , β , γ y δ . Las formas α , β y δ normalmente se encuentran unidas a las membranas celulares por medio de anclajes a glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas se reciclan entre compartimentos extracelulares y endocíticos, y pueden transportar folato al interior de la célula. Las formas solubles del receptor del folato se pueden derivar de la acción de proteasas o fosfolipasas en los receptores del folato anclados en la membrana.

El receptor α del folato (también denominado FR α , FR-alfa, FOLR-1 o FOLR1) se expresa en varios tejidos epiteliales, entre ellos los del plexo coroideo, los pulmones, la tiroides, los riñones, el útero, las mamas, las trompas de Falopio, los epidídimos y las glándulas salivales. Weitman, SD *et al.*, *Cancer Res* 52: 3396-3401 (1992); Weitman SD *et al.*, *Cancer Res* 52: 6708-6711 (1992). La sobreexpresión del FR α se ha observado en varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de pulmón (p. ej., tumores carcinoides y carcinomas de pulmón no microcíticos como adenocarcinomas); mesotelioma; cáncer de ovario; carcinoma renal; cáncer de cerebro (p. ej., ependimoma anaplásico, astrocitoma pilocítico cerebeloso infantil y metástasis al cerebro); cáncer de cuello uterino; carcinoma nasofaríngeo; tumor de origen mesodérmico; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cáncer endometrial; adenocarcinomas endometrioides y papilar seroso de ovario, cistoadenocarcinomas serosos de ovario, cáncer de mama; cáncer de vejiga; cáncer de páncreas; carcinoma óseo (p. ej., osteosarcoma de gran malignidad); carcinoma hipofisario (p. ej., adenomas hipofisarios); cáncer colorrectal y cáncer medular de tiroides. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.754.698; la publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0232919; Intl. Publ. No. WO 2009/132081; Bueno R *et al.*, *J of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 121(2): 225-233 (2001); Elkanat H & Ratnam M. *Frontiers in Bioscience*, 11, 506-519 (2006); Basal *et al.*, *PLoS ONE*, 4(7):6292 (2009); Fisher RE *J Nucl Med*, 49: 899-906 (2008); Franklin, WA *et al.*, *Int J Cancer*, Suppl 8:89-95 (1994); Hartmann LC *et al.*, *Int J Cancer* 121:938-942 (2007); Iwakiri S *et al.*, *Annals of Surgical Oncology*, 15(3): 889-899 (2008); Publicación de patente europea EP 2199796, Parker N. *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 338: 284-293 (2005); Weitman, SD *et al.*, *Cancer Res* 52: 3396-3401 (1992); Saba NF *et al.*, *Head Neck*, 31(4): 475-481 (2009); Yang R *et al.*, *Clin Cancer Res* 13:2557-2567 (2007). En algunos tipos de cáncer (p. ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), un nivel elevado de expresión del FR α se asocia a un pronóstico desfavorable, mientras que en otros tipos de cáncer (p. ej., carcinomas de pulmón no microcíticos), un nivel elevado de expresión del FR α se asocia a un pronóstico más favorable. Véanse, por ejemplo, Iwakiri S *et al.*, *Annals of Surgical Oncology*, 15(3): 889- 899; Saba NF *et al.*, *Head Neck*, 31(4): 475-481 (2009). En el artículo publicado por Smith *et al.* en *Hybridoma*, vol. 26, n.o 5, 2007-10, págs. 281-288 se da a conocer un anticuerpo monoclonal que se puede utilizar para detectar el receptor α del folato.

La detección precoz del cáncer mejora las tasas de supervivencia y la calidad de vida. A fin de aumentar las probabilidades de que la detección y el tratamiento sean tempranos, urge desarrollar métodos no invasivos para diagnosticar cánceres con expresión del FR α y para vigilar cánceres con expresión del FR α .

RESUMEN

En la presente memoria se dan a conocer anticuerpos que específicamente se unen al FR α . También se describen polinucleótidos relacionados que pueden codificar los anticuerpos dados a conocer, células que expresan los anticuerpos dados a conocer, así como vectores y marcajes detectables de anticuerpos relacionados. Además, se describen métodos para utilizar los anticuerpos dados a conocer. Por ejemplo, los anticuerpos dados a conocer se pueden utilizar para diagnosticar cáncer; para comprobar si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable; para establecer un pronóstico de cáncer en un sujeto; para determinar si un paciente debe recibir tratamiento contra el cáncer o no, o para determinar si un sujeto padece o no cáncer con expresión del FR α y por lo tanto, si es susceptible de tratamiento con un agente terapéutico anticancerígeno específico para el FR α .

En un primer aspecto de la presente invención se da a conocer un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α) que comprende una CDR1 de cadena ligera con la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 26, una CDR2 de cadena ligera con la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 27, una CDR3 de cadena ligera con la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 28, una CDR1 de cadena pesada con la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 30, una CDR2 de cadena pesada con la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 31 y una CDR3 de cadena pesada con la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 32.

65

5 En un segundo aspecto de la presente invención se da a conocer un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α), donde la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 26, la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 27, la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 28, la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 30, la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 31 y la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 32.

10 En un tercer aspecto de la presente invención se da a conocer un vector que comprende el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6.

15 En un cuarto aspecto de la presente invención se da a conocer una célula recombinante que comprende el vector de la reivindicación 7.

En un quinto aspecto de la presente invención se da a conocer un anticuerpo aislado específico frente al receptor α del folato (FR α) producido por una estirpe celular depositada en la ATCC con número de acceso PTA-11885.

20 En un sexto aspecto de la presente invención se da a conocer un método para detectar el receptor α del folato (FR α) o cáncer con expresión del FR α en una muestra biológica; dicho método comprende la exposición de la muestra al anticuerpo de la reivindicación 1 o 10, o a un fragmento de unión al antígeno del mismo, y la detección del receptor α del folato (FR α).

25 En un séptimo aspecto de la presente invención se da a conocer un método para diagnosticar cáncer con expresión del receptor α del folato en un sujeto; dicho método comprende:

- a. exponer una muestra biológica del sujeto al anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o a un fragmento de unión al antígeno del mismo;
- b. determinar la cantidad de receptor α del folato (FR α) presente en la muestra;
- 30 c. comparar la cantidad de receptor α del folato (FR α) presente en la muestra con un patrón conocido; y
- d. determinar si la concentración de receptor α del folato (FR α) en el sujeto se encuentra dentro del intervalo de concentraciones de receptor α del folato (FR α) asociadas al cáncer.

35 En un octavo aspecto de la presente invención se da a conocer un método para vigilar el cáncer con expresión del receptor α del folato en un sujeto; dicho método comprende:

- a. exponer una muestra biológica del sujeto al anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o a un fragmento de unión al antígeno del mismo;
- b. determinar la cantidad de receptor α del folato (FR α) presente en la muestra que está unido al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo;
- 40 c. comparar la cantidad de receptor α del folato (FR α) presente en la muestra con
 - i. un patrón conocido; o
 - ii. una muestra biológica obtenida del sujeto en el pasado; y
- 45 d. con base en la concentración de receptor α del folato (FR α) en el sujeto, determinar si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable.

50 En un noveno aspecto de la presente invención se da a conocer un kit para detectar la presencia de receptor α del folato (FR α) en una muestra biológica; dicho kit comprende al menos un anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

55 En un décimo aspecto de la presente invención se da a conocer un kit para detectar la presencia de receptor α del folato (FR α) en una muestra biológica; dicho kit comprende: al menos un anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; donde el anticuerpo incluido, o fragmento de unión al antígeno del mismo, está fijado a un soporte sólido.

60 En un undécimo aspecto de la presente invención se da a conocer un kit para detectar la presencia de receptor α del folato (FR α) en una muestra biológica; dicho kit comprende: al menos un anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; donde el anticuerpo incluido, o fragmento de unión al antígeno del mismo, está marcado de manera que se puede detectar.

Anticuerpos específicos frente al receptor α del folato (FR α)

65 En el presente se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno aislados que específicamente se unen al FR α . En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG murinas o derivados de estas.

En el presente se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno aislados que se unen específicamente al FR α , ya sea en forma nativa, no reducida, o químicamente conservada. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG murinas o derivados de estas. Aunque los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser humanos, humanizados o quiméricos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno ilustrados en el presente son murinos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos pueden incluir un dominio variable de cadena ligera que incluye una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 29. En algunas realizaciones, un polinucleótido aislado que incluye una secuencia sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 61 puede codificar esta secuencia aminoacídica del dominio variable de cadena ligera. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos pueden incluir un dominio variable de cadena pesada que incluye una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 33. En algunas realizaciones, un polinucleótido aislado que incluye una secuencia sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 65 puede codificar esta secuencia aminoacídica del dominio variable de cadena pesada. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos pueden incluir dominios variables de cadena ligera y pesada, donde el dominio variable de cadena ligera incluye una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 29 y el dominio variable de cadena pesada incluye una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 33. En algunas realizaciones, se dan a conocer el anticuerpo 26B3.F2 (26B3), o fragmentos de unión al antígeno del mismo, los cuales se pueden unir a las formas nativas, no reducidas o químicamente conservadas del FR α .

En algunas realizaciones, el anticuerpo 26B3 ha sido producido por células productoras de anticuerpos depositadas en la Colección de Cultivos Americana (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 19 de mayo de 2011 y a las que se les ha asignado el número de acceso PTA-11885. En algunas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, poseen la misma afinidad de unión al FR α que los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, comprenden las CDR de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas.

También se dan a conocer polinucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a las formas nativas, no reducidas o químicamente conservadas del FR α . En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR1 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 58. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR2 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 59. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR3 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 60. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 62. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR2 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 63. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR3 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 32, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 64. Los polinucleótidos pueden codificar un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tenga una cadena ligera con una CDR1 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 58; una CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 59; y una CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 60. Los polinucleótidos pueden codificar un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tenga una CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 62; una CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 63; y una CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 32, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 64. Los polinucleótidos pueden codificar un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tenga una CDR1 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 58; y una CDR2 codificada por una secuencia nucleotídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 59; y una CDR3 codificada por una secuencia nucleotídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 60; y una CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 62; una CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 63; y una CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 32, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 64. Las disposiciones de CDR que se unen al antígeno también pueden construirse mediante técnicas de ingeniería genética utilizando como armazón para ellas proteínas similares a los anticuerpos. Tales proteínas que se unen al antígeno construidas mediante técnicas de ingeniería genética se encuentran dentro del alcance de la divulgación.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden codificar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tienen un segmento del dominio variable de cadena ligera que incluye una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 29, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 61. En algunas realizaciones, los polinucleótidos descritos pueden codificar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tengan un segmento del dominio variable de cadena pesada que incluya una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 33, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 65. En algunas realizaciones, los polinucleótidos descritos pueden codificar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tengan un segmento del dominio variable de cadena ligera que incluya una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 29, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 61; y un segmento del dominio variable de cadena pesada que incluye una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 33, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 65. Los polinucleótidos que pueden codificar los segmentos del dominio variable dados a conocer en el presente se pueden incluir en los mismos, o distintos, vectores para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno. Los polinucleótidos descritos en el presente pueden codificar el anticuerpo 26B3, o fragmentos de unión al antígeno del mismo, los cuales se pueden unir a las formas nativas, no reducidas o químicamente conservadas del FR α .

Se dan a conocer vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, así como células que expresan los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente al FR α . También se dan a conocer células que pueden expresar los vectores descritos. Estas células pueden ser células de mamíferos (como células CHO-K1), células de insectos (como células Sf7), células de levadura, células vegetales o células de bacterias (como *E. coli*). Los anticuerpos descritos también se pueden producir mediante células de hibridoma, como las descritas en el presente.

Métodos para diagnosticar el cáncer

En la presente memoria se dan a conocer métodos para diagnosticar en un sujeto cáncer de origen epitelial, ya sea de mama, de tiroides, colorrectal, endometrial, de trompas de Falopio, de ovario o de pulmón. En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si un sujeto padece cáncer con expresión del FR α mediante la determinación de la concentración de FR α presente en una muestra obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la concentración de FR α observada con la concentración de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto y la concentración de FR α en la muestra de control indica si el sujeto padece o no un cáncer con expresión del FR α .

En algunas realizaciones la muestra de control se puede obtener a partir de un sujeto que no padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones, la muestra de control se puede obtener a partir de un sujeto que padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones en las que la muestra de control se obtiene a partir de un sujeto que no padece cáncer con expresión del FR α , un aumento observado en la cantidad de FR α presente en la muestra, con respecto a la cantidad observada en la muestra de control, indica que el sujeto evaluado padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones en las que la muestra de control se obtiene a partir de un sujeto que no padece cáncer con expresión del FR α , una disminución o similitud observada en la cantidad de FR α presente en la muestra problema, con respecto a la cantidad observada en la muestra de control, indica que el sujeto evaluado no padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones en las que la muestra de control se obtiene a partir de un sujeto que padece cáncer con expresión del FR α , una similitud observada en la cantidad de FR α presente en la muestra problema, con respecto a la cantidad observada en la muestra de control, indica que el sujeto evaluado padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones en las que la muestra de control se obtiene a partir de un sujeto que padece cáncer con expresión del FR α , una disminución observada en la cantidad de FR α presente en la muestra problema, con respecto a la cantidad observada en la muestra de control, indica que el sujeto evaluado no padece cáncer con expresión del FR α .

En algunas realizaciones, la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , tales como los anticuerpos descritos en el presente. Se pueden utilizar métodos similares para determinar si el sujeto padece un cáncer que no está asociado con una mayor producción de FR α . La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede proceder de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares.

En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si un sujeto padece cáncer con expresión del FR α mediante la determinación de la concentración de FR α asociada a una célula o tejido que está presente en una muestra obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la concentración de FR α observada con la concentración de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto y la concentración de FR α en la muestra de control indica que el sujeto padece un cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones, la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , tales como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede ser de células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej.,

tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares.

5 En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si un sujeto padece cáncer con expresión del FR α mediante la determinación de la concentración de FR α no asociada a una célula o tejido que está presente en una muestra obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la concentración de FR α observada con la concentración de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto y la concentración de FR α en la muestra control indica que el sujeto padece un cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones, la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , tales como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede ser de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, preparados histológicos y similares.

15 En diversas realizaciones de los métodos descritos, el cáncer puede ser un cáncer con expresión del FR α . En una realización particular, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer endometrial. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de las trompas de Falopio. En otra realización, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de pulmón no microcítico, como un adenocarcinoma. Por otra parte, los métodos descritos se pueden utilizar para identificar un cáncer sin expresión del FR α , como carcinoma de células escamosas. Por ejemplo, los métodos descritos se podrían utilizar para distinguir un cáncer de pulmón con expresión del FR α , como adenocarcinoma, de un cáncer de pulmón sin expresión del FR α , como carcinoma de células escamosas. Los métodos descritos se podrían utilizar para distinguir un cáncer de mama con expresión del FR α , como fibroadenoma, de un cáncer de mama sin expresión del FR α , como sarcoma quístico. Además, los métodos descritos se podrían utilizar para distinguir un cáncer de tiroides con expresión del FR α , como carcinoma papilar, de un cáncer de tiroides sin expresión del FR α , como carcinoma medular. En algunas realizaciones descritas en el presente la detección en un sujeto de células cancerígenas que expresan el FR α se puede utilizar para determinar si el sujeto puede ser tratado con un agente terapéutico específico para el FR α . En algunas realizaciones, el agente terapéutico específico para el FR α puede ser un anticuerpo, como Farletuzumab.

35 En diversos aspectos, la concentración de FR α se determina mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con más de un tipo de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con un primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α y a continuación, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . Cuando se utilizan dos anticuerpos, uno de los anticuerpos es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

- 40 (a) un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3;
- (b) el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, o un fragmento de unión al antígeno de los mismos;
- 45 (c) un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende las CDR de cadena ligera y pesada del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3;
- (d) un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende el segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, como se describe en el Cuadro 1; o
- 50 (e) un anticuerpo que tiene la secuencia aminoacídica del anticuerpo producido por cualquiera de las estirpes celulares depositadas en la ATCC con número de acceso PTA-11887, PTA-11884, PTA-11886, o PTA-11885, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

55 En determinadas realizaciones, la concentración de FR α se determina mediante análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo, inmunofluorometría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (EQL), inmunohistoquímica, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ELISA.

60 En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la muestra de control es una concentración de FR α de referencia estándar en un sujeto sano. En otras realizaciones la muestra de control puede ser proteína FR α a una concentración conocida (p. ej., muestra de proteína FR α purificada o recombinante). En algunas realizaciones, la concentración de FR α observada en el sujeto evaluado se puede comparar con las concentraciones de FR α observadas en muestras obtenidas a partir de sujetos de los cuales se sabe que presentan cáncer con expresión del FR α o cuyas concentraciones de FR α se conocen.

Métodos para vigilar el cáncer

- 5 En la presente memoria se dan a conocer métodos para vigilar un cáncer con expresión del FR α en un sujeto. Los métodos descritos se pueden utilizar antes del tratamiento anticancerígeno, después del tratamiento anticancerígeno, o tanto antes como después del tratamiento anticancerígeno. En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si el cáncer con expresión del FR α evoluciona, remite o se mantiene estable mediante la determinación de la concentración de FR α presente en una muestra problema obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la concentración de FR α observada con la concentración de FR α en una muestra obtenida a partir del sujeto en el pasado, donde una diferencia entre la concentración de FR α en la muestra problema y la muestra obtenida en el pasado aporta una indicación de si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable. A este respecto, una muestra problema con una concentración de FR α más elevada con respecto a la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la evolución de un cáncer con expresión del FR α . A la inversa, una muestra problema con una concentración de FR α más baja con respecto a la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la regresión de un cáncer con expresión del FR α . Por lo tanto, una muestra problema con una concentración de FR α cuya diferencia con la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado sea negligible puede indicar que un cáncer con expresión del FR α se mantiene estable. En algunas realizaciones, la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , tales como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α se puede derivar de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares.
- 10
- 15
- 20
- 25 En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si el cáncer con expresión del FR α evoluciona, remite o se mantiene estable mediante la determinación de la concentración de FR α presente en una muestra problema obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la concentración de FR α observada con la concentración de FR α en una muestra obtenida de manera similar a partir del sujeto en el pasado, donde una diferencia entre la concentración de FR α en la muestra problema y la muestra obtenida en el pasado aporta una indicación de si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable. A este respecto, una muestra problema con una concentración de FR α más elevada con respecto a la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la evolución de un cáncer con expresión del FR α . A la inversa, una muestra problema con una concentración de FR α más baja con respecto a la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la regresión de un cáncer con expresión del FR α . Por lo tanto, una muestra problema con una concentración de FR α cuya diferencia con la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado sea negligible puede indicar que un cáncer con expresión del FR α se mantiene estable. En algunas realizaciones, la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , tales como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede ser de células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares.
- 30
- 35
- 40
- 45 En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si el cáncer con expresión del FR α evoluciona, remite o se mantiene estable mediante la determinación de la concentración de FR α presente en una muestra problema obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la concentración de FR α observada con la concentración de FR α en una muestra obtenida de manera similar a partir del sujeto en el pasado, donde una diferencia entre la concentración de FR α en la muestra problema y la muestra obtenida en el pasado aporta una indicación de si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable. A este respecto, una muestra problema con una concentración de FR α más elevada con respecto a la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la evolución de un cáncer con expresión del FR α . A la inversa, una muestra problema con una concentración de FR α más baja con respecto a la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la regresión de un cáncer con expresión del FR α . Por lo tanto, una muestra problema con una concentración de FR α cuya diferencia con la concentración observada en la muestra obtenida en el pasado sea negligible puede indicar que un cáncer con expresión del FR α se mantiene estable. En algunas realizaciones, la concentración de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , tales como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede ser de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, preparados histológicos y similares.
- 50
- 55
- 60 En diversas realizaciones de los métodos descritos, el cáncer puede ser un cáncer con expresión del FR α . En una realización particular, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer endometrial. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de las trompas de Falopio. En otra realización, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de pulmón no microcítico, como un adenocarcinoma.
- 65

En diversos aspectos, la concentración de FR α se determina mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con más de un tipo de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con un primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α y a continuación, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . Cuando se utilizan dos anticuerpos, uno de los anticuerpos es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3;
- (b) el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, o un fragmento de unión al antígeno de los mismos;
- (c) un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende las CDR de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3.

En determinadas realizaciones, la concentración de FR α se determina mediante análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo, inmunofluorometría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (EQL), inmunohistoquímica, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ELISA.

Otros aspectos de la materia expuesta se dan a conocer en mayor detalle en la descripción detallada, los ejemplos aportados y las figuras correspondientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Todas las figuras que no estén dentro del alcance de las reivindicaciones se aportan solamente como referencia y no forman parte de la invención.

En la Figura 1 se representan las características de migración del FR α mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. El FR α se evaluó en su forma nativa (carril 2) o reducida y alquilada (carril 3).

En la Figura 2 se ilustran los residuos aminoacídicos del FR α (SEC. N.º ID: 1) que comprenden los epítipos (regiones sombreadas) para los anticuerpos monoclonales 9F3, 24F12 y 26B3, según se predijo mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio y métodos de acoplamiento simulado.

En la Figura 3 se muestran cuatro transferencias de Western correspondientes a células CHO que expresan FR α u homólogos del FR, FR β , FR γ o FR Δ : (A) células recombinantes purificadas y (B) lisados de células enteras. La separación se realizó en geles de SDS-PAGE. Las proteínas se prepararon en tampón de carga con o sin agentes reductores. Panel A: carril 1, marcadores de peso molecular; carriles 2-5, 0,5 μ g de FR α , FR β , FR γ y FR Δ reducidos, respectivamente; carril 6, blanco; carriles 7-10, 0,5 μ g de FR α , FR β , FR γ y FR Δ no reducidos, respectivamente. La banda positiva representa la única especie reactiva en cada carril y corresponde a un peso molecular de \sim 38kDa. Panel B: carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, CHO-FR α ; carril 3, CHO-FR β ; carril 4, CHO-FR Δ . Los lisados de células enteras se prepararon en tampón de carga sin agentes reductores y se separaron en gel de SDS-PAGE. Cada panel se rastreó con el AcM anti-FR α marcado correspondiente como sonda situado en la derecha. Los pesos moleculares de los FR son: FR α \sim 38kDa; FR β \sim 30kDa; FR γ \sim 28kDa; FR Δ \sim 26kDa. Los anticuerpos LK26 y BN3.2 que reconocen al FR α en condiciones desnaturalizadas y no reducidas o reducidas, respectivamente, se utilizaron como controles positivos.

En la Figura 4 se observa una muestra de tejido de cáncer de ovario seroso papilar fijada en formol e incluida en parafina, la cual se rastreó para detectar la presencia de FR α con el anticuerpo monoclonal 26B3 como sonda.

En la Figura 5 se muestra la expresión del FR α en tejidos normales. Las muestras de pulmón (A) y riñón (B) normales teñidas con el anticuerpo 26B3 demuestran que la expresión del FR α está altamente restringida a las células epiteliales y presenta una distribución predominantemente apical (las imágenes están aumentadas 20 veces).

En la Figura 6 se aporta una representación gráfica en la que se comparan las puntuaciones M correspondientes a adenocarcinoma de pulmón obtenidas con el anticuerpo 26B3 o anticuerpo BN3.2.

En la Figura 7 se muestra la tinción del FR α en subtipos histológicos de carcinoma de pulmón no microcítico: (A) adenocarcinoma de pulmón a 20x, (B) adenocarcinoma de pulmón a 40x, (C) carcinoma de pulmón adenoescamoso a 20x y (D) carcinoma de pulmón de células escamosas a 40x.

En la Figura 8 se aporta una representación gráfica en la que se comparan las puntuaciones M correspondientes a muestras (partes centrales) duplicadas de adenocarcinoma de pulmón teñidas con el anticuerpo 26B3.

5 En la Figura 9 se ilustran las puntuaciones M para la distribución del FR α en adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón de células escamosas. Las puntuaciones M medias fueron 19,84 (\pm 18,64) y 1,39 (\pm 5,54), respectivamente ($p < 0,0001$).

10 La Figura 10 muestra la expresión del FR α en tres muestras de aspirados con aguja fina (FNA) de adenocarcinoma de pulmón, muestras (A), (B), y (C). La tinción con el anticuerpo 26B3 del material de bloques celulares procedente de FNA de ganglios linfáticos demostró que la tinción del FR α se produjo con éxito, y la expresión de este se limita a las células epiteliales con una distribución apical.

15 En la Figura 11 se ilustran las funciones de supervivencia (muerte o censura) para sujetos con adenocarcinoma de pulmón que se consideraron que presentaban positividad para el FR α y para los que la detección del FR α con el anticuerpo 26B3 mediante análisis inmunohistoquímico de muestras de tejidos fue negativa.

En la Figura 12 se muestra una micromatriz de tejidos (TMA) representativa teñida con el anticuerpo 26B3 a un aumento de 20x o 40x para (A) carcinoma canalicular localizado, (B)-(D) carcinoma canalicular infiltrante.

20 En la Figura 13 se aporta una representación gráfica de la distribución de las puntuaciones M, determinadas mediante tinción con 26B3, correspondientes al subtipo molecular (her-2 (+) y her-2 (-)) de la muestra de cáncer de mama.

25 En la Figura 14 (A-D) se pueden observar muestras histológicas representativas de cánceres de mama her2 negativo en estadio IV teñidas con el anticuerpo 26B3 a un aumento de 20x o 40x.

En la Figura 15 se muestran imágenes representativas de muestras de cáncer de mama metastásico obtenidas mediante aspirado con aguja fina y teñidas con el anticuerpo 26B3.

30 En la Figura 16 se muestra la expresión del FR α en el carcinoma seroso de ovario. A) A un aumento de 10x, se puede apreciar una tinción de membrana intensa (3+) en la región derecha, y moderada (2+) en la región izquierda superior. B) Muestra la misma área de A) a un aumento de 20x, lo que confirma una tinción periférica, gruesa e intensa (3+) de la membrana (región derecha). La tinción moderada (2+) de la membrana (región izquierda superior) es más débil y fina que la tinción con una puntuación de 3+, y es periférica o está localizada en los bordes luminales. C) Muestra que la tinción débil (1+) de la membrana se limita a los bordes luminales y requiere un aumento de 40x para poder ser visualizada. D) Las células epiteliales de ovario y las células estromales corticales subyacentes son completamente negativas (aumento de 20x).

40 En la Figura 17 se muestra que la expresión del FR α se limita a los bordes luminales en el endometrio normal, con una intensidad débil (1+) y moderada (2+) a un aumento de 40x (A). Se puede observar una tinción intensa (+3) de la membrana en los bordes luminales en la hiperplasia atípica compleja a un aumento de 20x (B).

45 En la Figura 18 se observa una tinción intensa (+3) del FR α en la membrana en los bordes luminales para el adenocarcinoma de endometrio de grado 1 (A). Además, muchas células tumorales presentan una tinción citoplasmática con una intensidad de 2+ o 3+ (aumento de 20x). Se aprecia una tinción de intensidad 2+ y 3+ del FR α en la membrana en los bordes luminales para el adenocarcinoma de endometrio de grado 2; la tinción citoplasmática es débil (aumento de 20x, B). Aproximadamente el 50 % de las células tumorales de adenocarcinoma de endometrio de grado 3 presentan una tinción intensa (3+) periférica de la membrana con una tinción citoplasmática débil a un aumento de 40x (C).

50 En la Figura 19 se muestra un adenocarcinoma con metaplasia escamosa en el que aproximadamente un 80 % de las células escamosas metaplásicas, a un aumento de 20x, presentan una tinción del FR α en la membrana con una intensidad de 2+ y 3+, y una tinción del FR α en el citoplasma con una intensidad de 1+ y 2+ (A). Las células tumorales de carcinoma de endometrio de células claras presentan un núcleo irregular, nucléolos prominentes y un citoplasma claro y abundante. La mayoría de estas células tumorales presentan una tinción del FR α en la membrana con una intensidad de 2+ o 3+ a un aumento de 40x (B).

60 En la Figura 20 se muestra que tanto las células ciliadas como las no ciliadas de trompas de Falopio normales presentan una tinción del FR α en la membrana con una intensidad de 3+ en los bordes luminales y laterales de las células (A). La tinción citoplasmática también es obvia (aumento de 20x). B) Salpingitis crónica con abundantes linfocitos y células plasmáticas en el estroma. Las células de la mucosa retienen una tinción del FR α en los bordes luminales con una intensidad de 3+ (aumento de 20x). C) Células tumorales de adenocarcinoma seroso tubárico de grado 2 que forman proyecciones papilares complejas y que presentan una tinción del FR α en la membrana con una intensidad de 3+ en los bordes luminales y laterales de las células; la tinción citoplasmática también es obvia (aumento de 20x).

En la Figura 21 se representan quistes serosos/tubáricos corticales de ovario. Las células de revestimiento presentan una tinción intensa (3+) de la membrana y el citoplasma (aumento de 20x).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES A MODO DE ILUSTRACIÓN

5 En la siguiente descripción se caracterizan anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno del mismo, que se unen específicamente al FR α . También se describen polinucleótidos relacionados que pueden codificar estos anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno, células que expresan los anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno, así como vectores y marcajes detectables de anticuerpos relacionados. Además, se describen métodos para utilizar los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno. Por ejemplo, los anticuerpos dados a conocer y fragmentos de unión al antígeno se pueden utilizar para diagnosticar cáncer de ovario, de mama, de tiroides, colorrectal, endometrial, de las trompas de Falopio o de pulmón; para comprobar si el cáncer de ovario, de mama, de tiroides, colorrectal, endometrial, de las trompas de Falopio o de pulmón evoluciona, remite o se mantiene estable; para determinar si un paciente debe recibir tratamiento contra el cáncer o no, o para determinar si un sujeto padece o no cáncer con expresión del FR α y por lo tanto, si es susceptible de tratamiento con un agente terapéutico anticancerígeno específico para el FR α .

Definiciones

20 A lo largo de la memoria descriptiva y reivindicaciones se utilizan diversos términos relacionados con aspectos de la descripción. A tales términos se les da su significado habitual en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos de manera específica se han de interpretar de una manera coherente con las definiciones aportadas en la presente memoria.

25 Como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones anexas, las formas en singular «un», «una», «el» y «la» incluyen las formas en plural, a menos que el contenido claramente indique lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a «una célula» incluye una combinación de dos o más células y similares.

30 Con el término «aproximadamente», tal y como se utiliza en el presente al hacer referencia a un valor mensurable como una cantidad, una duración de tiempo, y similares, se pretende abarcar variaciones de hasta $\pm 10\%$ con respecto al valor especificado, ya que dichas variaciones son adecuadas para llevar a cabo los métodos dados a conocer. A menos que se indique lo contrario, se debe entender que, en todos los casos, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades como el peso molecular, condiciones de reacción, etc., en la memoria descriptiva y reivindicaciones están modificados por el término «aproximadamente». Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones anexas constituyen aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se quieran obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y sin la intención de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debería interpretar al menos teniendo en cuenta el número de cifras significativas aportadas y aplicando técnicas de redondeo convencionales.

40 A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el alcance amplio de la invención constituyen aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se facilitan de la manera lo más precisa posible. Sin embargo, todo valor numérico de manera inherente contiene un cierto error que inevitablemente resulta de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de ensayo.

45 «Aislado» significa que un componente biológico (como un ácido nucleico, péptido o proteína) ha sido sustancialmente separado, producido aparte, o purificado a partir de otros componentes biológicos del organismo en los que el componente se encuentra de manera natural, es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas. Por lo tanto, los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas que se han «aislado» comprenden ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación convencionales. Los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas «aislados» que pueden ser parte de una composición y también pueden ser aislados si dicha composición no forma parte del entorno natural del ácido nucleico, péptido o proteína. El término también abarca a ácidos nucleicos, péptidos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos sintetizados mediante procedimientos químicos.

50 «Polinucleótido», que de manera sinónima también se denomina «molécula de ácido nucleico» o «ácidos nucleicos», hace referencia a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar, así como ARN o ADN modificado. Los «polinucleótidos» incluyen, entre otros, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más comúnmente, bicatenario o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, «polinucleótido» hace referencia a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN, o tanto ARN como ADN. El término «polinucleótido» también incluye a ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas, así como ADN o ARN con cadenas principales modificadas por razones de estabilidad u otras razones. Las bases «modificadas» comprenden, por ejemplo, bases tritiladas y bases atípicas como inosina. Al ADN y ARN

se le pueden realizar varias modificaciones. Por lo tanto, «polinucleótido» abarca formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente, como las comúnmente encontradas en la naturaleza, así como formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. «Polinucleótido» también abarca cadenas de ácido nucleico relativamente cortas, a menudo denominadas oligonucleótidos.

5 El significado de «sustancialmente el mismo» puede diferir dependiendo del contexto en el que el término se utilice. Debido a la variación natural en la secuencia que probablemente existe entre las cadenas pesadas y ligeras y los genes que las codifican, cabe esperar cierto grado de variación en las secuencias aminoacídicas o en los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente, con un efecto mínimo o nulo en sus particulares propiedades de unión (p. ej., especificidad y afinidad). Tal expectativa se debe en parte a la redundancia del código genético, así como al éxito evolutivo de las variaciones conservativas en la secuencia aminoacídica, que no alteran de manera apreciable la naturaleza de la proteína codificada. Por lo tanto, en el contexto de secuencias de ácido nucleico, «sustancialmente el mismo» significa una identidad de al menos el 65 % entre dos o más secuencias. Preferiblemente, el término hace referencia a una identidad de al menos un 70 % entre dos o más secuencias, más preferiblemente una identidad de al menos un 75 %, más preferiblemente una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente una identidad de al menos un 85%, más preferiblemente una identidad de al menos un 90%, más preferiblemente una identidad de al menos un 91%, más preferiblemente una identidad de al menos un 92 %, más preferiblemente una identidad de al menos un 93%, más preferiblemente una identidad de al menos un 94%, más preferiblemente una identidad de al menos un 95%, más preferiblemente una identidad de al menos un 96%, más preferiblemente una identidad de al menos un 97%, más preferiblemente una identidad de al menos un 98%, y más preferiblemente una identidad de al menos un 99% o superior. Tal identidad se puede determinar mediante el algoritmo nBLAST (Altschul *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7).

25 El grado de variación que puede haber en la secuencia aminoacídica de una proteína sin que ello tenga un efecto considerable en la función de la proteína es mucho menor que el que puede haber en la secuencia de ácido nucleico, ya que los principios de redundancia que se aplican a las secuencias aminoacídicas son otros. Por lo tanto, en el contexto de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, «sustancialmente el mismo» significa anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tienen una identidad de un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 30 98 %, o 99 % con los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Otras realizaciones incluyen anticuerpos específicos frente al FR α , o fragmentos de unión al antígeno, que poseen regiones de entramado, de armazón o de otro tipo que no se unen al receptor ni comparten una identidad considerable con los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente, pero que incorporan una o más CDR u otras secuencias necesarias para que se produzca la unión, y que son idénticas en un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 35 %, 98 % o 99 % a dichas secuencias descritas en el presente.

Un «vector» es un replicón, como un plásmido, fago, cósmido o virus en el que se puede insertar operativamente otro segmento de ácido nucleico para que se produzca la replicación o expresión del segmento.

40 Una célula se ha «transformado» cuando ácidos nucleicos exógenos o heterólogos como ADN se han introducido en el interior de la célula. El ADN transformante puede estar integrado (unido covalentemente) o no en el genoma de la célula. En las células procariotas, de levadura y de mamíferos, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener en un elemento episomal, como un plásmido. En relación con las células eucarióticas, una célula transformada de manera estable, o «célula estable», se demuestra mediante la capacidad de la célula eucariótica de establecer estirpes celulares o clones que comprenden una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un «clon» es una población de células derivadas de una única célula o ancestro común mediante mitosis. Una «estirpe celular» es un clon de una célula primaria que puede crecer *in vitro* de manera estable durante muchas generaciones. En algunos ejemplos aportados en el presente, las células se transforman mediante su transfección con ADN.

50 Los términos «expresar» y «producir» se utilizan en el presente como si fueran sinónimos, y hacen referencia a la biosíntesis de un producto génico. Estos términos abarcan la transcripción de un gen a ARN. Estos términos también abarcan la traducción de ARN a uno o más polipéptidos, y también abarcan todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales que ocurren de manera natural. La expresión o producción de un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede tener lugar dentro del citoplasma celular, o en el medio extracelular, como el medio de crecimiento de un cultivo celular.

60 Los términos «tratar» o «tratamiento» hacen referencia a todo éxito o indicios de éxito en la mitigación o mejora de una lesión, patología o trastorno, incluido todo parámetro objetivo o subjetivo, como la reducción, remisión o disminución de los síntomas, o el hecho de que el trastorno se haga más tolerable para el paciente, el deterioro o declive tengan lugar más lentamente, el punto final del deterioro sea menos debilitante, el bienestar físico o mental del sujeto mejoren, o el tiempo de supervivencia se prolongue. El tratamiento se puede evaluar mediante parámetros objetivos o subjetivos, incluidos los resultados de una exploración física, un examen neurológico o evaluaciones psiquiátricas.

65

«Anticuerpo» hace referencia, a menos que se indique lo contrario, a todos los isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD e IgY), incluidas diversas formas monoméricas y poliméricas de cada isotipo.

5 Los fragmentos de unión al antígeno son toda estructura proteínica que pueda mostrar afinidad de unión a un antígeno determinado. Algunos fragmentos de unión al antígeno están formados por partes de anticuerpos intactos que conservan la especificidad de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo original. Por ejemplo, los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender al menos una región variable (una región variable de cadena ligera o de cadena pesada) o una o más CDR de un anticuerpo del cual se sabe que se une a un antígeno determinado. Entre los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno adecuados se incluyen, entre otros, 10 dianticuerpos y moléculas monocatenarias, así como moléculas de Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc y Fv, anticuerpos monocatenarios, cadenas ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos o CDR y otras proteínas, armazones proteicos, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera, y similares. Todos los isotipos de anticuerpos se pueden utilizar para producir fragmentos de unión al antígeno. Además, los fragmentos de unión al antígeno pueden incluir entramados proteínicos que no son anticuerpos y que pueden incorporar eficazmente segmentos polipeptídicos en una orientación que confiera afinidad a un determinado antígeno de interés, como armazones proteicos. Los fragmentos de unión al antígeno se pueden producir recombinantemente o mediante ruptura química o enzimática de anticuerpos intactos. La frase «un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo» se puede utilizar para indicar que un determinado 20 fragmento de unión al antígeno incorpora uno o más segmentos de aminoácidos del anticuerpo al que se hace referencia en la frase.

«Unión específica», cuando se utiliza en el contexto de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, representa la unión mediante dominios codificados por genes de inmunoglobulinas o fragmentos de genes de inmunoglobulinas a uno o 25 más epítomos de una proteína de interés, pero que ni reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas antigénicas. Normalmente, un anticuerpo se une a un antígeno análogo con una K_d inferior a, aproximadamente, 1x10⁻⁸ M, determinada mediante resonancia de plasmones superficiales o un ensayo de unión celular.

30 El término «sujeto» hace referencia a animales humanos y no humanos, incluidos todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, como primates no humanos, ratones, conejos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, gallinas, anfibios y reptiles. En muchas realizaciones de los métodos descritos, el sujeto es un humano.

Como se utiliza en el presente, el término «receptor α del folato» (también denominado FR_α, FR-alfa, FOLR-1 o FOLR1) hace referencia a la isoforma α del receptor del folato de alta afinidad. El FR_α unido a la membrana está fijado en la superficie celular por medio de anclajes a glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las formas solubles del FR_α se pueden derivar de la acción de proteasas o fosfolipasas en los receptores del folato anclados en la membrana. La secuencia aminoacídica para el FR_α humano se establece en el presente como la SEC. N.º ID: 1. Variantes, por ejemplo, variantes alélicas que se encuentran en la naturaleza o secuencias que contienen al menos una sustitución 40 de un aminoácido, se abarcan mediante los términos como se utilizan en el presente. Como apreciarán los expertos en la materia, las formas del FR_α humano asociadas a células y no asociadas a células pueden abarcar formas variantes de la SEC. N.º ID: 1.

45 El término «muestra» como se utiliza en el presente hace referencia a un grupo de fluidos, células o tejidos similares (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, incluido el aspirado con aguja fina) aislados a partir de un sujeto, así como a partir de fluidos, células o tejidos presentes en un sujeto. En algunas realizaciones, la muestra es un fluido biológico. Los fluidos biológicos son normalmente líquidos a temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos naturales que se encuentran en, aspiran de, expresan en o extraen de un sujeto o fuente biológica. Ciertos fluidos biológicos se derivan de determinados tejidos, órganos o regiones localizadas, y ciertos otros fluidos biológicos pueden estar situados de manera más global o sistémica en un sujeto o fuente biológica. Ejemplos de fluidos biológicos incluyen la sangre, el suero y líquidos serosos, el plasma, la linfa, la orina, la saliva, el líquido 50 quístico, las lágrimas, las heces, los esputos, las secreciones mucosas de los tejidos y órganos secretores, las secreciones vaginales, los líquidos ascíticos como los asociados a tumores no sólidos, los líquidos pleurales, pericardiales, peritoneales, abdominales y de otras cavidades corporales, los líquidos obtenidos mediante lavado bronquial y similares.

Los fluidos biológicos también pueden incluir soluciones líquidas puestas en contacto con un sujeto o fuente biológica, por ejemplo, medio de cultivo de células y órganos, incluido medio acondicionado de células u órganos, líquidos de lavado y similares. El término «muestra», tal y como se utiliza en el presente, abarca materiales extraídos a partir de un sujeto o materiales presentes en un sujeto. 60

El término «evolución», como se utiliza en el contexto de un cáncer con expresión del FR_α que evoluciona, incluye el cambio en un cáncer de un estado menos grave a un estado más grave. Ello podría incluir un aumento en el número de tumores o la gravedad de estos, el grado de metástasis, la velocidad con la que el cáncer avanza o se propaga, y similares. Por ejemplo, «la evolución del cáncer de ovario» incluye la evolución de tal cáncer de un estado menos 65

grave a un estado más grave, tal como la evolución de un estadio I a un estadio II, de un estadio II a un estadio III, etc.

El término «regresión», como se utiliza en el contexto de un cáncer con expresión del FR α que remite o experimenta una regresión, incluye el cambio en un cáncer de un estado más grave a un estado menos grave. Ello podría incluir una disminución en el número de tumores o la gravedad de estos, el grado de metástasis, la velocidad con la que el cáncer avanza o se propaga, y similares. Por ejemplo, «la regresión del cáncer de ovario» incluye la regresión de tal cáncer de un estado más grave a un estado menos grave, tal como la evolución de un estadio III a un estadio II, de un estadio II a un estadio I, etc.

Con el término «estable», como se utiliza en el contexto un cáncer con expresión del FR α que se mantiene estable, se pretende describir una alteración de la enfermedad que no está cambiando, o no ha cambiado, de manera lo suficientemente significativa a lo largo de un periodo de tiempo pertinente desde un punto de vista clínico como para que se pueda considerar que el cáncer está evolucionando o experimentando una regresión.

Las realizaciones descritas en el presente no se limitan a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos determinados, los cuales pueden, por supuesto, variar.

Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos frente al FR α

En el presente se describen anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno aislados que se unen al FR α de manera específica. La estructura general de una molécula de anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno, el cual incluye cadenas ligeras y pesadas, y el dominio Fc, que tiene varias funciones, como la fijación del complemento y la unión a receptores de anticuerpos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos incluyen todos los isotipos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, así como multímeros sintéticos de la estructura de inmunoglobulina con cuatro cadenas.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos también incluyen el isotipo IgY, por lo general encontrado en el suero de gallina o pavo, así como en la yema de huevo de gallina o pavo.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el apartado de ejemplos se han obtenido a partir de ratones. Anticuerpos similares se pueden obtener a partir de cualquier especie por medios recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser quiméricos de rata, cabra, caballo, cerdo, bovino, pollo, conejo, camélido, burro, humano y similares. Para su uso en administración a humanos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno no obtenidos a partir de humanos pueden ser alterados genética o estructuralmente para que sean menos antigénicos tras la administración a un paciente humano.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son quiméricos. Como se utiliza en el presente, el término «quimérico» hace referencia a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que al menos alguna parte de al menos un dominio variable procede de la secuencia aminoacídica del anticuerpo de un mamífero no humano, un roedor o un reptil, mientras que las partes restantes del anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se obtienen a partir de un humano. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender un dominio de unión al antígeno de ratón con un Fc de humano u otros dominios estructurales de este tipo.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados pueden ser inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen al antígeno) que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan con residuos de una CDR (anticuerpo donador) de una especie no humana, como el ratón, la rata o el conejo, que posee la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y comúnmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las zonas de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de entramado son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos una parte de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, comúnmente la de una inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente pueden existir en varias formas, pero incluirán uno o más de los segmentos del dominio variable del anticuerpo o CDR que se muestran en el Cuadro 1. Los isotipos de los anticuerpos descritos en el Cuadro 1 se muestran entre paréntesis para describir la región constante de cada anticuerpo, de los que se sabe que poseen secuencias conservadas.

Cuadro 1. Segmentos de anticuerpo de los anticuerpos descritos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos («Cl» significa cadena ligera y «Cp» significa cadena pesada).

Segmento de anticuerpo	SEC. N.º ID	Secuencia
Anticuerpo monoclonal 9F3 (región constante de IgG2a murina)		
CDR1 de Cl	2	RASSTVSYSYLH
CDR2 de Cl	3	GTSNLAS
CDR3 de Cl	4	QQYSGYPLT
Segmento de dominio variable de Cl	5	PAIMSASPGEKVTMTCRASSTVSYSYLHWYQQ KSGASPLWYIGTSNLASGVPARFSGSGSGTSY SLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPLTFGAGTKL ELKRADAAP
CDR1 de Cp	6	SGYYWN
CDR2 de Cp	7	YIKSDGSNNYNPSLKN
CDR3 de Cp	8	EWKAMDY
Segmento de dominio variable de Cp	9	ESGPGLVRPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIR QFPGSRLEWMGYIKSDGSNNYNPSLKNRISITR DTSKNQFFKLSVTTEDTATYFCTREWKAMD YWGGTSTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDT
Anticuerpo monoclonal 19D4 (región constante de IgG2a murina)		
CDR1 de Cl	10	RASESVDTYGNNFIH
CDR2 de Cl	11	LASNLES
CDR3 de Cl	12	QQNNGDPWT
Segmento de dominio variable de Cl	13	PASLAVSLGQRATISCRASESVDTYGNNFIHWY QQKPGQPPKLLIYASNLESVGPARGSGSRTD FTLTIDPVEADDAATYYCQQNNGDPWTFGGGT KLEIKRADAAP
CDR1 de Cp	14	HPYMH
CDR2 de Cp	15	RIDPANGNTKYDPKFQG
CDR3 de Cp	16	EEVADYTMDY
Segmento de dominio variable de Cp	17	GAELVKPGASVKLSCTASGFNIKHPYMHVVKQ RPDQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGGKATITA DTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCGREEVADYT MDYWGGTSTVSSAKTTAPSVYPLAPV
Anticuerpo monoclonal 24F12 (región constante de IgG1 murina)		
CDR1 de Cl	18	SASQGINNFLN
CDR2 de Cl	19	YTSSLHS
CDR3 de Cl	20	QHFSKLPWT
Dominio variable de Cl	21	TSSLSASLGDRVTISCSASQGINNFLNHYQQKP DGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT ISNLEPEDIAIYYCQHFSKLPWTFGGGKLEIKR ADAAP
CDR1 de Cp	22	SYAMS
CDR2 de Cp	23	EIGSGGSYTYYPDVTG
CDR3 de Cp	24	ETTAGYFDY
Dominio variable de Cp	25	SGGGLVRPGLSLKLSAASGFTFSSYAMSWVR QSPEKRELVVAEIGSGGSYTYYPDVTGRTISR DNAKSTLYEMSSLRSEDTAIYYCARETTAGYF DYWGQGTTLTVSS
Anticuerpo monoclonal 26B3 (región constante de IgG1 murina)		
CDR1 de Cl	26	RTSENFSYLA
CDR2 de Cl	27	NAKTLAE
CDR3 de Cl	28	QHHYAFPWT
Segmento de dominio variable de Cl	29	PASLSASVGETVTITCRTSENFSYLAWYQQKQ GISPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLK INSLQPEDFGSYCQHHYAFPWTFGGGSKLEIK RADAAP
CDR1 de Cp	30	GYFMN
CDR2 de Cp	31	RIFPYNGDTFYNQKFKG
CDR3 de Cp	32	GTHYFDY
Segmento de dominio variable de Cp	33	GPELVKPGASVKISCKASDYSFTGYFMNWVMQ SHGKSLEWIGRIFPYNGDTFYNQKFKGRATLTV DKSSSTAHMELRSLASEDSAVYFCARGTHYFD YWGGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQT
Anticuerpo monoclonal 9F3 (región constante de IgG2a murina)		
CDR1 de Cl	34	AGGGCCAGCTCAACTGTAAGTTACAGTTACTT

ES 2 663 556 T3

		GCAC
CDR2 de Cl	35	GGCACATCCAACCTGGCTTCT
CDR3 de Cl	36	CAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCAG
Segmento de dominio variable de Cl	37	CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAA AGGTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAAC TGTAAGTTACAGTTACTTGCCTGGTACCAGC AGAAGTCAGGTGCCTCCCCCAACTCTGGATT TATGGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCC TGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCT CTTACTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTA CAGTGGTTACCCACTCACGTTCCGGTGTGGGA CCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGC ACCAAC
CDR1 de Cp	38	AGTGGTTATTACTGGAAC
CDR2 de Cp	39	TACATAAAGTCCGACGGTAGCAATAATTACA ACCCATCTCTCAAAAAT
CDR3 de Cp	40	GAGTGGAAAGGCTATGGACTAC
Segmento de dominio variable de Cp	41	GAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAGACCTTCTCA GTCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGCT ACTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGAAGTGG ATCCGGCAGTTTCCAGGAAGCAGACTGGAAT GGATGGGCTACATAAAGTCCGACGGTAGCAA TAATTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAATCT CCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTT TTCCTGAAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGA CACAGCTACATATTTCTGTACAAGGGAGTGG AAGGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACC CCCATCAGTCTATCCACTGGCCCCTGGGTGTG GAGATACAAC
Anticuerpo monoclonal 19D4 (región constante de IgG2a murina)		
CDR1 de Cl	42	AGAGCCAGTGAAAGTGTTGATACTTATGGCA ATAATTTTATACAC
CDR2 de Cl	43	CTTGCATCCAACCTAGAATCT
CDR3 de Cl	44	CAGCAAAAATAATGGGGATCCGTGGACG
Segmento de dominio variable de Cl	45	CCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAG GGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTAAAAGT GTTGATACTTATGGCAATAATTTTATACACTG GTACCAGCAGAAAACCAGGACAGCCACCCAAA CTCCTCATTTATCTTGCATCCAACCTAGAATC TGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGG TCTAGGACAGACTTACCCTACCATTGATCC TGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACT GTCAGCAAAAATAATGGGGATCCGTGGACGTT CGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGG GCTGATGCTGCACCAA
CDR1 de Cp	46	CACCCCTATATGCAC
CDR2 de Cp	47	AGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAAT ATGACCCGAAGTTCAGGGC
CDR3 de Cp	48	GAGGAGGTGGCGGACTATACTATGGACTAC
Segmento de dominio variable de Cp	49	GGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCTCAG TCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAAC ATTAACACCCCTATATGCACTGGGTGAAGC AGAGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGATTGG AAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAA TATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTA TAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTA CCTACAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC ACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGAGGAGG TGGCGGACTATACTATGGACTACTGGGGTCA AGGAACCTCAGTACCCTCTCCTCAGCCAAA ACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCC TGTGTG
Anticuerpo monoclonal 24F12 (región constante de IgG1 murina)		

ES 2 663 556 T3

CDR1 de Cl	50	AGTGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTTTTTAAAC
CDR2 de Cl	51	TACACATCAAGTTTACTCA
CDR3 de Cl	52	CAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTGGACG
Segmento de dominio variable de Cl	53	ACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAG AGTCACCATCAGTTGCAGTGCAAGTCAGGGC ATTAACAATTTTTTAACTGGTATCAGCAGAA ACCAGATGGCACTGTAAACTCCTGATCTATT ACACATCAAGTTTACTACTCAGGAGTCCCATCA AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATT ATTCTCTACCATCAGCAACCTGGAACCTGAA GATATTGCCATATACTATTGTCAGCACTTTAG TAAGCTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACC AAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCAC CAAC
CDR1 de Cp	54	AGCTATGCCATGTCT
CDR2 de Cp	55	GAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTA TCCAGACACTGTGACGGGC
CDR3 de Cp	56	GAAACTACGGCGGGCTACTTTGACTAC
Segmento de dominio variable de Cp	57	TCTGGGGGAGGCTTAGTGAGGCCTGGAGGGT CCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT ACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCG CCAGTCTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTC GCAGAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCT ACTATCCAGACACTGTGACGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGACAATGCCAAGAGCACCTG TACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGG ACACGGCCATCTATTACTGTGCAAGGGAAAC TACGGCGGGCTACTTTGACTACTGGGGCCAA GGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA
Anticuerpo monoclonal 26B3 (región constante de IgG1 murina)		
CDR1 de Cl	58	CGAACAAAGTGAGAATATFTTCAGTTATTTAGC A
CDR2 de Cl	59	AATGCAAAAACCTTAGCAGAG
CDR3 de Cl	60	CAACATCATTATGCTTTTCCGTGGACG
Segmento de dominio variable de Cl	61	CCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAAC TGTCACCATCACATGTCGAACAAGTGAGAAT ATTTTCAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAA ACAGGGAATATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATA ATGCAAAAACCTTAGCAGAGGGTGTGCCATC AAGGTICAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAG TTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGA AGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATT ATGCTTTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCTCC AAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCAC CAAC
CDR1 de Cp	62	GGCTACTTTATGAAC
CDR2 de Cp	63	CGTATTTTTCCTTACAATGGTGATACTTTCTAC AACCAGAAGTTCAAGGGC
CDR3 de Cp	64	GGGACTCATTACTTTGACTAC
Segmento de dominio variable de Cp	65	GGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG TGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGATTACTCT TTTACTGGCTACTTTATGAACTGGGTGATGCA GAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGA CGTATTTTTCCTTACAATGGTGATACTTTCTAC AACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACA1TGA CTGTAGACAAATCCTCTAGCACAGCCACAT GGAGCI'CCGGAGCCTGGCATCTGAGGACTCT GCAGTCTATTTTTGTGCAAGAGGGACTCATT CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA CTGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCT GTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCA AACTAA

En el presente se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno aislados que se unen específicamente al FR α . En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG murinas o derivados de estas. Aunque los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser humanos, humanizados o quiméricos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno ilustrados en el presente son murinos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una secuencia aminoacídica de la CDR1 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una secuencia aminoacídica de la CDR2 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una secuencia aminoacídica de la CDR3 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una secuencia aminoacídica de la CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una secuencia aminoacídica de la CDR2 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una secuencia aminoacídica de la CDR3 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 32. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una cadena ligera que tenga una secuencia aminoacídica de la CDR1 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26; una secuencia aminoacídica de la CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27; y una secuencia aminoacídica de la CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una cadena pesada que tenga una secuencia aminoacídica de la CDR1 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30; una secuencia aminoacídica de la CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31; y una secuencia aminoacídica de la CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 32. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir una cadena ligera que tenga una secuencia aminoacídica de la CDR1 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26; una secuencia aminoacídica de la CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27; y una secuencia aminoacídica de la CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28; y también tienen una cadena pesada que tiene una secuencia aminoacídica de la CDR1 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30; una secuencia aminoacídica de la CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31; y una secuencia aminoacídica de la CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 32.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos pueden incluir un dominio variable de cadena ligera que incluya una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 29. En algunas realizaciones, un polinucleótido aislado que incluye una secuencia sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 61 puede codificar esta secuencia aminoacídica del dominio variable de cadena ligera. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos pueden incluir un dominio variable de cadena pesada que incluya una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 33. En algunas realizaciones, un polinucleótido aislado que incluye una secuencia sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 65 puede codificar esta secuencia aminoacídica del dominio variable de cadena pesada. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos pueden incluir dominios variables de cadena ligera y pesada, donde el dominio variable de cadena ligera incluye una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 29, y el dominio variable de cadena pesada incluye una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 33.

En algunas realizaciones, los anticuerpos han sido producidos por células productoras de anticuerpos depositadas en la Colección de Cultivos Americana (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 19 de mayo de 2011 y a las que se les ha asignado el número de acceso PTA-11885. En algunas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, tienen la misma afinidad de unión al FR α que los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, comprenden las CDR de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas.

También se dan a conocer polinucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente al FR α . En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una secuencia de la CDR1 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 58. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR2 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 59. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR3 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 60. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 62. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR2 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 63. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una CDR3 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica,

a la SEC. N.º ID: 32, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 64. Los polinucleótidos pueden codificar un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tenga una cadena ligera con una CDR1 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 58; una CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 59; y una CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 60. Los polinucleótidos pueden codificar un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tenga una CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 62; una CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 63; y una CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 32, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 64. Los polinucleótidos pueden codificar un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tenga una CDR1 de cadena ligera sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 26, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 58; una CDR2 codificada por una secuencia nucleotídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 27, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 59; y una CDR3 codificada por una secuencia nucleotídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 28, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 60; y una CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 30, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 62; una CDR2 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 31, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 63; y una CDR3 sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 32, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 64. Las disposiciones de CDR que se unen al antígeno también pueden construirse mediante técnicas de ingeniería genética utilizando como armazón para ellas proteínas similares a los anticuerpos. Tales proteínas que se unen al antígeno construidas mediante técnicas de ingeniería genética se encuentran dentro del alcance de la divulgación.

Los polinucleótidos descritos en el presente pueden codificar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tengan un segmento del dominio variable de cadena ligera que incluya una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 29, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 61. En algunas realizaciones, los polinucleótidos descritos pueden codificar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tengan un segmento del dominio variable de cadena pesada que incluya una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 33, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 65. En algunas realizaciones, los polinucleótidos descritos pueden codificar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tengan un segmento del dominio variable de cadena ligera que incluya una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 29, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 61; y un segmento del dominio variable de cadena pesada que incluya una secuencia aminoacídica sustancialmente igual, o idéntica, a la SEC. N.º ID: 33, por ejemplo, la SEC. N.º ID: 65. Los polinucleótidos que pueden codificar los segmentos del dominio variable dados a conocer en el presente se pueden incluir en los mismos, o distintos, vectores para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno.

Los polinucleótidos que codifican proteínas que se unen al antígeno construidas mediante técnicas de ingeniería genética también se encuentran dentro del alcance de la divulgación. En algunas realizaciones, los polinucleótidos descritos (y los péptidos que codifican) incluyen una secuencia guía. Se puede utilizar toda secuencia guía conocida en la técnica. La secuencia guía puede incluir, entre otros, un sitio de restricción o un sitio de inicio de la traducción.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente incluyen variantes con sustituciones, deleciones o adiciones de uno o varios aminoácidos que retienen las propiedades biológicas (es decir, afinidad de unión o actividad efectora inmunitaria) de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Los expertos en la técnica pueden producir variantes con sustituciones, deleciones o adiciones de uno o varios aminoácidos. Estas variantes pueden incluir: a) variantes en las que uno o más residuos aminoacídicos están sustituidos con aminoácidos conservados o no conservados; b) variantes en las que uno o más aminoácidos se añaden al polipéptido o se suprimen de este; c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente; y d) variantes en las que el polipéptido está fusionado con otro péptido o polipéptido, tal como un compañero de fusión, una etiqueta proteica u otro resto químico que pueda conferir propiedades útiles al polipéptido, tales como, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, un resto de biotina y similares. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente pueden incluir variantes en las que los residuos aminoacídicos de una especie sustituyen a los residuos correspondientes a otras especies, tanto en las posiciones conservadas como en las no conservadas. En otras realizaciones, los residuos aminoacídicos en las posiciones no conservadas están sustituidos con residuos conservados o no conservados. Los expertos en la técnica conocen las técnicas para obtener estas variantes, incluidas técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente pueden incorporar varios isotipos de anticuerpos, como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. La especificidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo está en gran medida determinada por la secuencia aminoacídica y la disposición de las CDR. Por lo tanto, las CDR de un isotipo se pueden transferir a otro isotipo sin alterar la especificidad frente al antígeno. Por otra parte, se han desarrollado técnicas para hacer que los hibridomas cambien de producir un isotipo de anticuerpo a otro (cambio de isotipo) sin alterar la especificidad frente al antígeno. Por lo tanto, tales isotipos de anticuerpos se encuentran dentro del alcance de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente poseen una afinidad de unión (en M) al FR α que incluye una constante de disociación (Kd) inferior a aproximadamente 1×10^{-9} M. En una realización el anticuerpo 9F3 tiene una afinidad al FR α de $7,15 \times 10^{-10}$ M. En una realización el anticuerpo 19D4 tiene una afinidad

al FR α de $5,67 \times 10^{-10}$ M. En una realización el anticuerpo 24F12 tiene una afinidad al FR α de $1,02 \times 10^{-10}$ M. En una realización el anticuerpo 26B3 tiene una afinidad al FR α de $2,73 \times 10^{-11}$ M. En una realización el anticuerpo 9F3 tiene una afinidad al FR α de aproximadamente $6,5 \times 10^{-10}$ M a aproximadamente 8×10^{-10} M. En una realización el anticuerpo 19D4 tiene una afinidad al FR α de aproximadamente 5×10^{-10} M a aproximadamente $6,5 \times 10^{-10}$ M. En una realización el anticuerpo 24F12 tiene una afinidad al FR α de aproximadamente $0,5 \times 10^{-10}$ M a aproximadamente 2×10^{-10} M. En una realización el anticuerpo 26B3 tiene una afinidad al FR α de aproximadamente 1×10^{-11} M a aproximadamente $3,5 \times 10^{-11}$ M.

También se dan a conocer vectores que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente.

Los vectores pueden ser vectores de expresión. Por lo tanto, los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés se contemplan como si estuvieran dentro del alcance de esta divulgación. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, entre otras, secuencias reguladoras (p. ej., promotor, potenciador), un marcador de selección y una señal de poliadenilación. Los vectores para transformar una amplia variedad de células hospedadoras son bien conocidos e incluyen, entre otros, plásmidos, fagómidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), así como otros vectores bacterianos, víricos y de levadura.

Los vectores de expresión recombinantes dentro del alcance de la descripción incluyen fragmentos de ácidos nucleicos sintéticos, genómicos o procedentes de ADNc que codifican al menos una proteína recombinante que puede estar operativamente enlazada a elementos reguladores adecuados. Tales elementos reguladores pueden incluir un promotor de la transcripción, secuencias que codifican sitios adecuados de unión del ribosoma en el ARNm y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión, especialmente los vectores de expresión para mamíferos, también pueden incluir uno o más elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuados enlazados al gen a expresar, otras secuencias no transcritas flanqueantes en 5' o 3', secuencias no traducidas en 5' o 3' (tales como sitios necesarios de unión del ribosoma), un sitio de poliadenilación, sitios aceptor y donador de ajuste, o secuencias de terminación de la transcripción. También se puede incorporar un origen de replicación que confiera a un hospedador la capacidad de replicarse.

Las secuencias de control transcripcional y traduccional en los vectores de expresión a utilizar cuando se transforman células de vertebrados pueden ser de origen vírico. Se pueden construir vectores modelo como describen Okayama y Berg en *3 Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, está colocada bajo el control de un promotor constitutivo muy fuerte, tales como los promotores de los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, β -actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y otros. Además, muchos promotores víricos funcionan constitutivamente en células eucarióticas y son adecuados para su uso con las realizaciones descritas. Tales promotores víricos incluyen, entre otros, el promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV), los promotores tempranos y tardíos del SV40, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de Epstein Barr (EBV), el virus del sarcoma de Rous (RSV) y otros retrovirus, así como el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple. En una realización, la secuencia que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo está colocada bajo el control de un promotor inducible, tal como el promotor de la metalotioneína, el promotor inducido por la tetraciclina, el promotor inducido por la doxiciclina, promotores que contienen uno o más elementos de respuesta estimulados por interferones (ISRE), tales como la proteína cinasa R, las 2',5'-oligoadenilato sintetasas, los genes Mx, ADAR1 y similares.

Los vectores descritos en el presente pueden contener uno o más sitios internos de entrada del ribosoma (IRES). La inclusión de una secuencia IRES en vectores de fusión puede resultar beneficioso para aumentar la expresión de algunas proteínas. En algunas realizaciones, el sistema de vector incluirá uno o más sitios de poliadenilación (p. ej., SV40), que pueden estar situados, o bien secuencia arriba, o bien secuencia abajo, de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mencionadas más arriba. Los componentes del vector pueden estar enlazados en contigüidad, o dispuestos de manera que se logre un espaciado óptimo para que se expresen los productos génicos (es decir, mediante la introducción de nucleótidos «espaciadores» entre los ORF), o posicionados de cualquier otra manera. Los elementos reguladores, tales como el motivo IRES, también pueden estar dispuestos de manera que se logre un espaciado óptimo para la expresión.

Los vectores pueden comprender marcadores de selección, los cuales son bien conocidos en la técnica. Los marcadores de selección incluyen marcadores de selección positivos y negativos, por ejemplo, genes de resistencia a los antibióticos (p. ej., gen de resistencia a la neomicina, gen de resistencia a la higromicina, gen de resistencia a la kanamicina, gen de resistencia a la tetraciclina, gen de resistencia a la penicilina), genes de la glutamato sintasa, HSV-TK, derivados de la HSV-TK para la selección con ganciclovir, o gen bacteriano de la fosforilasa de nucleósidos de purina para la selección con 6-metilpurina (Gadi et al., *7 Gene Ther.* 1738-1743 (2000)). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección o el sitio de clonación puede estar, o bien secuencia arriba, o bien secuencia abajo, de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés o sitio de clonación.

Los vectores descritos en el presente se pueden utilizar para transformar varias células con los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Por ejemplo, los vectores se pueden utilizar para generar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que produzca células. Por lo tanto, otro aspecto hace referencia a células hospedadoras transformadas con vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente al FR α , tales como los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente y ejemplificados.

En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en células, y se pueden utilizar para construir las células recombinantes con el objetivo de llevar a cabo los métodos descritos, de acuerdo con las diversas realizaciones descritas en el presente y ejemplificadas. La técnica utilizada debe facilitar la transferencia estable de la secuencia del gen heterólogo a la célula hospedadora, de manera que la secuencia del gen heterólogo se pueda heredar y se pueda expresar en la progenie de la célula, y para que ni el desarrollo necesario ni las funciones fisiológicas de las células receptoras se vean afectados. Entre las técnicas que se pueden utilizar se incluyen, entre otras, la transferencia de cromosomas (p. ej., la fusión celular, la transferencia de genes mediada por cromosomas, la transferencia de genes mediada por microcélulas), los métodos físicos (p. ej., transfección, fusión de esferoplastos, microinyección, electroporación, transporte en liposomas), la transferencia de vectores víricos (p. ej., virus con ADN recombinante, virus con ARN recombinante) y similares (descritos en *Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)*). La precipitación de fosfato de calcio y la fusión inducida por polietilenglicol (PEG) de protoplastos bacterianos con células de mamífero también se pueden utilizar para transformar células.

Las células adecuadas para su uso en la expresión de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente son preferentemente células eucarióticas, más preferentemente células vegetales, de roedores o de humanos, como por ejemplo, entre otras, células NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-tsl3, BHK, HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L, C127, 3T3, HeLa, NS1, Sp2/0 de mieloma y estirpes celulares BHK, entre otras. Además, la expresión de los anticuerpos se puede lograr con células de hibridoma. Los métodos para producir hibridomas están bien desarrollados en la técnica.

Las células transformadas con los vectores de expresión descritos en el presente se pueden seleccionar o cribar según la expresión recombinante de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente. Las células en las que se produjo la recombinación se expanden y se criban para seleccionar los subclones que muestran el fenotipo deseado, como un elevado nivel de expresión, propiedades de crecimiento potenciado, o la capacidad de producir proteínas con las características bioquímicas deseadas, por ejemplo, debido a modificaciones de la proteína o a la alteración de las modificaciones postraduccionales. Estos fenotipos podrían ser debidos a propiedades inherentes de un determinado subclon o a una mutación. Las mutaciones se pueden efectuar mediante el uso de compuestos químicos, luz ultravioleta, radiación, virus, mutágenos por inserción, inhibición de la reparación de discordancias en el ADN o una combinación de tales métodos.

En el presente se dan a conocer métodos para detectar el FR α en una muestra mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo aquí descrito, o fragmento de unión al antígeno del mismo. Como se describe en el presente, la muestra podría proceder de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares. En algunas realizaciones, los métodos descritos incluyen la detección del FR α mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato, como se define en las reivindicaciones. En realizaciones en las que se utilizan dos anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, uno de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno del mismo, son como se definen en las reivindicaciones y el segundo anticuerpo se selecciona de entre:

- a. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3;
- b. el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, o un fragmento de unión al antígeno de los mismos
- c. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende las secuencias aminoácidas de la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoácidas de la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, como se describe en el Cuadro 1;
- d. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende el segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, como se describe en el Cuadro 1; o
- e. un anticuerpo que tiene la secuencia aminoácida del anticuerpo producido por cualquiera de las estirpes celulares depositadas en la ATCC con número de acceso PTA-11887, PTA-11884, PTA-11886 o PTA-11885, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con más de uno de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, descritos en el presente.

Por ejemplo, una muestra se puede poner en contacto con un primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, y a continuación, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, donde el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno no son el mismo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede estar fijado a una superficie, como una placa multipocillo, un chip o sustratos similares, antes de ponerlo en contacto con la muestra. En otras realizaciones, el primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede no estar fijado, o anclado, a nada en absoluto antes de ponerlo en contacto con la muestra.

5 Se pueden utilizar diversas combinaciones de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, para detectar el FR α en una muestra.

En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 26B3 (como se muestra en el Cuadro 1) y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 9F3 (como se muestra en el Cuadro 1). En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 26B3 (como se muestra en el Cuadro 1) y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 24F12 (como se muestra en el Cuadro 1). En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 26B3 (como se muestra en el Cuadro 1) y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 19D4 (como se muestra en el Cuadro 1).

En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas del segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 26B3 (como se muestra en el Cuadro 1) y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas del segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9F3 (como se muestra en el Cuadro 1). En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas del segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 26B3 (como se muestra en el Cuadro 1) y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas del segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 24F12 (como se muestra en el Cuadro 1). En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas del segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 26B3 (como se muestra en el Cuadro 1) y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprenda las secuencias aminoacídicas del segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 19D4 (como se muestra en el Cuadro 1).

En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con el anticuerpo producido por la estirpe celular con número de acceso PTA-11885 en la ATCC, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo producido por la estirpe celular con número de acceso PTA-11884 en la ATCC, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con el anticuerpo producido por la estirpe celular con número de acceso PTA-11885 en la ATCC, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo producido por la estirpe celular con número de acceso PTA-11887 en la ATCC, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En una realización, la muestra se puede primeramente poner en contacto con el anticuerpo producido por la estirpe celular con número de acceso PTA-11885 en la ATCC, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y a continuación, por separado, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo producido por la estirpe celular con número de acceso PTA-11886 en la ATCC, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos pueden estar marcados de manera que se pueden detectar. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno marcados pueden facilitar la detección del FR α mediante los métodos descritos en el presente. Muchos marcajes como estos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, entre los marcajes adecuados se incluyen, entre otros, marcajes radiactivos, marcajes fluorescentes (como DyLight® 649), etiquetas epitópicas, biotina, marcajes cromóforos, marcajes electroquimioluminiscente o enzimas. Más específicamente, los marcajes descritos incluyen rutenio, ¹¹¹In-DOTA, ácido ¹¹¹In-dietilentriamino-pentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y β -galactosidasa, polihistidina (cola de His), colorantes de acridina, colorantes de cianuro, colorantes de fluorona, colorantes de oxazina, colorantes de fenantridina, colorantes de rodamina, colorantes Alexafluor® y similares.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos se pueden utilizar en varios ensayos para detectar el FR α en una muestra. Algunos ensayos adecuados incluyen, entre otros, análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo, inmunofluorometría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (EQL), inmunohistoquímica, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ELISA.

En algunas realizaciones descritas en el presente la detección en un sujeto de células cancerígenas que expresan el FR α se puede utilizar para determinar si el sujeto puede ser tratado con un agente terapéutico específico para el FR α . En algunas realizaciones, el agente terapéutico específico para el FR α puede ser un anticuerpo, como Farletuzumab.

Métodos para diagnosticar el cáncer

En el presente se dan a conocer métodos para diagnosticar en un sujeto cáncer de origen epitelial, ya sea de ovario, de mama, de tiroides, colorrectal, endometrial, de trompas de Falopio o de pulmón. En algunas realizaciones, como se describe más arriba, la detección del FR α en una muestra, como una muestra histológica, una muestra de aspirado con aguja fina, tejido tumoral resecado, células en circulación, células tumorales en circulación y similares, aporta la posibilidad de diagnosticar cáncer en el sujeto del cual se obtuvo la muestra. En algunas realizaciones, se podría ya saber que el sujeto del que se obtuvo la muestra presenta cáncer, pero el tipo de cáncer que padece el sujeto podría no haberse diagnosticado, o un diagnóstico preliminar podría no ser claro, por lo que la detección del FR α es una muestra obtenida a partir del sujeto puede permitir, o aclarar, el diagnóstico del cáncer.

En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si un sujeto padece cáncer con expresión del FR α mediante la determinación de la cantidad de FR α presente en una muestra obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la cantidad de FR α observada con la cantidad de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre la cantidad de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto y la cantidad de FR α en la muestra de control indica que el sujeto padece un cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones, la cantidad de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , como los anticuerpos descritos en el presente. Se pueden utilizar métodos similares para determinar si el sujeto padece un cáncer que no está asociado con una mayor producción de FR α . La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede proceder de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

En algunas realizaciones, el método de diagnóstico de un cáncer con expresión del FR α supone: la puesta en contacto de una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo específico frente al FR α , o fragmento de unión al antígeno del mismo (como los que se pueden derivar de los anticuerpos y fragmentos que figuran en el Cuadro 1), la determinación de la cantidad de FR α presente en la muestra que está unido al anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, la comparación de la cantidad de FR α presente en la muestra con un patrón conocido; y la determinación de si la concentración de FR α del sujeto se encuentran dentro del intervalo de concentraciones de FR α asociadas al cáncer. En otra realización, tras el método de diagnóstico se puede realizar un paso adicional en el que se administra o receta un tratamiento específico contra el cáncer. En algunas realizaciones, el tratamiento específico contra el cáncer puede ser para cánceres con expresión del FR α , como Farletuzumab.

En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si un sujeto padece cáncer con expresión del FR α mediante la determinación de la cantidad de FR α asociado a una célula o tejido que está presente en una muestra obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la cantidad de FR α observada con la cantidad de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre la cantidad de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto y la cantidad de FR α en la muestra de control indica que el sujeto padece un cáncer con expresión del FR α .

En algunas realizaciones, la muestra de control se puede obtener a partir de un sujeto que no padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones, la muestra de control se puede obtener a partir de un sujeto que padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones en las que la muestra de control se obtiene a partir de un sujeto que no padece cáncer con expresión del FR α , un aumento observado en la cantidad de FR α presente en la muestra, con respecto a la observada en la muestra de control, indica que el sujeto evaluado padece cáncer

con expresión del FR α . En algunas realizaciones en las que la muestra de control se obtiene a partir de un sujeto que no padece cáncer con expresión del FR α , una disminución o similitud observada en la cantidad de FR α presente en la muestra problema, con respecto a la observada en la muestra de control, indica que el sujeto evaluado no padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones en las que la muestra de control se obtiene a partir de un sujeto que padece cáncer con expresión del FR α , una similitud observada en la cantidad de FR α presente en la muestra problema, con respecto a la observada en la muestra de control, indica que el sujeto evaluado padece cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones en las que la muestra de control se obtiene a partir de un sujeto que padece cáncer con expresión del FR α , una disminución observada en la cantidad de FR α presente en la muestra problema, con respecto a la observada en la muestra de control, indica que el sujeto evaluado no padece cáncer con expresión del FR α .

En algunas realizaciones, la cantidad de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede ser de células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares.

En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si un sujeto padece cáncer con expresión del FR α mediante la determinación de la cantidad de FR α no asociado a una célula o tejido que está presente en una muestra obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la cantidad de FR α observada con la cantidad de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre la cantidad de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto y la cantidad de FR α en la muestra de control indica que el sujeto padece un cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones, la cantidad de FR α en la muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede ser de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, preparados histológicos y similares.

En varias realizaciones de los métodos descritos, el cáncer puede ser un cáncer con expresión del FR α . En una realización particular, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer endometrial. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de tiroides.

En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de las trompas de Falopio. En otra realización, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de pulmón no microcítico, como un adenocarcinoma. Por otra parte, los métodos descritos se pueden utilizar para diagnosticar un cáncer sin expresión del FR α , como carcinoma de células escamosas.

En diversos aspectos, la cantidad de FR α se determina mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con más de un tipo de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con un primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α , como se define en las reivindicaciones 1 a 3, y a continuación, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . El segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

- a. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3;
- b. el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, o un fragmento de unión al antígeno de los mismos;
- c. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, como se describe en el Cuadro 1; o
- d. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende el segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, como se describe en el Cuadro 1; o
- e. un anticuerpo que tiene la secuencia aminoacídica del anticuerpo producido por cualquiera de las estirpes celulares depositadas en la ATCC con número de acceso PTA-11887, PTA-11884, PTA-11886 o PTA-11885, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Se pueden utilizar diversas combinaciones de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en los apartados (a) a (e), como se especifica más arriba en la sección general donde se describen los métodos de detección, como «primer» y «segundo» anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para llevar a cabo los métodos de diagnóstico descritos.

En determinadas realizaciones, la cantidad de FR α se determina mediante análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo, inmunofluorometría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (EQL), inmunohistoquímica, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ELISA.

5 En diversas realizaciones de los métodos de diagnóstico descritos se utiliza una muestra de control. La muestra de control puede ser un control positivo o negativo para el ensayo que garantiza que el ensayo utilizado funciona correctamente; por ejemplo, un ensayo de control de este tipo se podría utilizar normalmente para ensayos
10 inmunohistoquímicos. Por otra parte, la muestra de control puede ser una cantidad de FR α de referencia estándar en un sujeto sano. En algunas realizaciones, la concentración observada de FR α en el sujeto evaluado se puede comparar con las concentraciones de FR α observadas en muestras de sujetos de control de los que se sabe que
15 presentan cáncer con expresión del FR α . En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α del sujeto de control es cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de las trompas de Falopio o cáncer de pulmón, como adenocarcinoma. En algunas realizaciones, se sabe que el sujeto
20 de control presenta cáncer con expresión del FR α en estadio temprano, como cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de las trompas de Falopio o cáncer de pulmón (p. ej., adenocarcinoma) en estadio I. En algunas realizaciones, se sabe que el sujeto de control presenta cáncer con expresión del FR α en estadio intermedio, como cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer colorrectal, cáncer de
25 mama, cáncer de tiroides, cáncer de las trompas de Falopio o cáncer de pulmón (p. ej., adenocarcinoma) en estadio II. En algunas realizaciones, se sabe que el sujeto de control presenta cáncer con expresión del FR α en estadio terminal, como cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer
30 de las trompas de Falopio o cáncer de pulmón (p. ej., adenocarcinoma) en estadio III.

Los métodos de diagnóstico descritos en el presente también aportan una base sobre la que se podría predecir si un
25 sujeto presenta una probabilidad relativamente más elevada o más baja de sobrevivir cinco años tras el diagnóstico. En algunas realizaciones, el método descrito se puede utilizar para predecir un desenlace clínico favorable para un sujeto con adenocarcinoma, y un desenlace clínico favorable se define como una tasa de supervivencia a los 5 años
30 más elevada. Como los datos aquí aportados indican, los sujetos para los que se ha determinado que presentan adenocarcinoma en estadio I o II sin expresión del FR α tienen una probabilidad 2 veces mayor de fallecer en los 5 años siguientes que los sujetos para los que se ha determinado que presentan adenocarcinoma en estadio I o II con
35 expresión del FR α .

Por lo tanto, los métodos de diagnóstico descritos en el presente se pueden combinar con este conocimiento para
obtener un método que permita predecir la probabilidad de supervivencia a los 5 años de los sujetos para los que se
ha determinado que presentan cáncer. En algunas realizaciones, el método se utiliza para predecir la probabilidad
35 de supervivencia a los 5 años de los sujetos para los que se ha determinado que presentan adenocarcinoma.

En algunas realizaciones, el método de pronóstico descrito supone: la puesta en contacto de una muestra biológica
de un sujeto con un anticuerpo específico frente al FR α , o fragmento de unión al antígeno del mismo (como los que
40 se pueden derivar de los anticuerpos y fragmentos que figuran en el Cuadro 1), la determinación de la cantidad de FR α presente en la muestra unido al anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, la comparación de la cantidad de FR α presente en la muestra con un patrón conocido; y la determinación de si la concentración de FR α
45 en el sujeto indica la presencia de un cáncer con expresión del FR α , de manera que se pueda predecir la probabilidad de que el sujeto sobreviva durante 5 años después de que se la haya diagnosticado cáncer. En algunas realizaciones se sabe que el sujeto presenta o va a presentar adenocarcinoma. En algunas realizaciones, el sujeto
es un humano.

Métodos para vigilar el cáncer

En el presente se dan a conocer métodos para vigilar cáncer de origen epitelial en un sujeto. En algunas
50 realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si el cáncer con expresión del FR α evoluciona, remite o se mantiene estable mediante la determinación de la cantidad de FR α presente en una muestra problema obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la cantidad de FR α observada con la cantidad de FR α en una muestra
55 obtenida a partir del sujeto en el pasado, donde una diferencia entre la cantidad de FR α en la muestra problema y la muestra obtenida en el pasado aporta una indicación de si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable. A este respecto, una muestra problema con una cantidad de FR α más elevada con respecto a la cantidad observada
60 en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la evolución de un cáncer con expresión del FR α . A la inversa, una muestra problema con una cantidad de FR α más baja con respecto a la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la regresión de un cáncer con expresión del FR α . Por lo tanto, una muestra
65 problema con una cantidad de FR α cuya diferencia con la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado sea negligible puede indicar que un cáncer con expresión del FR α se mantiene estable. En algunas realizaciones, la cantidad de FR α en una muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede proceder de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral
70 resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

En algunas realizaciones, el método para vigilar un cáncer con expresión del FR α supone: la puesta en contacto de una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo específico frente al FR α , o fragmento de unión al antígeno del mismo (como los que se pueden derivar de los anticuerpos y fragmentos que figuran en el Cuadro 1), la determinación de la cantidad de FR α presente en la muestra unido al anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, la comparación de la cantidad de FR α presente en la muestra con la cantidad de FR α determinada en una muestra obtenida del mismo sujeto en el pasado, y la determinación de si la concentración de FR α en el sujeto ha cambiado a lo largo del tiempo. Una muestra problema con una cantidad de FR α más elevado con respecto a la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la evolución de un cáncer con expresión del FR α . A la inversa, una muestra problema con una cantidad de FR α más baja con respecto a la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la regresión de un cáncer con expresión del FR α . Por lo tanto, una muestra problema con una cantidad de FR α cuya diferencia con la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado sea negligible puede indicar que un cáncer con expresión del FR α se mantiene estable. En algunas realizaciones, la concentración de FR α en la muestra se puede comparar con un patrón conocido, solamente o además de con la concentración de FR α observada en una muestra evaluada en el pasado. En algunas realizaciones, el patrón conocido puede ser proteína FR α a una concentración conocida (p. ej., una muestra de proteína FR α recombinante o purificada). En otra realización, tras el método de diagnóstico se puede realizar un paso adicional en el que se administra un tratamiento específico contra el cáncer. En algunas realizaciones, el tratamiento específico contra el cáncer puede ser para cánceres con expresión del FR α , como Farletuzumab.

En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si el cáncer con expresión del FR α evoluciona, remite o se mantiene estable mediante la determinación de la cantidad de FR α presente en una muestra problema obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la cantidad de FR α observada con la cantidad de FR α en una muestra obtenida de manera similar a partir del sujeto en el pasado, donde una diferencia entre la cantidad de FR α en la muestra problema y la muestra obtenida en el pasado aporta una indicación de si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable.

A este respecto, una muestra problema con una cantidad de FR α más elevada con respecto a la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la evolución de un cáncer con expresión del FR α . A la inversa, una muestra problema con una cantidad de FR α más baja con respecto a la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la regresión de un cáncer con expresión del FR α . Por lo tanto, una muestra problema con una cantidad de FR α cuya diferencia con la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado sea negligible puede indicar que un cáncer con expresión del FR α se mantiene estable. En algunas realizaciones, la cantidad de FR α en una muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede ser de células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, como aspirado con aguja fina), preparados histológicos y similares.

En algunas realizaciones, los métodos descritos suponen la evaluación de si el cáncer con expresión del FR α evoluciona, remite o se mantiene estable mediante la determinación de la cantidad de FR α presente en una muestra problema obtenida a partir del sujeto; y la comparación de la cantidad de FR α observada con la cantidad de FR α en una muestra obtenida de manera similar a partir del sujeto en el pasado, donde una diferencia entre la cantidad de FR α en la muestra problema y la muestra obtenida en el pasado aporta una indicación de si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable. A este respecto, una muestra problema con una cantidad de FR α más elevada con respecto a la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la evolución de un cáncer con expresión del FR α . A la inversa, una muestra problema con una cantidad de FR α más baja con respecto a la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado puede indicar la regresión de un cáncer con expresión del FR α . Por lo tanto, una muestra problema con una cantidad de FR α cuya diferencia con la cantidad observada en la muestra obtenida en el pasado sea negligible puede indicar que un cáncer con expresión del FR α se mantiene estable. En algunas realizaciones, la cantidad de FR α en una muestra obtenida a partir del sujeto se evalúa mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une al FR α , como los anticuerpos descritos en el presente. La muestra en la que se evalúa la presencia de FR α puede ser de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, preparados histológicos y similares.

En diversas realizaciones de los métodos descritos, el cáncer puede ser cáncer con expresión del FR α . En una realización particular, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer endometrial. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de las trompas de Falopio. En otra realización, el cáncer con expresión del FR α es cáncer de pulmón no microcítico, como un adenocarcinoma.

En diversos aspectos, la cantidad de FR α se determina mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α .

En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con más de un tipo de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . En algunas realizaciones, la muestra se puede poner en contacto con un primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α como se define en las reivindicaciones 1 a 3 y a continuación, se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al FR α . El segundo anticuerpo se puede seleccionar de entre:

- a. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3;
- b. el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, o un fragmento de unión al antígeno de los mismos;
- c. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias aminoacídicas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, como se describe en el Cuadro 1;
- d. un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende el segmento del dominio variable de cadena pesada y el segmento del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3, como se describe en el Cuadro 1; o
- e. un anticuerpo que tiene la secuencia aminoacídica del anticuerpo producido por cualquiera de las estirpes celulares depositadas en la ATCC con número de acceso PTA-11887, PTA-11884, PTA-11886 o PTA-11885, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Se pueden utilizar diversas combinaciones de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en los apartados (a) a (e), como se especifica más arriba en la sección general donde se describen los métodos de detección, como «primer» y «segundo» anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para llevar a cabo los métodos de vigilancia descritos.

En determinadas realizaciones, la cantidad de FR α se determina mediante análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo, inmunofluorometría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (EQL), inmunohistoquímica, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ELISA.

Otros aspectos de la materia expuesta se dan a conocer en mayor detalle en la descripción detallada, los ejemplos aportados y las figuras correspondientes.

Kits para detectar el FR α

En el presente se dan a conocer kits para detectar el FR α en una muestra según se define en la reivindicación 29.

El anticuerpo dado a conocer, o fragmento de unión al antígeno, puede estar en solución, liofilizado, fijado a un sustrato, portador o placa, o conjugado con un marcaje detectable.

Los kits descritos también pueden incluir otros componentes útiles para llevar a cabo los métodos descritos en el presente. A título de ejemplo, los kits pueden comprender medios para obtener una muestra de un sujeto, una muestra de control, como por ejemplo, una muestra procedente de un sujeto que presenta cáncer con evolución lenta y/o un sujeto que no presenta cáncer, uno o más compartimentos para muestras y/o material de instrucciones donde se describe la ejecución de un método de la invención y controles/patronos específicos para un tejido.

Los medios para determinar la concentración de FR α también pueden incluir, por ejemplo, tampones u otros reactivos para uso en un ensayo de determinación de la concentración de FR α . Las instrucciones pueden ser, por ejemplo, instrucciones impresas para realizar el ensayo y/o instrucciones para evaluar el nivel de expresión del FR α .

Los kits descritos también pueden incluir medios para aislar una muestra de un sujeto. Estos medios pueden comprender una o más partes de equipos o reactivos que se pueden utilizar para obtener un fluido o tejido de un sujeto. Los medios para obtener una muestra de un sujeto también pueden comprender medios para aislar componentes sanguíneos, como suero, de una muestra de sangre. Preferentemente, el kit está diseñado para su uso en un sujeto que sea un humano.

Los kits descritos también pueden incluir un reactivo de bloqueo que se puede aplicar a una muestra para disminuir la unión inespecífica de un anticuerpo primario o secundario. Un ejemplo de reactivo de bloqueo es la albúmina sérica bovina (BSA), la cual se puede diluir en un tampón antes de usarla. Otros reactivos de bloqueo disponibles en el mercado, como Block Ace y ELISA Synblock (AbD serotec), Background Punisher (BIOCARE MEDICAL) y StartingBlock (Thermo Fisher Scientific) son conocidos en la técnica. Los kits descritos también pueden incluir como control negativo un anticuerpo primario que no se una al FR α lo suficientemente como para dar un resultado positivo en un ensayo de detección con anticuerpos. Además, los kits descritos pueden incluir un anticuerpo secundario capaz de unirse a un anticuerpo primario del FR α , como el anticuerpo 9F3, el anticuerpo 19D4, el anticuerpo 24F12 o el anticuerpo 26B3. En algunas realizaciones, los anticuerpos secundarios pueden estar conjugados con un

marcaje detectable, como peroxidasa de rábano picante (HRP) o un fluoróforo, para permitir la detección del anticuerpo primario unido a la muestra. Los kits descritos también pueden incluir un sustrato colorimétrico o quimioluminiscente que permita la presencia de un anticuerpo secundario unido a detectar en una muestra. En algunas realizaciones, el sustrato colorimétrico o quimioluminiscente puede ser ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB); 3,3'-diaminobencidina (DAB); SuperSignal (Thermo Fisher Scientific); reactivo para EQL (Thermo Fisher Scientific) u otros reactivos similares conocidos por los expertos en la técnica.

Los siguientes ejemplos se aportan para complementar la divulgación anterior y para proporcionar una mejor comprensión de la materia descrita en el presente. No debe considerarse que estos ejemplos limiten la materia descrita.

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Todos los ejemplos que no estén dentro del alcance de las reivindicaciones se aportan solamente a título de referencia y no forman parte de la invención.

EJEMPLO 1 - Expresión y purificación del FR α humano recombinante

Para llevar a cabo los experimentos asociados a los estudios descritos en el presente se crearon varios sistemas o estirpes celulares que expresaban el receptor α del folato (FR α), a fin de generar sustratos celulares que expresaran el FR α o para generar proteína FR α humana recombinante purificada.

Un sistema de expresión utilizado fue la estirpe celular de insecto Sf9, que expresa el FR α humano recombinante mediante baculovirus. Este sistema se preparó con una secuencia del FR α humano, que contenía una secuencia guía optimizada para la expresión en células de insecto, una etiqueta epitópica de 6 histidinas (6xhis) en el N-terminal, con el sitio nativo de anclaje mediante GPI intacto. A continuación, las células se incubaron en un matraz en agitación de 1 L y los cultivos de células de insecto Sf9 en fase de crecimiento logarítmico se infectaron con el baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) < 1. Las células procedentes de un cultivo de 30 L se recolectaron, se lisaron y se extrajeron 2 veces con una solución salina tamponada con fosfato 1X que contenía 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 10 mM. La concentración de NaCl se ajustó a 300 mM y se filtró a través de una membrana de 0,2 μ m. El sobrenadante clarificado se purificó mediante cromatografía de afinidad, utilizando PBS 1X con NaCl 2 M, CHAPS 1 mM, pH 7,4 como tampón de lavado. A continuación se realizó una elución con ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 10 mM, MgCl₂ 3 M, CHAPS 1 mM, pH 6,8. Las fracciones de pico se dializaron exhaustivamente frente a PBS 1X a pH 7,4, su pureza se determinó mediante SDS-PAGE, se cuantificaron mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA), se alicuotaron y se almacenaron a -80 °C.

Se produjo una estirpe celular de ovario de hámster chino (CHO) con expresión y secreción estable del FR α humano utilizando una secuencia del receptor α del folato (FR α) humano que contenía una secuencia guía de la inmunoglobulina κ humana y una etiqueta epitópica de 6 histidinas en el C-terminal que reemplazaba el sitio de anclaje mediante GPI. Una vez producidas, las células de CHO con expresión del FR α se dejaron crecer en bolsas wave de 25 L. Para purificar la proteína FR α secretada, se eliminaron los desechos celulares del sobrenadante de células mediante filtración en profundidad y a continuación, este se concentró 10 veces mediante filtración de flujo tangencial y se diafiltró en fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 1 mM, pH 8,0. Este se depositó en una columna Talon® para IMAC previamente empaquetada con un FPLC. El material no unido se eliminó mediante un lavado con fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 5 mM, pH 8,0 y la proteína unida se eluyó con un gradiente lineal de imidazol 5 mM - 100 mM en fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0. Las fracciones de pico se dializaron exhaustivamente frente a PBS 1X a pH 7,4, su pureza se determinó mediante SDS-PAGE, se cuantificaron mediante el ensayo del BCA, se alicuotaron y se almacenaron a -80 °C.

También se produjo un sistema celular similar para el receptor β del folato (FR β) humano, el receptor γ del folato (FR γ) humano y el receptor δ del folato (FR δ) humano. En breve, para transfectar transitoriamente cultivos de 1 L de células 293F, se utilizaron construcciones de FR β , FR γ o FR δ que contenían una secuencia guía de la inmunoglobulina κ humana y una etiqueta epitópica de 6 histidinas en el C-terminal que reemplazaba el sitio de anclaje mediante GPI. Las proteínas FR recombinantes se purificaron como se describe más arriba para el FR α humano.

También se preparó una estirpe celular de ovario de hámster chino (CHO) con expresión y secreción estable de una secuencia de mesotelina humana que contenía una secuencia guía de la inmunoglobulina κ humana y una etiqueta epitópica de 6 histidinas en el C-terminal que reemplazaba el sitio de anclaje mediante GPI, ya que la mesotelina se ha utilizado como control negativo en muchos estudios. Las células CHO que expresaban mesotelina humana se dejaron crecer en bolsas wave de 25 L.

Para purificar la proteína mesotelina secretada, se eliminaron los desechos del sobrenadante de células mediante filtración por fibras huecas y el sobrenadante clarificado se concentró 10 veces mediante filtración de flujo tangencial. La concentración de NaCl del sobrenadante se ajustó a 300 mM de NaCl y 0,5 mM de imidazol. Este se depositó en una columna Talon® para IMAC previamente empaquetada con un FPLC. El material no unido se eliminó mediante un lavado con fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 3 mM, pH 8,0, y la proteína unida se

eluyó con fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 150 mM, pH 8,0. Las fracciones de pico se dializaron exhaustivamente frente a fosfato potásico 50 mM a pH 7,5. Se añadió sulfato amónico hasta una concentración final de 1 M, y la purificación final se realizó en una columna previamente empaquetada con fenil sefarosa siguiendo un gradiente escalonado de sulfato amónico 1 M - 0 M en fosfato potásico 50 mM a pH 7,5. Las fracciones de pico se dializaron exhaustivamente frente a PBS 1X a pH 7,4, su pureza se determinó mediante SDS-PAGE, se cuantificaron mediante el ensayo del BCA, se alicuotaron y se almacenaron a -80 °C.

EJEMPLO 2 - Producción de FR α alquilado y reducido purificado

Se trató de producir una forma antigénica del FR α reducida y alquilada. Para reducir la proteína, el FR α purificado se concentró a 2 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) mediante filtros de centrifuga (Amicon Ultra, límite de peso molecular: 3 kD). La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo del BCA (Thermo Scientific). El FR α resultante se diluyó en urea 8 M/PBS (1:1) para obtener una concentración final de FR α de 1 mg/ml en PBS con urea 4 M. Se añadió una solución de ditiotreitól (500 mM en PBS) hasta alcanzar una concentración final de 10 mM. La solución se incubó a 65 °C durante una hora, y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

A continuación, se añadió una solución de yodoacetamida 1 M en solución salina tamponada con fosfato a la solución de receptor del folato reducido hasta alcanzar una concentración final de 10 mM, y la reacción se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La proteína se mantuvo en solución en estas condiciones. El FR α reducido final para su uso en inmunizaciones se almacenó en una solución salina tamponada con fosfato que contenía urea 4 M, DTP 10 mM y yodoacetamida 10 mM.

En la Figura 1 se muestra la migración diferencial de la proteína FR α nativa y la proteína reducida y alquilada analizada mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

EJEMPLO 3 - Producción de hibridomas con el FR α

Se inmunizaron ratones hembra Balb/c de 8 semanas con proteína FR α marcada con 6 histidinas (n=5) o con proteína FR α reducida y alquilada (n=5). Las inmunizaciones iniciales administradas en el día 0 por vía intraperitoneal comprendían 50 μ g del inmunógeno respectivo mezclado en una relación 1:1 (v:v) con adyuvante completo de Freund (Rockland, n.º cat. D614-0050). A los ratones se les administró por vía intraperitoneal 50 μ g adicionales de inmunógeno mezclado en una relación 1:1 (v:v) con adyuvante completo de Freund (Rockland, n.º cat. D614-0050) 14 días más tarde y cada 21 días a partir de entonces. Se extrajeron muestras de sangre de los ratones inmunizados 24 días tras la inmunización inicial y cada 21 días a partir de entonces.

Las muestras de sangre extraídas se analizaron mediante inmunoensayo directo ligado a enzimas (EIA) frente al FR α . Las placas se recubrieron con proteína FR α (100 μ l de una solución de 1 mg/ml en PBS, fosfato potásico 0,02 M, cloruro sódico 0,15 M, pH 7,2), se incubaron durante la noche a 4 °C, se lavaron con PBS que contenía Tween®-20 (PBST; Rockland, n.º cat. MB-075-1000) al 0,2 % y se bloquearon con gelatina de pescado (Sigma) al 3 % durante una hora a temperatura ambiente. Una serie de diluciones a 1:3 de muestras independientes de suero de ratón se dejaron que se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación, las placas se lavaron 3 veces con PBST y después se rastrearon utilizando como sonda un anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con HRP (Rockland, n.º cat. 610-4320) a una dilución de 1:2500 durante 30 minutos a 37 °C. Se añadió sustrato TMB (Rockland, n.º cat. TMBE-100) y la reacción se paró a los 30 minutos mediante la adición de 100 μ l de HCl 1M. A continuación, se midió la absorbancia a 450 nm (Microplate Reader "Benchmark"; Biorad). Todas las muestras se contraanalizaron frente a la proteína mesotelina recombinante marcada con 6 histidinas (mesotelina-His₆) como control negativo.

Los bazos de ratón que mostraron los títulos más elevados de especificidad frente al antígeno se recolectaron y los hibridomas se prepararon mediante electrofusión (Hybrimune™ Model CEEF-50B Waveform Generator; Celectis, Romainville, Francia) de esplenocitos con células Sp2/0 Ag14 de mieloma (ATTC CRL1581). A continuación, el sobrenadante de los hibridomas se analizó mediante ELISA frente al FR α y la mesotelina-His₆ recombinante tal y como se describe más arriba a fin de seleccionar las estirpes celulares que expresan la fusión parental.

A continuación, las estirpes celulares parentales seleccionadas determinadas para producir anticuerpos reactivos frente al FR α humano recombinante (rhFR α) se subclonaron mediante dilución límite. A continuación, los anticuerpos producidos por estas células se volvieron a analizar para evaluar su unión al FR α y se isotiparon con el sistema Clonotyping™ (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, Estados Unidos de América). A fin de determinar la especificidad frente al receptor, el sobrenadante de estos clones se volvió a analizar mediante ELISA directo frente a otras tres isoformas del receptor del folato humano (FR β , FR γ y FR δ). Las placas se recubrieron durante la noche con 100 μ l de una solución de 1 μ g/ml de la isoforma respectiva del FR α a 4 °C, se lavaron con PBS que contenía Tween®-20 (Rockland, n.º cat. MB-075-1000) al 0,2 % y se bloquearon con gelatina de pescado (Sigma) al 3 %. Una serie de diluciones a 1:3 del sobrenadante de los cultivos se dejaron que se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación, las placas se lavaron y se rastrearon utilizando como sonda un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP tal y como se describe más arriba. Los clones que producían anticuerpos reactivos frente al

FR β , FR γ y FR δ no se seleccionaron para más análisis.

Los cuatro clones de hibridoma seleccionados, 19D4.B7, 26B3.F2, 24F12.B1 y 9F3.H9.H3.H3.B5.G2, se depositaron en la Colección de Cultivos Americana el 19 de mayo de 2011 y se les asignaron los números de acceso de la ATCC PTA-11884, PTA-11885, PTA-11886 y PTA-11887, respectivamente.

EJEMPLO 4 - Producción de anticuerpos monoclonales purificados del FR α

Las estirpes celulares seleccionadas se evaluaron para comprobar la presencia de micoplasma mediante un kit para tal fin (Rockland, n.º cat. MAB-012) antes de sembrarlas a una densidad de $0,5 \times 10^5$ células/ml en botellas rodantes de 1 L que contenían medio sin suero (Invitrogen, n.º cat. 12045-076) y SFB con IgG a una concentración baja del 5 % (Gibco, n.º cat. 16250-078). Los cultivos se dejaron crecer a 37 °C durante 14 o 21 días, tras lo cual el sobrenadante se recogió y se concentró aproximadamente 10 veces a través de una membrana de filtración de 50 kDa (Spectrum Labs, Rancho Dominguez, California, Estados Unidos de América) y a continuación, se purificó mediante cromatografía de proteína A (Rockland, n.º cat. PA50-00-0025). El anticuerpo unido se eluyó con citrato sódico 0,1 M a pH 13,5/4,5, dependiendo del isotipo de anticuerpo, y el tampón se dializó frente a PBS utilizando tubos con membrana de 12-14 kDa (Spectrum Labs, Rancho Dominguez California, Estados Unidos de América). El anticuerpo purificado se sometió a una filtración esterilizante con Express™ PLUS Stericups de 0,22 μ m (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos de América) y se almacenó a 4 °C para realizar más pruebas.

Se trató de secuenciar las cadenas pesadas y ligeras de cuatro clones de hibridoma seleccionados (9F3-H9, 19D4-B7, 24F12-B1 y 26B3-F2). Primero, el ARN total se aisló de la estirpe celular de cada hibridoma (sedimentos celulares de 1×10^3 a 1×10^5 células cada uno) con el kit RNAqueous® (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific).

A continuación, el ARN aislado se amplificó mediante RT-PCR múltiple, realizada por triplicado para cada hibridoma en un Mastercycler® EP Gradient Thermocycler (Eppendorf). Primero, para cada hibridoma se realizaron dos amplificaciones independientes del ADNc específico para el gen (<1 μ g ARN/reacción) a fin de determinar cuáles eran los genes de cadena pesada y ligera de la Ig que se utilizaban durante el reordenamiento de la Ig. Cada mezcla consistía en cebadores singulares específicos para la familia diseñados para hibridarse a cualquiera de las posibles familias de genes murinos de la Ig V (IgHv, IgKv) y genes de la región constante de las Ig (IgHcGamma, IgKc). La generación y amplificación del ADNc se realizó con el Superscript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen) en las condiciones siguientes: 55 °C durante 30 minutos y 95 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto, 68 °C durante 1 minuto y finalmente, 68 °C durante 10 minutos. Los productos del ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %. Las bandas correspondientes se cortaron y purificaron del gel con el kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN purificado se envió para su secuenciación (GENEWIZ, Inc., South Plainfield, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) a fin de determinar los segmentos del gen de la estirpe germinal expresados por cada hibridoma.

A continuación se realizaron más análisis de RT-PCR adecuados para los genes concretos identificados para cada hibridoma utilizando la misma fuente de ARN de más arriba y cebadores específicos para el gen (en contraposición a los cebadores específicos para la familia utilizados en la mezcla para RT-PCR múltiple). Para facilitar la clonación, los ADNc de Ig amplificados se colocaron en un vector de expresión In-Fusion (IF); cada cebador específico para el gen también contenía secuencias complementarias al vector, lo que permitiría un entrecruzamiento homólogo. Todos los otros reactivos y condiciones del termociclador son iguales a los utilizados para los experimentos de RT-PCR múltiple descritos más arriba.

EJEMPLO 5: Caracterización de la unión del anticuerpo al FR α

Las características de unión de los anticuerpos monoclonales purificados al FR α se determinaron mediante experimentos de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Todos los experimentos de SPR se realizaron a 25 °C utilizando un BIAcore T100 con chips CM5 para investigación (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Inicialmente, la IgG anti-ratón suministrada en el kit para captura de anticuerpos de ratón (GE Healthcare) se inmovilizó mediante la formación de enlaces amida con los chips sensores CM5. Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-FR α (26B3, 24F12, 19D4 o 9F3) se capturaron en celdas de flujo individuales por ciclo de unión, y la cuarta celda de flujo se utilizó como referencia. Los experimentos de unión se realizaron utilizando HBS-P (GE Healthcare) como tampón de análisis a un caudal de 30 μ l/min. Cada muestra de anticuerpo monoclonal (0,5 μ g/ml) se inyectó durante 3 minutos para capturar el anticuerpo. A continuación, se inyectó FR α humano recombinante purificado (rh-FR α) a diversas concentraciones (1nM - 30nM) en las superficies de referencia y en las superficies específicas para el FR α durante 3 minutos a fin de registrar los sensogramas de unión mediante un método de cinética de un solo ciclo. El perfil de disociación se monitorizó durante 25 minutos. Entre uniones, la superficie se regeneró con una inyección de 30 μ l de glicina 10 mM (pH 1,7). Los sensogramas se procesaron y se ajustaron a un modelo de unión 1:1 de Langmuir con el software de evaluación BIAcore T100 (versión 2.0.1). Algunas de las características de unión de los anticuerpos 26B3, 24F12, 19D4 y 9F3 se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Características de unión de los anticuerpos específicos frente al FR α

Nombre abreviado del clon	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	χ^2
26B3	$5,24 \times 10^5$	$1,43 \times 10^{-5}$	$2,73 \times 10^{-11}$	2,48
24F12	$3,93 \times 10^5$	$3,99 \times 10^{-5}$	$1,02 \times 10^{-10}$	1,08
19D4	$4,27 \times 10^5$	$2,42 \times 10^{-4}$	$5,67 \times 10^{-10}$	0,656
9F3	$4,34 \times 10^5$	$3,10 \times 10^{-4}$	$7,15 \times 10^{-10}$	1,89

5 EJEMPLO 6: Mapeo de los epítomos de los anticuerpos específicos frente al FR α seleccionados

Los anticuerpos específicos frente al FR α , 26B3, 24F12 y 9F3, también se evaluaron en estudios de unión al epítomo mediante Octet QK. Los resultados mostraron que 26B3 y 24F12, los cuales poseen una elevada afinidad al FR α humano purificado, compiten entre ellos para unirse al FR α . Así, estos anticuerpos podrían tener un epítomo en común, o epítomos inmediatamente adyacentes el uno al otro. Los resultados también indican que el anticuerpo 9F3 tiene un epítomo singular, ya que no compitió con otros anticuerpos específicos frente al FR α para unirse al FR α .

Se realizaron más estudios de mapeo de epítomos mediante ExSARTM con espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio y métodos de acoplamiento simulado. Los resultados de estos estudios obtenidos para los anticuerpos 9F3, 24F12 y 26B3 se muestran en la Figura 2.

En lo que respecta al epítomo para el anticuerpo 26B3, estos datos apuntan a que este es accesible en la estructura nativa anclada en la membrana, dado la capacidad de 26B3 de reconocer el FR α nativo mediante citometría de flujo. Además, estos datos también apuntan a que las restricciones conformacionales del epítomo reconocido por el AcM 26B3, como demuestra su incapacidad de detectar la proteína en transferencias de Western en condiciones reductoras, están relacionadas con la cisteína de la posición 185 en la proteína FR α , la cual forma un puente disulfuro con la cisteína de la posición 111.

EJEMPLO 7: Reconocimiento de formas del FR α desnaturalizadas y químicamente conservadas

Se realizaron experimentos para determinar si cualquiera de los anticuerpos específicos frente al FR α descritos más arriba podían reconocer formas desnaturalizadas del FR α . Para estos análisis, las células CHOK1 con expresión estable del FR α , β o Δ humano enlazado a GPI se lisaron en tampón OBG al 1,1 % (tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, OBG al 1,1 %) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos de América) y PMSF (100 nM), y se dejaron sobre hielo durante 15 minutos. Los lisados se preclarificaron mediante centrifugación a 13 000 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar los desechos. Para las muestras reducidas y desnaturalizadas, se hirvió la misma cantidad de proteína (20 μ g) durante 10 minutos en tampón de carga NuPAGE[®] LDS (Invitrogen) que contenía β -mercaptoetanol al 5 % + DTT 40 mM. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) con gel bis-tris al 4-12 % (Invitrogen) y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con PBST + leche descremada al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente tras lo cual, la membrana se lavó dos veces con PBST. La inmunotransferencia se realizó con los anticuerpos monoclonales purificados de ratón 9F3, 19D4, 24F12 o 26B3 (1 μ g/ml) específicos frente al FR α , que se detectaron con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP y se visualizaron con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, Illinois, Estados Unidos de América). La luminiscencia se visualizó con el sistema Omega 12iC de obtención de imágenes moleculares (Ultra-Lum, Claremont, California, Estados Unidos de América) y el análisis de las imágenes se realizó con el software UltraQuantTM 6.0 (Ultra-Lum).

Los análisis de transferencia de Western también se realizaron con preparados de receptor del folato purificado. Para estos experimentos, 0,5 μ g de FR α , β , Γ o Δ humano purificado, producidos como se describe en el Ejemplo 1, se incubaron en tampón de carga 1X SDS-PAGE (Invitrogen) con o sin DTT 20 mM, se hirvieron durante 10 min y se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE con un gradiente del 4-12 %. La proteína se transfirió a una membrana de PVDF y las transferencias se rastrearon con una sonda como se describe más arriba. Los geles se resolvieron utilizando el marcador de pesos moleculares con proteínas preteñidas de BenchmarkTM (Novex[®]). Los geles para los que se utilizaron proteínas FR recombinantes purificadas también se visualizaron mediante tinción con plata para asegurarse de que se había depositado la misma cantidad de proteínas.

Los análisis de transferencia de Western indican que los anticuerpos 19D4, 9F3, 24F12 y 26B3 reconocen el FR α no reducido, sin embargo, no se detectó la unión a muestras reducidas y desnaturalizadas para ninguno de estos anticuerpos (Figuras 3(A) y (B)).

También se realizaron estudios de inmunohistoquímica (IHQ) a fin de determinar si cualquiera de estos anticuerpos se podía unir a muestras de tejido de cáncer de ovario seroso papilar fijadas en formol e incluidas en parafina. Las

pruebas de IHQ indirecta para el FR α se realizaron con el kit MACH4™ para detección universal de HRP-polímero (Universal HRP-Polymer Detection, Biocare Medical). Las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina se cortaron en un tamaño de 5 micrómetros sobre unos portaobjetos de vidrio cargados positivamente y se calentaron durante aproximadamente 60 minutos a 60 °C. Los portaobjetos se desparafinizaron en 3 baños consecutivos de xileno de 3 minutos cada uno, se transfirieron a tres baños consecutivos de alcohol al 100 % de 3 minutos cada uno, seguido de 3 baños consecutivos de alcohol al 95 % de 3 minutos cada uno y finalmente, se enjuagaron durante 5 minutos con agua desionizada. A continuación, las muestras preparadas se pretrataron con la solución Diva para recuperación de epítomos inducida por calor (Biocare Medical) diluida a 1:10 en agua desionizada y se colocaron en una olla a presión (*decloaking chamber*) presurizada llena con 500 ml de agua desionizada. Las muestras se incubaron durante 15 minutos en una olla a presión (*decloaking chamber*) donde la incubación presurizada alcanzó un máximo de 125 °C a 16 psi durante 30 segundos y a continuación, se enfrió durante 15 minutos hasta alcanzar los 95 °C. A continuación, los portaobjetos se enfriaron durante 15 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. Tras enfriar, los portaobjetos se lavaron en 3 baños consecutivos de 3 minutos cada uno con tampón de lavado de solución salina tamponada Tris/Tween-20® al 0,1 % (TBST). Todos los lavados posteriores con tampón también se realizaron de esta manera. A continuación, los portaobjetos se bloquearon con solución de bloqueo de peroxidasa-1 (Biocare Medical) durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con TBST y entonces se aplicó el reactivo de bloqueo universal sin suero Background Sniper (Biocare Medical) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras bloquear las muestras, los portaobjetos se incubaron en una solución del anticuerpo 26B3 en diluyente para anticuerpos (*Antibody Diluent*, Dako) a 2,5 μ g/ml o del anticuerpo de ratón para control negativo universal listo para usar (*Universal Negative Control - Mouse ready-to-use negative control antibody*, Dako, para tejido con isotipo negativo) durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron con TBST y se incubaron con un realzador de la señal del anticuerpo primario de ratón (*Mouse Probe Primary Antibody Enhancer*, suministrado en el kit MACH4™ de Biocare Medical) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron otra vez con TBST y se incubaron con un reactivo para polímero-HRP (suministrado en el kit MACH4™ de Biocare Medical) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, los portaobjetos se lavaron con TBST y se incubaron en una solución de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (Dako) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se enjuagaron con abundante agua desionizada 3 veces durante 30-60 segundos cada vez y se contratiñeron con hematoxilina (Dako) durante 2 minutos, se lavaron con TBST, se deshidrataron en 3 baños consecutivos de alcohol al 95 % y alcohol al 100 % de 30 segundos cada uno, y se clarificaron en 3 baños consecutivos de xileno de 30 segundos cada uno. Finalmente, se aplicaron cubreobjetos a los portaobjetos antes del análisis.

Se suele creer que para que un anticuerpo sea eficaz en el análisis inmunohistoquímico de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, este ha de poder reconocer un epítomo lineal del antígeno de interés, pues el antígeno no posee una estructura terciaria debido a la naturaleza destructiva de la fijación del tejido. Por lo tanto, resultó sorprendente que el anticuerpo 26B3 pudiera reconocer el FR α en este ensayo (Fig. 4), ya que no reconoce el FR α reducido y desnaturalizado mediante transferencia de Western. Además, el perfil de tinción del FR α con el anticuerpo 26B3 observado en tejidos normales fue coherente con estudios publicados en la bibliografía en los que se utilizaron otros anticuerpos y técnicas, y el páncreas, la tiroides, el pulmón, las glándulas salivales, el riñón, la hipófisis, el cuello uterino y la mama mostraron expresión en diversos grados (Cuadro 3). Como se muestra en la Figura 5, el perfil de tinción en tejidos normales, ilustrado en cortes de pulmón normal (A) y riñón normal (B), está muy restringido a las células epiteliales y es de naturaleza comúnmente apical.

Cuadro 3. Expresión del FR α en tejidos humanos normales

Tipo de tejido	Tinción (Número/intensidad)	Comentarios
Cerebro	0/3	
Cerebelo	0/3	
Suprarrenal	0/3	
Ovarios	0/3	
Páncreas	3/3; 2+	Limitada a los bordes luminales de las células ductales y acinares
Tiroides	2/5; 1+ (dispersa)	Tinción citoplasmática en las células foliculares
Hipófisis	3/3; 1+	Predominantemente citoplasmática

Testículos	0/3	
Mamas	3/3; 1+/2+	Células ductales con tinción luminal y de la membrana
Bazo	0/3	
Amígdalas	0/3	
Timo	0/3	
Médula ósea	0/3	
Pulmones	3/3; 2+	Tinción en las células alveolares y bronquiales
Corazón	0/3	
Esófago	0/3	
Estómago	0/2	
Intestino delgado	0/3	
Colon	0/3	
Hígado	0/3	
Glándulas salivales	3/3; 3+	Células ductales y acinares
Riñones	3/3; 3+	Tinción luminal de las células tubulares proximales
Próstata	0/3	
Endometrio	0/3	
Cuello uterino	1/3; 1+	Células endocervicales
Músculo esquelético	0/3	
Piel	0/3	
Nervios	0/3	
Mesotelio (pleura y pulmón)	3/3; 2+	Células alveolares

EJEMPLO 8: Reconocimiento de formas nativas del FR α

- 5 Se realizaron estudios de citometría de flujo para evaluar la capacidad de los anticuerpos específicos frente al FR α seleccionados para unirse a la proteína nativa. Para estos estudios se recolectaron células de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban el FR α y a continuación, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento enfriado con hielo (RPMI suplementado con SFB al 10 %). Las células se incubaron durante 1 hora sobre hielo con 9F3, 19D4, 24F12 o 26B3 (1 μ g/ml), se lavaron y a continuación, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con FITC (dilución a 1:100) (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, Estados Unidos de América).
- 10 Antes del análisis, las células se marcaron con 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) para excluir las células no viables. También se sometieron a los mismos procedimientos de laboratorio a células CHO que no expresaban el FR α , como control negativo. Las células se analizaron en un citómetro de flujo EasyCyte™ (Guava® Technologies, Hayward, California, Estados Unidos de América).
- 15 Los datos que figuran en el Cuadro 4 indican que los cuatro anticuerpos pueden unirse al FR α nativo.

Cuadro 4: Anticuerpos específicos frente al FR α reconocen el FR α expresado en la superficie celular

Diana	Media geométrica observada para el anticuerpo:			
	9F3	26B3	24F12	19D4
Solo células	2,7	2,7	2,7	2,0
CHOK1	5,9	5,7	5,9	—
FR α	759,5	853,7	777,0	1130,5
FR β	6,1	5,9	6,6	—
FR Δ	5,6	5,4	5,9	—

5 **EJEMPLO 9: Detección del FR α en el suero de sujetos de los que se sabe que presentan cáncer de ovario**

Se realizaron estudios de electroquimioluminiscencia para determinar si los anticuerpos específicos frente al FR α descritos en el presente podían detectar FR α en el suero de pacientes de los que se sabía que presentaban cáncer de ovario. Para estos experimentos se utilizó el AcM 26B3 como AcM de captura y se añadió a placas de EQL a una concentración de 750 $\mu\text{g/ml}$. Las placas se lavaron, se añadieron 50 μl de suero de muestra a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas. Las muestras de suero se obtuvieron de mujeres sanas normales (control negativo) y de pacientes con cáncer de ovario. Las muestras se diluyeron a 1:4 en PBST (solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 que contenía Tween@20 al 0,01 %). Tras la incubación, las muestras se lavaron con PBST y para detectar la muestra unida, a cada pocillo se añadieron 25 μl del AcM 19D4 (1 $\mu\text{g/ml}$) marcado con Ru en una relación de aproximadamente 13 marcadores/molécula de IgG. Tras un período de incubación de 2 horas, las placas se lavaron con PBST y se leyeron con 2X MSD Buffer T. Los resultados que figuran en el Cuadro 5 muestran que el FR α en el suero se puede capturar y detectar con los anticuerpos monoclonales 26B3 y 19D4.

20 Cuadro 5: Concentración sérica relativa de FR α

Categoría (n)	Concentración media de FRA (pg/ml)	Desviación estándar
Normal (15)	223	74
Cáncer de ovario (15)	1815	3896

25 **EJEMPLO 10: Detección del FR α en el suero y la orina de sujetos de los que se sabe que presentan cáncer de ovario**

A continuación se realizaron estudios de electroquimioluminiscencia para determinar si los anticuerpos específicos frente al FR α descritos en el presente podían detectar el FR α en el suero y la orina de pacientes de los que se sabía que presentaban cáncer de ovario. Para estos experimentos se utilizó el AcM 26B3 como AcM de captura y se añadió a placas de EQL a una concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$. Las placas se lavaron, se añadieron 50 μl de suero de muestra a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas. Las muestras de suero y orina equivalentes se obtuvieron de mujeres sanas normales (control negativo) y de pacientes con cáncer de ovario. Las muestras (suero u orina) se diluyeron a 1:4 en PBST (solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 que contenía Tween@20 al 0,01 %). Tras la incubación, las muestras se lavaron con PBST y para detectar la muestra unida, a cada pocillo se añadieron 25 μl del AcM 19D4 (1 $\mu\text{g/ml}$) marcado con Ru en una relación de aproximadamente 13 marcadores/molécula de IgG. Tras un período de incubación de 2 horas, las placas se lavaron con PBST y se leyeron con 2X MSD Buffer T. Los resultados que figuran en el Cuadro 6 muestran que el FR α en el suero y la orina se puede capturar y detectar con los anticuerpos monoclonales 26B3 y 19D4.

Cuadro 6: Concentraciones relativas de FR α en el suero y la orina

Designación del paciente	Concentración de FR α en el suero (pg/ml)	Concentración de FR α en la orina (pg/ml)
Normal 1	398	3080
Normal 2	236	11508

Normal 3	315	7704
Normal 4	320	13198
Cáncer de ovario 1	19479	368066
Cáncer de ovario 2	4144	23738
Cáncer de ovario 3	986	165826
Cáncer de ovario 4	719	414187

EJEMPLO 11: Puntuación M como parámetro para medir los resultados de inmunohistoquímica

5 Se estableció un parámetro (puntuación M) para medir la tinción de las muestras, el cual se puede definir de la siguiente manera:

$$M_i = \frac{\sum_{j=1}^3 W_j \cdot X_{ij}}{\sum_{j=1}^3 W_j} = \frac{\sum_{j=1}^3 W_j \cdot X_{ij}}{6}$$

10 En la ecuación, X_{ij} representa el porcentaje de tumor teñido a una intensidad j para el paciente i, y w_j es el valor absoluto de la intensidad (que va de 0 a 3+). El intervalo teórico de este parámetro va de 0 (sin tinción positiva) a 50 (el 100 % de las células se tiñen a una intensidad de 3+). Así, la puntuación M es una puntuación ponderada para estimar la tinción mediante IHQ del FRα en la membrana de las células tumorales; dicha puntuación incluye tanto el porcentaje de células con positividad para el FRα como la intensidad de la tinción. Cuando fue necesario, las puntuaciones M de cada paciente se promediaron sobre varias muestras de micromatrices de tejidos (TMA). Si una muestra no daba resultados, es decir, no había ni tumor ni tejido necrótico, la puntuación M se asignaba a las determinaciones no nulas.

20 Una aplicación práctica de la ecuación anterior se muestra a continuación:

3+	2+	1+	0	Puntuación M
x = 40	y = 30	Z = 10		M = (3x + 2y+z)/6
3 × 40 = 120	2 × 30 = 60	1 × 10 = 10		(120+60+10)/6 = 31,67

25 Aquí, x = % de tumor teñido con una intensidad de 3+; y = % de tumor teñido con una intensidad de 2+; z = % de tumor teñido con una intensidad de 1+.

30 La tasa de positividad para la expresión del FRα en una histología determinada se calculó como el porcentaje de muestras que se tiñeron positivamente según la definición de resultado positivo (> 5 % de la totalidad de células tumorales se tiñen). Los intervalos de confianza binomiales exactos se determinaron mediante métodos convencionales (Clopper C.J. and Pearson R.C., *Biometrika*. 26:404-13 (1934)). Las estadísticas resumidas se presentan aquí para todas las variables demográficas y para la puntuación M.

35 Las diferencias correspondientes a los valores medios se determinaron mediante un ANOVA unilateral con pruebas a posteriori con control del error de tipo I general. Se consideró que las diferencias entre los valores medios eran estadísticamente distintas si el valor de p asociado a la prueba era menor que el error de tipo I ajustado por el método de Bonferroni para esa prueba (error de tipo I máximo = 0,05).

EJEMPLO 12: Tinción comparativa de células de carcinoma de pulmón con el anticuerpo 26B3 y el anticuerpo BN3.2

40 Existe una variabilidad considerable en la bibliografía en lo que respecta al porcentaje de los diversos carcinomas que expresan el FRα, determinado mediante IHQ, lo que se debe en parte al uso de diversos anticuerpos, la mayoría de los cuales no están disponible en el mercado. Un AcM específico frente al FRα disponible en el mercado para el que se ha demostrado que detecta el FRα en cortes FFIP mediante IHQ es el anticuerpo BN3.2 (Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, Estados Unidos de América). Por lo tanto, se realizaron estudios para comparar el anticuerpo BN3.2 con el anticuerpo 26B3 en términos de especificidad y sensibilidad para la detección del FRα utilizando una TMA disponible en el mercado que contenía diversos tipos histológicos de cáncer de pulmón.

45 Ambos anticuerpos eran altamente específicos frente al adenocarcinoma en comparación con otros subtipos histológicos, en particular, el carcinoma de células escamosas. Sin embargo, el anticuerpo 26B3 fue significativamente más sensible que el BN3.2: el anticuerpo 26B3 identificó 26/36 (72 %; puntuación M media ± SD = 19,84 + 18,64) muestras de adenocarcinoma, mientras que el anticuerpo BN3.2 identificó 22/36 (61 %; puntuación M

media \pm SD = 11,38 + 14,25). Estos datos demuestran que el anticuerpo BN3.2 es significativamente menos sensible que el anticuerpo 26B3 para detectar la expresión del FR α en muestras de tejido FFIP y, como se muestra en la Figura 6, existe una relación no lineal entre las puntuaciones M observadas en muestras de adenocarcinoma de pulmón con estos dos anticuerpos.

5 **EJEMPLO 13: Detección del FR α en sujetos de los que se sabe que presentan adenocarcinoma de pulmón**

10 Se realizaron experimentos para determinar si la presencia de histología con positividad para el FR α , según se detectó con el anticuerpo 26B3, estaba asociada a determinadas formas de cáncer de pulmón. Se evaluó una micromatriz de tejidos con muestras duplicadas de tejido pulmonar normal y canceroso en estadio I, II, III y IV para determinar la expresión del FR α mediante tinción IHQ con el anticuerpo 26B3, como se describe en el Ejemplo 7. Como se puede observar en los datos del Cuadro 6, el FR α se asocia a adenocarcinomas relacionados con carcinomas de células escamosas, los cuales mostraron una tinción positiva limitada.

15 Cuadro 7: Evaluación histológica de muestras de tejidos cancerosos

Tinción de membrana			Membrana positiva		Total
			Negativa	Positiva	
Grupos histológicos	Adenocarcinoma	Recuento % en cada grupo histológico	11 28,9 %	27 71,1 %	38 100,0 %
	Escamoso	Recuento % en cada grupo histológico	28 90,3 %	3 9,7 %	31 100,0 %
	Otros carcinomas	Recuento % en cada grupo histológico	17 81,0 %	4 19,0 %	21 100,0 %
	Normal	Recuento % en cada grupo histológico	2 20,0 %	8 80,0 %	10 100,0 %
Total		Recuento % en cada grupo histológico	58 58,0 %	42 42,0 %	100 100,0 %

20 Se realizaron análisis adicionales en 89 de las muestras histológicas de la micromatriz de tejidos, de las que 36 (40 %) eran de adenocarcinoma, 32 (36 %) eran de carcinoma de células escamosas, 2 (2 %) eran de carcinomas adenoescamosos y las 19 (21%) restantes representaban diversas histologías (Cuadro 8). Las tasas globales de positividad para el FR α fueron sustancialmente distintas para cada subtipo histológico. Un porcentaje significativamente más elevado de tumores de adenocarcinoma mostraron positividad para el FR α en comparación con los carcinomas de células escamosas (72 % frente al 13 %, $p < 0,0001$). De las 4 muestras de carcinoma de células escamosas que se tiñeron, solo 1 mostró tinción con una intensidad de 3+ en ambas muestras; 1 mostró tinción con una intensidad moderada (2+) en ambas muestras; y las otras 2 se tiñeron débilmente en una sola muestra (5-10 % de las células tumorales mostraron una intensidad de 1+). Además, las dos muestras de carcinoma adenoescamoso también mostraron positividad para el FR α , y en estas muestras la tinción se restringió a la parte con adenocarcinoma (Figura 7).

30 Cuadro 8: Distribución de la expresión del FR α entre los tipos de CPNM#

Variable	Con negatividad para el FR α (%)	Con positividad para el FR α (%)	Total	Valor de p*
Histología del tumor				
Normal	1 (10 %)	9 (90 %)	10	
Carcinoma de células escamosas	28 (87 %)	4 (14 %)	32	<0,0001
Carcinoma de células grandes	3 (60 %)	2 (40 %)	5	

Carcinoma de células pequeñas	7 (87 %)	1 (13 %)	8	
Carcinoma neuroendocrino	4 (67 %)	2 (33 %)	6	
Adenocarcinoma**	10 (16 %)	28 (74 %)	38	
Grado del tumor				
Grado 1	1 (20 %)	4 (80 %)	5	
Grado 2	5 (22 %)	18 (78 %)	23	
Grado 3	4 (40 %)	6 (60 %)	10	0,517
Estadio del tumor				
Estadio I	4 (29 %)	11 (71 %)	15	
Estadio II	2 (17 %)	10 (83 %)	12	
Estadio III + IV***	4 (36)	7 (64)	11	0,563
Sexo				
Hembra	3 (18 %)	14 (82 %)	17	
Varón	7 (33 %)	14 (67 %)	21	0,46

#TMA de cáncer de pulmón de US Biomax (Lung Cancer TMA, n.º cat. BC041114; 90 casos, partes centrales duplicadas).

5 * Los valores de p se determinaron mediante la prueba exacta de Fisher o la prueba de la χ^2 : carcinoma de células escamosas frente a adenocarcinoma, $p < 0,0001$; varón frente a mujer, $p = 0,46$; estadio, $p = 0,563$; grado, $p = 0,517$.

** Incluye 2 casos de adenoescamoso, ambos con positividad para el FR α solamente en la parte con adenocarcinoma.

10 *** Solo un caso en estadio IV.

Los análisis de la puntuación M de las muestras histológicas de adenocarcinoma duplicadas mostraron escasas diferencias en lo que respecta a la tinción con el anticuerpo 26B3 (Figura 8), lo que indica la fiabilidad de la tinción con el anticuerpo 26B3. Además, un análisis de las puntuaciones M según el estadio y el grado en cada subtipo histológico de adenocarcinoma indicó que ni el estadio ni el grado de la enfermedad estaban asociados al grado de tinción como se define mediante las puntuaciones M (los datos no se muestran).

15 La distribución de las puntuaciones M correspondientes a la tinción del FR α en muestras de adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de células escamosas se muestra en la Figura 9. La puntuación M media (\pm SD) correspondiente a las muestras de adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas teñidas con el anticuerpo 26B3 fueron 19,84 (\pm 18,64) y 1,39 (\pm 5,54), respectivamente ($p < 0,0001$). La puntuación M correspondiente al adenocarcinoma también fue significativamente más elevada cuando se comparó con todos los demás tipos histológicos de cáncer de pulmón. Además, se realizó un análisis de árbol para determinar las posibilidades de que la histología del cáncer fuera adenocarcinoma. Una puntuación M $> 21,7$ dio como resultado una razón de posibilidades (OR) igual a 16, lo que demuestra una vez más que el FR α se expresa predominantemente en la histología de adenocarcinoma (el análisis no se muestra).

20 Los bloques de tejido fijados en formol e incluidos en parafina (FFIP) raramente se pueden obtener de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón en estadio terminal, ya que no se suelen realizar resecciones quirúrgicas. Por lo tanto, se realizaron estudios para determinar la idoneidad de las muestras de aspirado con aguja fina (FNA) para el análisis IHQ del FR α con el AcM 26B3, ya que el cáncer de pulmón en estadio terminal se diagnostica con más frecuencia mediante biopsia pequeña o material citológico. Para estos estudios, las muestras se obtuvieron de nueve pacientes con adenocarcinoma en estadio terminal que habían sido diagnosticados mediante evaluación citológica de un aspirado de ganglios linfáticos torácicos (Figura 10), y se demostró que la tasa de positividad para el FR α (63 %) era similar a la observada en las muestras histológicas evaluadas de la TMA de cáncer de pulmón.

35 Aunque el tamaño de la muestra era pequeño, estos datos apuntan a que las muestras citológicas podrían constituir una fuente de tejido adecuada para determinar la expresión del FR α en pacientes con adenocarcinoma en estadio terminal.

EJEMPLO 14: El FR α se expresa en células CK+/CD45-, pero no en células CK-/CD45+, aisladas de la sangre de pacientes de los que se sabe que presentan carcinoma de pulmón no microcítico

5 Se realizaron estudios para determinar el perfil de expresión del FR α en células tumorales en circulación (CTC) de pacientes de los que se sabía que presentaban carcinoma de pulmón no microcítico
 Para estos estudios, las muestras de sangre se obtuvieron de 15 donantes sanos y de 5 pacientes con cáncer de pulmón en estadio IV. Las muestras se concentraron para enriquecerlas en CTC mediante el sistema ApoCell's ApoSteam™. Tras el enriquecimiento, cada muestra se tiñó para determinar la presencia de citoqueratina (CK),
 10 CD45 (receptor tipo C de la proteína tirosina fosfatasa), núcleos y FR α .
 La tinción del FR α se realizó con el anticuerpo 26B3 como anticuerpo primario, que a continuación se detectó con un anticuerpo secundario específico de ratón conjugado con DyLight® 649. Como se muestra en el Cuadro 9, la expresión del FR α se observó en CTC CK+/CD45-, pero no en CTC CK-/CD45+.

15 Cuadro 9 - Expresión del FR α en células tumorales en circulación de pacientes de los que se sabe que presentan carcinoma de pulmón no microcítico

Id. del paciente	Recuento de CK-/CD45+	CK-/CD45+/FR α + (%)	MFI del FR α (CK-/CD45+)
Paciente 1	2,270	0,0	No procede
Paciente 2	24,462	0,0	No procede
Paciente 3	26,503	0,0	No procede
Paciente 4	16,540	0,0	No procede
Paciente 5	2,652	0,0	No procede

Id. del paciente	Recuento de células CK+/CD45- en 7,5 ml de sangre	CK+/CD45-/FR α + (%)	MFI del FR α (CK+/CD45-)
Paciente 1	55	15,6	82,195
Paciente 2	105	32,8	172,669
Paciente 3	216	9,3	146,521
Paciente 4	57	16,7	179,027
Paciente 5	47	8,1	277,335

20 **EJEMPLO 15: Supervivencia a los 5 años de sujetos que presentan adenocarcinoma de pulmón con y sin expresión del FR α**

25 Se realizaron experimentos para determinar si la presencia de histología con positividad para el FR α , según se detectó con el anticuerpo 26B3, se podía asociar a una mejor o peor supervivencia a los 5 años. Se analizaron mediante tinción IHQ, como se describe en el Ejemplo 7, muestras de tejido pulmonar, normal y canceroso, adenocarcinoma en estadio I o estadio II, y después se midieron los resultados. Se registró el porcentaje de cada intensidad de tinción (3+, 2+, 1+ y 0) en el tumor. Había 177 portaobjetos que se podían interpretar como duplicados o triplicados de un paciente. Cuando se combinaron con los datos clínicos e histológicos evaluables, se identificaron
 30 53 casos evaluables. Los análisis se realizaron teniendo en cuenta los datos relativos al estado demográfico, clínico y de supervivencia 5 años tras el diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón no microcítico.

35 Para determinar el valor de corte óptimo para la puntuación M se realizó un análisis de la curva de eficacia diagnóstica (ROC). La exactitud del diagnóstico no revistió importancia en este análisis; no obstante, la relación entre la relación de probabilidad diagnóstica de la prueba positiva frente a la relación de probabilidad diagnóstica de la prueba negativa sí que fue importante. Estas relaciones se definen según está descrito en el libro *The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction*, de Pepe MS, *New York: Oxford University Press (2003)*. Para un valor de corte de 10, la razón de posibilidades alcanzó un máximo de 6,62. Este valor de M se seleccionó para determinar la positividad de un corte teñido.

40 Las funciones de supervivencia de Kaplan-Meier se representaron con la asociación al FR α como factor pronóstico. Una prueba del rango logarítmico indicó que la positividad para el FR α era beneficiosa para acontecimientos no mortales ($\chi^2 = 7,34$, $df = 1$, $p = 0,007$). La Figura 11 muestra las funciones de supervivencia correspondientes a los grupos con adenocarcinoma en estadio I y II que se consideró que presentaban positividad para el FR α y para los
 45 que la detección del FR α con 26B3 fue negativa. A los 5 años el cociente de riesgos instantáneos es 2,42. Ello indica

que los sujetos con tumores negativos para el FR α (M<10) tienen una probabilidad de morir en los 5 años que siguen al diagnóstico 2,5 veces mayor que los sujetos con tumores positivos para el FR α (M>10).

EJEMPLO 16: La expresión del receptor α del folato se asocia a formas de cáncer de mama triple negativo

Se realizaron estudios para evaluar la expresión del FR α en muestras de tejido de cáncer de mama. Los análisis se realizaron con muestras de la micromatriz de tejidos (TMA) teñidas con el anticuerpo 26B3 como se describe en el Ejemplo 7, y muestras histológicas FFIP preparadas y teñidas con el anticuerpo 26B3 como se describe en el Ejemplo 7.

La distribución de las histologías presentes en la TMA de cáncer de mama (U.S. BioMAX n.º cat. BR1503a; 72 casos, partes centrales duplicadas) se muestra en el Cuadro 10; la mayoría de los casos representados se identificaron como carcinoma ductal infiltrante (CDI). La TMA incluyó 2 muestras de mama normales, las cuales eran positivas para el FR α , según se determinó con el AcM 26B3. La tinción en las muestras de mama normales se limitó a las células ductales, con tinción de membrana y luminal. Dos de tres (67 %) casos de fibroadenoma, 0/2 (0 %) casos de sarcoma quístico y 1/6 (17 %) casos de carcinoma ductal localizado fueron positivos para el FR α . El carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) único no mostró tinción del FR α . De las 59 muestras de CDI, 18 (31 %) fueron positivas para el FR α (Figura 12).

Dado el reducido número de casos positivos en esta TMA, no fue posible realizar un análisis válido de la expresión del FR α en función del estadio o grado; sin embargo, cabe señalar que la mayoría de las muestras eran de T1 o T2. Se demostró que la expresión del FR α estaba asociada a tumores negativos para el RE/RP en comparación con tumores positivos para el RE/RP ($p = 0,012$) y a cánceres de mama triple negativo (CMTN) (RE/RP+ o Her2+ frente a RE/RP/Her2-, $p < 0,0001$).

De los 18 casos de CDI positivos para el FR α , solo 2 (11 %) fueron positivos para Her2, lo que significa que la gran mayoría (89 %) eran negativos para Her2. Estos datos apuntan a que la positividad para el FR α está más correlacionada con la negatividad para Her2. Además, de los 18 casos de CDI positivos para el FR α , 3 mostraron positividad para el receptor del estrógeno (RE) y 4 mostraron positividad para el receptor de la progesterona (RP), pero todos los casos con positividad para el RE/RP y/o positividad para el FR α fueron negativos para Her2. De los 18 casos de CDI positivos para el FR α , 12 (67 %) eran cánceres de mama triple negativo (CMTN), lo que apunta a que el FR α podría constituir un marcador y una diana para un subtipo molecular del CMTN con un pronóstico muy desfavorable. Si se examina la TMA en su conjunto, solo 2 (15 %) de los 13 casos con positividad para Her2 también mostraron positividad para el FR α , mientras que 16 (35 %) de los 46 casos con negatividad para Her2 también mostraron positividad para el FR α , lo que corrobora la hipótesis de que la expresión del FR α está correlacionada negativamente con la expresión de Her2. En la Figura 13 se muestra una representación de la distribución de las puntuaciones M para esta TMA en función del subtipo molecular (her-2 (+) y her-2 (-)).

La TMA descrita más arriba estaba compuesta principalmente por cánceres de mama en estadio temprano: estadio I, 6/60 (10 %); estadio II, 44/60 (73 %); estadio III, 10/60 (17 %). Por lo tanto, para confirmar y ampliar los resultados obtenidos en la TMA, se evaluaron 61 bloques de tejido FFIP de cánceres de mama negativos para Her2 en estadio IV (T4) cuya positividad para el RE/RP se conocía e iba del 0 al 100 % (los bloques de tejido FFIP se obtuvieron de los archivos de Genzyme Genetics). Todas estas 61 muestras eran de metástasis, y no de tumores primarios. Los resultados de este estudio se exponen en el Cuadro 11.

Cuadro 10: Distribución de la positividad para el FR α entre los tipos histológicos – datos de la TMA

Histología del tumor	Con positividad para el FR α N (%)	Con negatividad para el FR α N (%)	Total	Valor de p^*
Normal	2 (100 %)	0 (0 %)	2	
Fibroadenoma	2 (67 %)	1 (33 %)	3	
Sarcoma quístico	0 (0 %)	2 (100 %)	2	
Carcinoma ductal localizado (CDL)	1 (17 %)	5 (83 %)	6	
Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI)	0 (0 %)	1 (100 %)	1	

Carcinoma ductal infiltrante (CDI)	18 (31 %)	41 (69 %)	59	
Carcinomas totales:	21 (30 %)	50 (70 %)	71	
Análisis del subtipo molecular de CDI:				
RE/RP+	4 (14 %)	24 (86 %)	28]]
RE/RP-	14 (45 %)	17 (55 %)	31	
Her2+	2 (15 %)	11 (85 %)	13]]
Her2-	16 (35 %)	30 (65 %)	46	
RE/RP/Her2-	12 (67 %)	6 (33 %)	18	<0,0001
				(RE/RP+ o Her2+ frente a RE/RP/Her2-)
T1	3 (43 %)	4 (57 %)	7	
T2	10 (26 %)	29 (74 %)	39	
T3	5 (63 %)	3 (37 %)	8	
T4	0 (0 %)	5 (100 %)	5	
N0	18 (35 %)	33 (65 %)	51]]
N1/N2**	0 (0 %)	8 (100 %)	8	
Grado 1	1 (14 %)	6 (86 %)	7]]]
Grado 2	12 (36 %)	21 (64 %)	33	
Grado 3	5 (26 %)	14 (74 %)	19	

* Los valores de p se determinaron mediante un análisis de tablas de contingencia 2×2 utilizando la prueba exacta de Fisher.

** 4/8 (50 %) de las muestras N1/N2 eran Her2+.

5

10

Se encontró expresión del FR α (Figura 14) en 22/61 (36 %) de estos pacientes, lo que demuestra que el porcentaje de tumores/muestras positivas para el FR α determinado para el estadio temprano de la enfermedad se mantiene en el estadio terminal metastásico en una población con negatividad para Her2 (positividad en la TMA = 35 %; cáncer metastásico en estadio IV = 36 %). De los 22 pacientes con metástasis en estadio IV y con positividad para el FR α , solo 3 (14 %) mostraron positividad para el RE/RP, y dicha positividad tendía al intervalo bajo (de hasta el 30 %). Así pues, 19/22 (86 %) de los pacientes con positividad para el FR α pertenecían al subtipo molecular triple negativo. De nuevo, estos datos resultan favorables cuando se comparan con los datos obtenidos para el estadio temprano de la enfermedad en la TMA, donde el 67 % de los pacientes con positividad para el FR α pertenecían al subtipo triple negativo.

Cuadro 11: Distribución de la positividad para el FR α en subtipos moleculares de cáncer de mama metastásico

Subtipo de tumor molecular	Con positividad para el FR α N (%)	Con negatividad para el FR α N (%)	Total	Valor de p*
Muestras totales:	22 (36 %)	39 (64 %)	61	
RE/RP+	3 (14 %)	20 (86 %)	23	
RE/RP/Her2-	19 (50 %)	19 (50 %)	38	0,0054 (RE/RP+ frente a RE/RP/Her2-)
Grado 1	3 (30 %)	7 (70 %)	10	
Grado 2	11 (28 %)	28 (72 %)	39	1,0 (Grado 1 frente a grado 2)
Grado 3	8 (67 %)	4 (33 %)	12	0,037 (Grado 1 o 2 frente a grado 3)

* Los valores de p se determinaron mediante un análisis de tablas de contingencia 2×2 utilizando la prueba exacta de Fisher.

Además, las muestras de cáncer metastásico en estadio IV se obtuvieron de varios sitios con metástasis, incluidos los ganglios linfáticos, los huesos, la piel y el hígado, así como muestras de fluidos y aspirado con aguja fina (FNA) principalmente obtenidas de la pleura y mediante paracentesis. Varias de estas «biopsias fluidas» mostraron una tinción positiva para el FR α (Figura 15), lo que apunta a la aplicabilidad general del método de IHQ descrito a varios tipos de muestras.

EJEMPLO 17: Evaluación de la expresión del receptor α del folato en muestras histológicas de cánceres ginecológicos

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos para evaluar la expresión del FR α en neoplasias malignas ginecológicas de ovario, endometrio y trompas de Falopio. Los análisis se realizaron con muestras de la micromatriz de tejidos (TMA) teñidas con el anticuerpo 26B3, como se describe en el Ejemplo 7, y muestras histológicas FFIP preparadas y teñidas con el anticuerpo 26B3, como se describe en el Ejemplo 7. Las micromatrices de tejidos disponibles en el mercado se obtuvieron de US Biomax, Inc. (Rockville, MD) para los carcinomas de ovario (n.º cat. OV1921; 96 casos, partes centrales duplicadas); carcinomas de endometrio (n.º cat. EMC1021; 102 casos, partes centrales únicas); y carcinomas de las trompas de Falopio (n.º cat. UTE601; 30 casos, partes centrales duplicadas).

Se consideró que una muestra era positiva para la expresión del FR α si el porcentaje de células tumorales con tinción de membrana positiva era superior o igual al 5 % para cualquier intensidad.

Se rechazaban y por consiguiente, no se incluían en los análisis aquellas muestras que el patólogo ginecológico determinó que faltaban por completo o estaban formadas por tejido necrótico con un número insuficiente de células viables para evaluar. De las muestras de endometrio, seis contenían únicamente hiperplasia compleja atípica sin adenocarcinoma. La clasificación histológica del tipo celular y grado se realizó basándose en la "Clasificación de la OMS de las mamas y órganos genitales femeninos" (Tavassoli y Devilee). El fabricante de la TMA (US Biomax) aportó un estadiaje clínico basado en los sistemas FIGO y TNM.

La tasa de positividad para la expresión del FR α en un tipo determinado de tumor se calculó como el porcentaje de tumores con tinción positiva según la definición de un resultado positivo (± 5 % de la membrana de las células tumorales se tiñe). Las diferencias en la positividad para el FR α entre grupos, como histologías, estadio o grado, se evaluaron mediante tablas de contingencia 2×2 y la prueba exacta de Fisher. Se consideró que las diferencias entre los valores medios eran estadísticamente distintas si el valor de p asociado a la prueba era menor que el error de tipo I ajustado por el método de Bonferroni para esa prueba (error de tipo I máximo = 0,05).

A la intensidad de tinción citoplasmática y de membrana se le asignó una puntuación de 0 si no había tinción; de 1+ si era débil; de 2+ si era moderada y de 3+ si era intensa. También se determinó el porcentaje de células para cada intensidad en la muestra. El tejido se analizó a un aumento de 4x, 10x, 20x y 40x. La tinción intensa (3+) de membrana se visualizaba fácilmente a un aumento de 4x y se confirmaba a 10x. La tinción moderada (2+) de membrana se visualizaba a un aumento de 10x y se confirmaba a 20x. La tinción débil (1+) requería un aumento de 20x o 40x (Figura 16). Para la tinción con una intensidad de 3+, la membrana era gruesa y se localizaba en los bordes celulares apicales y laterales. En los cortes tangenciales, se observa claramente una distribución periférica y completa (Figuras 16 (A) y (B)). La tinción de membrana con una intensidad de 2+ era más débil y fina que la de 3+,

localizada normalmente en los bordes luminales apicales y a veces, en los bordes celulares laterales. La tinción de membrana con una intensidad de 1+ por lo general se limitaba a los bordes luminales. La tinción citoplasmática concomitante presentaba diferencias, dependiendo del tipo de tumor.

- 5 De las 94 muestras evaluables en la TMA de tumores de ovario, 70 (74 %) eran de tipo seroso, 10 (11 %) eran de tipo mucinoso, 4 (4 %) eran de tipo endometriode, 3 (3 %) eran de células claras y las 7 (8 %) restantes eran de tumores raros variados. De las 87 muestras de carcinomas de ovario, la tasa de positividad para el FR α en cada tipo celular fue la siguiente: 100 % (70/70) eran de tipo seroso, 80 % (8/10) eran de tipo mucinoso, 75 % (3/4) eran de tipo endometriode y 67 % (2/3) eran de células claras.
- 10 La diferencia entre los tipos seroso y mucinoso es significativa, con un valor de p igual a 0,014, obtenido con la prueba exacta de Fisher (Cuadro 12). El estado del FR α no fue significativo ni para el grado histológico ni para el estadio clínico. La tinción citoplasmática concomitante era de una intensidad normalmente de 2+ o 3+ en el tipo seroso y más débil y menos frecuente en otros tipos de tumores.
- 15 Cuadro 12: Distribución de la positividad para el FR α según el tipo histológico, el estadio clínico y el grado histológico en carcinomas de ovario

Histología del tumor*	Con negatividad para el FR α N (%)	Con positividad para el FR α N (%)	Total	Valor de p **
Carcinoma seroso	0 (0 %)	70 (100 %)	70	
Carcinoma mucinoso	2 (20 %)	8 (80 %)	10	0,014
Carcinoma endometriode	1 (25 %)	3 (75 %)	4	
Carcinoma de células claras	1 (33 %)	2 (67 %)	3	
Total	4 (5 %)	83 (95 %)	87	
Estadio II	4 (9 %)	41 (91 %)	45	
Estadio III	0 (0 %)	29 (100 %)	29	0,15
Estadio IV	0 (0 %)	13 (100 %)	13	
Grado 1	2 (15 %)	11 (85 %)	13	NS***
Grado 2	1 (3 %)	31 (97 %)	32	NS
Grado 3	1 (3 %)	39 (97 %)	40	NS

- 20 * 1 carcinoma de células de transición, 1 carcinoma de células escamosas, 1 carcinoma embrionario, 2 tumores de saco vitelino y 2 tumores de células de la granulosa no incluidos en el análisis.

** Los valores de p se determinaron mediante la prueba exacta de Fisher o la prueba de la χ^2 : carcinoma seroso frente a carcinoma mucinoso, $p = 0,014$.

*** NS = no significativo.

- 25 En las muestras endometrioides, el FR α se expresó en el 80 % (4/5) de las normales (Figura 17(A)), el 100 % (6/6) de la hiperplasia atípica compleja (Figura 17(B)) y el 89 % (80/90) de adenocarcinomas, incluidos 88 de tipo endometriode y 1 de células claras (Figuras 18 y 19). Ocho adenocarcinomas endometrioides contenían zonas de metaplasia escamosa. En el endometrio normal, la tinción de membrana era débil y se limitaba a los bordes luminales apicales (Figura 17(A)). En la hiperplasia atípica compleja y los carcinomas, la tinción era predominantemente luminal con tinción adicional en los bordes celulares laterales en algunos casos (Figura 17(B)).
- 30 En los casos de tinción de membrana con una intensidad de 3+, la tinción citoplasmática era de intensa (Figura 18(A)) a débil (Figuras 18(B) y (C)). Las células tumorales con una tinción de membrana con una intensidad de 1+ o 2+ raramente mostraban tinción citoplasmática. La mayoría de las células escamosas metaplásicas y células claras mostraron una tinción de membrana de moderada a intensa. (Figuras 19(A) y (B)).

- 35 La expresión del FR α fue positiva en el 100 % de los tumores de grado 1, el 96 % de los de grado 2 y el 74 % de los de grado 3 (grado 1 frente a grado 3, valor de $p = 0,0029$; grado 2 frente a grado 3, $p = 0,034$). El estado del FR α no fue significativo en términos de T1 frente a T2/3, N0 frente a N1, ni estadio I frente a estadio II/III.

- 40 Diecisiete partes centrales de trompas de Falopio normales, 16 muestras de salpingitis crónica y 20 muestras de carcinomas serosos tubáricos mostraron una tinción intensa de la membrana y el citoplasma (Figuras 20 (A) a (C)).

EJEMPLO 18: Evaluación de la expresión del receptor α del folato en muestras histológicas colorectales

5 Se realizaron estudios inmunohistoquímicos para evaluar la expresión del FR α en muestras de tejido colorectal. Los análisis se realizaron con muestras de una micromatriz de tejidos (TMA) que se obtuvo de US Biomax (n.º cat. BC051 111). La TMA contenía 90 muestras duplicadas de tejidos obtenidos de sujetos de los que se sabía que presentaban cáncer colorrectal y 10 muestras colorectales normales. Las muestras se tiñeron con el anticuerpo 26B3 como se describe en el Ejemplo 7. De las 90 muestras obtenidas de los sujetos de los que se sabía que presentaban cáncer colorrectal, 18 (20 %) fueron positivas para la expresión del FR α , mientras que ninguna de las
10 muestras normales fueron positivas. Además, la tinción positiva fue por lo general de moderada a débil, y no se observó ninguna relación obvia con el estadio de la enfermedad.

EJEMPLO 19: Evaluación de la expresión del receptor α del folato en muestras histológicas de tiroides

15 Se realizaron estudios inmunohistoquímicos para evaluar la expresión del FR α en muestras de tejido de tiroides. Los análisis se realizaron con muestras de una micromatriz de tejidos (TMA) que se obtuvo de US Biomax (n.º cat. TH802a). Las muestras se tiñeron con el anticuerpo 26B3 como se describe en el Ejemplo 7. El carcinoma papilar de tiroides se mostró intensamente positivo para la expresión del FR α en la membrana (26/28, 93 %) y se pudo distinguir del carcinoma medular, donde ninguna de las 5 muestras mostró tinción del FR α , lo que concuerda con
20 informes anteriores. Resulta interesante que los adenomas foliculares se podían dividir en dos tipos, macrofolicular y microfolicular, los cuales mostraron una positividad para la expresión del FR α de 3/13 (23 %) y 18/22 (82 %), respectivamente. También se observó cierta positividad en el pequeño número de muestras de tumores de células de Hurthle (2/3, 67 %) y carcinoma folicular (3/7, 43 %) de esta TMA. Estos resultados se exponen en el Cuadro 13.

25 Cuadro 13 - Expresión del FR α en muestras de tejido de tiroides

Subtipo histológico de cáncer de tiroides (N = 78)	Con positividad para el FRα N (%)	Con negatividad para el FRα N (%)
Carcinoma papilar, 28 (36 %)	26 (93 %)	2 (7 %)
Carcinoma medular, 5 (6 %)	0 (0 %)	5 (100 %)
Adenoma folicular de tipo macrofolicular, 13 (17 %)	3 (23 %)	10 (77 %)
Adenoma folicular de tipo microfolicular, 22 (28 %)	18 (82 %)	4 (18 %)
Tumor de células de Hurthle 3 (4 %)	2 (67 %)	1 (33 %)
Carcinoma folicular, 7 (9 %)	3 (43 %)	4 (57 %)

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

<120> ANTICUERPOS FRENTE AL RECEPTOR ALFA DEL FOLATO Y USOS DE LOS MISMOS.

<130> MOR-0839

35

<140>

<141>

<150> 61/604,954

40 <151> 2012-02-29

<150> 61/604,412

<151> 2012-02-28

45 <150> 61/508,444

<151> 2011-07-15

<160> 66

50 <170> PatentIn version 3.5

ES 2 663 556 T3

<210> 1
 <211> 257
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 10
 <400> 1
 Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
 1 5 10 15
 15 Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
 20 20 25 30
 Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
 35 40 45
 Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
 50 55 60
 Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
 65 70 75 80
 30 Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
 85 90 95
 35 Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110
 40 Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125
 45 Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140
 50 Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 145 150 155 160
 Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175
 55 Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190
 60 Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
 195 200 205
 65 Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220
 Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala

ES 2 663 556 T3

5 Lys Ser Gly Ala Ser Pro Gln Leu Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu
 35 40 45

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

15 Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 65 70 75 80

20 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 85 90 95

25 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105

25 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 6
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

40 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 7
 Tyr Ile Lys Ser Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

55 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

65 <400> 8
 Glu Trp Lys Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 9
 <211> 129
 <212> PRT

ES 2 663 556 T3

<213> secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 9
 Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr
 1 5 10 15
 10 Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp
 20 25 30
 15 Ile Arg Gln Phe Pro Gly Ser Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Lys
 35 40 45
 20 Ser Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser
 50 55 60
 25 Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser
 65 70 75 80
 30 Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Trp Lys
 85 90 95
 35 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
 100 105 110
 40 Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp
 115 120 125
 40 Thr

<210> 10
 45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 10
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Asn Phe Ile His
 55 1 5 10 15

<210> 11
 60 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 11
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

ES 2 663 556 T3

1 5

5 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

15 <400> 12
 Gln Gln Asn Asn Gly Asp Pro Trp Thr
 1 5

20 <210> 13
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

30 <400> 13
 Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Asn Phe Ile His Trp
 20 25 30

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

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

45 Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala
 65 70 75 80

50 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Gly Asp Pro Trp Thr Phe Gly
 85 90 95

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

55 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

65 <400> 14
 His Pro Tyr Met His
 1 5

ES 2 663 556 T3

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 10
 <400> 15
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 15 Gly

 20 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 30 <400> 16
 Glu Glu Val Ala Asp Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10
 35 <210> 17
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 45 <400> 17
 Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys His Pro Tyr Met His Trp Val Lys Gln
 20 25 30
 50 Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn
 35 40 45
 55 Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr
 50 55 60
 60 Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr
 65 70 75 80
 65 Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Glu Glu Val Ala Asp
 85 90 95
 Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

ES 2 663 556 T3

	100	105	110
5	Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val		
	115	120	125
10	<210> 18 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
15	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"		
20	<400> 18 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Phe Leu Asn 1 5 10		
25	<210> 19 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
30	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"		
35	<400> 19 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser 1 5		
40	<210> 20 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
45	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"		
50	<400> 20 Gln His Phe Ser Lys Leu Pro Trp Thr 1 5		
55	<210> 21 <211> 106 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
60	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"		
65	<400> 21 Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys 1 5 10 15		
	Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys 20 25 30		
	Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His		

ES 2 663 556 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 25
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 20 25 30
 15 Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Gly Ser Gly
 35 40 45
 20 Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile
 50 55 60
 25 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Thr Ala
 85 90 95
 30 Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 35

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

45 <400> 26
 Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

50 <210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

60 <400> 27
 Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5

65 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 5 <400> 28
 Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr
 1 5
 10 <210> 29
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 <400> 29
 20 Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys
 1 5 10 15
 25 Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 20 25 30
 30 Gln Gly Ile Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala
 35 40 45
 35 Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe
 50 55 60
 40 Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr
 65 70 75 80
 40 Cys Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys
 85 90 95
 45 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105
 50 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 55 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 30
 Gly Tyr Phe Met Asn
 1 5
 60 <210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente

ES 2 663 556 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 31
 5 Arg Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

10

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 32
 Gly Thr His Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

25 <210> 33
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

35 <400> 33
 Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 1 5 10 15

40 Ala Ser Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln
 20 25 30

45 Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Tyr Asn
 35 40 45

50 Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr
 50 55 60

55 Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala
 65 70 75 80

60 Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Thr His Tyr Phe
 85 90 95

65 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 100 105 110

70 Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
 115 120 125

<210> 34

ES 2 663 556 T3

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 <400> 34
 10 agggccagct caactgtaag ttacagttac ttgcac 36
 <210> 35
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 <400> 35
 ggcacatcca acttggttc t 21
 25 <210> 36
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 35 <400> 36
 cagcagtaca gtggttacc actcacg 27
 40 <210> 37
 <211> 323
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 <400> 37
 50 ccagcaatca tgtctgcatc tccaggggaa aaggtcacca tgacctgcag ggccagctca 60
 actgtaagtt acagttactt gcactggtac cagcagaagt caggtgcctc cccccaactc 120
 tggatttatg gcacatcaa cttggcttct ggagtccctg ctcgcttcag tggcagtggg 180
 55 tctgggacct cttactctct cacaatcagc agtgtggagg ctgaagatgc tgccacttat 240
 tactgccagc agtacagtgg ttaccactc acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg 300
 60 aaacgggctg atgctgcacc aac 323
 <210> 38
 <211> 18
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente

ES 2 663 556 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 <400> 38
 5 agtggttatt actggaac 18

 <210> 39
 <211> 48
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 15 <400> 39
 tacataaagt cgcacggtag caataattac aacctatctc tcaaaaat 48

 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 25
 <400> 40
 30 gagtggaagg ctatggacta c 21

 <210> 41
 <211> 389
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 40
 <400> 41
 gagtcaggac ctggcctcgt gagaccttct cagtctctgt ctctcacctg ctctgtcact 60
 45 ggctactcca tcaccagtgg ttattactgg aactggatcc ggcagtttcc aggaagcaga 120
 ctggaatgga tgggctacat aaagtccgac ggtagcaata attacaacc atctctcaa 180
 aatcgaatct ccatcactcg tgacacatct aagaaccagt ttttcctgaa gttgaattct 240
 50 gtgactactg aggacacagc tacatatttc tgtacaaggg agtggaaggc tatggactac 300
 tggggtcagg gaacctcagt caccgtctcc tcagccaaaa caacaccccc atcagtctat 360
 55 cactggccc ctgggtgtgg agatacaac 389

 <210> 42
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 65 <400> 42
 agagccagtg aaagtgttga tacttatggc aataatttta tacac 45

5 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

 <400> 43
 cttgcatcca acctagaatc t 21

 15 <210> 44
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

 25 <400> 44
 cagcaaaata atggggatcc gtggacg 27

 30 <210> 45
 <211> 331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

 40 <400> 45
 ccagcttctt tggctgtgtc tctagggcag agggccacca tatcctgcag agccagtgaa 60
 agtgttgata cttatggcaa taattttata cactggtacc agcagaaacc aggacagcca 120
 cccaaactcc tcatttatct tgcattcaac ctagaatctg ggggtccctgc caggttcagt 180
 45 ggcagtgggt ctaggacaga cttcaccctc accattgatc ctgtggaggc tgatgatgct 240
 gcaacctatt actgtcagca aaataatggg gatccgtgga cgttcggtgg aggcaccaag 300
 ctggagatca aacgggctga tgctgcacca a 331

 50 <210> 46
 <211> 15
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 60 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

 <400> 46
 caccctata tgcac 15

 65 <210> 47
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 5 <400> 47
 aggattgatc ctgcgaatgg taataactaaa tatgaccccga agttccaggg c 51

10 <210> 48
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 20 <400> 48
 gaggaggtgg cggactatac tatggactac 30

25 <210> 49
 <211> 380
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 <400> 49
 ggggcagagc ttgtgaagcc aggggcctca gtcaagttgt cctgcacagc ttctggcttc 60
 35 aacattaaac acccctatat gcactgggtg aagcagaggc ctgaccaggg cctggagtgg 120
 attggaagga ttgatcctgc gaatggtaat actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag 180
 gccactataa cagcagacac atcctccaac acagcctacc tacagctcag cagcctgaca 240
 40 tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtggt agagaggagg tggcggacta tactatggac 300
 tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagcca aaacaacagc cccatcggtc 360
 45 tatccactgg ccctgtgtg 380

50 <210> 50
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 <400> 50
 agtgcaagtc agggcattaa caatttttta aac 33

60 <210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 51
 tacacatcaa gtttacactc a 21

5
 <210> 52
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

15
 <400> 52
 cagcacttta gtaagcttcc gtggacg 27

20
 <210> 53
 <211> 320
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

30
 <400> 53
 acatcctccc tgtctgcctc tctgggagac agagtcacca tcagttgcag tgcaagtcag 60
 ggcattaaca attttttaaa ctggtatcag cagaaaccag atggcactgt taaactcctg 120
 atctattaca catcaagttt aactcagga gtcccatcaa ggttcagtgg cagtgggtct 180
 35 gggacagatt attctctcac catcagcaac ctggaacctg aagatattgc catatactat 240
 tgtcagcact ttagtaagct tccgtggacg ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 300
 40 cgggctgatg ctgcaccaac 320

45
 <210> 54
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

55
 <400> 54
 agctatgccca tgtct 15

60
 <210> 55
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 55
 gaaattggta gtggtgtag ttacacctac tatccagaca ctgtgacggg c 51

<210> 56

ES 2 663 556 T3

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

10 <400> 56
 gaaactacgg cgggctactt tgactac 27

15 <210> 57
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

25 <400> 57
 tctgggggag gcttagtgag gcctggaggg tcctgaaac tctcctgtgc agcctctgga 60
 ttcactttca gtagctatgc catgtcttgg gttcgccagt ctccagagaa gaggctggag 120
 tgggtcgcag aaattggtag tgggtgtagt tacacctact atccagacac tgtgacgggc 180
 cgattcacca tctccagaga caatgccaag agcaccctgt acctggaaat gagcagtctg 240
 30 aggtctgagg acacggccat ctattactgt gcaagggaaa ctacggcggg ctactttgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

35 <210> 58
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

45 <400> 58
 cgaacaagtg agaataatattt cagttattta gca 33

50 <210> 59
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

60 <400> 59
 aatgcaaaaa ccttagcaga g 21

65 <210> 60
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 <400> 60
 5 caacatcatt atgcttttcc gtggacg 27

 <210> 61
 <211> 320
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 15
 <400> 61
 ccagcctccc tatctgcatc tgtgggagaa actgtcacca tcacatgctg aacaagtgag 60
 20 aatattttca gttatttagc atggatcag cagaaacagg gaatatctcc tcagctcctg 120
 gtctataatg caaaaacctt agcagagggg gtgccatcaa ggttcagtgg cagtggatca 180
 ggcacacagt tttctctgaa gatcaacagc ctgcagcctg aagattttgg gagttattac 240
 25 tgtcaacatc attatgcttt tccgtggacg ttcggtggag gctccaagct ggaaatcaaa 300
 cgggctgatg ctgcaccaac 320

 30 <210> 62
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 40 <400> 62
 ggctacttta tgaac 15

 <210> 63
 <211> 51
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 <400> 63
 cgtatttttc cttacaatgg tgatactttc tacaaccaga agttcaaggg c 51
 55
 <210> 64
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
 65 <400> 64
 gggactcatt actttgacta c 21

ES 2 663 556 T3

<210> 65
<211> 386
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
10 <400> 65
ggacctgagc tggatgaagcc tggggcttca gtgaagatat cctgcaaggc ttctgattac 60
tcttttactg gctactttat gaactgggtg atgcagagcc atggaaagag ccttgagtgg 120
15 attggacgta tttttcctta caatggtgat actttctaca accagaagtt caagggcagg 180
gccacattga ctgtagacaa atcctctagc acagcccaca tggagctccg gagcctggca 240
20 tctgaggact ctgcagtcta tttttgtgca agagggactc attactttga ctactggggc 300
caaggcacca ctctcactgt ctctcagcc aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg 360
gcccctggat ctgctgccca aactaa 386
25
<210> 66
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
30
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: etiqueta 6xHis sintética"
35 <400> 66
His His His His His His
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente a la secuencia del receptor α del folato (FR α) que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 26, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 27, una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 28, una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 30, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 31 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 32.
- 10 2. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
- 15 3. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, que tiene una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 29, y/o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 33.
- 20 4. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α), donde la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 26, la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 27, la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 28, la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 30, la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 31 y la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo codificado comprende la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 32.
- 25 5. El polinucleótido según la reivindicación 4, que comprende las secuencias nucleotídicas de las SEC. N.º ID: 61 y 65.
- 30 6. El polinucleótido aislado de la reivindicación 4, que comprende las secuencias nucleotídicas de la SEC. N.º ID: 58, la SEC. N.º ID: 59, la SEC. N.º ID: 60, la SEC. N.º ID: 62, la SEC. N.º ID: 63 y la SEC. N.º ID: 64.
- 35 7. Un vector que comprende el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6.
8. Una célula recombinante que comprende el vector de la reivindicación 7.
- 40 9. La célula recombinante de la reivindicación 8, donde la célula es una célula eucariótica, una célula vegetal o una bacteria.
- 45 10. Un anticuerpo aislado específico frente al receptor α del folato (FR α) producido por la estirpe celular depositada en la ATCC con número de acceso PTA-11885.
- 50 11. Un método para detectar el receptor α del folato (FR α) o cáncer con expresión del FR α en una muestra biológica, que comprende exponer la muestra al anticuerpo de la reivindicación 1 o 10, o fragmento de unión al antígeno del mismo, y detectar el receptor α del folato (FR α).
- 55 12. El método de la reivindicación 11, donde la muestra biológica se obtiene a partir de un humano, roedor, primate no humano, conejo o perro.
- 60 13. Un método para diagnosticar cáncer con expresión del receptor α del folato en un sujeto, que comprende:
 - a. exponer una muestra biológica del sujeto al anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo;
 - b. determinar la cantidad de receptor α del folato (FR α) presente en la muestra;
 - c. comparar la cantidad de receptor α del folato (FR α) presente en la muestra con un patrón conocido; y
 - d. determinar si las concentraciones de receptor α del folato (FR α) en el sujeto se encuentran dentro del intervalo de concentraciones del receptor α del folato (FR α) asociadas al cáncer.
- 65 14. El método de la reivindicación 13, donde un hallazgo de que las células de adenocarcinoma del sujeto expresan receptor α del folato indica que el sujeto tendrá una probabilidad más elevada de presentar una

mejor tasa de supervivencia a los 5 años que si las células de adenocarcinoma no expresan receptor α del folato.

- 5
15. Un método para vigilar un cáncer con expresión del receptor α del folato en un sujeto, que comprende:
- 10
- a. exponer una muestra biológica del sujeto al anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo;
 - b. determinar la cantidad de receptor α del folato (FR α) presente en la muestra unido al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo;
 - c. comparar la cantidad de receptor α del folato (FR α) presente en la muestra con
 - 15 i. un patrón conocido; o
 - ii. una muestra biológica obtenida a partir del sujeto en el pasado; y
 - d. determinar si la concentración de receptor α del folato (FR α) en el sujeto es indicativa de si el cáncer evoluciona, remite o se mantiene estable.
- 20
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde la muestra biológica se deriva de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células en circulación, células tumorales en circulación, células no asociadas a tejidos, tejidos, tejido tumoral resecaado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspirado con aguja fina o preparados histológicos.
- 25
17. El método de la reivindicación 13, donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de las trompas de Falopio o cáncer de ovario.
- 30
18. El método de la reivindicación 17, donde el cáncer es cáncer de pulmón.
- 35
19. El método de la reivindicación 18, donde el cáncer de pulmón es adenocarcinoma.
- 40
20. El método de la reivindicación 13, donde el patrón conocido comprende:
- a. concentraciones de receptor α del folato (FR α) procedentes de sujetos identificados como que no presentan cáncer o un preparado con proteína receptor α del folato a una concentración conocida;
 - b. concentraciones de FR α procedentes de sujetos identificados como que presentan cáncer con expresión del receptor α del folato en estadio temprano;
 - c. concentraciones de FR α procedentes de sujetos identificados como que presentan cáncer con expresión del receptor α del folato en estadio intermedio; o
 - d. concentraciones de FR α procedentes de sujetos identificados como que presentan cáncer con expresión del receptor α del folato en estadio terminal.
- 45
21. El método de la reivindicación 20, donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de ovario o cáncer de pulmón.
- 50
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, que además comprende, tras dicho paso de exposición, exponer la muestra biológica del sujeto a un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, seleccionado de entre:
- 55
- i. el anticuerpo de la reivindicación 1;
 - ii. el anticuerpo de la reivindicación 10;
 - iii. un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α) que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 10, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 11, una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 12, una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 14, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 15 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 16;
 - iv. un anticuerpo aislado específico frente al receptor α del folato (FR α) producido por la estirpe
- 60
- 65

celular depositada en la ATCC con número de acceso PTA-11884;

v. un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α) que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 18, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 19, una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 20, una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 22, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 23 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 24;

vi. un anticuerpo aislado específico frente al receptor α del folato (FR α) producido por la estirpe celular depositada en la ATCC con número de acceso PTA-11886;

vii. un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α) que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 2, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 3, una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 4, una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 6, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 7 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 8; y

viii. un anticuerpo aislado específico frente al receptor α del folato (FR α) producido por la estirpe celular depositada en la ATCC con número de acceso PTA-11887;

donde el segundo anticuerpo es distinto al primer anticuerpo.

23. El método de la reivindicación 22, donde la muestra biológica del sujeto está expuesta al anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o fragmento de unión al antígeno del mismo, y a continuación se expone a:

a. un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α) que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 10, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 11, una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 12, una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 14, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 15 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 16;

b. un anticuerpo aislado específico frente al receptor α del folato (FR α) producido por la estirpe celular depositada en la ATCC con número de acceso PTA-11884;

c. un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α) que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 18, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 19, una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 20, una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 22, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 23 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 24;

d. un anticuerpo aislado específico frente al receptor α del folato (FR α) producido por la estirpe celular depositada en la ATCC con número de acceso PTA-11886;

e. un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, específico frente al receptor α del folato (FR α) que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 2, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 3, una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 4, una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 6, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 7 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica de la SEC. N.º ID: 8;

f. un anticuerpo aislado específico frente al receptor α del folato (FR α) producido por la estirpe celular depositada en la ATCC con número de acceso PTA-11887;

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, donde el método se realiza tras el tratamiento anticancerígeno del sujeto.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 24, donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, está marcado.
- 5 26. El método de la reivindicación 25, donde el marcaje es un marcaje radiactivo, un marcaje fluorescente, una etiqueta epitópica, biotina, un marcaje cromóforo, un marcaje EQL o una enzima.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 24, donde el receptor α del folato (FR α) expuesto está o no unido a una célula.
- 10 28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 24, donde la presencia de receptor α del folato (FR α) en la muestra se detecta mediante transferencia de Western, inmunohistoquímica, citometría de flujo, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (EQLIA) o ELISA.
- 15 29. Un kit para detectar la presencia de receptor α del folato (FR α) en una muestra biológica, que comprende al menos un anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 20 30. Un kit para detectar la presencia de receptor α del folato (FR α) en una muestra biológica, que comprende:
al menos un anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo;
donde el anticuerpo incluido, o fragmento de unión al antígeno del mismo, está fijado a un soporte sólido.
- 25 31. Un kit para detectar la presencia de receptor α del folato (FR α) en una muestra biológica, que comprende:
al menos un anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo;
30 donde el anticuerpo incluido, o fragmento de unión al antígeno del mismo, está marcado de manera que se puede detectar.
- 35 32. El método de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, donde la concentración de receptor α del folato (FR α) en el sujeto es indicativa del tipo de cáncer que padece el sujeto.
33. El método de la reivindicación 32, donde el cáncer es adenocarcinoma de pulmón o carcinoma de pulmón de células escamosas.
- 40 34. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 10, donde el anticuerpo está marcado de manera que se puede detectar.
- 45 35. El anticuerpo de la reivindicación 34, donde el marcaje detectable es un marcaje radiactivo, un marcaje fluorescente, una etiqueta epitópica, biotina, un marcaje cromóforo, un marcaje EQL o una enzima.
36. El anticuerpo de la reivindicación 35, donde el marcaje es rutenio, ^{111}In -DOTA, ácido ^{111}In -dietilentriaminopentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y β -galactosidasa o polihistidina.
- 50 37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21, donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, está fijado a un soporte sólido.
- 55 38. El método de la reivindicación 13 o 14, que además comprende la predicción de un desenlace clínico favorable para un sujeto que presenta adenocarcinoma con expresión del receptor α del folato (FR α), donde un desenlace clínico favorable se define como una tasa de supervivencia a los 5 años más elevada.

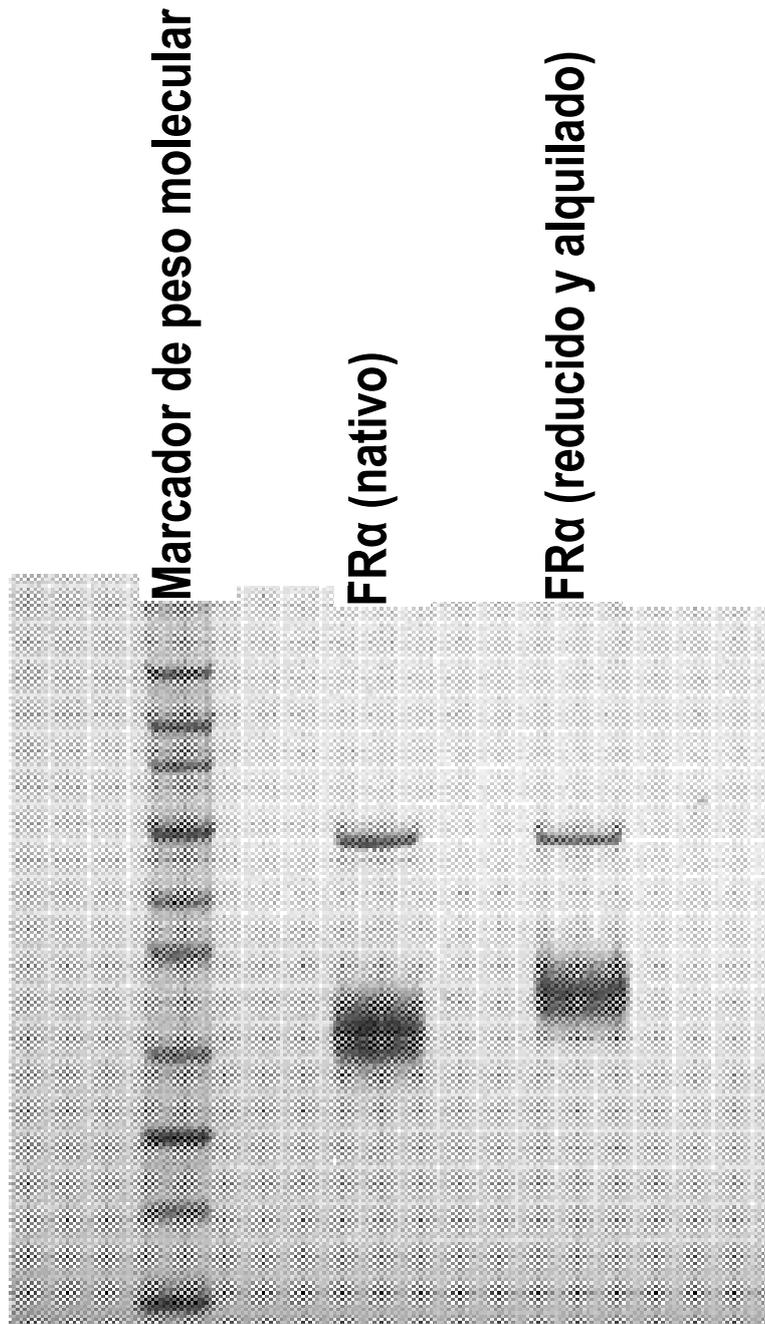


Figura 1

```

10 20 30 40 50 60
MAQRMTTQLL LLLVVAVVG EAQTRIAWAR TELLNVCMNA KHHKEKPGPE DKLHEQCRPW
RKNACCSINT SOEAHKDVSY LYRFNWNHCG HMAPACKRHF IQDTQLYECS PNLGPWIQQV
130 140 150 160 170 180
DQSWRKERVL NVPLCKEDCE QWVEDCRTSY TCKSNWHKGW NWTSGFNKCA VGAACQPFHF
190 200 210 220 230 240
YFPTPTVLCN EIWTHSYKVS NYSRSGRGI QMWFDPAQGN PNEEVARFYA AAMSGAGPWA
250
AWPFLLSLAL MLLWLLS (SEC. N.º ID: 1)

```

Leyenda

Residuos 1-24 (subrayado doble) = Secuencia de señal (no presente en rh-FRα)

Residuos 41-53 (sombreado) = Epítipo del AcM 9F3 (PTA-11887)

Residuos 68-80 y 92-105 (sombreado) = Epítipo del AcM 24F12 (PTA-11886)

Residuos 199-209 (sombreado) = Epítipo del AcM 26B3 (PTA-11885)

Residuos 236-257 (subrayado) = Secuencia de anclaje a GPI (no presente en rh-FRα)

Figura 2

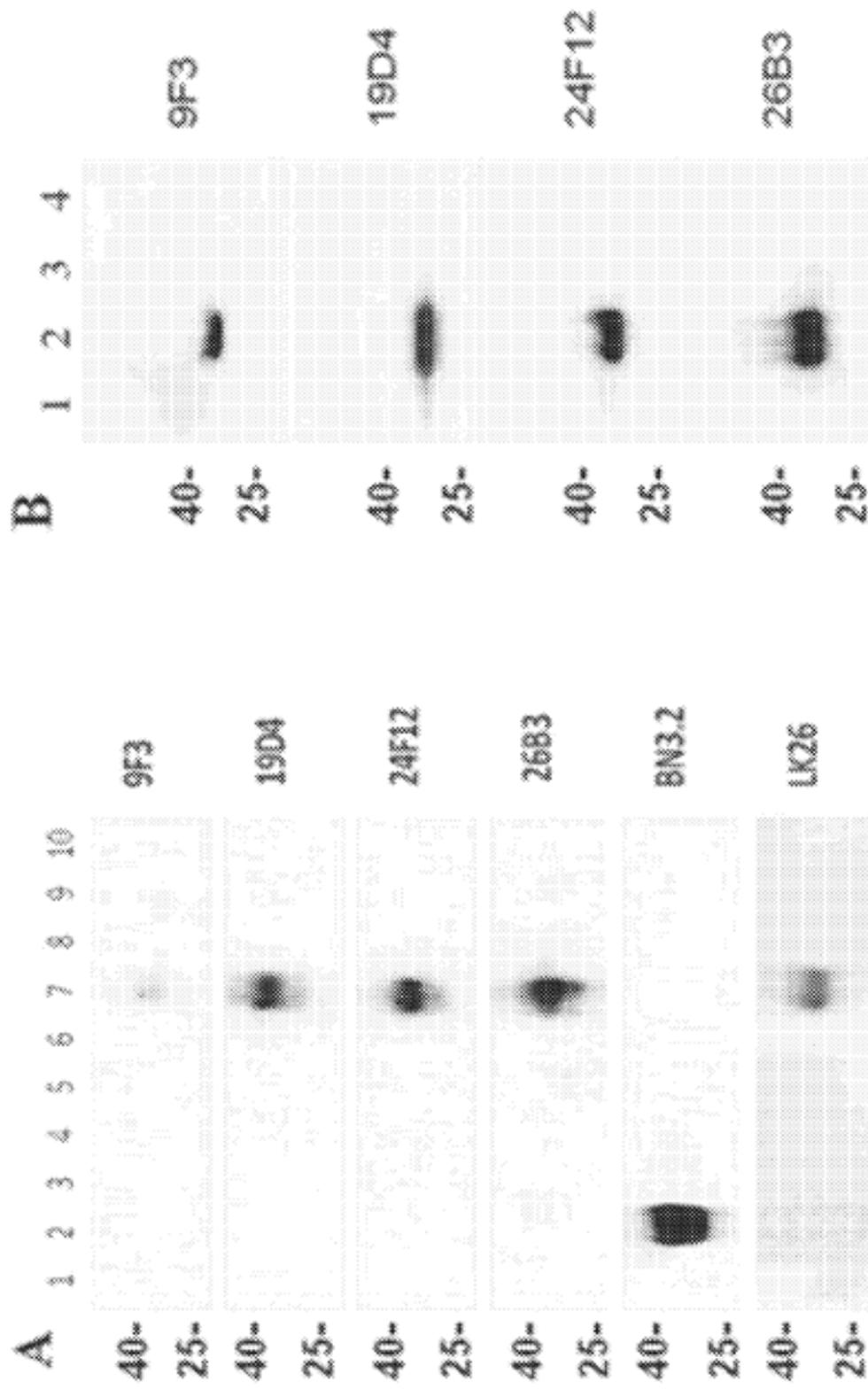


Figura 3

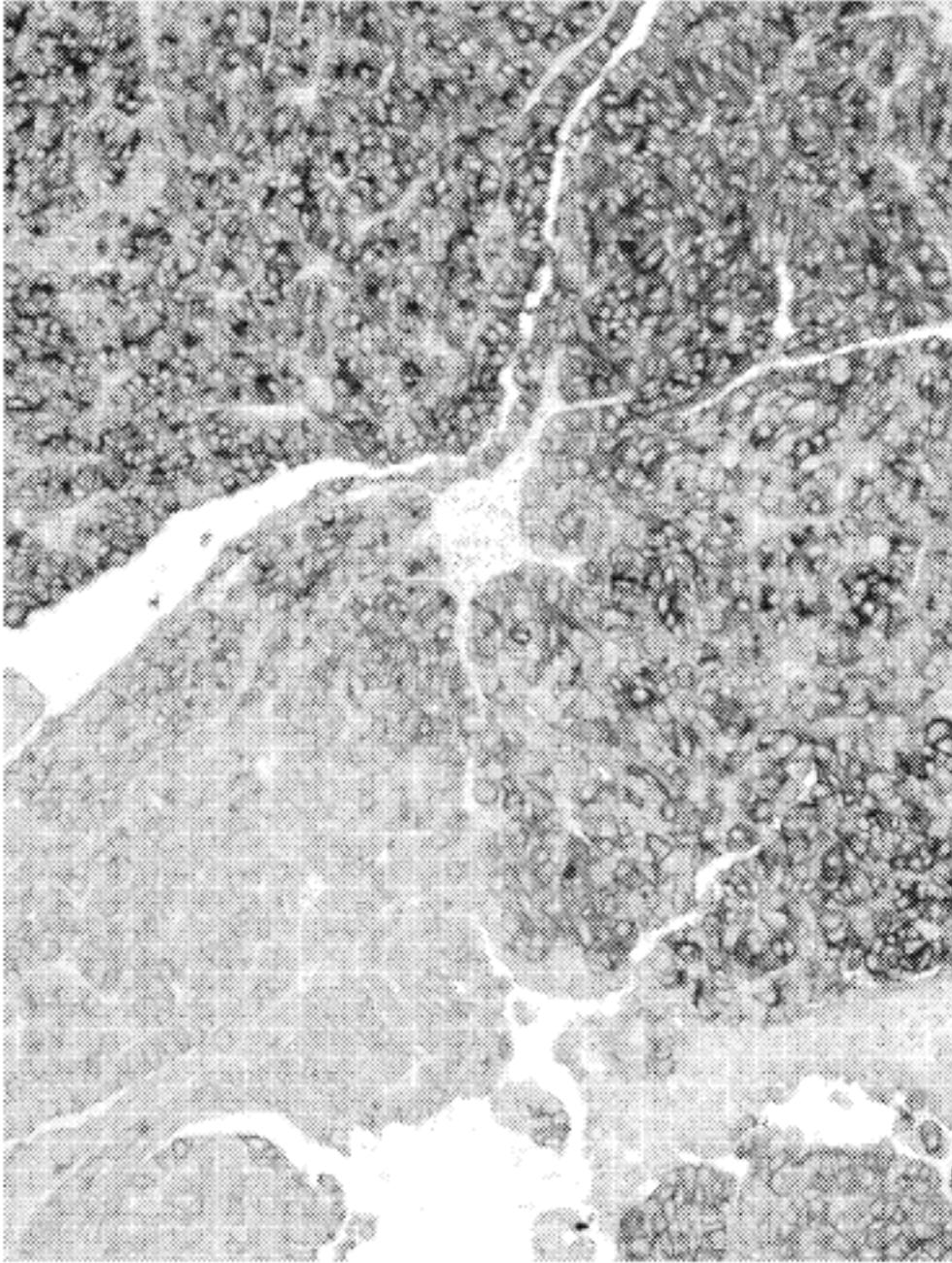
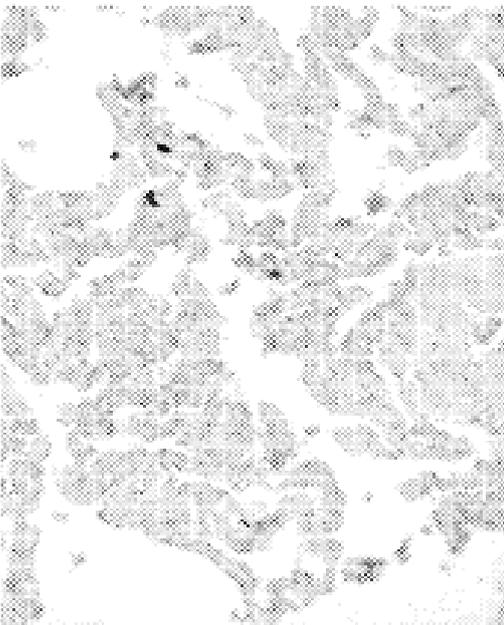


Figura 4



B.



A.

Figura 5

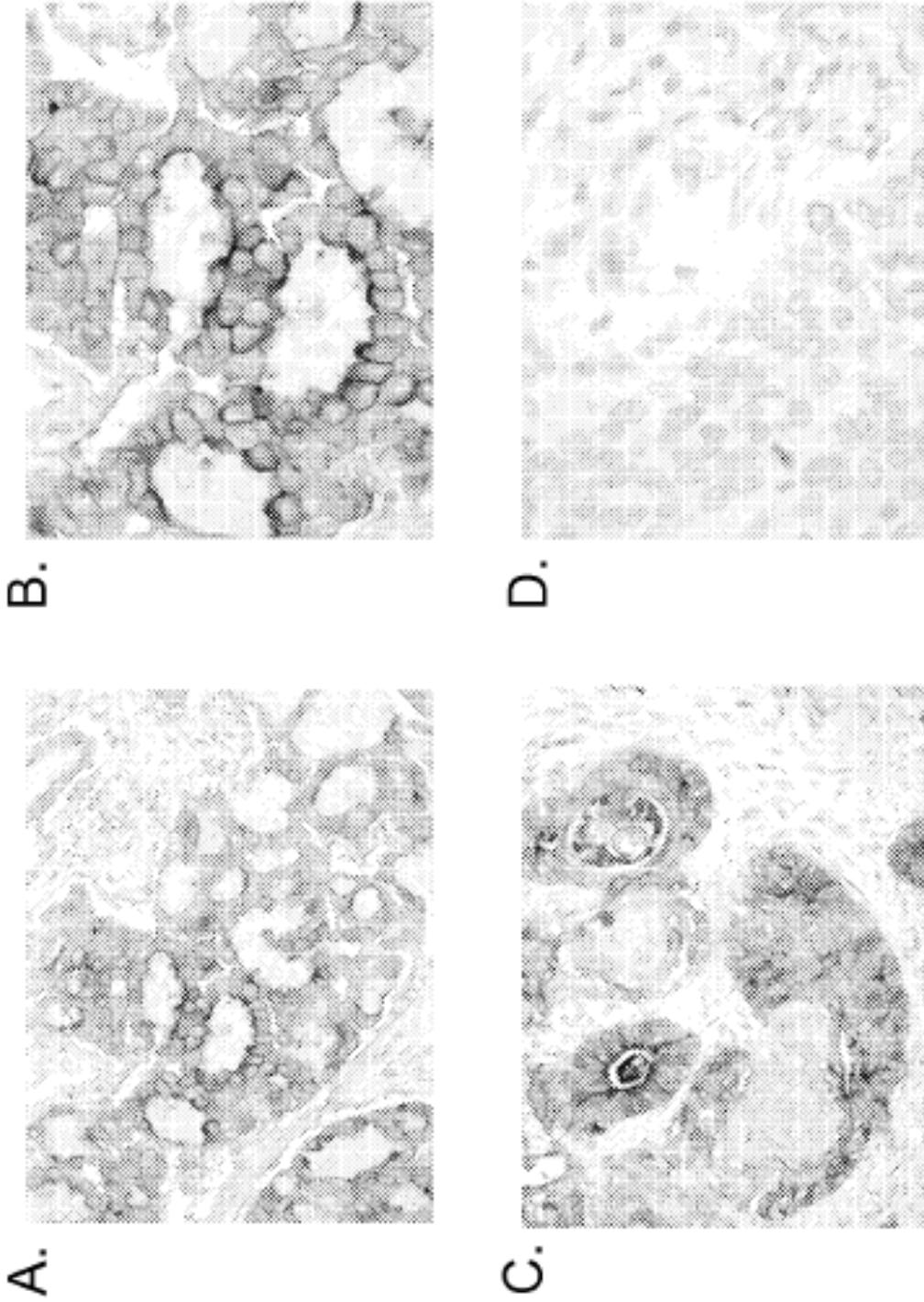


Figura 7

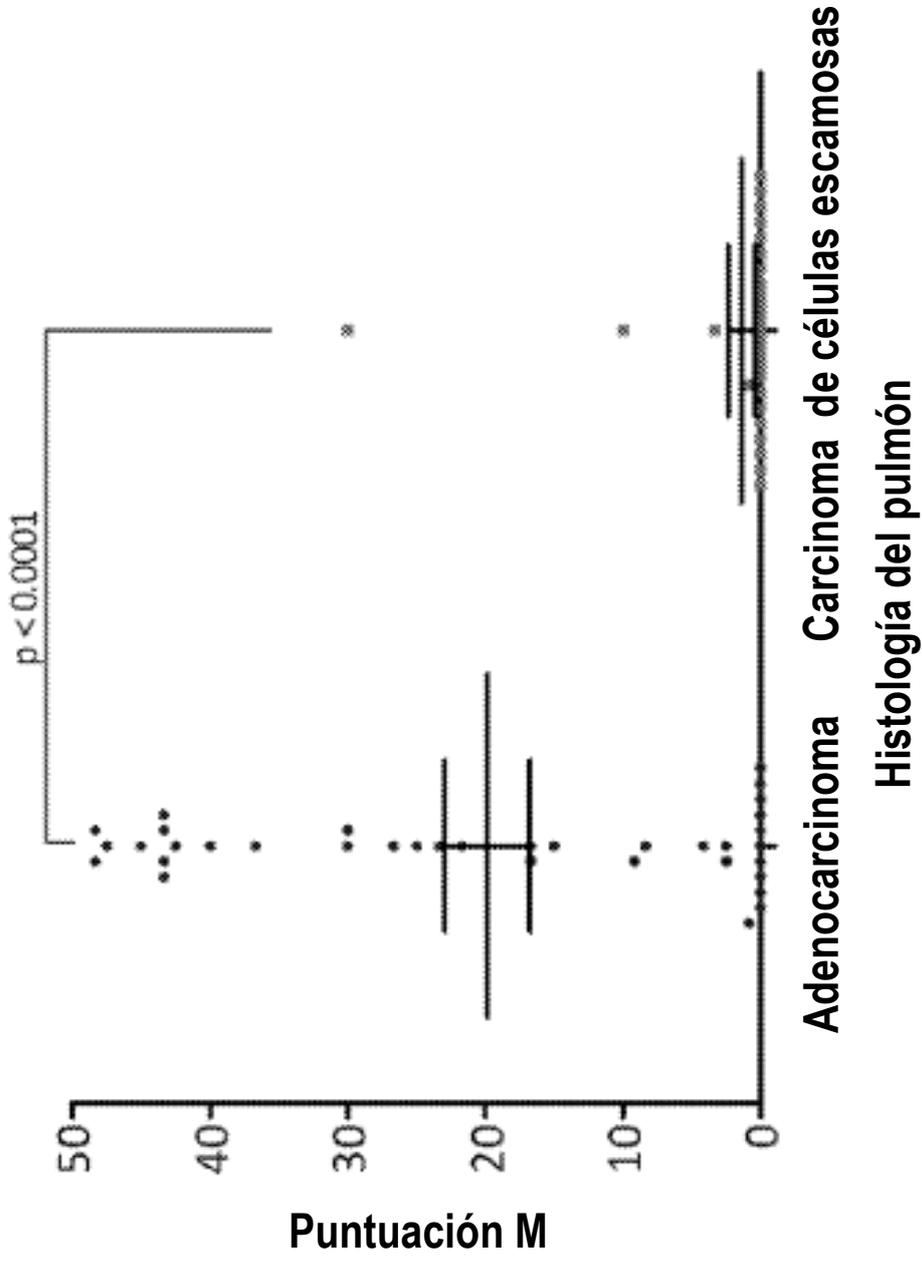


Figura 9

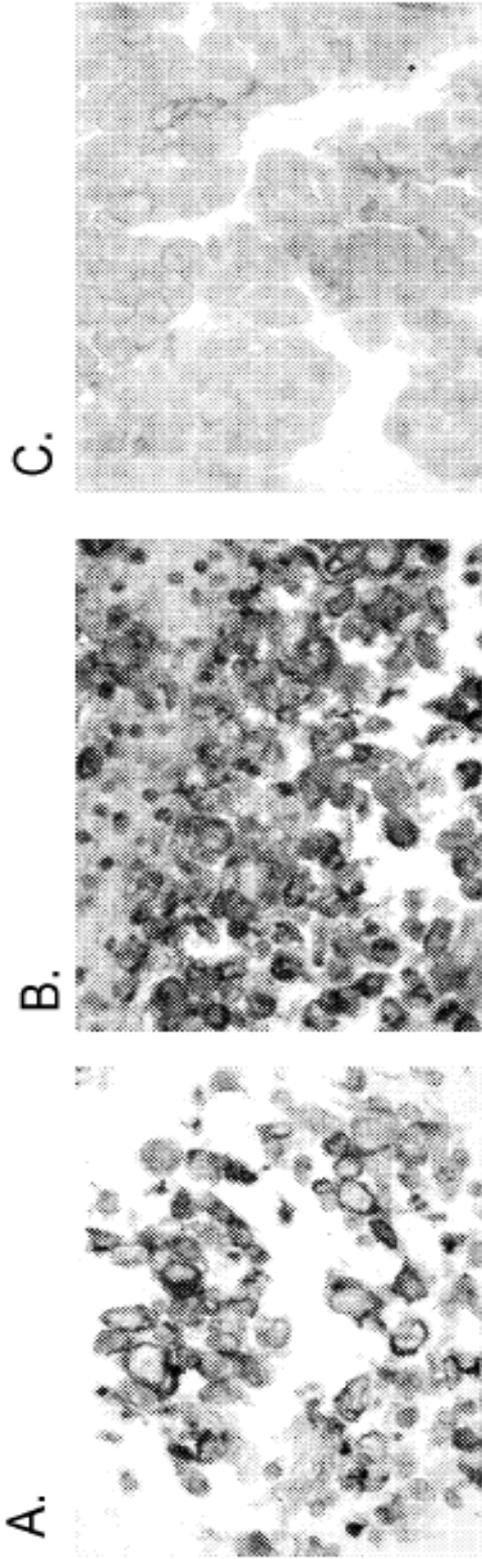


Figura 10

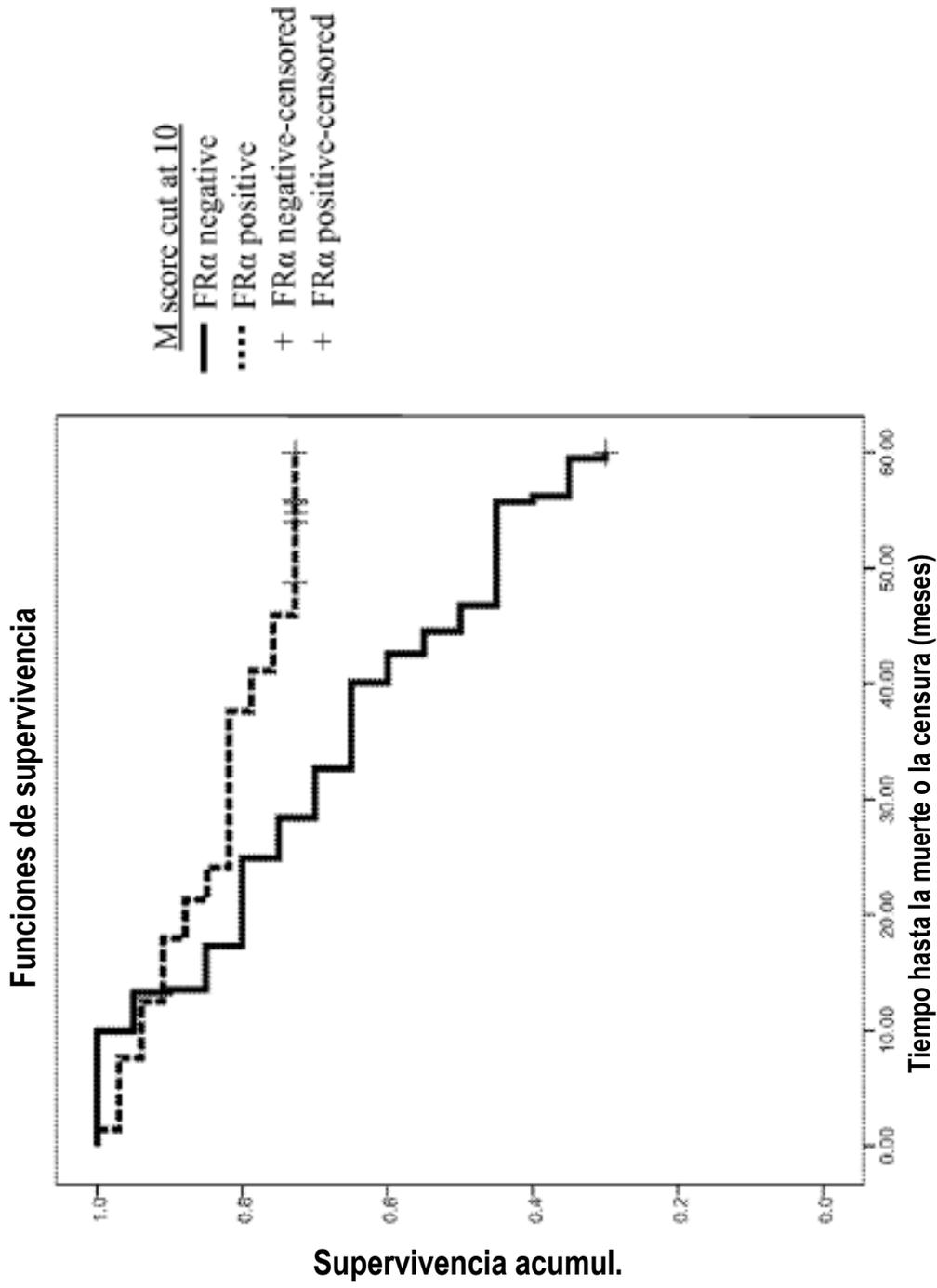


Figura 11

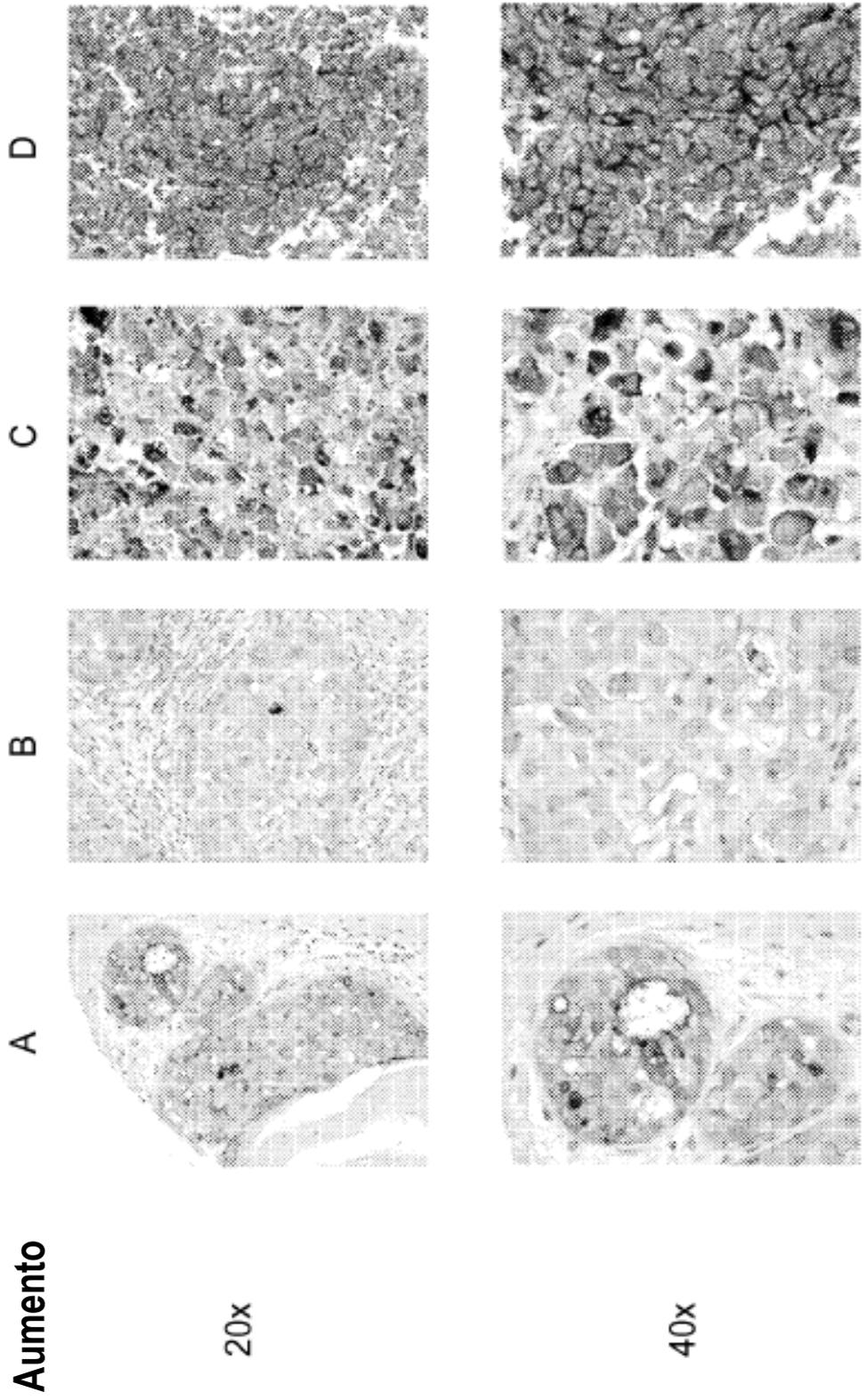


Figura 12

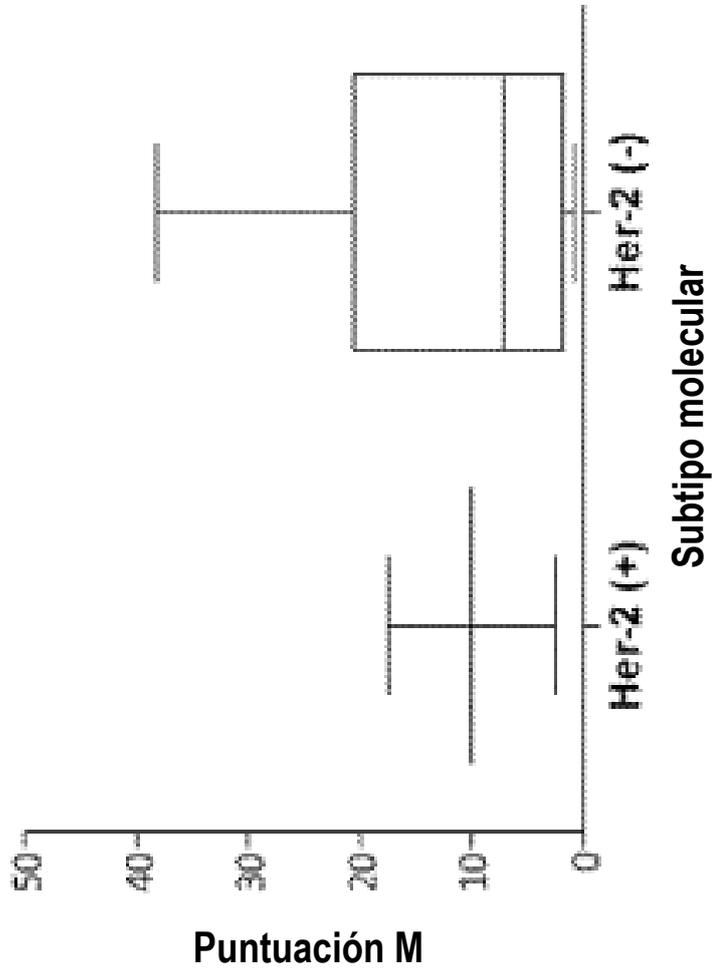


Figura 13

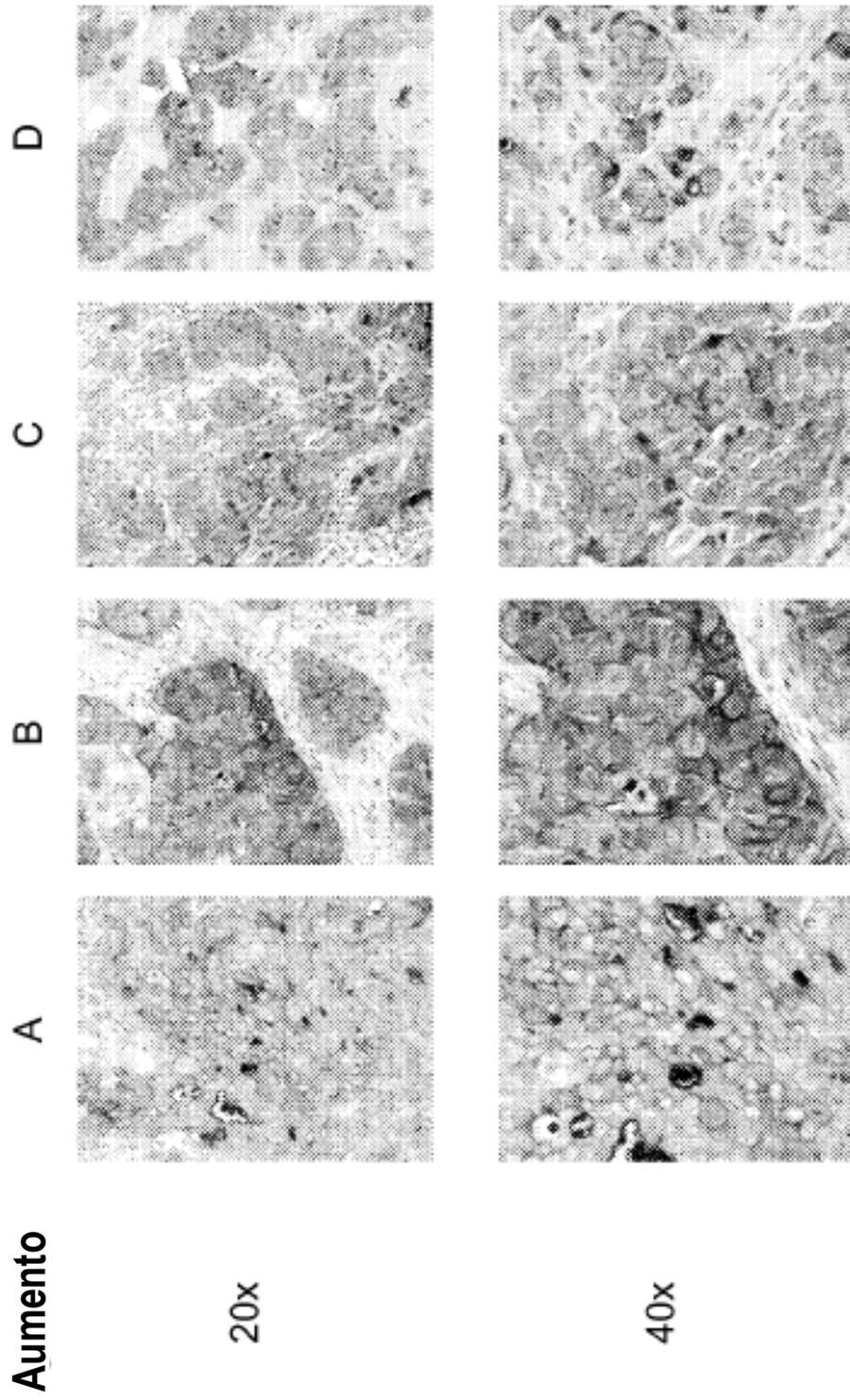


Figura 14

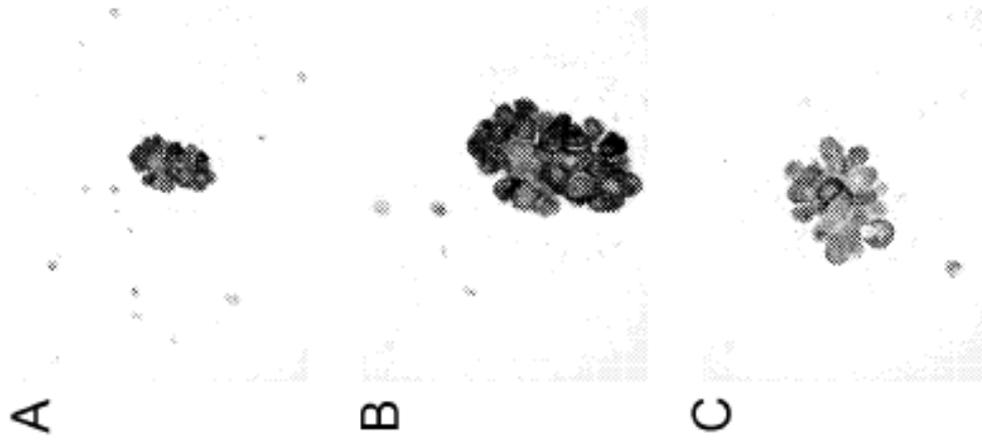
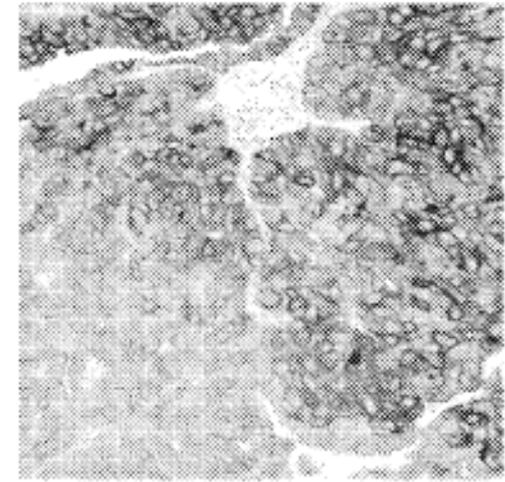
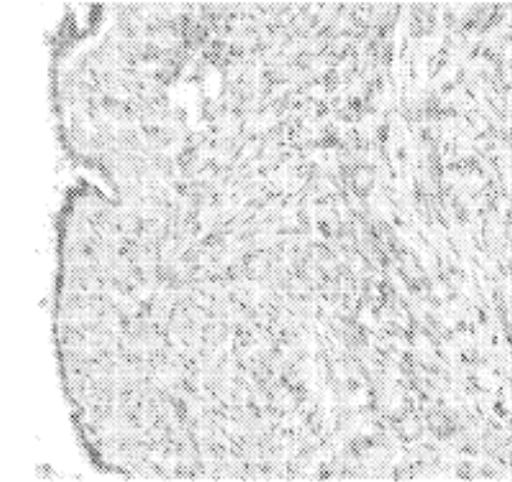


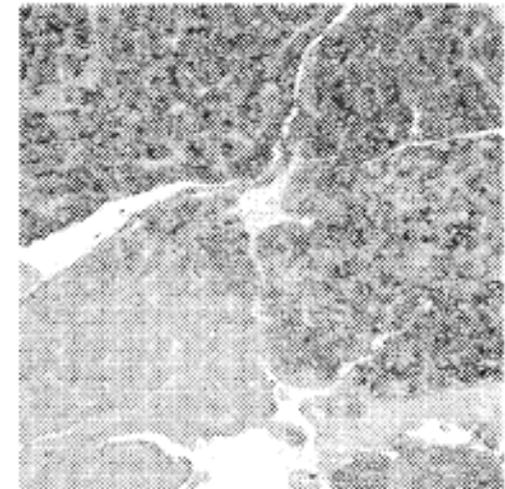
Figura 15



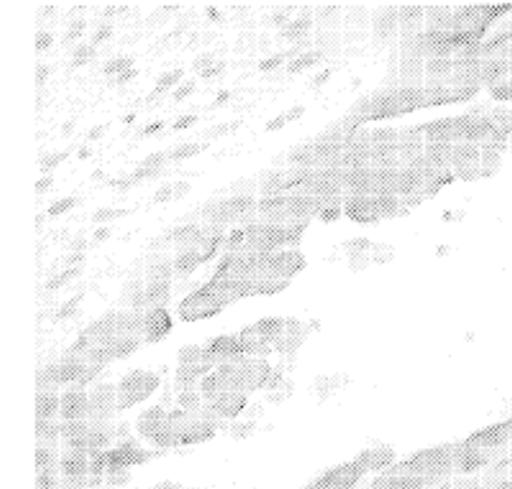
B



D



A



C

Figura 16

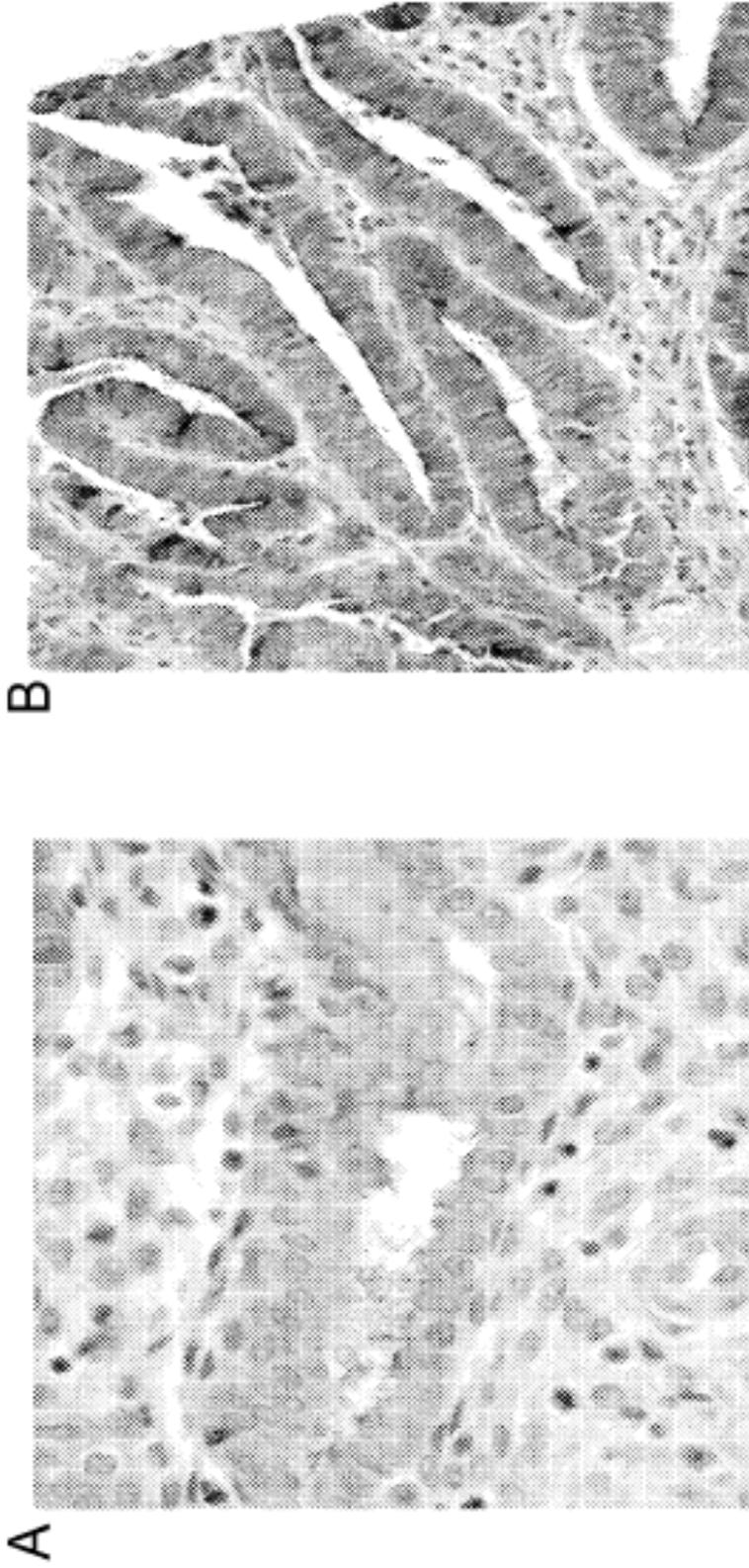


Figura 17

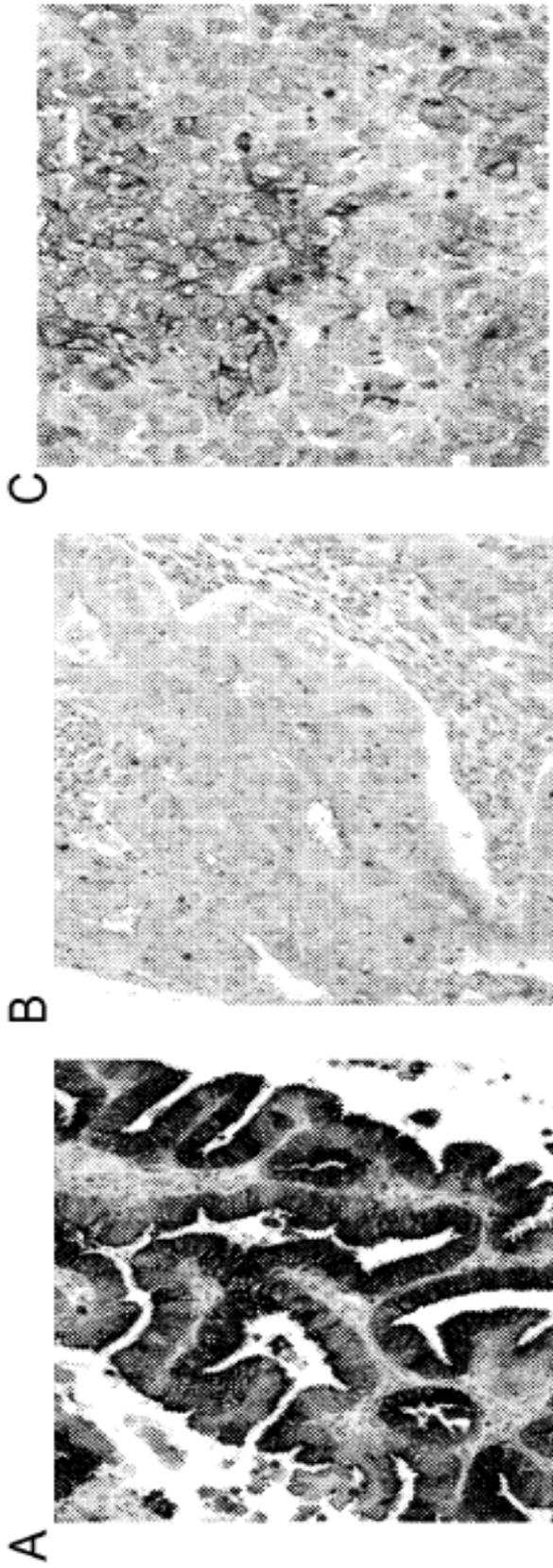
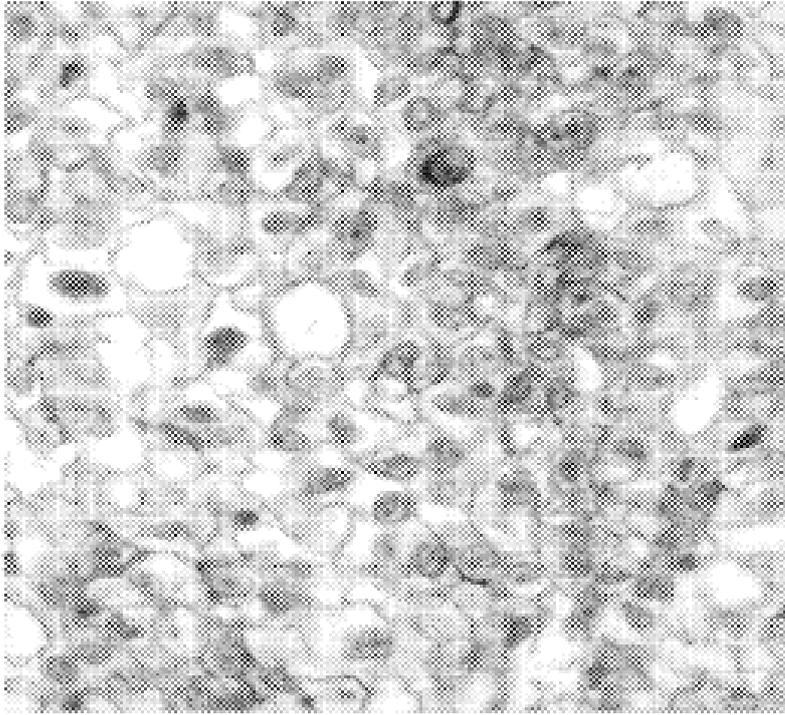
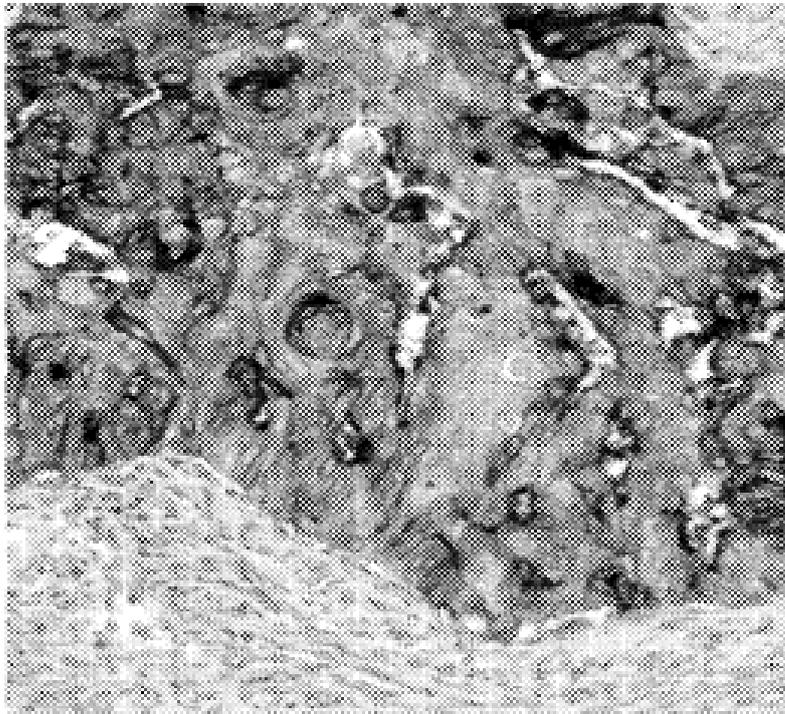


Figura 18



B



A

Figura 19

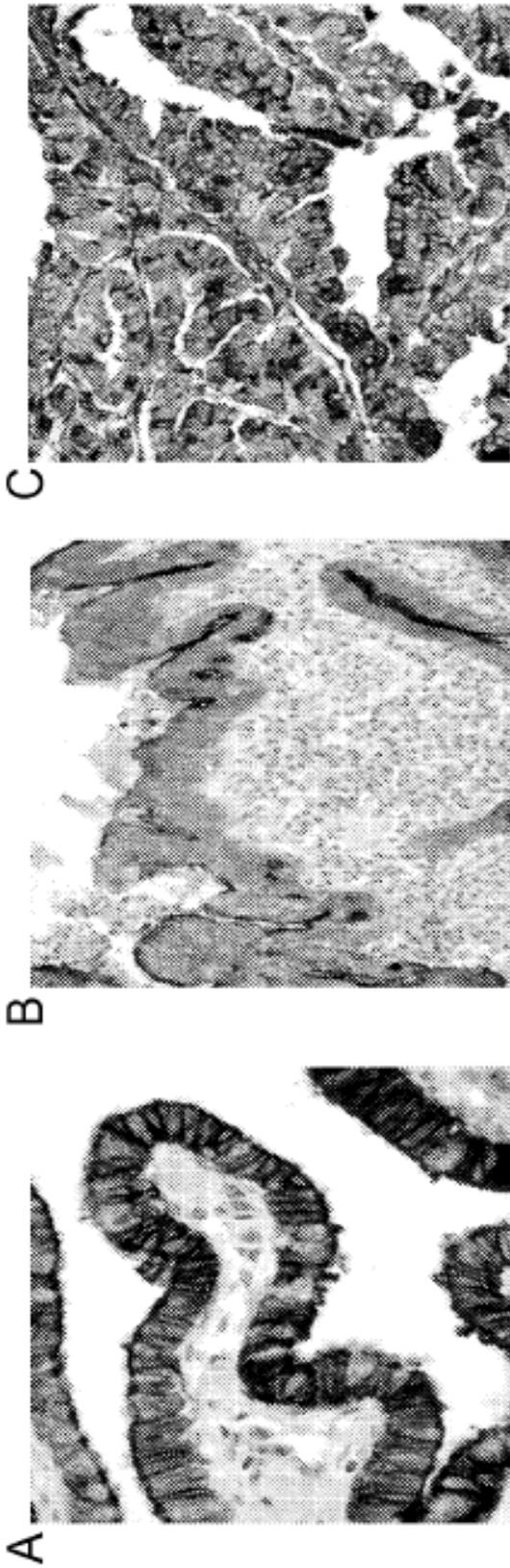


Figura 20

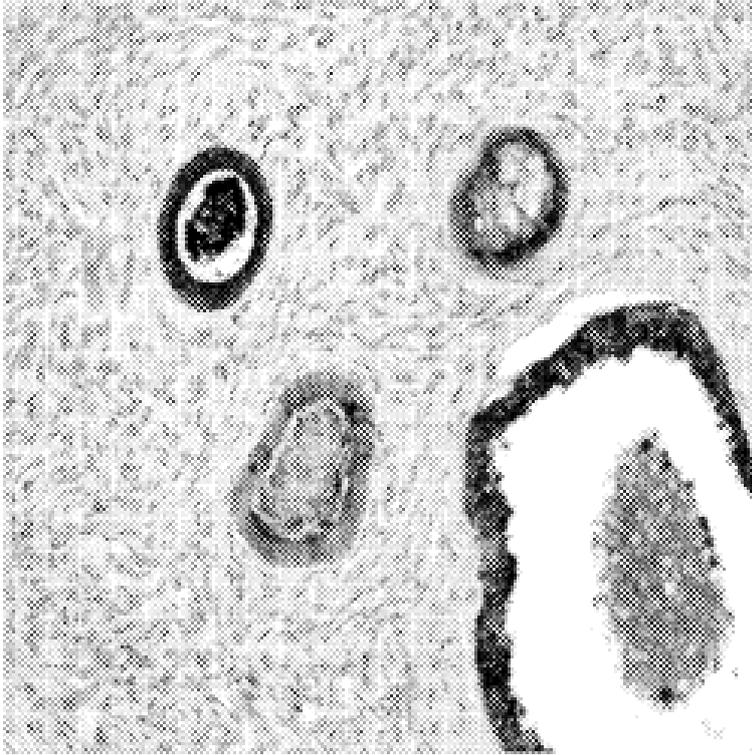


Figura 21