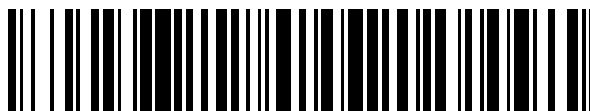


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 192**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 16186634 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3130605**

54 Título: **Folato receptor alfa como marcador diagnóstico y de pronóstico para cánceres que expresan folato receptor alfa**

30 Prioridad:

05.11.2010 US 410497 P

15.07.2011 US 201161508444 P

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

24.08.2020

73 Titular/es:

EISAI INC. (100.0%)

100 Tice Boulevard

Woodcliff Lake, NJ 07677, US

72 Inventor/es:

O'SHANNESY, DANIEL J.;

GRASSO, LUIGI;

WAN, SHANHONG;

CHAO, QIMIN y

SOMERS, ELIZABETH BROOKE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 780 192 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

Folato receptor alfa como marcador diagnóstico y de pronóstico para cánceres que expresan folato receptor alfa

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/410.497, presentada el 5 de noviembre de 2010 y la solicitud provisional de EE.UU. n° 61/508.444, presentada el 15 de julio, 2011.

Antecedentes de la invención

10 En los seres humanos, el receptor de alta afinidad para el folato aparece en tres isoformas: alfa, beta y gamma. Las formas alfa y beta típicamente se encuentran unidas a las membranas de las células mediante un anclaje de fosfatidilinositol de glicosilo (GPI). Se reciclan entre compartimentos extracelulares y endocíticos y son capaces de transportar el folato al interior de la célula. Las formas solubles de FR α se pueden derivar por la acción de proteasas o fosfolipasa en los receptores de folato anclados a membranas.

15 El receptor de folato alfa (también referido como FR α , FR-alfa, FOLR-1 o FOLR1) se expresa en una variedad de tejidos epiteliales, que incluyen los del plexo coroideo, pulmón, tiroides, riñón, útero, mama, trompa de Falopio, epidídimo, y las glándulas salivales. Weitman, SD et al. *Cancer Res* 52: 3396-3401 (1992); Weitman S.D. et al., *Cancer Res* 52: 6708-6711. La sobreexpresión de FR α se ha observado en varios tipos de cáncer, incluyendo el
 20 cáncer de pulmón (p.ej. carcinomas bronquioalveolares, tumores carcinoides, y cánceres de pulmón de célula no pequeña, tales como adenocarcinomas); mesotelioma; cáncer de ovario; cáncer renal; cáncer de cerebro (p.ej., ependimoma anaplásico, astrocitoma pilocítico juvenil cerebeloso, y metástasis cerebrales); cáncer de cuello uterino; cáncer nasofaríngeo; tumor derivado mesodérmicamente; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cáncer endometrial; adenocarcinomas endometrioides del ovario, cistoadenocarcinomas serosos, cáncer de mama; cáncer de vejiga; cáncer de páncreas; cáncer de hueso (p.ej., osteosarcoma de alto grado); cáncer de pituitaria (p.ej., adenomas de la pituitaria); cáncer colorrectal y cáncer de tiroides medular. Véase, p.ej., la Patente de EE.UU. N° 7.754.698; la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2005/0232919; 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); Fisher R.E. *J Nucl Med*, 49: 899-906 (2008); Franklin, WA et al. *Int J Cancer*, Suppl 8: 89-95-(1994); Hartman L.C. et al. *Int J Cancer* 121: 938-942 (2007); Iwakiri S et al. *Annals of Surgical Oncology*, 15 (3): 889-899; 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
 25 cánceres (p.ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), se asocia un mayor nivel de expresión FR α con un peor pronóstico, mientras que en otros tipos de cánceres (p.ej., cáncer de pulmón de célula no pequeña), un mayor nivel de expresión FR α se asocia con un mejor pronóstico. Véase, p.ej., Iwakiri S et al. *Annals of Surgical Oncology*, 15 (3): 889-899; Saba NF et al. *Head Neck*, 31 (4): 475-481 (2009).

35 Montovani et al. 1994 evalúa la distribución del receptor de folato alfa en fluidos biológicos, concluyendo en última instancia que no hay diferencia estadísticamente significativa en el nivel de receptor de folato alfa en la orina de sujetos con cáncer de ovario en comparación con el de sujetos sanos.

40 La detección temprana del cáncer mejora las tasas de supervivencia y la calidad de vida. Para mejorar la probabilidad de detección y tratamiento tempranos, existe una necesidad apremiante de métodos no invasivos para el diagnóstico de cáncer, para la determinación del nivel de riesgo de desarrollar cáncer, y para predecir la progresión del cáncer. La presente invención satisface estas necesidades de cánceres que expresan FR α .

Compendio de la invención

45 La presente invención queda definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier materia objeto identificada en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que excede el alcance de la invención tal como se representa a través de las reivindicaciones, no forma parte de la invención reivindicada, sino que sirve meramente como información adicional para comprender mejor la invención.

50 La presente invención proporciona métodos para evaluar si un sujeto está afectado por cánceres que expresan FR α como el cáncer de pulmón o de ovario en un sujeto afectado por cánceres que expresan FR α , métodos para evaluar la eficacia del tratamiento con MORAb-003 de cáncer de ovario o cáncer de pulmón, y kits para evaluar si un sujeto está afectado por cánceres que expresan FR α tales como cáncer de pulmón o de ovario, o para evaluar la progresión de cánceres que expresan FR α como el cáncer de pulmón o de ovario en un sujeto.

Métodos para evaluar si un sujeto está afectado por un cáncer que expresa FR α

55 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para evaluar si un sujeto está afectado por un cáncer que expresa FR α , mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a

una célula, en una muestra derivada del sujeto; y comparar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece un cáncer que expresa FR α ; en el que el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une a FR α . En una realización particular, la muestra es orina, suero, plasma o ascitis.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para evaluar si un sujeto está afectado con un cáncer que expresa FR α , mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula de una muestra de orina derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de orina derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra de orina derivada del sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece un cáncer que expresa FR α . En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para evaluar si un sujeto padece un cáncer que expresa FR α , determinando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de suero derivada del sujeto; y comparar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de suero derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra de suero derivada del sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece un cáncer que expresa FR α .

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, el cáncer que expresa FR α se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de cerebro, cáncer de cuello de útero, cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hueso, cáncer de pituitaria, cáncer colorrectal y cáncer de tiroides medular. En una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer que expresa FR α es cáncer de pulmón no microcítico, tal como un adenocarcinoma.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a métodos para evaluar si un sujeto padece cáncer de ovario, determinando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto, donde la presencia de FR α que no está unido a una célula en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9100 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario.

En varios aspectos de los anteriores aspectos de la invención, la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9500 pg/ml, de aproximadamente 10.000 pg/ml, de aproximadamente 11.000 pg/ml, aproximadamente 12.000 pg/ml, aproximadamente 13.000 pg/ml, aproximadamente 14.000 pg/ml, aproximadamente 15.000 pg/ml, aproximadamente 16.000 pg/ml, aproximadamente 17.000 pg/ml, aproximadamente 18.000 pg/ml, aproximadamente 19.000 pg/ml, o aproximadamente 20.000 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario.

En varios aspectos, el nivel de FR α se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une a FR α . Por ejemplo, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003;

(b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3;

(c) el anticuerpo MOV18;

(d) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18;

(e) el anticuerpo 548908;

(f) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 548908;

(g) el anticuerpo 6D398;

(h) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 6D398;

(i) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 26B3;

(j) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 55 (GYFMN) como CDRH1, SEQ ID NO: 56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 57 (GTHYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 51 (RTSENFYSYA) como CDRL1, SEQ ID NO: 52 (NAKTLAE) como CDRL2 y SEQ ID NO: 53 (QHYYAFPWT) como CDRL3;

(k) el anticuerpo 26B3;

- (l) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 19D4;
- (m) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 39 (HPYMH) como CDRH1, SEQ ID NO: 40 (RIDPANGNTKYDPKFQG) como CDRH2, SEQ ID NO: 41 (EEVADYTM DY) como CDRH3, SEQ ID NO: 35 (RASESVDTYGNNFIH) como CDRL1, SEQ ID NO: 36 (LASNLES) como CDRL2 y SEQ ID NO: 37 (QQNNGDPWT) como CDRL3;
- (n) el anticuerpo 19D4;
- (o) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3;
- (p) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 31 (SGYYWN) como CDRH1, SEQ ID NO: 32 (YIKSDGSNNYNPSLKN) como CDRH2, SEQ ID NO: 33 (EWKAMDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 27 (RASSTVSYSLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 28 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 29 (QQYSGYPLT) como CDRL3;
- (q) el anticuerpo 9F3;
- (r) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 24F12;
- (s) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 47 (SYAMS) como CDRH1, SEQ ID NO: 48 (EIGSGGSYTYYPDTVTG) como CDRH2, SEQ ID NO: 49 (ETTAGYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 43 (SASQGINNFLN) como CDRL1, SEQ ID NO: 44 (YTSSLHS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 45 (QHFSKLPWT) como CDRL3;
- (t) el anticuerpo 24F12;
- (u) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- (v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21);
- (w) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- (x) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); y
- (y) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

En una realización particular, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003. En otra realización, el anticuerpo incluye SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3. En otra realización, el anticuerpo es el anticuerpo MOV18. En aún otra realización, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18. En otra realización adicional, el anticuerpo comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16). Alternativamente o en combinación, el anticuerpo incluye una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21). En ciertas realizaciones, el anticuerpo incluye (i) la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW, Y (SEQ ID NO: 16); la cadena pesada de la región variable LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la cadena ligera de la región variable de LK26HuVKPW, Y (SEQ ID NO: 16); o la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW, Y (SEQ ID NO: 16).

En una realización particular, el nivel de FR_α en la muestra derivada de dicho sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un par de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado en un soporte sólido y marcado como anticuerpo MORAb-003; (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado en un soporte sólido y marcado como anticuerpo 24F12; (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado sobre un soporte sólido y marcado como anticuerpo 19D4; y (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado en un soporte sólido y marcado como anticuerpo 26B3.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, aficuerpo, avímero, versacuerpo, nanocuerpo y un dominio de anticuerpo. Alternativamente, o en

combinación, el anticuerpo está marcado, por ejemplo, con una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en un radiomarcador, un marcador de biotina, un marcador cromóforo, un marcador fluoróforo o un marcador enzimático.

5 En ciertas realizaciones, el nivel de FR α se determina mediante el uso de una técnica seleccionada del grupo que consiste en análisis de transferencia western, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, ensayo en fase de disolución, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) y ensayo ELISA.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la muestra de control es un nivel de control estandarizado de FR α en un sujeto sano.

10 En ciertas realizaciones, la muestra se trata con guanidina antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente o en combinación, la muestra se diluye antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente, o en combinación, la muestra se centrifuga, se agita con vórtex, o ambos, antes de determinar el nivel de FR α en la muestra.

15 En otro aspecto adicional, la presente invención está dirigida a un método para evaluar si un sujeto está afectado por cáncer de ovario, determinando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre los niveles de FR α en la muestra derivada del sujeto y en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario; en el que el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado en un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003, (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12, (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado en un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4, y (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado en un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3. Por ejemplo, la muestra puede ser orina, suero, plasma o ascitis.

Métodos de evaluación de la progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto

25 En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida a un método para evaluar la progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α , mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula, en una muestra derivada del sujeto; y comparar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control, en el que un aumento en el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer progresará rápidamente; y en el que una disminución en el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer progresará lentamente o retrocederá, evaluando de ese modo la progresión del cáncer que expresa FR α en el sujeto; en el que el nivel de FR α que no está unido a una célula en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une a FR α . En una realización particular, la muestra es orina, suero, plasma o ascitis.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para evaluar el progreso de un cáncer que expresa FR α en un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α , mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto; y comparando el nivel de folato receptor alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de orina derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, en el que un aumento en el nivel de FR α en la muestra de orina derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer progresará rápidamente; y en el que una disminución en el nivel de FR α en la muestra de orina derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer progresará lentamente o retrocederá, evaluando de ese modo la progresión del cáncer que expresa FR α en el sujeto.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para evaluar la progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α , mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de suero derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de suero derivada del sujeto con el nivel de FR α en la muestra de control, en el que un aumento en el nivel de FR α en la muestra de suero derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer avanzará rápidamente; y en el que una disminución en el nivel de FR α en la muestra de suero derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer progresará lentamente o retrocederá, evaluando de esta manera el progreso del cáncer que expresa FR α en el sujeto.

55 En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, el cáncer que expresa FR α se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer cerebral, cáncer de cuello de útero, cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hueso, cáncer de pituitaria, cáncer colorrectal y cáncer de tiroides medular. En una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer que expresa FR α es cáncer de pulmón no microcítico, tal como un adenocarcinoma.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a métodos para evaluar si un sujeto padece de cáncer de ovario, determinando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto, en el que la presencia de FR α que no está unido a una célula en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9100 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario.

5 En varios aspectos de los aspectos anteriores de la invención, la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9500 pg/ml, aproximadamente 10.000 pg/ml, aproximadamente 11.000 pg/ml, aproximadamente 12.000 pg/ml, aproximadamente 13.000 pg/ml, aproximadamente 14.000 pg/ml, aproximadamente 15.000 pg/ml, aproximadamente 16.000 pg/ml, aproximadamente 17.000 pg/ml, aproximadamente 18.000 pg/ml, aproximadamente 19.000 pg/ml, o aproximadamente 20.000 pg/ml es un indicio de que el sujeto
10 padece cáncer de ovario.

En varios aspectos, el nivel de FR α se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une a FR α . Por ejemplo, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003;
- 15 (b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3;
- (c) el anticuerpo MOV18;
- (d) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18;
- 20 (e) el anticuerpo 548908;
- (f) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 548908;
- (g) el anticuerpo 6D398;
- (h) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 6D398;
- (i) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 26B3;
- 25 (j) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 55 (GYFMN) como CDRH1, SEQ ID NO: 56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 57 (GTHYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 51 (RTSENFISYLA) como CDRL1, SEQ ID NO: 52 (NAKTLAE) como CDRL2 y SEQ ID NO: 53 (QHHYAFPWT) como CDRL3;
- (k) el anticuerpo 26B3;
- 30 (l) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 19D4;
- (m) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 39 (HPYMH) como CDRH1, SEQ ID NO: 40 (RIDPANGNTKYDPKFKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 41 (EEVADYTM DY) como CDRH3, SEQ ID NO: 35 (RASESVDTYGNFIH) como CDRL1, SEQ ID NO: 36 (LASNLES) como CDRL2 y SEQ ID NO: 37 (QQNNGDPWT) como CDRL3;
- 35 (n) el anticuerpo 19D4;
- (o) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3;
- (p) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 31 (SGYYWN) como CDRH1, SEQ ID NO: 32 (YIKSDGSNNYNPSLKN) como CDRH2, SEQ ID NO: 33 (EWKAMDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 27 (RASSTVSYSYLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 28 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 29 (QQYSGYPLT)
40 como CDRL3;
- (q) el anticuerpo 9F3;
- (r) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 24F12;
- (s) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 47 (SYAMS) como CDRH1, SEQ ID NO: 48 (EIGSGGSYTYYPDTVTG) como CDRH2, SEQ ID NO: 49 (ETTAGYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 43 (SASQGINNFLN) como CDRL1, SEQ ID NO: 44 (YTSSLHS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 45 (QHFSKLPWT)
45 como CDRL3;
- (t) el anticuerpo 24F12;

(u) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);

5 (v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21);

(w) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);

10 (x) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); y

(y) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

15 En una realización particular, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003. En otra realización, el anticuerpo incluye SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3. En otra realización, el anticuerpo es el anticuerpo MOV18. En otra realización adicional, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una
20 cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16). Alternativamente o en combinación, el anticuerpo incluye una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21). En ciertas realizaciones, el anticuerpo incluye (i) la región
25 variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); la región de cadena pesada variable LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); o la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

30 En una realización particular, el nivel de FR α en la muestra derivada de dicho sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un par de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003; (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado en un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12; (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado sobre un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4; y (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado en un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3.

35 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, aficuerpo, avímero, versacuerpo, nanocuerpo, y un dominio de anticuerpo. Alternativamente, o en combinación, el anticuerpo está marcado, por ejemplo, con una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en un radiomarcador, un marcador de biotina, un marcador cromóforo, un marcador fluoróforo o un marcador enzimático.

40 En ciertas realizaciones, el nivel de FR α se determina mediante el uso de una técnica seleccionada del grupo que consiste en el análisis de transferencia western, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, ensayo en fase de disolución, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) y ensayo ELISA.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la muestra de control es un nivel de control estandarizado de FR α en un sujeto sano. En otra realización, la muestra de control es una muestra previamente obtenida del sujeto.

45 En ciertas realizaciones, la muestra se trata con guanidina antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente o en combinación, la muestra se diluye antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente, o en combinación, la muestra se centrifuga, se agita con vórtex, o ambos, antes de determinar el nivel de FR α en la muestra.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para evaluar la progresión del cáncer de ovario en un sujeto que padece cáncer de ovario, determinando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra con el nivel de FR α en una muestra de control, en el que un aumento en el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer de ovario progresará rápidamente; y en el que una disminución en el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer de ovario progresará lentamente o retrocederá, evaluando con ello la progresión del cáncer de ovario en el sujeto; en el que el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con (a) anticuerpo
55

MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003, (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12, (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado en un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4, y (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado en un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3. Por ejemplo, la muestra puede ser orina, suero, plasma o ascitis.

5 *Métodos para clasificar un cáncer que expresa FR α en grupos de terapia de cáncer*

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para clasificar a un sujeto aquejado de un cáncer que expresa FR α en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no se une a una célula, en una muestra derivada del sujeto; y clasificar al sujeto en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer en base al nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula; en donde el nivel de FR α que no está unido a una célula en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une FR α . Por ejemplo, la muestra se selecciona del grupo que consiste en orina, suero, plasma o ascitis.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para clasificar a un sujeto aquejado de un cáncer que expresa FR α en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto; y clasificando al sujeto en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer en base al nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula de la muestra. En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida a métodos para clasificar a un sujeto aquejado de cáncer que expresa FR α en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de suero derivada del sujeto; y clasificando al sujeto en uno de al menos cuatro grupos de terapia del cáncer en base al nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de suero.

En diversas realizaciones de los anteriores aspectos de la invención, el cáncer que expresa FR α se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer cerebral, cáncer de cuello de útero, cáncer nasofaríngeo, carcinoma celular escamoso de la cabeza y cuello, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hueso, cáncer pituitario, cáncer colorrectal y cáncer medular tiroideo. En una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer que expresa FR α es cáncer de pulmón no microcítico, tal como un adenocarcinoma.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a métodos para evaluar si un sujeto está afectado por cáncer de ovario, determinando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto, en donde la presencia de FR α que no está unido a una célula en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9100 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece de cáncer de ovario.

En varios aspectos de los aspectos anteriores de la invención, la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9500 pg/ml, aproximadamente 10.000 pg/ml, aproximadamente 11.000 pg/ml, aproximadamente 12.000 pg/ml, aproximadamente 13.000 pg/ml, aproximadamente 14.000 pg/ml, aproximadamente 15.000 pg/ml, aproximadamente 16.000 pg/ml, aproximadamente 17.000 pg/ml, aproximadamente 18.000 pg/ml, aproximadamente 19.000 pg/ml, o aproximadamente 20.000 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario.

En varios aspectos, el nivel de FR α se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une FR α . Por ejemplo, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003;
- (b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3;
- (c) el anticuerpo MOV18;
- (d) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18;
- (e) el anticuerpo 548908;
- (f) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 548908;
- (g) el anticuerpo 6D398;
- (h) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 6D398;
- (i) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 26B3;

ES 2 780 192 T3

- (j) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 55 (GYFMN) como CDRH1, SEQ ID NO: 56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 57 (GTHYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 51 (RTSENFISYLA) como CDRL1, SEQ ID NO: 52 (NAKTLAE) como CDRL2 y SEQ ID NO: 53 (QHYYAFPWT) como CDRL3;
- 5 (k) el anticuerpo 26B3;
- (l) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 19D4;
- (m) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 39 (HPYMH) como CDRH1, SEQ ID NO: 40 (RIDPANGNTKYDPKFQG) como CDRH2, SEQ ID NO: 41 (EEVADYTMDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 35 (RASESVDTYGNFIH) como CDRL1, SEQ ID NO: 36 (LASNLES) como CDRL2 y SEQ ID NO: 37 (QQNNGDPWT) como CDRL3;
- 10 (n) el anticuerpo 19D4;
- (o) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3;
- (p) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 31 (SGYYWN) como CDRH1, SEQ ID NO: 32 (YIKSDGSNNYNPSLKN) como CDRH2, SEQ ID NO: 33 (EWKAMDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 27 (RASSTVSYSYLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 28 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 29 (QQYSGYPLT) como CDRL3;
- 15 (q) el anticuerpo 9F3;
- (r) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 24F12;
- (s) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 47 (SYAMS) como CDRH1, SEQ ID NO: 48 (EIGSGGSYTYYPDTVTG) como CDRH2, SEQ ID NO: 49 (ETTAGYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 43 (SASQGINNFLN) como CDRL1, SEQ ID NO: 44 (YTSSLHS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 45 (QHFSKLPWT) como CDRL3;
- 20 (t) el anticuerpo 24F12;
- (u) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- 25 (v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21);
- 30 (w) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- (x) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); y
- 35 (y) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

En una realización particular, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003. En otra realización, el anticuerpo incluye SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPMYT) como CDRL3. En otra realización, el anticuerpo es el anticuerpo MOV18. En otra realización adicional, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16). Alternativamente o en combinación, el anticuerpo incluye una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21). En ciertas realizaciones, el anticuerpo incluye (i) la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); la región de cadena pesada variable LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); o la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

40

45

50

En una realización particular, el nivel de FR α en la muestra derivada de dicho sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un par de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a

un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003; (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12; (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4; y (d) el anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3.

5 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, aficuerpo, avímero, versacuerpo, nanocuerpo, y un dominio de anticuerpo. Alternativamente, o en combinación, el anticuerpo está marcado, por ejemplo, con un marcador seleccionado del grupo que consiste de un radiomarcador, un marcador de biotina, un marcador cromóforo, un marcador fluoróforo, o un marcador enzimático.

10 En ciertas realizaciones, el nivel de FR α se determina mediante el uso de una técnica seleccionada del grupo que consiste en análisis de transferencia western, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, ensayo en fase de disolución, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) y ensayo ELISA.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la muestra de control es un nivel de control estandarizado de FR α en un sujeto sano.

15 En ciertas realizaciones, la muestra se trata con guanidina antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente o en combinación, la muestra se diluye antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente, o en combinación, la muestra se centrifuga, se agita con vórtex, o ambos, antes de determinar el nivel de FR α en la muestra.

En una realización particular, el sujeto se clasifica en cáncer de ovario de estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para clasificar un sujeto de cáncer ovario en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer determinando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada del sujeto; y clasificando el sujeto en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer en base al nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra; en el que el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto se evalúa mediante contacto de la muestra con
25 (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003, (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12, (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4, y (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3. Por ejemplo, la muestra puede ser orina, suero, plasma o ascitis.

Métodos para monitorizar la eficacia de tratamiento con MORAb-003 de cáncer de ovario o cáncer de pulmón

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método de monitorización de la eficacia de tratamiento con MORAb-003 de cáncer de ovario o cáncer de pulmón en un sujeto que padece de cáncer de ovario o cáncer de pulmón, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula, en una muestra derivada del sujeto, donde al sujeto se le ha administrado previamente MORAb-003; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control, en el
35 que un aumento en el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el tratamiento con MORAb-003 no es eficaz; y en el que una disminución en el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el tratamiento con MORAb-003 es eficaz. En realizaciones particulares, el nivel de FR α que no está unido a una célula en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo
40 que se une FR α . Por ejemplo, la muestra puede ser orina, suero, plasma o ascitis.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de monitorización de la eficacia del tratamiento con MORAb-003 de cáncer de ovario o cáncer de pulmón en un sujeto que padece de cáncer de ovario o cáncer de pulmón, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto, en el que se ha administrado previamente al sujeto MORAb-003;
45 y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de orina derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, en el que un aumento en el nivel de FR α en la muestra de orina derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el tratamiento con MORAb-003 no es eficaz; y en el que una disminución en el nivel de FR α en la muestra de orina derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el
50 tratamiento con MORAb-003 es eficaz.

En otro aspecto adicional, la presente invención está dirigida a un método de monitorización de la eficacia del tratamiento con MORAb-003 de cáncer de ovario o cáncer de pulmón en un sujeto que padece de cáncer de ovario o cáncer de pulmón, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de suero derivada del sujeto, en el que se ha administrado previamente al sujeto MORAb-
55 003; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de suero derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, en el que un aumento en el nivel de FR α en la muestra de suero derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el tratamiento con MORAb-003 no es eficaz; y en el que una disminución en el nivel de FR α en la muestra de

ES 2 780 192 T3

suero derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el tratamiento con MORAb-003 es eficaz.

En varios aspectos, el nivel de FR α se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une a FR α . Por ejemplo, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 (a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003;
- (b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3;
- 10 (c) el anticuerpo MOV18;
- (d) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18;
- (e) el anticuerpo 548908;
- (f) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 548908;
- (g) el anticuerpo 6D398;
- 15 (h) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 6D398;
- (i) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 26B3;
- (j) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 55 (GYFMN) como CDRH1, SEQ ID NO: 56 (RIFPYNGDIFYNQKFKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 57 (GTHYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 51 (RTSENIYSYLA) como CDRL1, SEQ ID NO: 52 (NAKTLAE) como CDRL2 y SEQ ID NO: 53 (QHYYAFPWT) como CDRL3;
- 20 (k) el anticuerpo 26B3;
- (l) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 19D4;
- (m) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 39 (HPYMH) como CDRH1, SEQ ID NO: 40 (RIDPANGNTKYDPKFQG) como CDRH2, SEQ ID NO: 41 (EEVADYTM DY) como CDRH3, SEQ ID NO: 35 (RASESVDTYGNNFIH) como CDRL1, SEQ ID NO: 36 (LASNLES) como CDRL2 y SEQ ID NO: 37 (QQNNGDPWT) como CDRL3;
- 25 (n) el anticuerpo 19D4;
- (o) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3;
- (p) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 31 (SGYYWN) como CDRH1, SEQ ID NO: 32 (YIKSDGSNNYNPSLKN) como CDRH2, SEQ ID NO: 33 (EWKAMDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 27 (RASSTVSYSYLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 28 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 29 (QQYSGYPLT) como CDRL3;
- 30 (q) el anticuerpo 9F3;
- (r) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 24F12;
- 35 (s) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 47 (SYAMS) como CDRH1, SEQ ID NO: 48 (EIGSGGSYTYYPDVTG) como CDRH2, SEQ ID NO: 49 (ETTAGYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 43 (SASQGINNFLN) como CDRL1, SEQ ID NO: 44 (YTSSLHS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 45 (QHFSKLPWT) como CDRL3;
- (t) el anticuerpo 24F12;
- 40 (u) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- (v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21);
- 45

(w) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);

(x) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); y

5 (y) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

10 En una realización particular, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003. En otra realización, el anticuerpo incluye SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3. En otra realización, el anticuerpo es el anticuerpo MOV18. En otra realización adicional, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16). Alternativamente o en combinación, el anticuerpo incluye una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21). En ciertas realizaciones, el anticuerpo incluye (i) la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); la región de cadena pesada variable LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); o la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

25 En una realización particular, el nivel de FR α en la muestra derivada de dicho sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un par de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003; (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12; (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4; y (d) el anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un humano anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, aficuerpo, avímero, versacuerpo, nanocuerpo, y un dominio de anticuerpo. Alternativamente, o en combinación, el anticuerpo está marcado, por ejemplo, con un marcador seleccionado del grupo que consiste de un marcador radiactivo, marcador de biotina, marcador cromóforo, marcador fluoróforo, o un marcador enzimático.

35 En ciertas realizaciones, el nivel de FR α se determina mediante el uso de una técnica seleccionada del grupo que consiste en análisis de transferencia western, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, ensayo en fase de disolución, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) y ensayo ELISA.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la muestra de control es un nivel de control estandarizado de FR α en un sujeto sano. En otra realización, la muestra de control es una muestra obtenida previamente del sujeto.

40 En ciertas realizaciones, la muestra se trata con guanidina antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente o en combinación, la muestra se diluye antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente, o en combinación, la muestra se centrifuga, se agita con vórtex, o ambos, antes de determinar el nivel de FR α en la muestra.

Métodos para predecir si un sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003

45 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir si un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α , como el cáncer de ovario o el cáncer de pulmón, responderá al tratamiento con MORAb-003, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003.

55 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir si un sujeto que padece cáncer que expresa FR α , como el cáncer de ovario o el cáncer de pulmón, responderá al tratamiento con MORAb-003, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de orina derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra de orina derivada del sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para predecir si un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α , como cáncer de ovario o cáncer de pulmón, responderá al tratamiento con MORAb-003, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de suero derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra de suero derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra de suero derivada del sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003.
- 10 En realizaciones adicionales, el cáncer que expresa FR α se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hueso, cáncer pituitario, cáncer colorrectal y cáncer de tiroides medular. En una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer de pulmón que expresa FR α es cáncer de pulmón de célula no pequeña, tal como adenocarcinoma.
- 15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para predecir si un sujeto que padece cáncer de ovario responderá al tratamiento con MORAb-003, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a células en una muestra de orina derivada del sujeto, en el que la presencia de FR α que no está unido a una célula en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9100 pg/ml es un indicio de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003.
- 20 En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9500 pg/ml, aproximadamente 10.000 pg/ml, aproximadamente 11.000 pg/ml, aproximadamente 12.000 pg/ml, aproximadamente 13.000 pg/ml, aproximadamente 14.000 pg/ml, aproximadamente 15.000 pg/ml, aproximadamente 16.000 pg/ml, aproximadamente 17.000 pg/ml, aproximadamente 18.000 pg/ml, aproximadamente 19.000 pg/ml, o aproximadamente 20.000 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario.
- 25 En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, el nivel de FR α se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une a FR α . Por ejemplo, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003;
 - 30 (b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3;
 - (c) el anticuerpo MOV18;
 - (d) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18;
 - 35 (e) el anticuerpo 548908;
 - (f) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 548908;
 - (g) el anticuerpo 6D398;
 - (h) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 6D398;
 - (i) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 26B3;
 - 40 (j) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 55 (GYFMN) como CDRH1, SEQ ID NO: 56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 57 (GTHYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 51 (RTSENFISYLA) como CDRL1, SEQ ID NO: 52 (NAKTLAE) como CDRL2 y SEQ ID NO: 53 (QHYYAFPWT) como CDRL3;
 - (k) el anticuerpo 26B3;
 - 45 (l) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 19D4;
 - (m) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 39 (HPYMH) como CDRH1, SEQ ID NO: 40 (RIDPANGNTKYDPKFQG) como CDRH2, SEQ ID NO: 41 (EEVADYTM DY) como CDRH3, SEQ ID NO: 35 (RASESVDTYGNNFIH) como CDRL1, SEQ ID NO: 36 (LASNLES) como CDRL2 y SEQ ID NO: 37 (QQNNGDPWT) como CDRL3;
 - 50 (n) el anticuerpo 19D4;

- (o) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3;
- (p) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 31 (SGYYWN) como CDRH1, SEQ ID NO: 32 (YIKSDGSNNYNPSLKN) como CDRH2, SEQ ID NO: 33 (EWKAMDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 27 (RASSTVSYSYLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 28 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 29 (QQYSGYPLT) como CDRL3;
- (q) el anticuerpo 9F3;
- (r) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 24F12;
- (s) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 47 (SYAMS) como CDRH1, SEQ ID NO: 48 (EIGSGGSYTYYPDTVTG) como CDRH2, SEQ ID NO: 49 (ETTAGYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 43 (SASQGINNFLN) como CDRL1, SEQ ID NO: 44 (YTSSLHS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 45 (QHFSKLPWT) como CDRL3;
- (t) el anticuerpo 24F12;
- (u) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- (v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21);
- (w) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- (x) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); y
- (y) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).
- En una realización particular, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003. En otra realización, el anticuerpo incluye SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPMYT) como CDRL3. En otra realización, el anticuerpo es el anticuerpo MOV18. En otra realización adicional, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16). Alternativamente o en combinación, el anticuerpo incluye una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21). En ciertas realizaciones, el anticuerpo incluye (i) la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); la región de cadena pesada variable LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); o la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).
- En una realización particular, el nivel de FR α en la muestra derivada de dicho sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un par de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003; (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12; (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4; y (d) el anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, aficuerpo, avímero, versacuerpo, nanocuerpo, y un dominio de anticuerpo. Alternativamente, o en combinación, el anticuerpo está marcado, por ejemplo, con un marcador seleccionado del grupo que consiste de un marcador radiactivo, marcador de biotina, marcador cromóforo, marcador fluoróforo, o un marcador enzimático.
- En ciertas realizaciones, el nivel de FR α se determina mediante el uso de una técnica seleccionada del grupo que consiste en análisis de transferencia western, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, ensayo en fase de disolución, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) y ensayo ELISA.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la muestra de control es un nivel de control estandarizado de FR α en un sujeto sano.

En ciertas realizaciones, la muestra se trata con guanidina antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente o en combinación, la muestra se diluye antes de determinar el nivel de FR α en la muestra.

5 Alternativamente, o en combinación, la muestra se centrifuga, se agita con vórtex, o ambos, antes de determinar el nivel de FR α en la muestra.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para predecir si un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α , como el cáncer de ovario o el cáncer de pulmón, responderá al tratamiento con MORAb-003, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre los niveles de FR α en la muestra derivada del sujeto y en la muestra de control es un indicio de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003; en el que el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003, (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12, (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4, y (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3. Por ejemplo, la muestra puede ser orina, suero, plasma o ascitis.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, el MORAb-003 para el tratamiento es (a) un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 8; (b) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003; o (c) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, la SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKKG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 4 (SVSSISSNNLH) como CDRL1, la SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3.

25 Métodos de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer de ovario o cáncer de pulmón

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que padece cáncer de ovario o cáncer de pulmón mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α), que no está unido a una célula, en una muestra derivada de dicho sujeto (por ejemplo, orina, suero, plasma o ascitis); y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra derivada de dicho sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario o cáncer de pulmón; y administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de MORAb-003 a dicho sujeto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que padece cáncer de ovario o cáncer de pulmón mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula, en una muestra de orina derivada de dicho sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra de orina derivada de dicho sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario o cáncer de pulmón; y administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de MORAb-003 a dicho sujeto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que padece cáncer de ovario o cáncer de pulmón mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula, en una muestra de suero derivada de dicho sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra de suero derivada de dicho sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario o cáncer de pulmón; y administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de MORAb-003 a dicho sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto que padece cáncer de ovario mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto, en donde la presencia de FR α que no está unido a una célula en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9100 pg/ml es un indicio de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003; y administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de MORAb-003 a dicho sujeto.

En realizaciones particulares, el nivel de FR α que no está unido a una célula en la muestra derivada de dicho sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une FR α .

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9500 pg/ml, aproximadamente 10.000 pg/ml, aproximadamente 11.000 pg/ml, aproximadamente 12.000 pg/ml, aproximadamente 13.000 pg/ml, aproximadamente 14.000 pg/ml, aproximadamente 15.000 pg/ml, aproximadamente 16.000 pg/ml, aproximadamente 17.000 pg/ml, aproximadamente

ES 2 780 192 T3

18.000 pg/ml, aproximadamente 19.000 pg/ml, o aproximadamente 20.000 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, el nivel de FR α se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une FR α . Por ejemplo, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 (a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003;
- 10 (b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3;
- (c) el anticuerpo MOV18;
- (d) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18;
- (e) el anticuerpo 548908;
- (f) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 548908;
- 15 (g) el anticuerpo 6D398;
- (h) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 6D398;
- (i) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 26B3;
- 20 (j) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 55 (GYFMN) como CDRH1, SEQ ID NO: 56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 57 (GTHYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 51 (RTSENFYSYLA) como CDRL1, SEQ ID NO: 52 (NAKTLAE) como CDRL2 y SEQ ID NO: 53 (QHYYAFPWT) como CDRL3;
- (k) el anticuerpo 26B3;
- (l) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 19D4;
- 25 (m) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 39 (HPYMH) como CDRH1, SEQ ID NO: 40 (RIDPANGNTKYDPKFQG) como CDRH2, SEQ ID NO: 41 (EEVADYTM DY) como CDRH3, SEQ ID NO: 35 (RASESVDTYGNNFIH) como CDRL1, SEQ ID NO: 36 (LASNLES) como CDRL2 y SEQ ID NO: 37 (QQNNGDPWT) como CDRL3;
- (n) el anticuerpo 19D4;
- (o) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3;
- 30 (p) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 31 (SGYYWN) como CDRH1, SEQ ID NO: 32 (YIKSDGSNNYNPSLKN) como CDRH2, SEQ ID NO: 33 (EWKAMDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 27 (RASSTVSYSYLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 28 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 29 (QQYSGYPLT) como CDRL3;
- (q) el anticuerpo 9F3;
- 35 (r) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 24F12;
- (s) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 47 (SYAMS) como CDRH1, SEQ ID NO: 48 (EIGSGGSYTYYPDVTG) como CDRH2, SEQ ID NO: 49 (ETTAGYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 43 (SASQGINNFLN) como CDRL1, SEQ ID NO: 44 (YTSSLHS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 45 (QHFSKLPWT) como CDRL3;
- 40 (t) el anticuerpo 24F12;
- (u) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- 45 (v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21);

(w) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);

(x) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); y

5 (y) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

En una realización particular, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003. En otra realización, el anticuerpo incluye SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPMYT) como CDRL3. En otra realización, el anticuerpo es el anticuerpo MOV18. En otra realización adicional, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16). Alternativamente o en combinación, el anticuerpo incluye una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21). En ciertas realizaciones, el anticuerpo incluye (i) la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); la región de cadena pesada variable LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); o la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

En una realización particular, el nivel de FR α en la muestra derivada de dicho sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un par de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003; (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12; (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4; y (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, aficuerpo, avímero, versacuerpo, nanocuerpo, y un dominio de anticuerpo. Alternativamente, o en combinación, el anticuerpo está marcado, por ejemplo, con un marcador seleccionado del grupo que consiste de un marcador radiactivo, marcador de biotina, marcador cromóforo, marcador fluoróforo, o un marcador enzimático.

En ciertas realizaciones, el nivel de FR α se determina mediante el uso de una técnica seleccionada del grupo que consiste en análisis de transferencia western, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, ensayo en fase de disolución, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) y ensayo ELISA.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, la muestra de control es un nivel de control estandarizado de FR α en un sujeto sano.

En ciertas realizaciones, la muestra se trata con guanidina antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente o en combinación, la muestra se diluye antes de determinar el nivel de FR α en la muestra. Alternativamente, o en combinación, la muestra se centrifuga, se agita con vórtex, o ambos, antes de determinar el nivel de FR α en la muestra.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece cáncer de ovario o cáncer de pulmón, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada del sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre los niveles de FR α en la muestra derivada del sujeto y la muestra de control es un indicio de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003; en el que el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo MORAb-003, (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 24F12, (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 19D4, y (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y etiquetado como anticuerpo 26B3. Por ejemplo, la muestra puede ser orina, suero, plasma o ascitis.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, el MORAb-003 para el tratamiento es (a) un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 8; (b) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003; o (c) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, la SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como

CDRH3, la SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, la SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3.

Kits

- 5 En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un kit para evaluar si un sujeto padece un cáncer que expresa FR α o para evaluar la progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto, el kit incluye medios para determinar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada del sujeto; e instrucciones para uso del kit para evaluar si el sujeto padece un cáncer que expresa FR α o para evaluar la progresión de un cáncer que expresa FR α . Por ejemplo, el cáncer que expresa FR α se selecciona del grupo que
- 10 consiste en cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hueso, cáncer pituitario, cáncer colorrectal y cáncer de tiroides medular. En una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario. En otra realización adicional, el cáncer que expresa FR α es cáncer de pulmón de célula no pequeña, por ejemplo, adenocarcinoma. En una realización adicional, la muestra es orina, suero, plasma o ascitis.
- 15 En una realización adicional, los medios incluyen un agente de unión de receptor de folato alfa (FR α), por ejemplo, un anticuerpo. En una realización adicional, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en
- (a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003;
 - (b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3;
 - (c) el anticuerpo MOV18;
 - (d) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18;
 - (e) el anticuerpo 548908;
 - 25 (f) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 548908;
 - (g) el anticuerpo 6D398;
 - (h) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 6D398;
 - (i) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 26B3;
 - (j) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 55 (GYFMN) como CDRH1, SEQ ID NO: 56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 57 (GTHYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 51 (RTSENFYSYLA) como CDRL1, SEQ ID NO: 52 (NAKTLAE) como CDRL2 y SEQ ID NO: 53 (QHYYAFPWT) como CDRL3;
 - 30 (k) el anticuerpo 26B3;
 - (l) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 19D4;
 - (m) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 39 (HPYMH) como CDRH1, SEQ ID NO: 40 (RIDPANGNTKYDPKFQG) como CDRH2, SEQ ID NO: 41 (EEVADYTM DY) como CDRH3, SEQ ID NO: 35 (RASESVDTYGNNFIH) como CDRL1, SEQ ID NO: 36 (LASNLES) como CDRL2 y SEQ ID NO: 37 (QQNNGDPWT) como CDRL3;
 - (n) el anticuerpo 19D4;
 - 40 (o) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3;
 - (p) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 31 (SGYYWN) como CDRH1, SEQ ID NO: 32 (YIKSDGSNNYNPSLKN) como CDRH2, SEQ ID NO: 33 (EWKAMDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 27 (RASSTVSYSLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 28 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 29 (QQYSGYPLT) como CDRL3;
 - 45 (q) el anticuerpo 9F3;
 - (r) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 24F12;
 - (s) un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 47 (SYAMS) como CDRH1, SEQ ID NO: 48 (EIGSGGSYTYYPDTVTG) como CDRH2, SEQ ID NO: 49 (ETTAGYFDY) como CDRH3, SEQ ID NO: 43

(SASQGINNFLN) como CDRL1, SEQ ID NO: 44 (YTSSLHS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 45 (QHFSKLPWT) como CDRL3;

(t) el anticuerpo 24F12;

5 (u) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);

(v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21);

10 (w) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);

(x) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); y

15 (y) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo está marcado, incluyendo, pero no limitado a, un marcador radiactivo, un marcador de biotina, un marcador cromóforo, un marcador fluoróforo, o un marcador enzimático.

En otra realización adicional, el kit incluye un medio para obtener una muestra del sujeto.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante la siguiente descripción detallada y las siguientes figuras.

20 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de un método de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) para evaluar FR α en orina, tal como se describe en los Ejemplos. El anticuerpo MOV18 unido a soportes sólidos se unió al FR α de la orina. El FR α fue detectado posteriormente por unión a anticuerpo MORAb-003 marcado con Ru.

25 La Figura 2 muestra la distribución de niveles de FR α en la orina de sujetos con cáncer de ovario y de sujetos de control normales, medidos mediante ECLIA (véase el Ejemplo 1).

La Figura 3 representa la detección de FR α en la orina de pacientes con cáncer de ovario (banda pálida en el carril 1, banda clara en el carril 2) usando inmunotransferencia (véase el Ejemplo 5).

30 La Figura 4 muestra la distribución de niveles de FR α en la orina de los sujetos con cáncer de ovario y los sujetos de control normales, medidos mediante ECLIA después de tratarse la orina con guanidina, tal como se describe en el Ejemplo 7.

35 La Figura 5 representa una curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de la medición ECLIA de niveles de FR α en orina después de que la orina fuera tratada con guanidina, tal como se describe en el Ejemplo 7. El área bajo la curva (AUC) mide la precisión del ensayo para separar los sujetos con cáncer de ovario de los sujetos de control. Se usó un valor de corte de 9100 pg/mL (por encima del cual se consideró los resultados de la prueba como anormales).

40 La Figura 6 muestra la distribución de niveles de FR α en sujetos con cáncer de ovario (OC) y en sujetos de control normales después de la corrección para los niveles de creatinina. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes de cáncer de ovario y los controles en los niveles corregidos para creatinina de FR α ($p=0,007$)-(véase el Ejemplo 8).

La Figura 7 representa un análisis ROC de los niveles de FR α corregidos para creatinina determinados usando ensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) de muestras de orina tratadas con guanidina (véase el Ejemplo 8).

45 La Figura 8 es una representación esquemática del método de inmunoensayo enzimático (EIA) utilizado para evaluar el nivel de FR α (es decir, FR α) en muestras, como se describe en el Ejemplo 9. MOV-18 actuó como el anticuerpo de captura, que se unió al FR α de fluidos biológicos. El FR α fue detectado mediante la unión a MORAb-003 biotinilado, que se detectó usando peroxidasa de rábano conjugada con avidina (avidina-HRP).

La Figura 9 representa los resultados obtenidos para la medición de FR α en suero utilizando procedimientos de incubación de uno y de dos pasos, como se describe en el Ejemplo 9.

La Figura 10 es una representación esquemática de las tres combinaciones diferentes de anticuerpos de captura y detector que se utilizaron con el método de inmunoensayo enzimático (EIA) para evaluar el nivel de FR α en plasma humano, como se describe en el Ejemplo 11.

5 La Figura 11 muestra las concentraciones plasmáticas de FR α (pg/ml) correspondientes a sujetos individuales determinadas utilizando EIA con tres combinaciones de anticuerpos de captura y detector, como se describe en el Ejemplo 11.

La Figura 12 representa la relación entre los valores de DO y las concentraciones de FR α (véase el Ejemplo 11).

La Figura 13 muestra la distribución de concentraciones de FR α en plasma en sujetos con cáncer de ovario y en sujetos de control normales, determinada mediante EIA (véase el Ejemplo 12).

10 La Figura 14 representa la correlación entre concentraciones plasmáticas de FR α determinadas utilizando EIA y ECLIA (véase el Ejemplo 12).

La Figura 15 muestra las correlaciones entre las medidas ECLIA de niveles de FR α en suero y orina. La correlación para pacientes con cáncer fue de $r=0,24$ (panel superior) y la correlación para los pacientes con cáncer de ovario fue de $r=-0,76$ (panel inferior) (véase el Ejemplo 13).

15 La Figura 16 muestra la correlación de los niveles de FR α en suero frente a plasma para los ensayos llevados a cabo usando el par 1 (véase el Ejemplo 16).

La Figura 17 muestra la correlación de los niveles de FR α en suero frente a plasma para los ensayos llevados a cabo usando el par 2 (véase el Ejemplo 16).

20 La Figura 18 muestra la correlación de los niveles en suero de FR α para los ensayos llevados a cabo usando el par 1 frente al par 2 (véase el Ejemplo 16).

La Figura 19 muestra la correlación de los niveles en plasma de FR α para los ensayos llevados a cabo usando el par 1 frente al par 2 (véase el Ejemplo 16).

La Figura 20 muestra la correlación intradía de niveles en suero de FR α para los ensayos llevados a cabo usando el par 2 (Ejemplo 16).

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que el receptor de folato alfa (FR α), no unido a una célula, se encuentra en niveles elevados en los fluidos corporales, por ejemplo, orina o suero, de un sujeto que tiene un cáncer que expresa FR α tal como cáncer de pulmón o de ovario en comparación con una muestra de control. Además, la presente invención se basa, al menos en parte, en la identificación de un ensayo inmunológico que exhibe la sensibilidad necesaria para la evaluación de niveles de FR α en muestras, donde intentos previos han fallado repetidamente. Como resultado, la presente invención proporciona métodos para diagnosticar un cáncer que expresa FR α mediante la evaluación de los niveles de un FR α no unido a una célula en muestras derivadas del sujeto. De hecho, la presente invención supera los retos observados durante los intentos previos para desarrollar un ensayo de diagnóstico basado en FR α para cánceres que expresan FR α , tales como el cáncer de ovario, proporcionando un ensayo inmunológico capaz de evaluar con precisión los niveles de FR α no unido a una célula en las muestras.

Por consiguiente, se proporcionan los métodos y kits para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer que expresa FR α y, además, para evaluar la progresión del cáncer que expresa FR α . En diversas realizaciones, los métodos implican la comparación de niveles de FR α no unido a una célula en muestras, por ejemplo, orina y suero, en comparación con los niveles de control, en la evaluación de la presencia, el grado o el riesgo de desarrollo de cáncer de ovario en el sujeto. En realizaciones particulares, los métodos implican el uso del anticuerpo MORAb-003, anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003 o anticuerpos que tienen la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, la SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 4 (SVSSISSNNLH) como CDRL1, la SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPMYT) como CDRL3, en la evaluación de los niveles de FR α no unido a una célula en una muestra, por ejemplo, orina o suero. Alternativamente o adicionalmente, el anticuerpo MOV18 o un anticuerpo que se une al mismo epítipo del anticuerpo MOV18, el anticuerpo 548908, un anticuerpo que se une al mismo epítipo del anticuerpo 548908, el anticuerpo 6D398 o un anticuerpo que se une al mismo epítipo del anticuerpo 548908, pueden utilizarse de acuerdo con los métodos de la presente invención.

50 En las siguientes subsecciones se describen varios aspectos de la invención con más detalle:

I. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado en esta sección.

Los artículos "un" y "una" se usan aquí para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a humanos y a animales no humanos, incluyendo sujetos veterinarios. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ratones, conejos, ovejas, perro, gato, caballo, vaca, pollos, anfibios y reptiles. En una realización preferida, el sujeto es un humano.

Los términos "cáncer" o "tumor" son bien conocidos en la técnica y se refieren a la presencia, por ejemplo, en un sujeto, de células que poseen características típicas de células causantes de cáncer, tales como la proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, rápido crecimiento y velocidad de proliferación, y ciertas propiedades morfológicas características. Las células cancerosas a menudo se encuentran en la forma de un tumor, pero dichas células pueden existir solas dentro de un sujeto, o pueden ser células cancerosas no tumorigénicas, tales como células de leucemia. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cáncer" incluye los cánceres pre-malignos, así como los cánceres malignos.

Tal como se usa en este documento, un "cáncer que expresa FR α " incluye cualquier tipo de cáncer caracterizado porque las células cancerosas expresan FR α . En realizaciones concretas, el cáncer que expresa FR α incluye condiciones cancerosas que se caracterizan porque las células cancerosas son capaces de secretar, derramar, exportar o liberar FR α de tal manera que se pueden detectar niveles elevados de FR α en una muestra biológica del sujeto. Los cánceres que expresan FR α incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinomas bronquioalveolares, tumores carcinoides, y cáncer de pulmón de célula no pequeña, tales como adenocarcinomas); mesotelioma; cáncer de ovarios; cáncer renal; cáncer de cerebro (por ejemplo, ependimoma anaplásico y astrocitoma pilocítico juvenil cerebeloso); cáncer de cuello uterino; cáncer de la nasofaringe; tumor derivado de mesodermo; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cáncer endometrial; adenocarcinomas de endometrio del ovario, cistadenocarcinomas serosos, cáncer de mama; cáncer de vejiga; cáncer de páncreas; cáncer de hueso (por ejemplo, osteosarcoma de alto grado); cáncer de pituitaria (por ejemplo, adenoma de la pituitaria). Véase por ejemplo, la Patente de EE.UU. N^o 7.754.698; la Solicitud de Patente de EE.UU. N^o 2005/0232919; 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); Franklin, W.A. et al. *Int J Cancer*, Suppl 8: 89-95 (1994); Hartman L.C. et al. *Int J Cancer* 121: 938-942 (2007); Iwakiri S et al. *Annals of Surgical Oncology*, 15 (3): 889-899; Weitman, S.D. 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 una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer que expresa FR α es cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón de célula no pequeña. En otras realizaciones, el cáncer que expresa FR α es cáncer colorrectal y cáncer de tiroides medular.

Tal como se usa en la presente memoria, un sujeto que "padece un cáncer que expresa FR α " es uno que ha sido diagnosticado clínicamente con dicho cáncer por un médico cualificado (por ejemplo, mediante los métodos de la presente invención), o uno que exhibe uno o más signos o síntomas de un cáncer (por ejemplo, niveles elevados de FR α en fluidos biológicos), y que es diagnosticado clínicamente posteriormente con dicho cáncer por un médico cualificado (por ejemplo, mediante los métodos de la presente invención). Un sujeto no humano, que sirve como un modelo animal de cáncer que expresa FR α , también puede caer dentro del alcance de la expresión de un sujeto "que padece un cáncer que expresa FR α ".

El término "cáncer de ovario" se refiere a la enfermedad reconocida en la técnica e incluye cada uno de cáncer de ovario epitelial (EOC; >90% de cáncer de ovario en los países occidentales), tumores de células germinales (aproximadamente 2-3% de cáncer de ovario), y el cáncer de ovario del estroma. El cáncer de ovario se clasifica en diferentes grupos basados en la diferenciación del tejido tumoral. En el grado I, el tejido tumoral está bien diferenciado. En el grado II, el tejido tumoral está moderadamente bien diferenciado. En el grado III, el tejido tumoral está pobremente diferenciado. Este grado se correlaciona con un pronóstico menos favorable que los grados I y II.

El cáncer de ovario se clasifica en diferentes estadios en base a la propagación del cáncer. El estadio I se limita generalmente dentro de la cápsula que rodea un ovario (estadio IA) o ambos ovarios (estadio IB), aunque en algunos cánceres de estadio I (a saber, estadio IC), las células malignas pueden ser detectadas en la ascitis, en el líquido de enjuague peritoneal, o en la superficie de los ovarios. El estadio II implica la extensión o metástasis del tumor a partir de uno o ambos ovarios a otras estructuras pélvicas. En el estadio IIA, el tumor se extiende o se ha metastatizado al útero, las trompas de Falopio, o ambos. El estadio IIB implica la extensión del tumor a la pelvis. El estadio IIC es el estadio IIA o IIB en el que las células malignas pueden ser detectadas en la ascitis, en el líquido de enjuague peritoneal, o en la superficie de los ovarios. En el estadio III, el tumor comprende al menos una extensión maligna al intestino delgado o el epiplón, se han formado implantes peritoneales extrapélvicos de tamaño microscópico (estadio IIIA) o macroscópico (<2 centímetros de diámetro, estadio IIIB; > 2 centímetros de diámetro, estadio IIIC), o se ha metastatizado a un ganglio linfático inguinal o retroperitoneal (un indicador alternativo del estadio IIIC). En el estadio IV, se puede detectar metástasis distante del tumor (es decir, no-peritoneal).

Las duraciones de los diversos estadios del cáncer de ovario no se conocen actualmente, pero se cree que son al menos de aproximadamente un año cada uno (Richart et al., 1969, *Am J. Obstet Gynecol.* 105: 386). El pronóstico

disminuye al aumentar la designación de estadio. Por ejemplo, las tasas de supervivencia a 5 años para sujetos humanos diagnosticados con cáncer de ovario de estadio I, II, III y IV son de 80%, 57%, 25% y 8%, respectivamente.

Todos y cada uno de los tipos, grupos y estadios del cáncer de ovario anteriores quedan abarcados por el término "cáncer de ovario" tal como se usa en el presente documento.

- 5 Tal como se utiliza aquí, el término "cáncer de pulmón" se refiere a una enfermedad en los tejidos del pulmón que implica un crecimiento celular incontrolado, que, en algunos casos, conduce a la metástasis. El cáncer de pulmón es la causa más común de muerte por cáncer en hombres y mujeres. La mayoría de los cánceres primarios de pulmón son carcinomas de pulmón, derivados a partir de células epiteliales. Los principales tipos de cáncer de pulmón son el carcinoma de pulmón de célula pequeña (SCLC) y carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NSCLC). En una
10 realización particular, el cáncer que expresa FR α es un cáncer de pulmón de célula no pequeña.

El cáncer de pulmón de célula pequeña o carcinoma de pulmón de célula pequeña (SCLC) es un cáncer maligno del pulmón, en el que las células cancerosas tienen una forma plana y citoplasma escaso; por lo tanto, el SCLC a veces es llamado "carcinoma de célula de avena". El SCLC generalmente es más metastásico que el NSCLC, y a veces aparece en combinación con carcinomas de células escamosas.

- 15 Tal como se utiliza aquí, el término "cáncer de pulmón de célula no pequeña", también conocido como carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), se refiere a un cáncer de pulmón epitelial distinto del carcinoma de pulmón de célula pequeña (SCLC). Hay tres subtipos principales: adenocarcinoma, carcinoma de pulmón de células escamosas y carcinoma de pulmón de célula grande. Otros tipos menos comunes de cáncer de pulmón de célula no
20 pequeña incluyen pleomórfico, tumor carcinoide, carcinoma de glándula salival, y carcinoma no clasificado. Los adenocarcinomas representan aproximadamente el 40% de los cánceres de pulmón, y son el tipo más común de cáncer de pulmón en personas que nunca han fumado. Los carcinomas de células escamosas representan aproximadamente el 25% de los cánceres de pulmón. El carcinoma de células escamosas del pulmón es más común en hombres que en mujeres, y está correlacionado de forma aún más clara con antecedentes de consumo de
25 tabaco que otros tipos de carcinoma de pulmón. Hay al menos cuatro variantes de carcinoma de células escamosas de pulmón (papilar, de célula pequeña, de célula clara, y basaloide). Los carcinomas de pulmón de célula grande son un grupo heterogéneo de neoplasmas malignos que se originan a partir de células epiteliales transformadas del pulmón. Los carcinomas de pulmón de célula grande son carcinomas que carecen de las características microscópicas ligeras del carcinoma de célula pequeña, el carcinoma de célula escamosa, o el adenocarcinoma.

- 30 Se utilizan diferentes sistemas de clasificación para SCLC y NSCLC. El SCLC se clasifica como enfermedad limitada confinada al hemitórax ipsilateral o como enfermedad extensiva con metástasis más allá del hemitórax ipsilateral.

- El NSCLC puede clasificarse utilizando el sistema de estadificación de tumor-nodos-metástasis (TNM). Véase Spira J & Ettinger, D.S. *Multidisciplinary management of lung cancer*, *N Engl J Med*, 350: 382 (2004) (en adelante, Spira); Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, et al (eds). *AJCC Cancer Staging Manual*. 6^a
35 edición. Nueva York: Springer-Verlag, 2002: 167-77 (en lo sucesivo, Greene); Sobin LH, Wittekind CH (eds). *Internacional Union Against Cancer. TNM clasificación of malignant tumors*. 6^a edición. Nueva York: Wiley-Liss (2002) (en adelante, Sobin). Además, el NSCLC se trata típicamente según el estadio del cáncer determinado por el siguiente esquema de clasificación (véase <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/Patient/page2#Keypoint10>).

- 40 En el estadio oculto (escondido), se observan células cancerosas en el esputo (moco expulsado de los pulmones), pero no se observa ningún tumor en el pulmón mediante imágenes o broncoscopia, o el tumor es demasiado pequeño para ser revisado.

En el estadio 0 (carcinoma *in situ*), se observan células anormales en el revestimiento de las vías respiratorias. Estas células anormales se pueden volver cancerosas y diseminarse hasta el tejido cercano normal. El estadio 0 también se llama carcinoma *in situ*.

- 45 Estadio I, en el que se ha formado el cáncer, se divide en los estadios IA y IB.

En el estadio IA, el tumor está solo en el pulmón y es de 3 centímetros o menos.

- En el estadio IB, el cáncer no se ha extendido a los ganglios linfáticos y se cumple una o más de las siguientes afirmaciones: (i) El tumor es mayor de 3 centímetros, pero no mayor de 5 centímetros; (ii) el cáncer se ha
50 diseminado al bronquio principal y está al menos 2 centímetros por debajo de donde la tráquea se une con el bronquio; (iii) el cáncer se ha extendido a la capa más interna de la membrana que cubre el pulmón; (iv) una parte del pulmón se ha colapsado o ha desarrollado neumonitis (inflamación del pulmón) en el área donde la tráquea se une con el bronquio.

- En estadio IIA, el cáncer se ha extendido a ciertos ganglios linfáticos del mismo lado del pecho que el tumor primario; el cáncer es (a) de 5 cm o más pequeño, (b) se ha extendido hasta el bronquio principal, y/o (c) se ha
55 extendido a la capa más interna del revestimiento del pulmón. O, el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos; el cáncer es (d) mayor de 5 cm, pero no de 7 cm, (e) se ha extendido hasta el bronquio principal, y/o (f) se

ha extendido a la capa más interna del revestimiento del pulmón. Parte del pulmón puede haberse colapsado o haberse inflamado. El estadio IIA se divide en dos secciones, dependiendo del tamaño del tumor, de dónde se encuentra el tumor, y de si existe cáncer en los ganglios linfáticos. En la primera sección, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos en el mismo lado del pecho del tumor. Los ganglios linfáticos con cáncer están dentro del pulmón o cerca del bronquio. Además, una o más de las siguientes afirmaciones es cierta: (i) el tumor no tiene más de 5 centímetros, (ii) el cáncer se ha diseminado al bronquio principal y está al menos 2 centímetros por debajo de donde la tráquea se une con el bronquio, (iii) el cáncer se ha extendido a la capa más interna de la membrana que cubre el pulmón, (iv) una parte del pulmón se colapsa o desarrolla neumonitis (inflamación del pulmón) en el área donde la tráquea se une con el bronquio. En la segunda sección, el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos y una o más de las siguientes situaciones es cierta: (i) el tumor es mayor de 5 centímetros, pero no de 7 centímetros, (ii) el cáncer se ha diseminado al bronquio principal y está al menos 2 centímetros por debajo de donde la tráquea se une con el bronquio, (iii) el cáncer se ha extendido a la capa más interna de la membrana que cubre el pulmón, (iv) una parte del pulmón se colapsa o desarrolla neumonitis (inflamación del pulmón) en la zona donde la tráquea se une con el bronquio.

En el estadio IIB, el cáncer se ha extendido a ciertos ganglios linfáticos en el mismo lado del pecho que el tumor primario; el cáncer es (a) mayor de 5 cm, pero no de 7 cm, (b) se ha extendido hasta el bronquio principal, y/o (c) se ha extendido a la capa más interna del revestimiento del pulmón. Parte del pulmón puede haberse colapsado o inflamado. Alternativamente, (d) el cáncer es mayor de 7 cm; (e) se ha extendido hasta el bronquio principal, (f) el diafragma, (g) la pared torácica o el revestimiento de la pared torácica; y/o (h) se ha extendido a la membrana que rodea el corazón. Puede haber uno o más tumores separados en el mismo lóbulo del pulmón; el cáncer puede haberse diseminado al nervio que controla el diafragma; todo el pulmón puede haberse colapsado o inflamado. El estadio IIB se divide en dos secciones, dependiendo del tamaño del tumor, de dónde se encuentra el tumor, y de si existe cáncer en los ganglios linfáticos. En la primera sección, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos del mismo lado del pecho del tumor. Los ganglios linfáticos con cáncer están dentro del pulmón o cerca del bronquio. Además, uno o más de las siguientes afirmaciones es cierta: (i) el tumor es mayor de 5 centímetros, pero no de 7 centímetros, (ii) el cáncer se ha diseminado al bronquio principal y está al menos 2 centímetros por debajo de donde la tráquea se une a los bronquios, (iii) el cáncer se ha extendido a la capa más interna de la membrana que cubre el pulmón, (iv) una parte del pulmón se ha colapsado o ha desarrollado neumonitis (inflamación del pulmón) en el área donde la tráquea se une con el bronquio. En la segunda sección, el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos y una o más de las siguientes situaciones es cierta: (i) el tumor es mayor que 7 centímetros, (ii) el cáncer se ha diseminado al bronquio principal (y está menos de 2 centímetros por debajo de donde la tráquea se une con el bronquio), la pared torácica, el diafragma, o el nervio que controla el diafragma, (iii) el cáncer se ha extendido a la membrana que rodea el corazón o al revestimiento de la pared del pecho, (iv) todo el pulmón se ha colapsado o ha desarrollado neumonitis (inflamación del pulmón), (v) hay uno o más tumores separados en el mismo lóbulo del pulmón.

El estadio IIIA se divide en tres secciones, dependiendo del tamaño del tumor, de dónde se encuentra el tumor, y de qué ganglios linfáticos tienen cáncer (si es que hay alguno). En la primera sección del estadio IIIA, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos del mismo lado del pecho que el tumor. Los ganglios linfáticos con cáncer están cerca del esternón (hueso torácico) o donde el bronquio entra en el pulmón. También, el tumor puede ser de cualquier tamaño; parte del pulmón (donde la tráquea se une con el bronquio) o todo el pulmón puede haberse colapsado o haber desarrollado neumonitis (inflamación del pulmón); puede haber uno o más tumores separados en el mismo lóbulo del pulmón; y el cáncer puede haberse diseminado a cualquiera de los siguientes: (i) bronquio principal, pero no el área donde la tráquea se une con el bronquio, (ii) pared torácica, (iii) el diafragma y el nervio que lo controla, (iv) la membrana alrededor del pulmón o el revestimiento de la pared del pecho, (v) la membrana alrededor del corazón. En la segunda sección del estadio IIIA, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos del mismo lado del pecho que el tumor. Los ganglios linfáticos con cáncer están dentro del pulmón o cerca del bronquio. También, el tumor puede ser de cualquier tamaño; todo el pulmón puede haberse colapsado o haber desarrollado neumonitis (inflamación del pulmón); puede haber uno o más tumores separados en cualquiera de los lóbulos del pulmón con cáncer; y el cáncer puede haberse diseminado a cualquiera de los siguientes: (i) bronquio principal, pero no el área donde la tráquea se une con el bronquio, (ii) pared torácica, (iii) el diafragma y el nervio que lo controla, (iv) la membrana alrededor del pulmón o el revestimiento de la pared del pecho, (v) el corazón o la membrana alrededor de él, (vi) los vasos sanguíneos principales que conducen al corazón o que salen desde el corazón, (vii) la tráquea, (viii) el esófago, (viii) el nervio que controla la laringe (caja de voz), (ix) el esternón (hueso torácico) o la columna vertebral, (x) la carina traqueal (donde la tráquea se une con los bronquios). En la tercera sección del estadio IIIA, el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos y el tumor puede ser de cualquier tamaño, y el cáncer se ha diseminado a cualquiera de los siguientes: (i) el corazón, (ii) los principales vasos sanguíneos que conducen hacia el corazón o que salen desde el corazón, (iii) la tráquea, (iv) el esófago, (v) el nervio que controla el laringe (caja de voz), (vi) el esternón (hueso torácico) o la columna vertebral, (vi) la carina traqueal (donde la tráquea se une con los bronquios).

El estadio IIIB se divide en dos secciones, dependiendo del tamaño del tumor, de dónde se encuentra el tumor, y de qué ganglios linfáticos tienen cáncer. En la primera sección, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos situados encima de la clavícula o a los ganglios linfáticos del lado opuesto del pecho que el tumor; el tumor puede ser de cualquier tamaño; parte del pulmón (donde la tráquea se une con el bronquio) o todo el pulmón puede haber

colapsado o haber desarrollado neumonitis (inflamación del pulmón); puede haber uno o más tumores separados en cualquiera de los lóbulos del pulmón con cáncer; y el cáncer puede haberse diseminado a cualquiera de los siguientes: (i) bronquio principal, (ii) pared torácica, (iii) el diafragma y el nervio que lo controla, (iv) la membrana alrededor del pulmón o el revestimiento de la pared del pecho, (v) el corazón o la membrana alrededor de él, (vi) los vasos sanguíneos principales que conducen al corazón o que salen desde el corazón, (vii) la tráquea, (viii) el esófago, (ix) el nervio que controla la laringe (caja de voz), (x) el esternón (hueso torácico) o la columna vertebral, (xi) la carina traqueal (donde la tráquea se une con los bronquios). En la segunda sección del estadio IIIB, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos del mismo lado del pecho que el tumor; los ganglios linfáticos con cáncer están cerca del esternón (hueso torácico) o donde el bronquio entra en el pulmón; el tumor puede ser de cualquier tamaño; puede haber tumores separados en diferentes lóbulos del mismo pulmón; y el cáncer se ha diseminado a cualquiera de los siguientes: (i) el corazón, (ii) los principales vasos sanguíneos que van hacia el corazón o que salen desde el corazón, (iii) la tráquea, (iv) el esófago, (v) el nervio que controla la laringe (caja de la voz), (vi) el esternón (hueso torácico) o la columna vertebral, (vii) la carina traqueal (donde la tráquea se une con los bronquios).

En el estadio IV, el tumor puede ser de cualquier tamaño y el cáncer puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos. Una o más de las siguientes afirmaciones es cierta: hay uno o más tumores en ambos pulmones; el cáncer se encuentra en el líquido alrededor de los pulmones o el corazón; el cáncer se ha extendido a otras partes del cuerpo, como el cerebro, el hígado, las glándulas suprarrenales, los riñones, o el hueso.

Por consiguiente, en diversas realizaciones de la invención anterior, el cáncer de pulmón puede clasificarse en cualquiera de los estadios anteriores (por ejemplo, oculto, estadio 0, estadio IA, estadio IB, estadio IIA, estadio IIB, estadio IIIA, estadio IIIB o estadio IV) en base a la evaluación de los niveles de FR α no unido a una célula, tal como una célula normal o cancerosa, en una muestra (por ejemplo, orina o suero) de un sujeto.

Tal como se utiliza aquí, el término "receptor de folato alfa" (también referido como FR α , FR-alfa, FOLR-1 o FOLR1) se refiere a la isoforma alfa del receptor de folato de alta afinidad. El FR α ligado a membrana se une a la superficie celular mediante un anclaje de glicosil fosfatidilinositol (GPI), se recicla entre los compartimentos extracelulares y endocíticos y es capaz de transportar folato al interior de la célula. El FR α se expresa en una variedad de tejidos epiteliales, incluyendo los del tracto reproductivo femenino, la placenta, la mama, los túbulos proximales del riñón, el plexo coroideo, el pulmón y las glándulas salivales. Las formas solubles de FR α se pueden derivar a través de la acción de proteasas o fosfolipasa en los receptores de folato ligado a membrana.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de consenso correspondientes al FR α humano se presentan en el presente documento como SEQ ID NO: 24 y 25, respectivamente. Las variantes, por ejemplo, variantes alélicas naturales o secuencias que contienen al menos una sustitución de aminoácidos, quedan abarcadas por los términos usados en la presente memoria.

Tal como se utiliza aquí, el término "no unido a una célula" se refiere a FR α que no está unido a la membrana celular de una célula, tal como una célula cancerosa. En una realización particular, el FR α no unido a una célula no está unido a ninguna célula y se encuentra flotando libremente o solubilizado en fluidos biológicos, por ejemplo, orina o suero. Por ejemplo, el FR α puede ser derramado, secretado o exportado desde células normales o cancerosas, por ejemplo, desde la superficie de células cancerosas, a los fluidos biológicos.

El "nivel" del receptor de folato alfa no unido a una célula, tal como se usa en el presente documento, se refiere al nivel de la proteína de receptor de folato alfa determinada usando cualquier método conocido en la técnica para la medición de niveles de proteína. Tales métodos incluyen, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, reacciones de precipitina de fluido o gel, la espectroscopía de absorción, ensayos colorimétricos, ensayos espectrofotométricos, citometría de flujo, inmunodifusión (simple o doble), ensayo en fase de disolución, inmunolectroforesis, transferencia western, radioinmunoensayo (RIA), ensayos de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, e inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ejemplificado más adelante), y similares. En una realización preferida, el nivel se determina usando técnicas basadas en anticuerpos, como se describe en más detalle en el presente documento.

En general, es preferible inmovilizar o bien un anticuerpo o una proteína de unión específica para FR α no unido a una célula en un soporte sólido para las transferencias western y para las técnicas de inmunofluorescencia. Los soportes o vehículos de fase sólida adecuados incluyen cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o un anticuerpo. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros y magnetita.

El especialista en la técnica conocerá muchos otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpo o antígeno, y será capaz de adaptar dicho soporte para su uso en la presente invención. Por ejemplo, se puede someter la proteína aislada de una muestra de un sujeto (por ejemplo, orina o suero) a un análisis de electroforesis en gel de poliácridamida e inmovilizarse sobre un soporte en fase sólida tal como nitrocelulosa. El soporte se puede lavar con tampones adecuados, seguido de un tratamiento con el anticuerpo marcado. El soporte de fase sólida se puede lavar con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido sobre el soporte sólido puede detectarse entonces por medios convencionales. Los medios para detectar proteínas usando

técnicas electroforéticas son bien conocidos por los especialistas en la técnica (véase, de forma general, R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, (1990) *Methods in Enzymology* Vol 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., N.Y.).

5 Otros métodos estándar incluyen técnicas de inmunoensayo que son bien conocidas para el especialista en la técnica y se pueden encontrar en *Principles And Practice Of Immunoassay*, 2ª edición, Price y Newman, eds., MacMillan (1997) y *Antibodies, A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, cap. 9 (1988).

10 Los anticuerpos utilizados en inmunoensayos para determinar el nivel de expresión de receptor de folato alfa se pueden marcar con un marcador detectable. El término "marcado", con respecto al agente o anticuerpo de unión, se pretende que abarque el marcaje directo del agente o anticuerpo de unión por acoplamiento (es decir, vincular físicamente) de una sustancia detectable al agente o anticuerpo de unión, así como el marcaje indirecto del agente de unión o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Un ejemplo de marcado indirecto incluye la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. En una realización, el anticuerpo está marcado, por ejemplo, radiomarcado, marcado con cromóforo, 15 marcado con fluoróforo, o marcado con enzima. En otra realización, el anticuerpo es un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado a un sustrato o a la proteína o ligando de un par proteína-ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena única, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado) que se une específicamente a FR α no unido a una célula.

20 En una realización de la invención, se usan métodos proteómicos, por ejemplo espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una técnica analítica que consiste en compuestos químicos ionizantes para generar moléculas cargadas (o fragmentos de las mismas) y la medición de sus relaciones de masa a carga. En un procedimiento típico de espectrometría de masas, se obtiene una muestra de un sujeto, se carga en la espectrometría de masas, y sus componentes (por ejemplo, FR α) se ionizan por diferentes métodos (por ejemplo, mediante el impacto con un haz de electrones), resultando en la formación de partículas cargadas (iones). La 25 relación de carga a masa de las partículas se calcula entonces a partir del movimiento de los iones cuando se mueven a través de campos electromagnéticos.

30 Por ejemplo, para determinar el nivel de FR α se puede utilizar la espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asociada a matriz (MALDI-TOF MS) o la espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser mejorada en superficie (SELDI-TOF MS), que implica la aplicación de una muestra, tal como orina o suero, a un chip de unión a proteínas (Wright, GL, Jr., et al (2002) *Expert Rev Mol Diagn* 2: 549; Li, J., et al (2002) *Clin Chem* 48: 1296; Laronga, C., et al (2003) *Dis Markers*. 19: 229; Petricoin, EF, et al. (2002) 359: 572; Adam, BL, et al (2002) *Cancer Res* 62: 3609; Tolson, J., et al (2004) *Lab Invest*. 84: 845; Xiao, Z., et al (2001) *Cancer Res* 61: 6029).

35 Adicionalmente, las técnicas *in vivo* para la determinación del nivel de FR α no unido a una célula incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra FR α , que se une y transforma al FR α en una molécula detectable. La presencia, nivel, o ubicación de los FR α detectables no unidos a una célula en un sujeto pueden determinarse usando técnicas estándar de imagen.

40 El término "muestra" tal como se utiliza aquí se refiere a una colección de fluidos similares, células, o tejidos aislados de un sujeto, así como fluidos, células, o tejidos presentes dentro de un sujeto. En realizaciones preferidas, la muestra es un fluido biológico que contiene FR α no unido a una célula cancerosa. Los fluidos biológicos son típicamente líquidos a temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos de origen natural presentes, retirados, expresados o extraídos de otro modo de un sujeto o de una fuente biológica. Ciertos fluidos biológicos se derivan de determinados tejidos, órganos o regiones localizadas y otros ciertos fluidos biológicos pueden ser más globales o situarse sistémicamente en un sujeto o fuente biológica. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y 45 fluidos serosos, plasma, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, fluidos oculares, líquido quístico, gotas de lágrimas, heces, esputo, secreciones mucosas de los tejidos secretores y órganos, secreciones vaginales, fluidos ginecológicos, fluidos ascíticos, tales como los asociados con tumores no sólidos, fluidos de la cavidad pleural, pericárdica, peritoneal, abdominal y de otras cavidades corporales, fluidos recogidos por lavado bronquial y similares. En una realización particular, la muestra es orina o suero. En otra realización, la muestra no incluye ascitis o no es una muestra de ascitis. En otra realización, la muestra no incluye fluido peritoneal o no es fluido peritoneal. 50

En una realización, la muestra se extrae del sujeto. En otra realización, la muestra está presente dentro del sujeto. Los fluidos biológicos también pueden incluir disoluciones líquidas en contacto con un sujeto o fuente biológica, por ejemplo, medio de cultivo celular y de órgano, que incluye medio de cultivo celular y de órgano acondicionado, fluidos de lavado y similares.

55 En algunas realizaciones, sólo una porción de la muestra se somete a un ensayo para determinar el nivel de FR α no unido a una célula, o diversas porciones de la muestra son sometidas a diversos ensayos para determinar el nivel de FR α no unido a una célula. Además, en muchas realizaciones, la muestra puede ser pre-tratada por medios físicos o químicos antes del ensayo. Por ejemplo, en realizaciones descritas con más detalle en la sección de Ejemplos, las muestras, por ejemplo, muestras de orina, se sometieron a centrifugación, dilución y/o tratamiento con una sustancia

solubilizante (por ejemplo, tratamiento con guanidina) antes de ensayar las muestras para determinar el FR α no unido a célula. Tales técnicas sirven para mejorar la precisión, la fiabilidad y reproducibilidad de los ensayos de la presente invención.

5 El término "muestra de control", tal como se usa aquí, se refiere a cualquier muestra de control clínicamente relevante, incluyendo, por ejemplo, una muestra de un sujeto sano no afectado por cáncer de ovario, una muestra de un sujeto que tiene un cáncer de ovario menos grave o de progresión más lenta que el sujeto a evaluar, una muestra de un sujeto que tiene algún otro tipo de cáncer o enfermedad, y similares. Una muestra de control puede incluir una muestra derivada de uno o más sujetos. Una muestra de control también puede ser una muestra del sujeto a evaluar tomada a un tiempo previo. Por ejemplo, la muestra de control podría ser una muestra tomada del sujeto a evaluar antes de la aparición del cáncer que expresa FR α como el cáncer de pulmón o el cáncer de ovario, en una fase anterior de la enfermedad, o antes de la administración del tratamiento o de una parte de tratamiento. La muestra de control también puede ser una muestra de un modelo animal, o de un tejido o líneas celulares derivadas del modelo animal, del cáncer que expresa FR α , tal como cáncer de pulmón o de ovario. El nivel de FR α no unido a una célula en una muestra de control que consiste en un grupo de mediciones puede determinarse en base a cualquier medida estadística adecuada, tal como, por ejemplo, medidas de tendencia central que incluyen valores de media, mediana, o modales.

20 El término "nivel de control" se refiere a un nivel aceptado o pre-determinado de FR α que se utiliza para comparar con el nivel de FR α en una muestra derivada de un sujeto. En una realización, el nivel de control de FR α se basa en el nivel de FR α no unido a una célula en la muestra(s) de un sujeto(s) que presenta una progresión lenta de la enfermedad. En otra realización, el nivel de control de FR α no unido a una célula se basa en el nivel en una muestra de un sujeto(s) que presenta una progresión rápida de la enfermedad. En otra realización, el nivel de control de FR α se basa en el nivel de FR α no unido a una célula en una muestra(s) a partir de un sujeto(s) no afectado, es decir, no enfermo, es decir, un sujeto que no tiene un cáncer que expresa FR α tal como cáncer de pulmón o de ovario. En aún otra realización, el nivel de control de FR α se basa en el nivel de FR α no unido a una célula en una muestra de un sujeto(s) antes de la administración de una terapia para el cáncer de ovario. En otra realización, el nivel de control de FR α se basa en el nivel de FR α no unido a una célula en una muestra(s) de un sujeto(s) que tiene un cáncer que expresa FR α como cáncer de pulmón o de ovario que no ha sido puesta en contacto con un compuesto de ensayo. En otra realización, el nivel de control de FR α se basa en el nivel de FR α no unido a una célula en una muestra(s) de un sujeto(s) que no tiene un cáncer que expresa FR α como el cáncer de pulmón o de ovario que ha sido puesta en contacto con un compuesto de ensayo. En una realización, el nivel de control de FR α se basa en el nivel de FR α no unido a una célula en una muestra(s) de un modelo animal de un cáncer que expresa FR α como el cáncer de pulmón o el cáncer de ovario, una célula, o una línea celular derivada del modelo animal de un cáncer que expresa FR α , tal como cáncer de pulmón o de ovario.

35 En una realización, el control es un control normalizado, tal como, por ejemplo, un control que está predeterminado utilizando un promedio de los niveles de FR α no unido a una célula de una población de sujetos que no tienen cáncer que expresa FR α , tal como cáncer de pulmón o cáncer de ovario. En otras realizaciones adicionales de la invención, un nivel de control de FR α se basa en el nivel de FR α no unido a una célula en una muestra no cancerosa derivada del sujeto que tiene un cáncer que expresa FR α , como el cáncer de pulmón o de ovario. Por ejemplo, cuando una laparotomía u otro procedimiento médico revela la presencia de cáncer de ovario en una porción de los ovarios, el nivel de control de FR α puede determinarse utilizando la parte no afectada del ovario, y este nivel de control puede ser comparado con el nivel de FR α en una parte afectada de los ovarios. De forma similar, cuando una biopsia u otro procedimiento médico revela la presencia de un cáncer de pulmón en una porción de los pulmones, el nivel de control de FR α puede determinarse utilizando la parte no afectada de los pulmones, y este nivel de control puede ser comparado con el nivel de FR α en una parte afectada de los pulmones.

45 Tal como se usa en este documento, "una diferencia" entre el nivel de receptor de folato alfa no unido a una célula en una muestra de un sujeto (es decir, una muestra de ensayo) y el nivel de receptor de folato alfa no unido a una célula en una muestra de control, se refiere de forma general a cualquier diferencia clínicamente relevante y/o estadísticamente significativa en el nivel de receptor de folato alfa entre las dos muestras. En una realización ejemplar, la diferencia se selecciona en base a un valor de corte determinado usando un análisis de característica de operación de receptor (ROC), un ejemplo del cual se presenta en el Ejemplo 6.

55 En otras realizaciones, la diferencia debe ser mayor que los límites de detección del método para determinar el nivel de FR α no unido a una célula. Se prefiere que la diferencia sea al menos mayor que el error estándar del método de evaluación, y preferiblemente una diferencia de al menos aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1000 veces o mayor que el error estándar del método de evaluación. La diferencia puede ser evaluada mediante cualquier comparación apropiada, incluyendo cualquier estadística o comparación descriptiva paramétrica o no paramétrica apropiada. Por ejemplo, "un aumento" en el nivel de FR α no unido a una célula puede referirse a un nivel en una muestra de prueba que es aproximadamente dos, y más preferiblemente aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco, aproximadamente seis, aproximadamente siete, aproximadamente ocho, aproximadamente nueve, aproximadamente diez o más veces mayor que el nivel de FR α en la muestra de control. Un aumento también puede

referirse a un nivel en una muestra de ensayo que es preferiblemente al menos aproximadamente 1,5, y más preferiblemente aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco o más desviaciones estándar por encima del nivel medio de FR α en la muestra de control. Del mismo modo, "una disminución" en el nivel de FR α no unido a una célula puede referirse a un nivel en una muestra de ensayo que es preferiblemente al menos aproximadamente dos, y más preferiblemente aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco, aproximadamente seis, aproximadamente siete, aproximadamente ocho, aproximadamente nueve, aproximadamente diez o más veces inferior al nivel de FR α en la muestra de control. Una disminución también puede referirse a un nivel en una muestra de ensayo que es preferiblemente al menos aproximadamente 1,5, y más preferiblemente aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco o más desviaciones estándar inferior al nivel medio de FR α en la muestra de control.

Tal como se utiliza aquí, el término "poner en contacto la muestra" con un agente de unión a FR α , por ejemplo, un anticuerpo anti-FR α , incluye exponer la muestra, o cualquier porción de la misma al agente o anticuerpo, de tal modo que al menos una porción de la muestra entra en contacto con el agente o anticuerpo. La muestra o porción de la misma puede ser alterada de alguna manera, tal como sometiénola a tratamientos físicos o químicos (por ejemplo, dilución o tratamiento con guanidina), antes del acto de ponerla en contacto con el agente o anticuerpo.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, así como cualquier fragmento funcional (es decir, de unión a antígeno), mutante, variante, o derivación de las mismas, que conserva las características de unión al epítipo esenciales de una molécula de Ig. Dicho mutante, variante, o formatos de anticuerpo derivados son conocidos en la técnica, e incluyen moléculas tales como fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fabc, anticuerpos Sc (anticuerpos de cadena sencilla), diacuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos, y similares. Las moléculas de inmunoglobulinas pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos del huésped o a factores, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, FR α no unido a una célula). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios de V_H y CH1 y; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un dAb que incluye dominios V_H y V_L; (vi) un fragmento de dAb (Ward et al (1989) *Nature* 341, 544-546), que consiste en un dominio V_H; (vii) un dAb que consiste en un dominio VH o VL; y (viii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (ix) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un ligando sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligando sintético que les permite constituirse en una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase por ejemplo, Bird et al (1988) *Science* 242, 423-426; y Huston et al (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5879-5883). Se pretende que dichos anticuerpos de cadena única también queden abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los especialistas en la técnica, y los fragmentos se criban en función de su utilidad, de la misma manera que los anticuerpos intactos. Se pueden producir porciones de unión a antígeno mediante técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de ratón, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos humanos, y aquellos producidos de forma natural o que son producidos recombinantemente de acuerdo a métodos bien conocidos en la técnica.

5 En una realización, un anticuerpo para su uso en los métodos de la invención es un anticuerpo biespecífico. Un "anticuerpo biespecífico" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos, que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songvilai y Lachmann, (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79, 315-321; Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148, 1547-1553.

10 En otra realización, un anticuerpo para uso en los métodos de la invención es un anticuerpo camélido como el descrito en, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/04678.

Una región del anticuerpo camélido que es el dominio de variable pequeño y único identificado como V_{HH} se puede obtener mediante ingeniería genética para producir una proteína pequeña que tiene una alta afinidad por una diana, lo que resulta en una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como "nanoanticuerpo camélido". Véase la patente de los Estados Unidos. Nº 5.759.808; véase también Stijlemans et al., 2004 *J. Biol. Chem.* 279: 1256-1261; Dumoulin et al., 2003 *Nature* 424: 783-788; Pleschberger et al., 2003, *Bioconjugate Chem.* 14: 440-448; Cortez-Retamozo et al., 2002 *Int. J. Cancer* 89: 456-62; y Lauwereys et al., 1998 *EMBO J.* 17: 3512-3520. Se dispone comercialmente de bibliotecas modificadas de anticuerpos camélidos y de fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, de Ablynx, Gante, Bélgica. Por consiguiente, una característica de la presente invención es un nanocuerpo camélido que tiene una alta afinidad por FR α .

En otras realizaciones de la invención, un anticuerpo para uso en los métodos de la invención es un diacuerpo, un diacuerpo de cadena sencilla, o un di-diacuerpo.

Los diacuerpos son moléculas bivalentes biespecíficas en las que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, conectada por un ligando que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Los dominios V_H y V_L se emparejan con dominios complementarios de otra cadena, creando de este modo dos sitios de unión de antígeno (véase por ejemplo, Holliger et al., 1993 *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6444-6448; Poljak et al. 1994 *Structure* 2: 1121-1123). Los diacuerpos pueden ser producidos mediante la expresión de dos cadenas de polipéptidos, ya sea con la estructura V_{HA}-V_{LB} y V_{HB}-V_{LA} (configuración V_H-V_L), o V_{LA}-V_{HB} y V_{LB}-V_{HA} (configuración V_L-V_H) dentro de la misma célula. La mayoría de ellos se puede expresar en forma soluble en bacterias.

Los diacuerpos de cadena única (scDb) se producen mediante la conexión de las dos cadenas polipeptídicas de formación de diacuerpo con un ligando de aproximadamente 15 residuos de aminoácido (véase Holliger y Winter, 1997 *Cancer Immunol Immunother.* 45 (3-4): 128-30; Wu et al., 1996 *Immunotechnology*, 2 (1): 21-36). Los scDb pueden expresarse en bacterias en forma monomérica soluble activa (véase Holliger y Winter, 1997 *Cancer Immunol Immunother.* 45 (34): 128-30; Wu et al., 1996 *Immunotechnology*, 2 (1): 21-36; Pluckthun y Pack, 1997 *Immunotechnology*, 3 (2): 83-105; Ridgway et al., 1996 *Protein Eng.* 9 (7): 617-21).

Un diacuerpo puede fusionarse a Fc para generar un "di-diacuerpo" (véase Lu et al., 2004 *J. Biol. Chem.*, 279 (4): 2856-65).

También se pueden utilizar en los métodos de la presente invención moléculas de unión a FR α que exhiben propiedades funcionales de anticuerpos pero derivan sus porciones marco y de unión a antígeno de otros polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos distintos de los codificados por genes de anticuerpo o generados por la recombinación de genes de anticuerpos *in vivo*). Los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, dominios de unión a FR α) de estas moléculas de unión se generan a través de un proceso de evolución dirigida. Véase la patente de los Estados Unidos. Nº 7.115.396. Las moléculas que tienen un pliegue global similar al de un dominio variable de un anticuerpo (un pliegue de "tipo inmunoglobulina") son proteínas estructurales adecuadas. Las proteínas estructurales adecuadas para derivar moléculas de unión a antígeno incluyen fibronectina o un dímero de fibronectina, tenascina, N-cadherina, E-cadherina, ICAM, titina, receptor de GCSF, receptor de citocina, inhibidor de glicosidasa, cromoproteína antibiótica, molécula de adhesión a membrana de mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC de clase I, receptor de antígeno de células T, dominios de conjunto CD1, C2 e I de VCAM-1, dominio de inmunoglobulina de conjunto I de la proteína de unión a miosina C, dominio de inmunoglobulina de conjunto C de la proteína vinculante a miosina H, dominio de inmunoglobulina de conjunto I de telocquina, NCAM, twitchina, neuroglía, receptor de la hormona del crecimiento, receptor de la eritropoyetina, receptor de la prolactina, receptor de interferón-gamma, β -galactosidasa/glucuronidasa, β -glucuronidasa, transglutaminasa, receptor de antígeno de células T, superóxido dismutasa, dominio de factor tisular, citocromo F, proteína verde fluorescente, GroEL, y taumatina.

"Unión específica", cuando se usa en el contexto de anticuerpos, o de fragmentos de anticuerpos, representa la unión a través de los dominios codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina a uno o más epítopos de una proteína de interés, pero que no reconocen sustancialmente ni se unen a otras

moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas antigénicas. Típicamente, un anticuerpo se une a un antígeno relacionado con una K_d de menos de aproximadamente 1×10^{-8} M, medida mediante un ensayo de resonancia de plasmón de superficie o un ensayo de unión celular.

5 Tal como se usa en este documento, un "agente de unión" de receptor de folato alfa incluye un anticuerpo que se une a FR α no unido a una célula, así como agentes de unión que no son anticuerpos. Para generar agentes de unión que no son anticuerpos o moléculas de unión, se puede crear una biblioteca de clones en cuyas secuencias las regiones de la proteína estructural que forman las superficies de unión a antígeno (por ejemplo, las regiones análogas en posición y estructura a las CDR de un dominio variable de anticuerpo plegado de la inmunoglobulina) se asignan al azar. Se evalúan clones de biblioteca para determinar la unión específica al antígeno de interés (por ejemplo, FR α) y para determinar otras funciones (por ejemplo, la inhibición de la actividad biológica de FR α). Los clones seleccionados se pueden utilizar como base para una aleatorización adicional y en la selección para producir derivados de mayor afinidad por el antígeno.

15 Las moléculas de unión de alta afinidad se generan, por ejemplo, usando el décimo módulo de fibronectina III (10 Fn3) como estructura, descrito en las patentes de los Estados Unidos. N $^{\circ}$ 6.818.418 y 7.115.396.; Roberts y Szostak, 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 12297; Patente de EE.UU. N $^{\circ}$ 6.261.804; Patente de EE.UU. N $^{\circ}$ 6.258.558; y Szostak et al. (WO98/31700).

20 Las moléculas de unión que no son anticuerpos pueden ser producidas como dímeros o multímeros para aumentar la avidéz por el antígeno diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno se expresa como una fusión con una región constante (Fc) de un anticuerpo que forma dímeros Fc-Fc. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos. N $^{\circ}$ 7.115.396.

Un "antígeno" es una molécula reconocida por el sistema inmune; el término viene originalmente de "generador de anticuerpo" e incluye una molécula que se une específicamente a un anticuerpo. A nivel molecular, un antígeno se caracteriza por su capacidad de unirse en el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. En la presente invención, el antígeno es FR α , tal como FR α que no está unido a una molécula, FR α o una porción del mismo.

25 Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo" se refiere a las características de la superficie molecular de un antígeno, por ejemplo FR α , capaces de unirse a un anticuerpo. Las moléculas antigénicas, que normalmente son "grandes" polímeros biológicos, por lo general presentan varias características de superficie que pueden actuar como puntos de interacción con anticuerpos específicos. Cualquier característica molecular de este tipo constituye un epítipo. Por lo tanto, la mayoría de los antígenos tienen el potencial de unirse a varios anticuerpos distintos, cada uno de los cuales es típicamente específico para un epítipo particular. En una realización de la presente invención, un agente de unión, por ejemplo, un anticuerpo, se une a un epítipo en FR α que está disponible en la forma del receptor que no está unido a una célula, pero no en la forma unida a membrana del receptor. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse al mismo epítipo en FR α al que se une MORAb-003.

35 Tal como se usa en este documento, la frase "progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α " incluye la progresión de un cáncer de este tipo de un estado menos severo a un estado más grave. Esto podría incluir un aumento en el número o la gravedad de los tumores, el grado de metástasis, la velocidad con la que el cáncer está creciendo y difundiéndose, y similares. Por ejemplo, "la progresión de cáncer de ovario" incluye la progresión de un cáncer de este tipo desde un estado menos severo a uno más grave, tal como la progresión desde el estadio I al estadio II, del estadio II al estadio III, etc. Alternativamente, la frase "progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α " puede referirse a la regresión de un cáncer que expresa FR α desde un estado más grave a un estado menos grave. Por ejemplo, en una realización, "la progresión de cáncer de ovario" se refiere a la regresión del estadio IV al estadio III, del estadio III al estadio II, etc. En otras realizaciones, la "progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α " puede referirse a la tasa de supervivencia determinada desde el comienzo de los síntomas del cáncer que expresa FR α , o a la tasa de supervivencia desde el momento del diagnóstico del cáncer que expresa FR α .

50 Tal como se utiliza aquí, el término "clasificar" se refiere a la caracterización de un cáncer que expresa FR α , por ejemplo, cáncer de ovario o de pulmón, en un estadio apropiado, en base, por ejemplo, al grado de la propagación del cáncer, como clasificaciones bien aceptadas en la técnica. Por ejemplo, la clasificación incluye la caracterización del cáncer que expresa FR α en estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV. En ciertas realizaciones, el estadio I se refiere a los cánceres que se localizan en una parte del cuerpo. En ciertas realizaciones, los estadios II y III se refieren a cánceres que están avanzados localmente, en los que una distinción entre estadios a menudo es específica del cáncer particular. Por último, el estadio IV se refiere a los cánceres que se han metastatizado o que se han propagado a otros órganos o partes del cuerpo.

55 Tal como se utiliza aquí, el término "supervivencia" se refiere a la continuación de la vida de un sujeto que ha sido tratado por cáncer. En una realización, la supervivencia se refiere a la no repetición de un tumor. Tal como se utiliza aquí, el término "reaparecer" se refiere a la regeneración de las células tumorales o cancerosas en un sujeto en el que se ha administrado el tratamiento primario para el tumor. El tumor puede reaparecer en el sitio original o en otra parte del cuerpo. En una realización, un tumor que se repite es del mismo tipo que el tumor original para el que se trató el sujeto. Por ejemplo, si un sujeto tenía un tumor de cáncer de ovario, se trató y posteriormente se desarrolló

otro tumor de cáncer de ovario, el tumor ha reaparecido. Además, un cáncer puede reaparecer en un órgano o tejido diferente a aquel en el que apareció originalmente.

II. Métodos y kits de la invención

5 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que el receptor de folato alfa (FR α), no unido a una célula, se encuentra en niveles elevados en los fluidos corporales, por ejemplo, orina o suero, de un sujeto que tiene un cáncer que expresa FR α en comparación con una muestra de control. Además, la presente invención se basa, al menos en parte, en la identificación de un ensayo inmunológico que exhibe la sensibilidad necesaria para evaluar los niveles de FR α no unido a célula en muestras, donde intentos anteriores habían fracasado repetidamente. De hecho, la presente invención supera los retos observados durante los intentos anteriores para desarrollar un ensayo de diagnóstico basado en FR α para cáncer que expresa FR α , tal como cáncer de pulmón o de ovario, proporcionando un ensayo inmunológico capaz de evaluar con precisión los niveles de FR α no unido a una célula en una muestra, por ejemplo, orina o suero.

15 Por consiguiente, se proporcionan métodos y kits para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer que expresa FR α y, además, para evaluar la progresión de un cáncer que expresa FR α . En diversas realizaciones, los métodos implican la comparación de los niveles de FR α no unido a una célula en muestras, por ejemplo, de orina y suero, en comparación con los niveles de control, para determinar la presencia, el grado o el riesgo de desarrollar cáncer de ovario en el sujeto.

A. Métodos de diagnóstico, métodos de pronóstico, métodos de evaluación de riesgo, y métodos de clasificación

20 Específicamente, la presente invención proporciona métodos de diagnóstico para evaluar si un sujeto padece un cáncer que expresa FR α , tal como cáncer de pulmón o cáncer de ovario, los métodos de pronóstico para predecir la progresión de un cáncer que expresa FR α , tal como cáncer de pulmón o cáncer de ovario, y los métodos de evaluación de riesgos para evaluar el nivel de riesgo de que un sujeto desarrolle un cáncer que expresa FR α . Además, la invención proporciona métodos de clasificación para clasificar un sujeto que padece cáncer que expresa FR α , tal como cáncer de pulmón o cáncer de ovario, en grupos de terapia de cáncer. Los diversos aspectos y realizaciones de la invención aquí descritos no pretenden ser limitativos ni abarcar todas las posibles combinaciones de las realizaciones específicas mencionadas, que pueden aplicarse a cualquiera de los métodos y kits discutidos en este documento o que se reivindican a continuación.

30 Los métodos de la presente invención se pueden llevar a la práctica en combinación con cualquier otro método utilizado por el especialista en la materia para diagnosticar un cáncer que expresa FR α , para predecir la progresión de un cáncer que expresa FR α , o para evaluar el nivel de riesgo de que un sujeto desarrolle un cáncer que expresa FR α .

35 En un aspecto, la invención proporciona un método para evaluar si un sujeto padece un cáncer que expresa FR α , mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula, en una muestra (tal como orina o suero) derivada del sujeto; y comparar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece un cáncer que expresa FR α . En una realización particular, el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une a FR α no unido a una célula y se selecciona del grupo que consiste en (a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003; y (b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGSL) como CDRH1, la SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 4 (SVSSISSNNLH) como CDRL1, la SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3. En una realización, la muestra se selecciona del grupo que consiste en orina y suero.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para evaluar si un sujeto padece un cáncer que expresa FR α , como cáncer de pulmón o cáncer de ovario, comprendiendo el método la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) no unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto; y comparar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) en la muestra de orina derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra de orina derivada del sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece un cáncer que expresa FR α .

50 En otro aspecto, la invención proporciona un método para evaluar si un sujeto padece un cáncer que expresa FR α , mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) no unido a una célula en una muestra de suero derivada del sujeto; y comparar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) en la muestra de suero derivada del sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra de suero derivada del sujeto y la nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto padece un cáncer que expresa FR α . En realizaciones particulares, el sujeto no ha sido tratado con un agente, tal como un esteroide, que mejora los niveles de FR α en el suero. En una realización específica, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario y el sujeto no ha sido tratado con un agente, tal como un esteroide, que mejora los niveles de FR α en el suero.

En los métodos y kits de la presente invención, los cánceres que expresan FR α incluyen cánceres que se caracterizan porque las células cancerosas expresan FR α . En realizaciones particulares, el FR α se libera de las células de cáncer, por ejemplo, desde la superficie de la célula cancerosa, y se incorpora a los fluidos biológicos del sujeto. Los cánceres que expresan FR α incluyen cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinomas bronquioalveolares, tumores carcinoides, y cáncer de pulmón de célula no pequeña, tal como adenocarcinomas); mesotelioma; cáncer de ovario; cáncer renal; cáncer de cerebro (por ejemplo, ependimoma anaplásico y astrocitoma pilocítico juvenil cerebelar); cáncer de cuello uterino; cáncer de la nasofaringe; tumor derivado del mesodermo; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cáncer endometrial; adenocarcinomas de endometrio del ovario, cistoadenocarcinomas serosos, cáncer de mama; cáncer de vejiga; cáncer de páncreas; cáncer de hueso (por ejemplo, osteosarcoma de alto grado); y cáncer de pituitaria (por ejemplo, adenoma de la pituitaria). En una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario.

En ciertas realizaciones de los métodos y kits de la presente invención, el cáncer que expresa FR α es cáncer de pulmón. En realizaciones más específicas, el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NSCLC). En dicha realización, el NSCLC se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, carcinoma de pulmón de células escamosas, carcinoma de pulmón de célula grande, NSCLC pleomórfico, tumor carcinoide, carcinoma de glándula salival, y carcinoma no clasificado. En una realización preferida, el NSCLC es adenocarcinoma. En realizaciones alternativas, el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón de célula pequeña (SCLC). En otra realización, el cáncer de pulmón es carcinoma bronquioalveolar. En aún otra realización, el cáncer de pulmón es un tumor carcinoide de pulmón.

La presente invención también proporciona métodos para evaluar si un sujeto padece cáncer de ovario mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) no unido a una célula en una muestra de orina derivada del sujeto, donde la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 3000 ua/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario. En realizaciones particulares, la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 4000 ua/ml, aproximadamente 5000 ua/ml, aproximadamente 6000 ua/ml, aproximadamente 7000 ua/ml, aproximadamente 8000 ua/ml, aproximadamente 9000 ua/ml, aproximadamente 10000 ua/ml, aproximadamente 11000 ua/ml, aproximadamente 12000 ua/ml, aproximadamente 13000 ua/ml, aproximadamente 14000 ua/ml, aproximadamente 15000 ua/ml, aproximadamente 16000 ua/ml, aproximadamente 17000 ua/ml, aproximadamente 18000 ua/ml, aproximadamente 19000 ua/ml, aproximadamente 20000 ua/ml, aproximadamente 21000 ua/ml, aproximadamente 22000 ua/ml, aproximadamente 23000 ua/ml, aproximadamente 24000 ua/ml, aproximadamente 25000 ua/ml, aproximadamente 26000 ua/ml, aproximadamente 27000 ua/ml, aproximadamente 28000 ua/ml, aproximadamente 29000 ua/ml o aproximadamente 30000 ua/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para evaluar si un sujeto padece cáncer de ovario, determinando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) en una muestra de orina derivada del sujeto, en el que la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9100 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario o en el que una concentración de menos de aproximadamente 9100 pg/ml es un indicio de que el sujeto no padece cáncer de ovario. Por ejemplo, la presencia de FR α en la muestra de orina a una concentración de más de aproximadamente 9500 pg/ml, aproximadamente 10000 pg/ml, aproximadamente 11000 pg/ml, aproximadamente 12000 pg/ml, aproximadamente 13000 pg/ml, aproximadamente 14.000 pg/ml, aproximadamente 15000 pg/ml, aproximadamente 16000 pg/ml, aproximadamente 17000 pg/ml, aproximadamente 18000 pg/ml, aproximadamente 19000 pg/ml, aproximadamente 20000 pg/ml, aproximadamente 21000 pg/ml, aproximadamente 22000 pg/ml, aproximadamente 23000 pg/ml, aproximadamente 24000 pg/ml, aproximadamente 25000 pg/ml, aproximadamente 26000 pg/ml, aproximadamente 27000 pg/ml, aproximadamente 28000 pg/ml, aproximadamente 29000 pg/ml, aproximadamente 30000 pg/ml, aproximadamente 40000 pg/ml, aproximadamente 50000 pg/ml, aproximadamente 60000 pg/ml, aproximadamente 70000 pg/ml, aproximadamente 80000 pg/ml, aproximadamente 90000 pg/ml, aproximadamente 100000 pg/ml o aproximadamente 150000 pg/ml es un indicio de que el sujeto padece cáncer de ovario.

En ciertas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención, los niveles de FR α no unido a una célula en una muestra (por ejemplo, una muestra tal como una muestra de orina o una muestra de suero) derivada de un sujeto se comparan con los niveles de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre los niveles es un indicio de que el sujeto padece un cáncer que expresa FR α tal como cáncer de pulmón o de ovario. En una realización particular, la diferencia supone un aumento del nivel de FR α no unido a una célula en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control, donde dicho aumento es indicativo de la presencia o el crecimiento de un cáncer que expresa FR α . Alternativamente, la diferencia supone una disminución del nivel de FR α , en el que la disminución es indicativa de la ausencia o regresión del cáncer que expresa FR α . Tal como se usa en este documento, "una diferencia" entre el nivel de receptor de folato alfa no unido a una célula en una muestra de un sujeto (es decir, una muestra de ensayo) y el nivel de receptor de folato alfa en una muestra de control se refiere de forma general a cualquier cambio clínicamente relevante (incluyendo un aumento o una disminución) y/o diferencia estadísticamente significativa en el nivel de receptor de folato alfa en las dos muestras. En una realización ejemplar, la diferencia se selecciona en base a un valor de corte determinado usando un análisis de característica de operación de receptor (ROC), un ejemplo del cual se presenta en el Ejemplo 6. El valor de corte óptimo puede variar dependiendo de los métodos y condiciones de ensayo empleados. En otras realizaciones, la diferencia debe ser mayor que los límites de detección del método para determinar el nivel de FR α

no unido a una célula. Se prefiere que la diferencia sea al menos mayor que el error estándar del método de evaluación, y preferiblemente una diferencia de al menos aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1000 veces o más superior al error estándar del método de evaluación. La diferencia puede ser evaluada mediante cualquier comparación apropiada, incluyendo cualquier estadística o comparación descriptiva paramétrica o no paramétrica apropiada. Por ejemplo, "un aumento" en el nivel de FR α puede referirse a un nivel que excede de un valor de corte determinado usando un análisis ROC. También puede referirse a un nivel en una muestra de ensayo que es dos, y más preferiblemente de aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 100%, aproximadamente el 150%, aproximadamente el 200%, aproximadamente el 300%, aproximadamente el 400%, aproximadamente el 500%, aproximadamente el 600%, aproximadamente el 700%, aproximadamente 800%, aproximadamente el 900% o aproximadamente el 1000% más que el nivel de FR α en la muestra de control. Un aumento también puede referirse a un nivel en una muestra de ensayo que es preferiblemente de al menos aproximadamente 1,5, y más preferiblemente de aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco o más desviaciones estándar superior al nivel medio de FR α en la muestra de control. Del mismo modo, "una disminución" en el nivel de FR α no unido a una célula puede referirse a un nivel en una muestra de ensayo que no exceda de un valor de corte determinado usando un análisis ROC. También puede referirse a un nivel en una muestra de ensayo que es de aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 90% inferior al nivel de FR α en la muestra de control. Una disminución también puede referirse a un nivel en una muestra de ensayo que es preferiblemente al menos aproximadamente 1,5, y más preferiblemente aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco o más desviaciones estándar por debajo del nivel medio de FR α en la muestra de control.

Las muestras útiles en los métodos y kits de la invención incluyen cualquier tejido, célula, biopsia o fluido corporal que puede contener niveles detectables de FR α no unido a una célula. En una realización, una muestra puede ser un tejido, una célula, sangre entera, plasma, raspado bucal, saliva, líquido cefalorraquídeo, heces o lavado broncoalveolar. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor que expresa FR α o una muestra de tejidos o células donde se puede encontrar un cáncer que expresa FR α . En realizaciones preferidas, la muestra es una muestra de orina o suero.

Se pueden obtener muestras corporales de un sujeto mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, el uso de una biopsia, o raspando o frotando un área, o mediante el uso de una aguja para aspirar fluidos corporales. Los métodos para la recogida de diversas muestras corporales son bien conocidos en la técnica.

Las muestras adecuadas para la detección y la cuantificación del nivel de proteína FR α pueden ser frescas, congeladas o fijadas de acuerdo a métodos conocidos por un especialista en la técnica. Las muestras de tejido adecuadas preferentemente se seccionan y se colocan en un portaobjetos de microscopio para análisis adicional. Las muestras sólidas, es decir, muestras de tejido, pueden solubilizarse y/o homogeneizarse, y posteriormente se analizan como extractos solubles. Las muestras líquidas también pueden ser sometidas a tratamientos físicos o químicos. En algunas realizaciones, las muestras de orina son tratadas por centrifugación, agitación en vórtex, dilución y/o tratamiento con una sustancia solubilizante (tal como, por ejemplo, tratamiento con guanidina).

En una realización, una muestra de biopsia recién obtenida se congela usando, por ejemplo, nitrógeno líquido o difluorodichlorometano. La muestra congelada se monta para seccionarse utilizando, por ejemplo, OCT, y se secciona en serie en un criostato. Las secciones seriadas se recogen sobre un portaobjetos de microscopio de vidrio. Para la tinción inmunohistoquímica los portaobjetos se pueden recubrir, por ejemplo, con cromó-alumbre, gelatina o poli-L-lisina para asegurar que las secciones se adhieran a los portaobjetos. En otra realización, las muestras se fijan y se embeben antes de seccionarse. Por ejemplo, una muestra de tejido puede fijarse, por ejemplo, en formalina, deshidratarse en serie e incluirse, por ejemplo, en parafina.

Una vez obtenida la muestra, se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica por ser adecuado para detectar y cuantificar FR α no unido a una célula (ya sea a nivel de ácido nucleico o, preferiblemente, a nivel de proteína), como se describe en la sección (B) a continuación. En la técnica son bien conocidos ejemplos de métodos e incluyen, aunque sin limitación, transferencias Western, transferencias Northern, transferencias Southern, inmunohistoquímica, ensayo en fase de disolución, ELISA, por ejemplo, ELISA amplificado, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunocitoquímica, análisis espectrométrico de masa, por ejemplo, MALDI-TOF y SELDI-TOF, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, y métodos de amplificación de ácido nucleico.

En muchas realizaciones, el nivel de FR α no unido a una célula en la muestra (tal como, por ejemplo, orina o suero) se evalúa poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo que se une a FR α . Los anticuerpos que se unen a FR α son conocidos en la técnica e incluyen (i) el anticuerpo monoclonal de ratón LK26 (las cadenas pesadas y ligeras del mismo se presentan en el presente documento como SEQ ID NO: 22 y 23), como se describe en la Solicitud de Patente Europea N^o 86104170.5 (Rettig); (ii) el anticuerpo MORAb-003, como se describe en la Publicación Internacional N^o WO2004/113388 y en la Patente de EE.UU. N^o 5.646.253. Los anticuerpos monoclonales MOV18 y MOv19 también se unen a diferentes epítopos de la molécula FR α (anteriormente conocida como gp38/FBP). Miotti, S. et al. *Int J Cancer*, 38: 297-303 (1987). Por ejemplo, el anticuerpo MOV18 se une al epítipo mostrado en el presente documento como SEQ ID NO: 26 (TELLNVXMNAK*XKEKPXPX*KLXXQX) (nótese que en la posición 12, un residuo de triptófano o histidina es posible, y en la posición 21, es posible tener un residuo de ácido aspártico o un residuo de ácido glutámico), como se muestra en Coney et al. *Cancer Res*, 51: 6125-6132 (1991).

Tal como se utiliza aquí, el término "MORAb-003" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a FR α y que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada madura mostrada en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de cadena ligera madura de la SEQ ID NO: 8. Las correspondientes secuencias de aminoácidos pre-proteína para MORAb-003 se muestran en la SEQ ID NO: 9 (cadena pesada) y 10 (cadena ligera). El anticuerpo MORAb-003 comprende las siguientes CDRs: SEQ ID NO: 1 como CDRH1, SEQ ID NO: 2 como CDRH2, SEQ ID NO: 3 como CDRH3, SEQ ID NO: 4 como CDRL1, SEQ ID NO: 5 como CDRL2, y SEQ ID NO: 6 como CDRL3. Las células productoras de anticuerpos MORAb-003 han sido depositadas en la *American Type Culture Collection* (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 24 de abril de 2006, y se les ha asignado el N^o de Acceso PTA-7552.

Otros anticuerpos que se unen FR α y para uso en los métodos de la presente invención incluyen 9F3.H9.H3.H3.B5.G2 (también denominado 9F3), 19D4.B7 (también denominado 19D4), 24F12.B1 (también denominado 24F12), y 26B3.F2 (también denominado 26B3). Las secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos, sus CDR, y sus dominios variables de cadena pesada y ligera, así como las secuencias de polinucleótidos que pueden codificarlos, se proporcionan en la Tabla 33. En algunas realizaciones, estos anticuerpos son de IgG de ratón, o derivados de la misma. En otras realizaciones, los anticuerpos son humanos, humanizados, o quiméricos.

9F3

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 27. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 28. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 29. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 32. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 33. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 27; una secuencia de aminoácidos de CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 28; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 29. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 31; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 32; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 33. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 27; una secuencia de CDR2 de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 28; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 29, y también tienen una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 31; una secuencia de CDR2 de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 32; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 33.

El anticuerpo que se une a FR α puede incluir un dominio variable de cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 30. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir un dominio variable de cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 34. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir dominios variables de cadena ligera y pesada, donde el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 30, y el dominio variable de cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 34. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es el anticuerpo 9F3.H9.H3.H3.B5.G2 (9F3) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse ya sea a una forma nativa o a una forma no reducida de FR α . En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de IgG2a de ratón.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es un anticuerpo producido por las células productoras de anticuerpos depositadas en la *American Type Culture Collection* (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 19 de mayo de 2011 y se le ha asignado el N^o de Acceso PTA-11887. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α comprende una o más de las CDRs de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α comprende las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas.

19D4

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 35. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 37. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 40. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 41. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 35; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 36; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 37. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 39; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 40; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 41. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 35; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 36; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 37, y también tienen una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 39; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 40; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 41.

El anticuerpo que se une a FR α puede incluir un dominio variable de cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 38. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir un dominio variable de cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 42. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera o pesada de los dominios variables, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 38, y el dominio variable de cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 42. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es el anticuerpo 19D4.B7 (19D4) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse ya sea a una forma nativa o a una forma no reducida de FR α . En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de IgG2a de ratón.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es un anticuerpo producido por las células productoras de anticuerpos depositadas en la *American Type Culture Collection* (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 19 de mayo de 2011, y se le ha asignado el N^o de Acceso PTA-11884. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α comprende una o más de las CDRs de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α comprende las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas.

24F12

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 43. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 44. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 47. En algunas formas de realización, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 48. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 49. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 43; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 44; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 45. El anticuerpo

que se une a FR α puede incluir una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 47; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 48; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 49. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 43; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 44; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 45, y también tienen una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 47; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 48; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 49.

El anticuerpo que se une a FR α puede incluir un dominio variable de cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 46. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir un dominio variable de cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 50. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir dominios variables de cadena ligera y pesada, en la que el dominio variable de cadena ligera incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 46, y el dominio variable de cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 50. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es el anticuerpo 24F12.B1 (24F12) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse ya sea a una forma nativa o a una forma no reducida de FR α . En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de IgG1 de ratón.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es un anticuerpo que es producido por las células productoras de anticuerpos depositadas en la *American Type Culture Collection* (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 19 de mayo de 2011 y se le ha asignado el N $^{\circ}$ de Acceso PTA-11886. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α comprende una o más de las CDRs de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α comprende las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas.

26B3

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 51. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 52. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 53. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 55. En algunas formas de realización, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 56. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α incluye una secuencia de aminoácidos de cadena pesada CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 57. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 51; una secuencia de CDR2 de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 52; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 53. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 55; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 56; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 57. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 51; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 52; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 53, y también tienen una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos CDR1 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 55; una secuencia de aminoácidos CDR2 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 56; y una secuencia de aminoácidos CDR3 sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 57.

El anticuerpo que se une a FR α puede incluir un dominio variable de cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 54. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir un dominio variable de cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 58. El anticuerpo que se une a FR α puede incluir dominios variables de cadena ligera y pesada, donde el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 54, y el dominio variable de cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a la SEQ ID NO: 58. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es el anticuerpo 26B3.F2 (26B3) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse ya sea a una forma nativa o a una forma no reducida de FR α . En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de IgG1 de ratón.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α es un anticuerpo producido por las células productoras de anticuerpos depositadas en la *American Type Culture Collection* (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 19 de mayo de 2011 y se le ha asignado el N $^{\circ}$ de Acceso PTA-11885. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α comprende una o más de las CDRs de cadena ligera y pesada de los anticuerpos

producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FR α comprende las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos depositadas.

- 5 Las disposiciones de unión a antígeno de las CDRs se pueden diseñar usando proteínas de tipo anticuerpo como plantillas de CDR. Las proteínas de unión a antígeno diseñadas se incluyen dentro del alcance de los anticuerpos que se unen a FR α .

En la técnica se conocen otros anticuerpos reactivos que se unen a FR α , y en la actualidad, muchos de dichos anticuerpos reactivos están disponibles comercialmente (en base a una búsqueda de anticuerpos anti-FR α en <http://www.biocompare.com>), que se enumeran en la siguiente tabla.

Producto	Empresa	Cantidad	Aplicaciones	Reactividad
Anti-FR α humano de ratón purificado - MaxPab anticuerpo policlonal, no conjugado	Abnova Corporation	50 μ g	La detección de anticuerpos, Transferencia Western (lisado transfectado)	Humano
Anti-FR α humano de ratón purificado - MaxPab anticuerpo policlonal, no conjugado	Abnova Corporation	50 μ g	La detección de anticuerpos, Transferencia Western (lisado transfectado)	Humano
Anti-FR α humano de conejo purificado - MaxPab anticuerpo policlonal, no conjugado	Abnova Corporation	100 μ g	La detección de anticuerpos, Transferencia Western (lisado transfectado)	Humano
Anticuerpo policlonal anti-FR α de conejo, no conjugado	Aviva Systems Biology	50 μ g	Transferencia Western	Humano, ratón, rata
Anticuerpo policlonal anti-FR α humano de conejo, no conjugado	GeneTex	100 μ l	Transferencia Western. No se ha determinado la utilidad de este producto en otras aplicaciones.	Humano
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, conjugado con biotina	LifeSpan BioSciences	10 mg	ELISA (1:4000 - 1:20.000), Inmunofluorescencia, Inmunohistoquímica, transferencia Western	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, conjugado con biotina	LifeSpan BioSciences	No proporcionado	ELISA (1:5000 - 1:25.000), Transferencia Western	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, conjugado con Hrp	LifeSpan BioSciences	20 mg	ELISA (1:2000 - 1:10000), Inmunohistoquímica, Transferencia Western	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, conjugado con Hrp	LifeSpan BioSciences	1000 μ g	ELISA (1:2000 - 1:12000), Cambio de Gel, inmunohistoquímica (1:100 - 1:200), inmunohistoquímica	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, conjugado con Hrp	LifeSpan BioSciences	2000 μ g (200 μ l)	ELISA, Transferencia Western	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, conjugado con Hrp	LifeSpan BioSciences	No proporcionado	ELISA, inmunohistoquímica (secciones congeladas), inmunohistoquímica (Parafina), Transferencia Western	Bovino

ES 2 780 192 T3

Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, no conjugado	LifeSpan BioSciences	50 mg	ELISA (1:10000 - 1:40.000), inmunoprecipitación, Transferencia Western	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, no conjugado	LifeSpan BioSciences	10000 μ g	ELISA (1:10000 - 1:40.000), inmunoprecipitación, Transferencia Western	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, no conjugado	LifeSpan BioSciences	1 mL	ELISA (1:3000 - 1:9000), inmunoprecipitación, Transferencia Western	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de cabra, policlonal, no conjugado Receptor de folato alfa (FR α)	LifeSpan BioSciences	No proporcionado	ELISA (1:3000 - 1:9000), inmunoprecipitación, Transferencia Western	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) monoclonal anti-bovino de ratón, no conjugado	LifeSpan BioSciences	200 μ g	ELISA	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) monoclonal anti-bovino de ratón, no conjugado	LifeSpan BioSciences Receptor de folato alfa (FR α)	200 μ g	ELISA	Humano
Receptor de folato alfa (FR α) monoclonal anti-bovino de ratón, no conjugado	LifeSpan BioSciences	200 μ g	ELISA	Humano
Receptor de folato alfa (FR α) monoclonal anti-bovino de ratón, no conjugado	LifeSpan BioSciences	200 μ g	ELISA	No proporcionado
Receptor de folato alfa (FR α) monoclonal anti-bovino de ratón, no conjugado, clon 6d398	LifeSpan BioSciences	100 μ l	ELISA (1-10 μ g/ml), citometría de flujo, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica (secciones congeladas)	Mono
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de ratón, no conjugado	LifeSpan BioSciences	1 mL	ELISA	Bovino
Receptor de folato alfa (FR α) policlonal anti-bovino de ratón, no conjugado	LifeSpan BioSciences	No proporcionado	No proporcionado	Bovino
Anticuerpo policlonal FR α anti-humano de ratón, no conjugado, receptor de folato de clon 1 (adulto)	Novus Biologicals	0,05 mL	Transferencia Western, ELISA	
FR α policlonal anti-humano de ratón, no conjugado	Novus Biologicals	0,05 mg	ELISA, Transferencia Western	Humano

Anticuerpo policlonal purificado de afinidad FR α anti-humano de cabra, conjugado con biotina	R&D Systems	50 μ g	Transferencia Western	Humano
Anticuerpo policlonal purificado de afinidad FR α anti-humano de cabra, no conjugado	R&D Systems	100 μ g	Citometría de Flujo, Transferencia Western	Humano
Anticuerpo monoclonal FR α anti-humano de ratón, conjugado de alofocianina, clon 548908	R&D Systems	100 Ensayos	Citometría de flujo	Humano
Anticuerpo monoclonal FR α anti-humano de ratón, conjugado de ficoeritrina conjugado, clon 548908	R&D Systems	100 Ensayos	Citometría de flujo	Humano
Anticuerpo monoclonal FR α anti-humano de ratón, no conjugado, clon 548908	R&D Systems	100 μ g	Citometría de flujo, inmunocitoquímica, Transferencia Western	Humano
Anticuerpo monoclonal FR α anti-humano de ratón, no conjugado	United States Biological	100 μ g	ELISA, citometría de flujo, inmunocitoquímica, Transferencia Western	Humano

En una realización preferida, el anticuerpo que se une a FR α comprende al menos una de las siguientes CDRs, derivadas de las cadenas pesada y ligera de LK26 de ratón: SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3. Véase la Patente de EE.UU. N^o 5.646.253. Se pueden realizar otras mutaciones en las regiones de marco, tal como se muestra en la Patente de EE.UU. N^o 5.646.253.

En otra realización preferida, el anticuerpo incluye una cadena ligera de la región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13), LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14), LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15), y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO:16); y una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH I,I (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21). Véase la Patente de EE.UU. N^o 5.646.253 y la Patente de EE.UU. N^o 6.124.106. En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16). En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16). En una realización adicional, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).

En algunas realizaciones, las muestras pueden necesitar ser modificadas con el fin de hacer accesible el FR α a la unión del anticuerpo. En un aspecto particular de los métodos de inmunocitoquímica o inmunohistoquímica, los portaobjetos se pueden transferir a un tampón de pretratamiento y calentarse opcionalmente para aumentar la accesibilidad del antígeno. El calentamiento de la muestra en el tampón de pretratamiento interrumpe rápidamente la bi-capa lipídica de las células, y hace que los antígenos (puede ser el caso en muestras frescas, pero no lo que ocurre típicamente en muestras fijadas) (es decir, la proteína FR α) sean más accesibles para la unión del anticuerpo. El término "tampón de pretratamiento" se usa indistintamente en este documento para referirse a un tampón que se utiliza para preparar las muestras de citología o histología para la inmunotinción, en particular mediante el aumento de la accesibilidad de la proteína FR α para la unión de anticuerpos. El tampón de pretratamiento puede comprender una disolución salina de pH específico, un polímero, un detergente, o un tensioactivo no iónico o aniónico, tal como, por ejemplo, un agente tensioactivo etiloxilado aniónico o no iónico, un alcanoato o un alcoxilato o incluso mezclas de estos tensioactivos, o incluso el uso de una sal biliar. El tampón de pretratamiento puede ser, por ejemplo, una disolución de 0,1% a 1% de ácido desoxicólico, sal de sodio, o una disolución de sodio de laurilo-13-carboxilato de metilo (por ejemplo, Sandopan LS) y/o un complejo aniónico etoxilado. En algunas realizaciones, el tampón de pretratamiento también puede utilizarse como tampón de almacenamiento de portaobjetos. En una realización particular, la muestra, por ejemplo, muestra de orina, se centrifuga, se agita con vórtex, se diluye y/o se somete a tratamiento con guanidina.

En la práctica de la invención se puede utilizar cualquier método para la fabricación de proteína FR α más accesible para la unión de anticuerpo, incluyendo los métodos de recuperación de antígeno conocidos en la técnica. Véase,

por ejemplo, Bibbo, et al. (2002) *Acta. Cytol.* 46: 25-29; Saqi, et al. (2003) *Diagn. Cytopathol.* 27: 365-370; Bibbo, et al. (2003) *Anal. Quant. Citol. Histol.* 25: 8-11.

5 Tras el pretratamiento para aumentar la accesibilidad de la proteína de FR α , las muestras pueden ser bloqueadas usando un agente de bloqueo adecuado, por ejemplo, un reactivo de bloqueo de peroxidasa, tal como peróxido de hidrógeno. En algunas realizaciones, las muestras pueden ser bloqueadas usando un reactivo de bloqueo de proteína para prevenir la unión no específica del anticuerpo. El reactivo de bloqueo de proteína puede comprender, por ejemplo, caseína purificada. A continuación, se incuba con la muestra un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o policlonal, que se une específicamente a FR α .

10 Las técnicas para la detección son bien conocidas en la técnica de unión de anticuerpos. La unión a FR α del anticuerpo puede ser detectada mediante el uso de reactivos químicos que generan una señal detectable que se corresponde con el nivel de unión de anticuerpos y, en consecuencia, con el nivel de expresión de proteína FR α . En uno de los métodos de inmunohistoquímica o inmunocitoquímica de la invención, se detecta la unión de anticuerpos a través del uso de un anticuerpo secundario que está conjugado a un polímero marcado. Los ejemplos de polímeros marcados incluyen, aunque sin limitación, conjugados de polímero-enzima. Las enzimas de estos complejos se utilizan típicamente para catalizar la deposición de un cromógeno en el sitio de unión antígeno-anticuerpo, lo que resulta en una tinción de las células que se corresponde con el nivel de expresión del biomarcador de interés. Las enzimas incluyen, aunque sin limitación, peroxidasa de rábano (HRP) y fosfatasa alcalina (AP).

15 En un método inmunohistoquímico o inmunocitoquímico de la invención, la unión del anticuerpo a la proteína FR α se detecta a través del uso de un polímero marcado con HRP que se conjuga a un anticuerpo secundario. La unión del anticuerpo también se puede detectar a través del uso de un reactivo de sonda específica de la especie, que se une a anticuerpos monoclonales o policlonales, y un polímero conjugado con HRP, que se une al reactivo de sonda específica de la especie. Los portaobjetos se tiñen para la unión usando cualquier cromógeno, anticuerpo, por ejemplo, el cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB), y después se contratiñen con hematoxilina y, opcionalmente, un agente de azulado tal como hidróxido de amonio o TBS/Tween-20. Otros cromógenos adecuados incluyen, por ejemplo, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). En algunos aspectos de la invención, los portaobjetos son revisados microscópicamente por un citotécnico y/o un patólogo para evaluar la tinción de células, por ejemplo, la tinción fluorescente (es decir, la expresión de FR α). Alternativamente, las muestras pueden ser revisadas mediante microscopía automatizada o por personal con la ayuda de software de ordenador que facilite la identificación de células de tinción positiva.

20 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo está marcado. Por ejemplo, la detección de la unión del anticuerpo se puede facilitar mediante el acoplamiento del anticuerpo anti-FR α a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H . En una realización particular, el anticuerpo está marcado con un radiomarcador, un marcador cromóforo, un marcador fluoróforo, o un marcador enzimático.

25 En una realización de la invención se preparan muestras congeladas como se ha descrito anteriormente y se tiñen a continuación con anticuerpos contra FR α diluidos a una concentración apropiada usando, por ejemplo, disolución salina tamponada con Tris (TBS). Los anticuerpos primarios pueden detectarse mediante incubación de los portaobjetos en anti-inmunoglobulina biotinilada. Esta señal opcionalmente puede ser amplificada y visualizarse usando precipitación con diaminobencidina del antígeno. Además, los portaobjetos se pueden contrateñir opcionalmente con, por ejemplo, hematoxilina, para visualizar las células.

30 En otra realización, las muestras fijadas y embebidas se tiñen con anticuerpos contra FR α y se contratiñen como se ha descrito anteriormente para las secciones congeladas. Además, las muestras se pueden tratar opcionalmente con agentes para amplificar la señal con el fin de visualizar la tinción de anticuerpos. Por ejemplo, puede utilizarse una deposición catalizada por peroxidasa de biotil-tiramida, que a su vez se hace reaccionar con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Catalyzed Signal Amplification (CSA) System, DAKO, Carpintería, CA).

35 El especialista en la técnica reconocerá que la concentración de un anticuerpo particular utilizado para llevar a la práctica los métodos de la invención variará dependiendo de factores tales como el tiempo para la unión, el nivel de especificidad del anticuerpo para FR α , y el método de preparación de la muestra. Además, cuando se usan múltiples anticuerpos, la concentración requerida puede verse afectada por el orden en que los anticuerpos se aplican a la muestra, por ejemplo, al mismo tiempo como un cóctel o secuencialmente como reactivos de anticuerpo individuales. Además, la química de detección utilizada para visualizar la unión de anticuerpo a FR α debe ser optimizada para producir la relación señal-ruido deseada. En una realización de la invención, se utilizan métodos proteómicos, por ejemplo, espectrometría de masas, para detectar y cuantificar la proteína FR α . Por ejemplo, se puede utilizar espectrometría de masas de tiempo-de-vuelo de desorción/ionización por láser asociada a la matriz

(MALDI-TOF MS) o espectrometría de masas de tiempo-de-vuelo de desorción/ionización por láser potenciada por superficie (SELDI-TOF MS), que implica la aplicación de una muestra, tal como suero, a un chip de unión a proteínas (Wright, GL, Jr., et al (2002) *Expert Rev Mol Diagn.* 2: 549; Li, J., et al (2002) *Clin Chem.* 48: 1296; Laronga, C., et al (2003) *Dis Markers* 19: 229; Petricoin, EF, et al. (2002) 359: 572; Adam, BL, et al (2002) *Cancer Res* 62: 3609; Tolson, J., et al (2004) *Lab Invest* 84: 845; Xiao, Z., et al (2001) *Cancer Res* 61: 6029) para detectar y cuantificar la proteína FR α . Los métodos de espectrometría de masas se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N $^{\circ}$ 5.622.824, 5.605.798 y 5.547.835.

La presente invención además implica, al menos en parte, la identificación de FR α como biomarcador de pronóstico, es decir, como biomarcador de la progresión y/o la gravedad de un cáncer que expresa FR α , tal como cáncer de ovario o cáncer de pulmón de célula pequeña. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de evaluación de la progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto que padece cáncer de ovario, comparando el nivel de FR α en una muestra derivada de un sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, en el que una diferencia en el nivel de FR α en la muestra (tal como una muestra de orina o suero) derivada del sujeto en comparación con la muestra de control es un indicio de que el cáncer progresa rápidamente. Del mismo modo, los métodos de evaluación del nivel de riesgo de que un sujeto desarrolle un cáncer que expresa FR α implican comparar el nivel de FR α en una muestra derivada de un sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia en el nivel de FR α en la muestra (tal como una muestra de orina o suero) derivada del sujeto en comparación con la muestra de control es un indicio de que el sujeto tiene un mayor nivel de riesgo de desarrollar un cáncer que expresa FR α con respecto al riesgo normal en un individuo sano.

En una realización, la diferencia es un aumento. En otra realización, la diferencia es una disminución. En algunos tipos de cáncer (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello, cáncer de ovario), un mayor nivel de expresión de FR α se asocia con un peor pronóstico, mientras que en otros tipos de cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón de célula no pequeña), un mayor nivel de expresión de FR α se asocia con un mejor pronóstico. Por lo tanto, en una realización específica, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario o carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, y la diferencia es un aumento. En otra realización específica, el cáncer que expresa FR α es un cáncer de pulmón de célula no pequeña, y la diferencia es una disminución.

En ciertos aspectos, la invención proporciona métodos de evaluación de la progresión de un cáncer que expresa FR α en un sujeto que padece un cáncer que expresa FR α mediante la comparación del nivel de FR α en una muestra derivada de un sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde un aumento en el nivel de FR α en la muestra (tal como una muestra de orina o suero) derivada del sujeto en comparación con la muestra de control es un indicio de que el cáncer progresará rápidamente, o una disminución en el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el cáncer progresará lentamente o retrocederá. Del mismo modo, los métodos de evaluación del nivel de riesgo de que un sujeto desarrolle un cáncer que expresa FR α implican comparar el nivel de FR α en una muestra derivada de un sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde un aumento del nivel de FR α en la muestra (tal como una muestra de orina o suero) derivada del sujeto en comparación con la muestra de control es un indicio de que el sujeto tiene un mayor nivel de riesgo de desarrollar un cáncer que expresa FR α en comparación con el riesgo normal en un individuo sano, o una disminución en el nivel de FR α en la muestra derivada del sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto tiene un nivel inferior de riesgo de desarrollar un cáncer que expresa FR α , en comparación con un riesgo normal en un individuo sano.

Cualquier aumento o disminución clínicamente relevante o estadísticamente significativa, usando cualquier método de análisis conocido en la técnica, puede utilizarse en la evaluación del pronóstico, el riesgo y otros métodos de la invención. En una realización, un aumento en el nivel de FR α se refiere a un nivel que excede de un valor de corte determinado usando un análisis ROC, como se ejemplifica en el Ejemplo 6. En otra realización, una disminución en el nivel de FR α se refiere a un nivel en una muestra de ensayo que no excede de un valor de corte determinado utilizando un análisis de ROC.

En otras realizaciones, el aumento o disminución debe ser mayor que los límites de detección del método para determinar el nivel de FR α . En realizaciones adicionales, el aumento o disminución debe ser al menos mayor que el error estándar de un método de evaluación, y preferiblemente una diferencia de al menos aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1000 veces o mayor que el error estándar del método de evaluación. En algunas realizaciones, el aumento o disminución se evalúa utilizando estadísticas descriptivas paramétricas o no paramétricas, comparaciones, análisis de regresión, y similares.

En otras realizaciones, el aumento o la disminución es un nivel en la muestra derivada del sujeto que es aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 100%, aproximadamente 150%, aproximadamente 200%, aproximadamente 300%, aproximadamente 400%, aproximadamente 500%, aproximadamente 600%, aproximadamente 700%, aproximadamente 800%, aproximadamente 900% o aproximadamente 1.000% mayor o menor que el nivel de FR α en la muestra de control. En realizaciones

alternativas, el aumento o la disminución es un nivel en la muestra derivada del sujeto que es al menos aproximadamente 1,5, y más preferiblemente aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco o más desviaciones estándar por encima o por debajo del nivel medio de $FR\alpha$ en la muestra de control. Tal como se usa en la presente memoria, la frase "progresión de un cáncer que expresa $FR\alpha$ en un sujeto que padece un cáncer que expresa $FR\alpha$ " puede referirse a la progresión de un cáncer que expresa $FR\alpha$ desde un estado de cáncer menos severo a un estado más grave. Esto podría incluir un aumento en el número o la gravedad de los tumores, el grado de metástasis, la velocidad con la que el cáncer está creciendo y extendiéndose, y similares. En ciertas realizaciones, la progresión es una progresión desde un estadio menos severo a un estadio más severo, donde el estadio se evalúa de acuerdo con un esquema de clasificación conocido en la técnica. En una realización, en la que el cáncer que expresa $FR\alpha$ es cáncer de ovario, la progresión se refiere a una progresión desde el estadio I al estadio II, desde el estadio II al estadio III, etc. En otra realización, en la que el cáncer que expresa $FR\alpha$ es cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), la progresión se refiere a una progresión del estadio 0 al estadio IA, del estadio IA al estadio IB, del estadio IB al estadio IIA, del estadio IIA al estadio IIB, del estadio Etapa IIB al estadio IIC, etc. En otra forma de realización, en la que el cáncer que expresa $FR\alpha$ es cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), la progresión se refiere a una progresión desde un estado menos severo a uno más severo, determinado con arreglo al sistema de clasificación TNM. Véase Spira; Greene; Sobin.

Alternativamente, la frase "progresión de un cáncer que expresa $FR\alpha$ en un sujeto que padece un cáncer que expresa $FR\alpha$ " puede referirse a una regresión de un cáncer que expresa $FR\alpha$ desde un estado más grave a uno menos grave, tal como una disminución en el número o la gravedad de los tumores, el grado de metástasis, la velocidad con la que el cáncer está creciendo extendiéndose, y similares. En ciertas realizaciones, la progresión es una progresión desde un estadio más severa a una estadio menos grave, en la que la estadio se evalúa de acuerdo con un esquema de clasificación conocido en la técnica. En una realización, en el que el cáncer que expresa $FR\alpha$ es cáncer de ovario, la progresión se refiere a una regresión desde el estadio IV al estadio III, desde el estadio III al estadio II, etc. En otra realización, en el que el cáncer que expresa $FR\alpha$ es cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), la progresión se refiere a una progresión desde el estadio IV al estadio IIIB, desde el estadio IIIB al estadio IIIA, desde el estadio IIIA al estadio IIB, etc. En otra realización, en el que el cáncer que expresa $FR\alpha$ es cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), la progresión se refiere a una progresión desde un estadio más severo a uno menos severo, tal como se determina bajo el sistema de clasificación TNM. Véase Spira; Greene; Sobin.

En realizaciones adicionales, puede usarse el nivel de $FR\alpha$ para calcular la probabilidad de que un sujeto esté afectado por un cáncer que expresa $FR\alpha$, determinar la progresión de un cáncer que expresa $FR\alpha$ en un sujeto, determinar el nivel de riesgo de desarrollar un cáncer que expresa $FR\alpha$, determinar el riesgo de recurrencia del cáncer en un sujeto que está siendo tratado por un cáncer que expresa $FR\alpha$, determinar la supervivencia de un sujeto que está siendo tratado por un cáncer que expresa $FR\alpha$, determinar la eficacia del régimen de tratamiento para tratar un cáncer que expresa $FR\alpha$, y similares, utilizando los métodos de la invención, que pueden incluir los métodos de análisis de regresión conocidos por el especialista en la técnica. Por ejemplo, los modelos de regresión adecuados incluyen, aunque sin limitación, CART (por ejemplo, Hill, T y Lewicki, P. (2006) "STATISTICS Methods and Applications" StatSoft, Tulsa, OK), Cox (por ejemplo, www.evidence-based-medicine.co.uk), exponencial, normal y log normal (por ejemplo, www.obgyn.cam.ac.uk/mrg/statsbook/stsurvan.html), logística (por ejemplo, www.wikipedia.org/wiki/Logistic_regression), paramétrico, no paramétrico, semi-paramétrico (por ejemplo, www.soc-serv.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion), lineal (por ejemplo, www.wikipedia.org/wiki/Linear_regression), o aditivo (por ejemplo, www.wikipedia.org/wiki/Generalized_additive_model).

En una realización, un análisis de regresión incluye el nivel de $FR\alpha$. En realizaciones adicionales, un análisis de regresión puede incluir covariables clínicas y/o moleculares adicionales. Tales covariables clínicas incluyen, aunque sin limitación, la edad del sujeto, el estadio del tumor, el grado del tumor, el tamaño del tumor, el régimen de tratamiento, por ejemplo, quimioterapia y/o terapia de radiación, el resultado clínico (por ejemplo, recaída, supervivencia específica de la enfermedad, fracaso de la terapia), y/o el resultado clínico en función del tiempo después del diagnóstico, tiempo después del inicio de la terapia, y/o el tiempo después de la finalización del tratamiento. Las covariables moleculares pueden incluir, aunque sin limitación, valores de otros marcadores moleculares adicionales. Por ejemplo, en realizaciones en las que el cáncer que expresa $FR\alpha$ es cáncer de ovario, tales marcadores pueden incluir, por ejemplo, los niveles de CA125 en suero, niveles de DF3 de suero, y/o los niveles de LPA en plasma.

En otros aspectos, la invención proporciona métodos para monitorizar la eficacia de un régimen de terapia o tratamiento. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos para monitorizar la eficacia del tratamiento con MORAb-003 de cáncer de ovario o cáncer de pulmón en un sujeto que padece de cáncer de ovario o cáncer de pulmón. Específicamente, los métodos implican determinar el nivel de receptor de folato alfa ($FR\alpha$) que no está unido a una célula, en una muestra derivada de dicho sujeto, en el que a dicho sujeto se le ha administrado previamente MORAb-003; y comparar el nivel de receptor de folato alfa ($FR\alpha$) que no está unido a una célula con el nivel de $FR\alpha$ en una muestra de control, en donde un incremento o ningún cambio en el nivel de $FR\alpha$ en la muestra derivada de dicho sujeto en comparación con el nivel de $FR\alpha$ en la muestra de control, es un indicio de que el tratamiento con MORAb-003 no es eficaz; y en el que una disminución en el nivel de $FR\alpha$ en la muestra derivada de dicho sujeto en comparación con el nivel de $FR\alpha$ en la muestra de control es un indicio de que el tratamiento MORAb-003 es eficaz.

5 Por ejemplo, la muestra de control puede derivarse de un sujeto no sometido al régimen de tratamiento, y una muestra de ensayo puede derivarse de un sujeto sometido a al menos una parte del régimen de tratamiento. Alternativamente, la muestra de ensayo y la muestra de control pueden derivarse del mismo sujeto. Por ejemplo, la muestra de ensayo puede ser una muestra derivada de un sujeto después de la administración de un agente terapéutico, tal como MORAb-003. La muestra de control puede ser una muestra derivada de un sujeto antes de la administración de un compuesto terapéutico o en una etapa anterior del régimen terapéutico. Por consiguiente, una disminución en el nivel de expresión de FR α en la muestra de ensayo, respecto a la muestra de control, es un indicio de que la terapia ha frenado la progresión del cáncer que expresa FR α , por ejemplo, cáncer de ovario. Para cánceres que expresan FR α en los que un nivel más alto de FR α está asociado con un peor pronóstico, tales como por ejemplo cáncer de ovario o carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, una disminución en el nivel de expresión de FR α en la muestra de ensayo, respecto de la muestra de control, es un indicio de que la terapia es eficaz para retrasar la progresión del cáncer que expresa FR α , o para producir una regresión del cáncer, en el sujeto que padece el cáncer que expresa FR α . En una realización preferida, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario.

15 En diversas realizaciones de este aspecto de la invención, la muestra puede ser orina, suero, plasma o ascitis. En realizaciones particulares, la muestra es orina o suero. Además, el FR α puede determinarse por contacto de la muestra con un anticuerpo que se une a FR α , opcionalmente, usando anticuerpos como los descritos en el presente documento y métodos de ensayo como los descritos en el presente documento.

20 En diversas realizaciones, el anticuerpo de tratamiento MORAb-003 es (a) un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 8; (b) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003; o (c) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, la SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 4 (SVSSISSNNLH) como CDRL1, la SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 6 (QWSSYPYMYT) como CDRL3.

30 En una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario. En otras realizaciones, el cáncer que expresa FR α es cáncer de pulmón. En realizaciones más específicas, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC). En una de tales realizaciones, el NSCLC se selecciona del grupo que consiste de adenocarcinoma, carcinoma de pulmón de células escamosas, carcinoma de pulmón de célula grande, NSCLC pleomórfico, tumor carcinoide, carcinoma de glándula salival, y carcinoma no clasificado. En una realización preferida, el NSCLC es adenocarcinoma. En realizaciones alternativas, el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón de célula pequeña (SCLC). En otra realización, el cáncer de pulmón es carcinoma bronquioalveolar. En otra realización adicional, el cáncer de pulmón es un tumor carcinoide de pulmón.

35 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para clasificar un sujeto con un cáncer que expresa FR α en grupos de terapia de cáncer en base al nivel determinado de FR α en una muestra. En una realización preferida, el método implica la clasificación de un sujeto con un cáncer que expresa FR α en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer. En otras realizaciones, el método implica la clasificación de un sujeto con un cáncer que expresa FR α en uno de al menos aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco, aproximadamente seis, aproximadamente siete, aproximadamente ocho, aproximadamente nueve, o aproximadamente diez grupos de terapia de cáncer.

45 Según la presente invención, los niveles de FR α pueden estar asociados con la gravedad, es decir, el estadio, del cáncer que expresa FR α . Por ejemplo, el cáncer de ovario se clasifica en diferentes estadios en función de la gravedad del cáncer, como se expone en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para clasificar el cáncer de ovario en Estadio I, por ejemplo, Estadio IA, Estadio IB o Estadio IC; Estadio II, por ejemplo, Estadio IIA, Estadio IIB o Estadio IIC; Estadio III, por ejemplo, Estadio IIIA, Estadio IIIB o Estadio IIIC; o cáncer de ovario de Estadio IV.

50 El SCLS o el NSCLC pueden clasificarse en diferentes estadios en función de la gravedad del cáncer, como se expone en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de clasificación del cáncer de pulmón, por ejemplo, SCLS o NSCLC, en estadio oculto (escondido); estadio 0; Estadio I, por ejemplo, estadios IA y IB; Estadio II, por ejemplo, estadios IIA y IIB; Estadio III, por ejemplo, etapas IIIA y IIIB; o cáncer de pulmón de Estadio IV.

55 En otro aspecto adicional, la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el FR α puede servir como biomarcador predictivo para el tratamiento de cánceres que expresan FR α . Específicamente, los métodos de la presente invención permiten evaluar si un sujeto responderá al tratamiento, por ejemplo, con MORAb-003, y si iniciar el tratamiento y cuándo hacerlo, por ejemplo, con MORAb-003, mediante la evaluación de los niveles de FR α en un sujeto.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir si un sujeto que padece de un cáncer que expresa FR α , por ejemplo, cáncer de ovario o de pulmón, responderá al tratamiento con MORAb-003, mediante la determinación del nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada

de dicho sujeto; y comparando el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en la muestra derivada de dicho sujeto con el nivel de FR α en una muestra de control, donde una diferencia entre el nivel de FR α en la muestra deriva de dicho sujeto y el nivel de FR α en la muestra de control es un indicio de que el sujeto responde al tratamiento con MORAb-003.

5 En ciertas realizaciones, el grado de diferencia entre los niveles de FR α no unido a una célula de cáncer en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control es indicativo de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003. Por ejemplo, una diferencia de al menos aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1000 veces o mayor que el error estándar del método de evaluación es indicativo de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003. Alternativamente o en combinación, una diferencia de al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 100%, aproximadamente 150%, aproximadamente 200%, aproximadamente 300%, aproximadamente 400%, aproximadamente 500%, aproximadamente 600%, aproximadamente 700%, aproximadamente 800%, aproximadamente 900% o aproximadamente 1000% es indicativo de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003. Alternativamente o en combinación, una diferencia de al menos aproximadamente 1,5, y más preferiblemente de aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco o más desviaciones estándar es indicativo de que el sujeto responderá al tratamiento con MORAb-003.

En diversas realizaciones, el anticuerpo de tratamiento MORAb-003 es (a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003; o (b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, la SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 4 (SVSSISSNNLH) como CDRL1, la SEQ ID NO: 5 (GTSNLAS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3.

En diversas realizaciones, la muestra es orina, plasma, suero o ascitis. En realizaciones particulares, la muestra es orina o suero. En realizaciones adicionales, el cáncer que expresa FR α se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer cerebral, cáncer del cuello uterino, cáncer de la nasofaringe, carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hueso, cáncer de hipófisis, cáncer colorrectal y cáncer de tiroides medular. En una realización particular, el cáncer que expresa FR α es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer que expresa FR α es cáncer de pulmón de célula no pequeña, tal como adenocarcinoma.

B. Ensayos basados en anticuerpos anti-FR α para detectar cánceres que expresan FR α

35 Hay una variedad de formatos de ensayo conocidos por los especialistas en la una técnica para el uso de un anticuerpo para detectar un polipéptido en una muestra, que incluyen, aunque sin limitación, análisis de inmunoabsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, ensayo en fase de disolución, diálisis de equilibrio, inmunodifusión y otras técnicas. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Weir, DM, "Handbook of Experimental Immunology", 1986, Blackwell Scientific, Boston. Por ejemplo, el ensayo puede realizarse en un formato de transferencia de Western, en el que una preparación de proteína de la muestra biológica se somete a electroforesis, se transfiere a una membrana adecuada y se deja reaccionar con el anticuerpo. La presencia del anticuerpo en la membrana puede entonces detectarse utilizando un reactivo de detección adecuado, como es bien conocido en la técnica y se describe a continuación.

45 En otra realización, el ensayo implica el uso de un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse al polipéptido FR α diana y separarlo del resto de la muestra. El polipéptido FR α unido puede entonces detectarse usando un segundo anticuerpo reactivo con un determinante antigénico de polipéptido FR α distinto, por ejemplo, un reactivo que contiene un resto informador detectable. Como ejemplo no limitativo, de acuerdo con esta realización, el anticuerpo inmovilizado y el segundo anticuerpo que reconoce determinantes antigénicos distintos pueden ser cualquiera de dos de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento, seleccionados de MORAb-003, MOV18, 548908, 6D398, o variantes de los mismos tal como se describe en el presente documento. Alternativamente, se puede utilizar un ensayo competitivo en el que el FR α es marcado con un resto indicador detectable y se deja unir al anticuerpo anti-FR α inmovilizado después de la incubación del anticuerpo inmovilizado con la muestra. La medida en que los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado al anticuerpo es indicativa de la reactividad de la muestra con el anticuerpo inmovilizado y, como resultado, es indicativa del nivel de FR α en la muestra.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los especialistas en la técnica al que el anticuerpo puede unirse, tal como un pocillo de ensayo en una placa de microtitulación, un filtro de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser una perla o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El anticuerpo puede inmovilizarse sobre el soporte sólido usando

una variedad de técnicas conocidas por los especialistas en la técnica, ampliamente descritas en la bibliografía científica y de patentes.

En ciertas realizaciones preferidas, el ensayo para la detección de FR α en una muestra es un ensayo tipo sándwich de dos anticuerpos. Este ensayo puede realizarse poniendo en contacto primero un anticuerpo específico de FR α (p.ej., MORAb-003, MOV18, 548908, 6D398 o variantes de los mismos tal como se describe en el presente documento) que ha sido inmovilizado sobre un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una de placa de microtitulación, con la muestra biológica, de manera que se permite la unión al anticuerpo inmovilizado de una molécula soluble de origen natural en la muestra y que tiene un determinante antigénico que es reactivo (por ejemplo, generalmente es suficiente un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente) para formar un complejo antígeno-anticuerpo o un complejo inmune. Los constituyentes no unidos de la muestra se separan de los complejos inmunes inmovilizados. A continuación, se añade un segundo anticuerpo específico para FR α , en el que el sitio de combinación de antígeno del segundo anticuerpo no inhibe competitivamente la unión del sitio de combinación de antígeno del primer anticuerpo de FR α inmovilizado (por ejemplo, MORAb-003, MOV18, 548908, 6D398 o variantes de los mismos tal como se describen aquí, que no es igual que el anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre el soporte sólido). El segundo anticuerpo puede estar marcado de forma detectable, tal como se indica en la presente memoria, de manera que se puede detectar directamente. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede ser detectado indirectamente a través del uso de un anti-anticuerpo secundario (o "segunda etapa") marcado de manera detectable, o usando un reactivo de detección específica como se proporciona aquí. El método objeto de la invención no se limita a cualquier procedimiento particular de detección, como apreciarán los que tienen familiaridad con inmunoensayos, ya que hay numerosos reactivos y configuraciones para detectar inmunológicamente un antígeno particular (por ejemplo, FR α) en un inmunoensayo tipo sándwich de dos anticuerpos.

En ciertas realizaciones preferidas de la invención que usan el ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos descrito anteriormente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para FR α es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para FR α es un anticuerpo policlonal. En otras formas particulares de realización de la invención, el primer anticuerpo inmovilizado específico para FR α es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para FR α es un anticuerpo policlonal. En otras formas específicas de realización de la invención, el primer anticuerpo inmovilizado específico para FR α es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para FR α es un anticuerpo monoclonal. En otras formas específicas de realización de la invención, el primer anticuerpo inmovilizado específico para FR α es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para FR α es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, en las realizaciones cabe señalar que los anticuerpos monoclonales MORAb-003, MOV18, 548908, 6D398 o variantes de los mismos tal como se describen en el presente documento, como se proporciona aquí, reconocen determinantes antigénicos distintos y no competitivos (por ejemplo, epítomos) en polipéptidos de FR α , de manera que se puede emplear cualquier combinación de pares de estos anticuerpos monoclonales. En otras realizaciones preferidas de la invención, el primer anticuerpo inmovilizado específico para FR α y/o el segundo anticuerpo específico para FR α pueden ser cualquiera del tipo de anticuerpos conocidos en la técnica y referenciados en el presente documento, por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, proteínas de fusión de la región V de inmunoglobulina o anticuerpos de cadena sencilla. Aquellos familiarizados con la técnica apreciarán que la presente invención abarca el uso de otras formas de anticuerpos, fragmentos, derivados y similares, en los métodos descritos y reivindicados en el presente documento.

En ciertas realizaciones particularmente preferidas, el segundo anticuerpo puede contener un resto indicador o marcador detectable tal como una enzima, colorante, radionúclido, grupo luminiscente o biotina, o similares. La cantidad del segundo anticuerpo que permanece unido al soporte sólido se determina entonces utilizando un método apropiado para el resto indicador detectable o etiqueta específicos. Para grupos radioactivos, generalmente son apropiados el recuento de centelleo o métodos autorradiográficos. Los conjugados anticuerpo-enzima se pueden preparar usando una variedad de técnicas de acoplamiento (para una revisión véase, por ejemplo, Scouten, WH, Methods in Enzymology 135: 30-65, 1987). Para detectar colorantes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes se pueden utilizar métodos espectroscópicos (incluyendo, por ejemplo, productos colorimétricos de reacciones enzimáticas). La biotina puede detectarse utilizando avidina o estreptavidina, acoplada a un grupo indicador diferente (comúnmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores enzimáticos pueden detectarse generalmente mediante la adición de sustrato (generalmente durante un periodo específico de tiempo), seguido por medios espectroscópicos, análisis espectrofotométrico u otro de los productos de reacción. Se pueden utilizar patrones y adiciones de patrones para determinar el nivel de polipéptido de mesotelina en una muestra, utilizando técnicas bien conocidas.

Un método de cribado para determinar la presencia de un cáncer que expresa FR α de acuerdo con la presente invención puede mejorarse adicionalmente mediante la detección de más de un marcador asociado a tumor en una muestra biológica de un sujeto. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método de cribado que, además de la detección de la reactividad de FR α no unido a una célula, también incluye la detección de al menos un marcador soluble adicional de un cuadro clínico maligno utilizando métodos establecidos, como se conoce en la técnica y se proporciona en el presente documento. Como se señaló anteriormente, hay actualmente un número de antígenos asociados a tumores solubles que son detectables en muestras de fluidos biológicos obtenidos fácilmente.

C. Kits

5 La invención también proporciona usos de kits para evaluar si un sujeto padece un cáncer que expresa FR α , para la evaluación de la progresión de un cáncer que expresa FR α , para evaluar el nivel de riesgo de que un sujeto desarrolle un cáncer que expresa FR α , o para monitorizar la eficacia de un régimen de terapia o tratamiento para un cáncer que expresa FR α . Estos kits incluyen medios para determinar el nivel de expresión de FR α e instrucciones para el uso del kit para evaluar la progresión de un cáncer que expresa FR α , para evaluar el nivel de riesgo de que un sujeto desarrolle un cáncer que expresa FR α , o para supervisar la eficacia de un régimen de terapia o tratamiento de un cáncer que expresa FR α .

10 Los kits pueden comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para llevar a cabo los métodos de la invención. A modo de ejemplo, los kits pueden comprender medios para obtener una muestra de un sujeto, una muestra de control, por ejemplo, una muestra de un sujeto que padece un cáncer de progresión lenta y/o un sujeto que no tiene cáncer, uno o más compartimentos de muestra, e instrucciones que describen el rendimiento de un método de la invención y controles/estándares específicos de tejidos.

15 Los medios para determinar el nivel de FR α incluyen métodos conocidos en la técnica para la evaluación de los niveles de proteína, como se ha discutido anteriormente, y formas de realización preferidas específicas, por ejemplo, utilizando el anticuerpo MORAb-003, como se discute en el presente documento. Así, por ejemplo, en una realización, el nivel de FR α se evalúa poniendo en contacto una muestra derivada de un sujeto (tal como orina o suero) con un agente de unión de receptor de folato alfa (FR α). En una realización preferida, el agente de unión es un anticuerpo. Muchos de los tipos de anticuerpos que se unen a FR α se discuten más arriba en los métodos de la invención y también se pueden utilizar en los kits.

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

25 Los kits pueden incluir también medios para aislar una muestra de un sujeto. Estos medios pueden comprender uno o más elementos del equipo o de los reactivos que se pueden utilizar para obtener un fluido o tejido de un sujeto. Los medios para la obtención de una muestra de un sujeto también pueden comprender medios para aislar componentes de la sangre, tales como suero, a partir de una muestra de sangre. Preferiblemente, el kit está diseñado para su uso con un sujeto humano.

III. Ensayos de cribado

30 En realizaciones adicionales, la invención también proporciona métodos (también denominados aquí "ensayos de selección") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, moléculas pequeñas u otros fármacos), que modulan el crecimiento, la progresión y/o la agresividad del cáncer, por ejemplo, un cáncer que expresa FR α , o una célula de cáncer, por ejemplo, una célula de cáncer de ovario, monitorizando y comparando los niveles de FR α en una muestra. Tales ensayos comprenden típicamente un compuesto de ensayo, o una combinación de compuestos de ensayo, cuya actividad contra el cáncer o una célula de cáncer se evalúa. Los compuestos identificados mediante ensayos tales como los descritos en el presente documento pueden ser útiles, por ejemplo, para modular, por ejemplo, inhibir, paliar, tratar, o prevenir la agresividad de un cáncer que expresa FR α o de una célula de cáncer que expresa FR α , por ejemplo, una célula de cáncer de ovario. Monitorizando el nivel de FR α en una muestra se puede determinar si el cáncer que expresa FR α está progresando o retrocediendo, y si el compuesto de ensayo tiene el efecto deseado. Por ejemplo, en realizaciones en las que el cáncer que expresa FR α es un cáncer para el cual mayores niveles de FR α se asocian con un peor pronóstico, una disminución en el nivel de FR α después de la administración del/de los compuesto(s) de ensayo sería indicativa de la eficacia del compuesto de ensayo. Por el contrario, un aumento en el nivel de FR α después de la administración del/de los compuesto(s) de ensayo indicaría que el compuesto de ensayo no es eficaz en el tratamiento de cáncer de ovario. Por el contrario, en formas de realización en las que el cáncer que expresa FR α es un cáncer para el que mayores niveles de FR α están asociados con un mejor pronóstico, un aumento en el nivel de FR α después de la administración del/de los compuesto(s) de ensayo sería indicativo de la eficacia del compuesto de ensayo. Por el contrario, una disminución en el nivel de FR α después de la administración del/de los compuesto(s) de ensayo indicaría que el compuesto de ensayo no es eficaz en el tratamiento de cáncer de ovario.

Los compuestos de ensayo utilizados en los ensayos de cribado de la presente invención pueden obtenerse de cualquier fuente disponible, incluyendo bibliotecas sistemáticas de los compuestos naturales y/o sintéticos. Los compuestos de ensayo también se pueden obtener mediante cualquiera de las numerosas estrategias de los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen bibliotecas biológicas; bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con un nuevo esqueleto no peptídico que son resistentes a la degradación enzimática, pero que sin embargo siguen siendo bioactivas; véase, por ejemplo, Zuckermann et al., 1994, J. Med Chem. 37: 2678-85); bibliotecas en fase de disolución o en fase sólida paralelas espacialmente direccionables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el método de biblioteca 'una perla-un compuesto'; y métodos de bibliotecas sintéticas que emplean la selección por

cromatografía de afinidad. Las estrategias de biblioteca biológica y biblioteca de peptoides se limitan a bibliotecas de péptidos, mientras que las otras cuatro estrategias son aplicables a bibliotecas de compuestos de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12: 145).

5 En la técnica se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares, por ejemplo en: DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann et al. (1994). *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho et al. (1993) *Science* 261: 1303; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y en Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233.

10 Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (por ejemplo, Houghten, 1992, *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (Lam, 1991, *Nature* 354: 82-84), chips (Fodor, 1993, *Nature* 364: 555-556), bacterias y/o esporas, (Ladner, Patente de EE.UU. 5.223.409), plásmidos (Cull et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1865-1869) o en fago (Scott y Smith, 1990, *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990, *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc Natl Acad Sci.* 87: 6378-6382; Felici, 1991, *J. Mol Biol* 222: 301-310; Ladner, ver anterior).

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

15 Ejemplos

EJEMPLO 1. Determinación de niveles de FR α en muestras de orina de sujetos humanos con y sin cáncer de ovario medidos por inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA).

Materiales y métodos

20 Se obtuvieron muestras de orina de sujetos humanos, incluidos los sujetos que padecen cáncer de ovario y de sujetos de control normales que no padecen cáncer de ovario. Se determinaron los niveles de FR α en muestras de orina utilizando un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), de acuerdo con el siguiente procedimiento (véase Namba et al (1999) *Analytical Science* 15: 1087-1093):

i. Recubrimiento de anticuerpos en microperlas

25 El anticuerpo anti-receptor de folato alfa monoclonal se revistió sobre la superficie de microesferas (Dynabeads M-450 Epoxy, Dynal). Se mezclaron treinta y seis miligramos de microperlas con 1,2 mL de anticuerpo MOV18 (0,36 mg/ml, Enzo Life Science) en 0,15 mol/L de solución salina de tampón fosfato (PBS) de pH 7,8, seguido de un mezclado suave durante 16 horas a temperatura ambiente. A continuación, las microperlas se lavaron 5 veces con tampón HEPES 50 mM que contenía suero normal de conejo (NRS) al 0,1%, 150 mmol/L de NaCl, 0,01% de Tween 20 pH 7,5 (tampón de lavado). A continuación, las microesferas revestidas se suspendieron en 1,2 mL de tampón HEPES 50 mM que contenía 20% de NRS, 150 mmol/L de NaCl y 0,01% de Tween 20 pH 7,5 (tampón de reacción) para bloquear la superficie no unida, seguido de un mezclado suave durante 3,5 horas a temperatura ambiente. Por último, las microperlas se lavaron 5 veces con tampón de lavado y se resuspendieron con 1,2 mL de tampón HEPES 50 mM que contiene 10% de NRS, 150 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L de EDTA-2Na y 0,01% de Tween 20 pH 7,5 (tampón de reacción), de modo que la concentración de microesferas fue de 30 mg/mL. Las microesferas se almacenaron a 4°C hasta su uso.

ii. Etiquetado de anticuerpo con rutenio-quelato-NHS (Ru)

40 Un mililitro de MORAb-003 (1 mg/mL) en PBS se mezcló con 14 μ L de Ru (10 mg/mL), la relación molar inicial de anticuerpo a Ru fue de 1:20, seguido de agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se terminó mediante la adición de 25 μ L de disolución de glicina 2 mol/L, seguido de incubación durante 20 minutos. El anticuerpo marcado se purificó por filtración en gel utilizando Sephadex G-25 (GE Healthcare) eluido con PBS. Se recogió la fracción amarilla que se eluyó primero y se determinó la concentración de anticuerpo y Ru por medio del kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific) y la absorción a 455 nm, respectivamente. La relación molar final se calculó mediante la fórmula: Relación molar final=[(absorción a 455)/13700]/[Ab(mg/mL/150.000)]. El anticuerpo marcado se almacenó a 4°C hasta su uso.

45 iii. Inmunoensayo de una etapa

Las microperlas revestidas de anticuerpo se establecieron en la tabla de reactivos de Picolumi 8220 (Sanko, Tokio, Japón) después de ajustar la concentración de las perlas a 1,5 mg/mL (disolución de trabajo) en tampón de reacción. El anticuerpo marcado con Ru se estableció en la tabla de reactivos de Picolumi 8220 después de ajustar la concentración de anticuerpo a 2 μ g/mL (disolución de trabajo) en tampón de reacción.

50 Se dispensaron diez microlitros de orina (diluidos 1:51 en tampón de reacción) o de patrón de FR α (preparado en tampón de reacción) y 100 μ L de tampón de reacción en un tubo de reacción (Sanko, Tokio, Japón) y se estableció en Picolumi 8220.

Los pasos siguientes se llevaron a cabo automáticamente mediante Picolumi 8220. Se dispensaron veinticinco microlitros de perlas (disolución de trabajo) y 180 μ L de anticuerpo marcado con Ru (disolución de trabajo). Después

de 26 minutos de incubación a 30 +/- 2°C, las perlas se lavaron y se suspendieron en 300 µL de la disolución de electrolito (Sanko, Tokio, Japón). Las perlas lavadas se transfirieron posteriormente al electrodo y se midió la emisión de electroquimioluminiscencia (ECL).

Todas las mediciones de ECL se llevaron a cabo por duplicado.

5 Resultados

La Tabla 1 representa los niveles en orina de FRα en sujetos individuales con cáncer de ovario y en sujetos de control femeninos no afectados.

Tabla 1: Niveles de FRα en la orina de sujetos con cáncer de ovario y de sujetos de control femeninos normales.

Grupo	Muestra nº	FRα (pg/mL)
cáncer de ovario	1	27800
	2	40242
	3	85580
	4	4994
	5	2017
	6	3781
	7	29469
	8	47456
	9	4479
	10	11920
	11	18352
	12	162017
	13	30630
	14	14431
	15	11801
	16	13470
	17	11563
	18	22185
	19	52106
control normal	20	8491
	21	4885
	22	3595
	23	21301
	24	22757
	25	16578
	26	6081
	27	4195
	28	12169
	29	20639

10 La Figura 2 representa la distribución de niveles de FRα en la orina de sujetos con cáncer de ovario y de sujetos de control femeninos normales, tal como se expone en la Tabla 1.

La Tabla 2 resume el número de sujetos (n), la media, la desviación estándar (SD), los valores máximos (Max.) y mínimos (Min.) correspondientes a los niveles de FRα en el grupo de cáncer de ovario y en el grupo de control normal femenino.

Tabla 2: Resumen de la medición de FRα en orina.

	FRα (pg/mL)	
	cáncer de ovario	femenino normal
N	19	10
Media	31279	12069
SD	37895	7654
Max.	162017	22757
Min.	2017	3595

15

Discusión

Se detectó un nivel alto de FRα en la orina de los sujetos con cáncer de ovario. Por otra parte, los niveles de FRα diferían significativamente entre los grupos de cáncer de ovario y los grupos de control femeninos normales (p=0,03, unilateral).

5 EJEMPLO 2. Linealidad de dilución - Determinación de niveles de FRα en muestras de orina diluidas en serie, medidos mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA)

La linealidad de dilución es una medida de la precisión de un ensayo. Dos muestras de orina se diluyeron en serie en un factor de 10 y 100. Los niveles FRα de cada muestra se midieron tal como se expone en el Ejemplo 1 y se compararon para evaluar el porcentaje de error. El error porcentual se calcula del siguiente modo:

$$10 \quad \frac{[(FR\alpha \text{ en la muestra diluida}) * (\text{factor de difusión})] - (FR\alpha \text{ en la muestra no diluida}) * 100}{(FR\alpha \text{ en la muestra no diluida})}$$

Los resultados se presentan en la Tabla 3:

Tabla 3: Linealidad de dilución para la orina

Muestra	Factor de dilución	FRα (pg/mL)	Error (%)
1	1	25037	-
	10	2601	4
	100	279	11
2	1	16649	-
	10	1696	2
	100	173	4

15 Los resultados anteriores demuestran la linealidad de dilución en la evaluación de los niveles de FRα en muestras de orina humana y que, dentro de los errores aceptables, la orina puede diluirse hasta un factor de al menos 100 conservando niveles precisos de FRα. En consecuencia, se puede considerar la dilución de las muestras de orina antes de determinar los niveles de FRα.

EJEMPLO 3: Centrifugación de muestras de orina – determinación de la reproducibilidad

20 También se examinó la reproducibilidad del ensayo ECLIA para una muestra de orina en particular. Por ejemplo, tal como se refleja en la Tabla 4, los ensayos de ECLIA de la misma muestra dieron lugar a resultados variables.

Tabla 4. Reproducibilidad sin centrifugación de la muestra

Muestra	Recuento de ECL	
	Prueba 1	Prueba 2
1	29380	15046
2	20912	17227

25 Se planteó la hipótesis de que la presencia de material insoluble (precipitados) en muestras de orina era responsable de la variabilidad observada en la medición de los niveles de FRα. Como resultado, la centrifugación de muestras con el fin de eliminar el sedimento de orina, antes de la medición de los niveles de FRα, se consideró como una opción para mejorar la exactitud y la reproducibilidad del ensayo.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos al centrifugar tres muestras antes de la realización del ensayo ECLIA.

Tabla 5. Reproducibilidad con centrifugación de la muestra

Prueba	Concentración de FRα (ng/mL)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1	10,4	9,2	13,3
2	10,5	8,9	14,0
3	10,3	9,2	13,4
Media	10,4	9,1	13,6
SD	0,1	0,1	0,3
CV (%)	1,0	1,1	2,2

Como se ha expuesto anteriormente, los resultados indican que la centrifugación proporciona mediciones más consistentes de concentración de FRα.

Adicionalmente, se sometieron dos muestras a (i) centrifugación (a 2000 x g durante 2 min) y el sobrenadante se retiró para la medición de FRα (representado como muestra "A" a continuación en la Tabla 6), y (ii) centrifugación seguida de agitación en vórtex (representado como muestra "B" a continuación en la Tabla 6), antes de la medición de los niveles de FRα mediante el ensayo ECLIA expuesto en el Ejemplo 1. Los resultados se reflejan en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Efecto de la centrifugación en los niveles de FRα en orina

Muestra	Sedimento después de la centrifugación	A/B	FRα (pg/mL)	Diferencia (%)
1	Sí (++)	A	13678	-
		B	16559	21
2	Si (+)	A	12271	-
		B	13206	8

La diferencia (%) se determinó como se indica a continuación:

$$\frac{[(\text{Nivel de FR}\alpha \text{ en "B"}) - (\text{nivel de FR}\alpha \text{ en "A"})] * 100}{(\text{nivel de FR}\alpha \text{ en "A"})}$$

Tal como se muestra en la Tabla 6, los niveles de FRα determinados mediante el ensayo ECLIA varían dependiendo de si la orina se clarificó por centrifugación para eliminar precipitados o de si la orina se agitó en vórtex para suspender o dispersar los sedimentos. Por consiguiente, en ciertas realizaciones se puede llevar a cabo una centrifugación o una agitación de las muestras de orina antes de determinar los niveles de FRα.

EJEMPLO 4. Determinación de los niveles de FRα en muestras de orina centrifugadas de sujetos humanos con y sin cáncer de ovario, medido mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA).

En base a los resultados del Ejemplo 3, se modificó el ensayo para la evaluación de los niveles de FRα en los sujetos para introducir un paso de centrifugación. Los niveles de FRα fueron determinados en las mismas muestras utilizadas en el Ejemplo 1, incluyendo el grupo de sujetos con cáncer de ovario y el grupo de sujetos de control femeninos normales.

Materiales y métodos

La metodología utilizada fue como se describe en el Ejemplo 1, excepto que las muestras de orina se centrifugaron a 10.000 x g durante 1 minuto y el sobrenadante resultante se diluyó posteriormente 1:51 en tampón de reacción.

Resultados

La Tabla 7 representa los niveles de FRα en muestras de orina centrifugadas y no centrifugadas de sujetos que padecen cáncer de ovario y los sujetos de control sanos.

Tabla 7: Nivel de FRα1 en orina en el grupo de cáncer de ovario y el grupo de control normal

Grupo	Muestra nº	FRα (pg/mL)		sedimento después de la centrifugación
		Sin centrifugación	Con centrifugación	
cáncer de ovario	1	27800	23960	+
	2	40242	37852	+
	3	85580	78976	+
	4	4994	3766	+
	5	2017	1512	-
	6	3781	3443	-
	7	29469	25728	+
	8	47456	16556	+
	9	4479	3357	-
	10	11920	5020	+
	11	18352	16695	-
	12	162017	82705	+
	13	30630	4496	+
	14	14431	8786	+

	15	11801	10582	-
	16	13470	5611	+
	17	11563	5463	+
	18	22185	14443	+
	19	52106	38327	-
control normal	20	8491	6867	+
	21	4885	3754	-
	22	3595	3529	-
	23	21301	15047	+
	24	22757	4850	+
	25	16578	14366	+
	26	6081	5201	-
	27	4195	3135	-
	28	12169	499	+
	29	20639	2439	+

De acuerdo con los resultados expuestos en la Tabla 7, la centrifugación dio como resultado una disminución de la medida de niveles de FR α en algunas muestras, como se ha demostrado anteriormente en la Tabla 6.

EJEMPLO 5: Detección de FR α en sedimento urinario mediante inmunotransferencia

5 En base a los resultados mostrados en los Ejemplos 3 y 4, se evaluó la presencia o ausencia de FR α en el sedimento/precipitado de orina mediante transferencia Western.

Materiales y métodos

10 Se sometieron muestras de orina de 2 pacientes con cáncer de ovario, para las que las concentraciones medidas de FR α fueron 18.747 pg/mL y 145.564 pg/mL, respectivamente (véase la Tabla 10 anterior), a los siguientes procedimientos. Las muestras de control consistieron en 10 μ g de lisado de células HeLa, 20 μ g de lisado de tejido hepático, y 20 μ g de lisado de tejido de cáncer de ovario.

- se centrifugaron 900 μ L de orina durante 2 minutos a 10.000 g
- se eliminó el sobrenadante
- se disolvió el sedimento restante en 15 μ L de tampón de muestra PAGE (que contiene LDS 292 mM) y posteriormente se hirvió a 70°C durante 10 min
- 15 • la muestra completa (aprox. 20 μ L) se cargó en el gel de bis-tris NuPAGE (Invitrogen)
- después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF
- se añadió 1% de leche desnatada/0,05% de Tween 20/PBS para bloquear
- la membrana se lavó con 0,05% de Tween 20/PBS
- 20 • se añadieron 0,5 mL de anticuerpo monoclonal 548908 (R&D Systems) a 2 μ g/mL y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente
- la membrana se lavó con 0,05% de Tween 20/PBS
- se añadieron 10 mL de IgG anti-ratón-HRP (DAKO p0447, 1:2000) y se dejó incubar durante 60 minutos
- la membrana se lavó con 0,05% de Tween 20/PBS
- se añadió sustrato Pierce ECL a la membrana
- 25 • la membrana se retiró de los sustratos y después se obtuvieron imágenes usando el sistema LAS-3000 (FUJIFILM)

Resultados

La inmunotransferencia resultante se muestra en la Figura 3. En esta figura, los carriles 1-5 corresponden a FR α detectado en las siguientes fuentes:

- 30 (1) orina de pacientes con cáncer de ovario con un nivel de FR α medido de 18.747 pg/mL

(2) orina de pacientes con cáncer de ovario con un nivel de FR α medido a 145.564 pg/mL

(3) lisado de células HeLa: 10 μ g

(4) lisado de tejido de hígado: 20 μ g

(5) lisado de tejido de cáncer de ovario: 20 μ g

5 El carril 6 en la transferencia Western representa marcadores de peso molecular y demuestra que la banda observada en los carriles 1, 2, 3 y 5 corresponde al peso molecular esperado para FR α .

Los carriles 3 y 5 son muestras de control positivo y el carril 4 es una muestra de control negativo. La banda débil del carril 1 y la banda clara del carril 2 demuestra que se puede detectar FR α en el sedimento de orina de pacientes con cáncer de ovario mediante transferencia Western.

10 EJEMPLO 6. Determinación de los niveles de FR α en muestras de orina humana normal tratadas con guanidina mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA).

En base a los resultados del Ejemplo 4, en el que la centrifugación dio como resultado niveles disminuidos de FR α , y los resultados del Ejemplo 5, donde se demostró que el sedimento de orina obtenido mediante centrifugación para contener FR α inmunorreactivo, se buscaron métodos para solubilizar los sedimentos de orina para obtener mediciones más cuantitativas y precisas de FR α .

15

En este sentido, se intentó el tratamiento de muestras de orina femeninas normales con guanidina antes de evaluar los niveles de FR α .

La metodología utilizada fue la descrita en el Ejemplo 1, excepto que se mezclaron muestras de orina en una relación 1:1 con guanidina 6 M en tampón (PBS) o con tampón solo. Posteriormente, se diluyeron las muestras de orina a 1:51 en tampón de reacción.

20

Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Nivel de FR α normal en orina con o sin tratamiento de guanidina.

Muestra	Tratamiento de guanidina		FR α (pg/mL)
	std Ag		
		Sí	83964
		No	82512
Orina normal	1	Sí	9431
		No	7796
	2	Sí	5713
		No	4066
	3	Sí	9687
		No	9428

Los resultados de este experimento indican que la guanidina no interfiere con las mediciones de FR α . Como se puede observar, para el control de antígeno puro (Std Ag), esta metodología de tratamiento con guanidina y posterior dilución no tiene ningún efecto en la medición de FR α . Además, cabe destacar que en las tres (3) muestras de orina evaluadas, los niveles de FR α fueron mayores en las muestras tratadas (solubilizadas) con guanidina en relación con las muestras no tratadas con guanidina.

25

La fiabilidad del pre-tratamiento de guanidina de las muestras de orina se evaluó adicionalmente mediante la exposición de tres muestras a guanidina y la medición de la concentración de FR α de cada muestra de guanidina tratada 3 veces usando el ensayo ECLIA. Los resultados se reflejan en la Tabla 9 a continuación:

30

Tabla 9: Reproducibilidad intra-ensayo de orina tratada con guanidina

Ensayo	FR α (pg/mL)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1	9210	5477	9889
2	9638	5405	10047
3	10192	5812	10944
Media	9680	5565	10293
SD	492	217	569
CV (%)	5,1	3,9	5,5

Como se ha expuesto anteriormente, los resultados indican que el tratamiento con guanidina de la orina antes del ensayo de FR α proporciona mediciones consistentes de concentración de FR α con CV's muy bajos.

EJEMPLO 7. Determinación de los niveles de FR α en muestras de orina tratadas con guanidina de sujetos humanos con y sin cáncer de ovario, medidos mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA).

- 5 En base a los resultados del Ejemplo 6 en el que se muestra que el tratamiento de guanidina no interfiere con los ensayos de FR α , se empleó un protocolo de ensayo modificado para medir FR α en las muestras de orina de los sujetos con y sin cáncer de ovario del Ejemplo 1.

Se empleó el siguiente protocolo de ensayo:

Materiales y métodos

- 10 La metodología utilizada fue la descrita en el Ejemplo 1, excepto que las muestras de orina se mezclaron en una relación 1:1 con un tampón de guanidina 6 M y posteriormente se diluyeron 1:26 en tampón de reacción.

Resultados

La Tabla 10 muestra los niveles de FR α en muestras de orina tratadas de guanidina de sujetos que padecen cáncer de ovario y de sujetos de control femeninos sanos.

- 15 Tabla 10: Nivel de FR α en orina en el grupo de cáncer de ovario y el grupo de control normal

Grupo	Muestra nº	FR α (pg/mL)
cáncer de ovario	1	27015
	2	37315
	3	79579
	4	285
	5	1864
	6	2902
	7	27914
	8	51864
	9	2699
	10	9455
	11	18396
	12	145564
	13	19046
	14	10440
	15	10977
	16	9199
	17	18223
	18	18747
	19	51098
control normal	20	8012
	21	3797
	22	3323
	23	20976
	24	6941
	25	14512
	26	7286
	27	2789
	28	2617
	29	7233

La Figura 4 muestra la distribución de niveles de FR α en la orina de sujetos con cáncer de ovario y en sujetos de control normales femeninos utilizando el protocolo modificado con el tratamiento de guanidina. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. La Tabla 11 resume estos resultados.

Tabla 11: Resumen de las medidas de FR α en orina

	FR α (pg/mL)	
	cáncer de ovario	control normal
N	19	10
Media	28557	7749

SD	34990	5850
Max.	145564	20976
Min.	285	2617

Mediante el uso de los datos de este experimento, se realizó un análisis de característica operativa del receptor (ROC). La Figura 5 muestra una curva ROC de la sensibilidad y especificidad de la medida ECLIA de niveles de FRα en orina después de tratar la orina con guanidina. AUC es el área bajo la curva, que mide la precisión de la prueba para discriminar el cáncer de ovario de los sujetos de control.

- 5 Mediante el uso de un valor de corte arbitrario de 9100 pg de FRα/mL, el AUC era de 0,70 con un valor predictivo positivo de 70% y un valor predictivo negativo del 80%, como se muestra en la Tabla 12. Usando este valor de corte, 15/19 pacientes con cáncer de ovario presentaron una concentración de FRα por encima de 9100 pg/mL, y 8/10 sujetos normales presentaron una concentración de FRα inferior a 9100 pg/mL.

Tabla 12: Tratamiento de guanidina para la medición de la orina

	cáncer de ovario	control
Número de muestras	19	10
Positivo	15	2
Valor predictivo (%)	78,9	80,0

- 10 EJEMPLO 8: Corrección de creatinina de concentraciones de FRα determinadas en muestras de orina tratadas con guanidina mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA)

Las concentraciones de FRα se determinaron previamente utilizando ECLIA en muestras de orina tratadas con guanidina de pacientes con cáncer de ovario y de controles femeninos normales (véase el Ejemplo 7, Tabla 10). Aquí, estas concentraciones de FRα fueron corregidas respecto a los niveles de creatinina en orina con el fin de normalizar en relación a la velocidad de filtración glomerular. Los valores resultantes se sometieron a un análisis ROC.

- 15

Métodos

El nivel de creatinina urinaria se determinó mediante el kit de ensayo aprobado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, determinante L CRE (Kyowa Medex, Japón). El valor corregido para concentración de FRα en orina se calculó del siguiente modo:

- 20

Corrección de creatina de FRα de orina (ng/g)

$$=(FR\alpha \text{ en orina (ng/L)} \times 1000) / (\text{Creatina en orina (mg/dL)} \times 10)$$

$$=(FR\alpha \text{ en orina (ng/L)} \times 1000) / \text{Creatina en orina (mg/L)}$$

$$= FR\alpha \text{ en orina (ng/L)} / \text{Creatina en orina (g/L)}$$

- 25

$$= FR\alpha \text{ en orina (ng)} / \text{Creatina en orina (g)}$$

o

$$= 1/1000 \times FR\alpha \text{ en orina (}\mu\text{g)} / \text{Creatina en orina (g)}$$

Resultados

La Tabla 13 presenta los niveles de FRα corregidos para creatinina resultantes.

- 30 Tabla 13: Niveles de FRα corregidos para creatinina determinados usando ECLIA de muestras de orina tratadas con guanidina

Grupo	Muestra nº	FRα (pg/mL)	FRα corregido (µg de FRα/g de creatinina)
cáncer de ovario	1	27015	11,6
	2	37315	37,8
	3	79579	33,9
	4	285	0,6
	5	1864	6,7
	6	2902	7,1
	7	27914	54,9
	8	51864	17,1

	9	2699	13,5
	9	9455	14,5
	10	18396	23,1
	11	145564	66,0
	12	19046	9,1
	13	10440	8,5
	14	10977	7,4
	15	9199	5,9
	16	18223	13,0
	17	18747	9,6
control normal	18	3797	7,7
	19	3323	7,9
	20	20976	10,7
	21	6941	4,3
	22	14512	8,6
	23	7286	13,8
	24	2789	4,3
	25	2617	1,9
	26	7233	3,1

La Figura 6 muestra la distribución de niveles de FR α en sujetos de cáncer de ovario (OC) y en sujetos de control femeninos normales después de la corrección para los niveles de creatinina en orina. Hay una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de FR α corregidos para creatinina de pacientes de cáncer de ovario y de los controles ($p=0,007$).

- 5 El resumen de datos correspondientes a sujetos de cáncer de ovario y de control normales se proporciona en la Tabla 14.

Tabla 14: Resumen de las estadísticas para niveles de FR α corregidos para creatinina.

	FR α ($\mu\text{g/g-creatinina}$)	
	cáncer de ovario	control normal
N	18	9
Media	18,9	6,9
SD	17,9	3,9
Max.	66,0	13,8
Min.	0,6	1,9

- 10 Los niveles de FR α corregidos para creatinina se sometieron además a un análisis ROC. La curva ROC se muestra en la Figura 7. La Tabla 15 presenta la sensibilidad, especificidad, y el área bajo la curva (AUC) para varios valores de corte del ensayo corregido para creatinina.

Tabla 15: Sensibilidad, especificidad y AUC para varios valores de corte del ensayo de FR α corregido para creatinina.

Límite	Sensibilidad	Especificidad	AUC
3,0	94,4%	11,1%	0,67
4,0	94,4%	22,2%	0,70
5,0	94,4%	44,4%	0,78
6,0	88,9%	44,4%	0,74
9,0	66,7%	77,8%	0,70

Como se señaló anteriormente, existe una clara discriminación entre orinas de pacientes con cáncer de ovario y las de los sujetos de control sanos femeninos.

- 15 EJEMPLO 9: Inmunoensayo enzimático (EIA) y optimización del mismo

1. Inmunoensayo enzimático (EIA)

Recubrimiento de anticuerpo a placas de microtitulación

El anticuerpo monoclonal anti-receptor de folato alfa se revistió sobre la superficie de placas de microtitulación (Nunc-immunoplate, Thermo Scientific) del siguiente modo. Se dispensó en los pocillos cien microlitros de anticuerpo

(absorbancia de 0,02 a 280 nm) en 50 mmol/L de tampón de carbonato de pH 9,4, seguido de revestimiento durante 16 horas a 4°C. A continuación, las microplacas se lavaron 2 veces con PBS que contenía 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Después de esto se dispensaron en los pocillos 0,15 mL de PBS que contenía 20% suero normal de conejo pH 7,8 para bloquear la superficie no unida, seguido de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, las microplacas se lavaron 2 veces con PBS-T. Las placas recubiertas de anticuerpo se secaron y se mantuvieron a 4°C en bolsas de aluminio hasta su uso.

Etiquetado con biotina

El etiquetado con biotina se realizó de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes para EZ-Link Sulfo-NHS LC-LC-Biotin (Nº de Producto 21338, Thermo Scientific). Brevemente, se mezcló 1 mg de anticuerpo en 0,4 mL de PBS con 0,013 mL de 10 mM de Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, con una relación molar de anticuerpo a biotina de 1:20, seguido de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo acoplado a biotina se purificó por filtración en gel utilizando una columna PD-10 (GE Healthcare) eluida con PBS para eliminar la biotina no reaccionada. Con el fin de determinar el nivel de incorporación de biotina, se utilizó el kit de cuantificación EZ Biotin (Producto Nº 28005, Thermo Scientific). El anticuerpo marcado con biotina se almacenó a -80°C hasta su uso.

15 Inmunoensayo de dos etapas

Para la primera reacción, se dispensó en los pocillos recubiertos de anticuerpo 40 µL de plasma o de antígeno estándar y 60 µL de tampón HEPES 50 mM que contiene 10% de NRS, 150 mmol/L de NaCl, 10 mmol/l de EDTA-2Na, 0,01% de Tween 20, pH 7,5 (tampón de reacción). La placa se incubó durante 18 horas a 4°C, y posteriormente se lavó 5 veces con PBS-T. Para la segunda reacción, se dispensaron 100 µL de anticuerpo marcado con biotina 10 µg/mL en tampón de reacción. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente se lavó 5 veces con PBS-T. Se dispensaron 100 µL de estreptavidina (Pierce) marcada con peroxidasa de rábano. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 5 veces con PBS-T. Finalmente, para el desarrollo del color, se dispensaron 100 µL de disolución de TMB (KPL) y se dejó durante 15 minutos en la oscuridad. Después de parar el desarrollo del color mediante la adición de 100 µL de HCl 1N, se leyó la absorción a 450 nm usando un lector de placas. Todas las etapas de lavado se realizaron automáticamente mediante un dispositivo automático de lavado de placas (AMW-8, Biotec, Japón), y todas las mediciones de EIA se llevaron a cabo por duplicado.

La Figura 8 representa el ensayo EIA usando MOV18 como anticuerpo de captura y MORAb-003 biotinilado como anticuerpo detector.

30 2. Optimización de los procedimientos de EIA

Los procedimientos de EIA anteriores se formularon, en parte, en base a los siguientes experimentos diseñados para optimizar el procedimiento.

En primer lugar, se comparó el anticuerpo marcado con biotina y avidina-HRP y el anticuerpo marcado con HRP. En comparación con el anticuerpo marcado con HRP, el anticuerpo marcado con biotina y avidina-HRP proporcionó una señal más alta; por lo tanto, se empleó el anticuerpo marcado con biotina y avidina-HRP.

En segundo lugar, se compararon los procedimientos de incubación de una y dos etapas. Como se representa en la Figura 9, un procedimiento de incubación de dos etapas dio una señal más alta y por lo tanto éste fue el empleado.

En tercer lugar, para optimizar el segundo tiempo de incubación, se compararon los tiempos de incubación de una a cuatro horas. Los resultados indicaron que los tiempos de incubación de una hora proporcionan la ratio señal a ruido más alta y por lo tanto se empleó a continuación un tiempo de incubación de una hora.

En cuarto lugar, con el fin de optimizar la concentración de trabajo de anticuerpo marcado con biotina, de anticuerpo marcado con HRP y el volumen de muestra, se emplearon diferentes concentraciones como se expone en la descripción anterior del ensayo EIA. Las concentraciones óptimas de valores se han descrito anteriormente.

45 EJEMPLO 10: Comparación de FR α en plasma humano usando inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) e inmunoensayo enzimático (EIA)

Se midieron los niveles de FR α en muestras de plasma humano tomadas de pacientes de cáncer de ovario y de controles femeninos sanos, utilizando el ensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) descrito en el Ejemplo 1 y la Figura 1 (utilizando MORAb-003 como anticuerpo de captura y MOV-18 marcado con rutenio (Ru) como anticuerpo detector marcado) y el inmunoensayo enzimático (EIA) descrito en el Ejemplo 9 y la Figura 8. En ambos ensayos, se evaluaron 40 µL de plasma.

La Tabla 16 muestra los niveles plasmáticos de FR α en sujetos de cáncer de ovario y en sujetos de control normales, determinados usando EIA y ECLIA.

Tabla 16: Concentraciones plasmáticas de FR α determinadas usando los métodos de EIA y ECLIA.

Grupo	Muestra n ^o	Concentración de FR α (pg/mL)	
		EIA	ECLIA
Cáncer de ovario	1	10	73
	2	<10	200
	3	56	286
	4	44	286
	5	353	1606
	6	83	494
control sano	7	110	127
	8	162	112
	9	88	252
	10	180	254
	11	262	471
	12	206	396

5 Con una sola excepción, los resultados para todos los sujetos indicaron que las concentraciones de FR α detectadas en suero utilizando EIA son más bajas que los niveles detectados usando ECLIA, lo que demuestra que el ensayo EIA, con este formato, no es tan sensible como el ensayo ECLIA cuando se emplea esta combinación particular de anticuerpo de captura (MOV-18) y anticuerpo detector (MORAb- 003). Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos adicionales con otros tipos de anticuerpos para desarrollar un procedimiento de EIA más sensible.

EJEMPLO 11: Viabilidad de los diferentes tipos de anticuerpos para la medición con EIA de FR α en el plasma humano

1. Experimentación preliminar de combinaciones de anticuerpos

10 Se consideraron varias combinaciones de anticuerpos de captura/detección. La experimentación preliminar rindió los resultados expuestos en la Tabla 17.

Tabla 17

		Anticuerpo de captura							
		MORAb-003		MOV18		548908 (R&D)		6D398	
Anticuerpo de detección marcado con biotina	003	Blanco Patrón 1-S	Bajo - -	Blanco Patrón 1-S	Bajo +++ ++	Blanco Patrón 1-S	Bajo ++ ++	Blanco Patrón 1-S	Bajo ++ +
	MOV18	Blanco Patrón 1-S	Bajo + ++	Blanco Patrón 1-S	Alto - +++	Blanco Patrón 1-S	Alto - ++	Blanco Patrón 1-S	Alto - +++
	548908							Blanco Patrón 1-S	Bajo - ++

2.Comparación de ensayos EIA usando varias combinaciones de anticuerpos y comparación con el ensayo ECLIA

15 Se midieron los niveles de FR α en el plasma de pacientes con cáncer de ovario y controles normales femeninos sanos usando un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (EIA) con diferentes combinaciones de anticuerpos de captura y anticuerpos marcados con biotina, y se compararon con los niveles de FR α medidos usando el ensayo ECLIA.

Materiales y métodos

20 El método ECLIA fue como se describe en el Ejemplo 1 y se representa en la Figura 1 (usando el anticuerpo MORAb-003 como anticuerpo de captura y el anticuerpo Mov-18 como anticuerpo detector marcado). El método EIA fue como se describe en el Ejemplo 9, excepto que se emplearon tres combinaciones diferentes de anticuerpo de captura/detector, tal como se representa en la Figura 10: MOV18/MORAb-003, 548908/MORAb-003 y 6D398/MORAb-003. Los anticuerpos 548908 y 6D398 están disponibles comercialmente. El anticuerpo 548908 se obtuvo de R&D Systems (North Las Vegas, NV) y el anticuerpo 6D398 se obtuvo de US Biological (Swampscott, MA 01907).

Resultados

Las concentraciones de FR α (pg/mL) determinadas usando los métodos EIA y ECLIA se muestran en la Tabla 18. Además, las concentraciones de FR α (pg/mL) determinadas por EIA usando varias combinaciones de anticuerpo de captura/detector se representan gráficamente en la Figura 11.

- 5 Tabla 18: Concentraciones plasmáticas de FR α (pg/mL) determinadas usando los métodos EIA y ECLIA con diversas combinaciones de anticuerpos de captura y anticuerpos detectores.

Grupo	Muestra #	EIA 548908-MORAb-003	EIA 6D398-MORAb-003	EIA MOV18-MORAb-003	ECLIA MOV18-MORAb-003
Cáncer de ovario	1	176	2	10	217
	2	85	<0	-	165
	3	257	35	-	296
	4	117	42	44	322
	5	2048	370	353	1335
	6	447	63	83	390
Control normal	7	247	66	110	137
	8	213	110	162	185
	9	367	78	88	219
	10	364	152	180	228
	11	804	224	262	388
	12	473	194	206	318

- 10 Los datos de la Tabla 18 indican que las medidas de niveles de FR α con EIA utilizando la combinación 54908-MORAb-003 dan resultados que son más similares a los resultados obtenidos utilizando el ensayo de ECLIA. Se realizaron análisis cuantitativos, que confirmaron esta observación. Además, estos datos demuestran que la detección de FR α es dependiente de los anticuerpos y de la combinación de anticuerpos empleados. Por consiguiente, se pueden emplear diferentes combinaciones de anticuerpos para la determinación de FR α en fluidos biológicos. Además, ya que los datos obtenidos de los formatos de ensayo EIA y ECLIA son similares, se pueden utilizar diferentes formatos de ensayo para la determinación de FR α .

- 15 Para cada una de las tres combinaciones de anticuerpos de captura y detector utilizadas para el método de EIA, se realizó un análisis de regresión, y las concentraciones de FR α (pg/mL) determinadas con EIA se correlacionaron con las concentraciones determinadas con el ensayo ECLIA. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 19 y en la Figura 12.

Tabla 19: Correlaciones de las concentraciones plasmáticas de FR α medidas por ECLIA con las concentraciones medidas por EIA utilizando tres combinaciones de anticuerpos de captura y detector.

Anticuerpo de captura - anticuerpo detector	548098 - MORAb-003	6D398 - MORAb-003	MOV18 - MORAb-003
r	0,960	0,781	0,715
Pendiente	1,595	0,285	0,223
Interceptación	-87,06	-0,64	58,62

- 20 Los resultados para EIA utilizando la combinación de captura-detector 548098-MORAb-003 se correlacionaron bien (r=0,96) con los resultados para ECLIA.

EJEMPLO 12: Niveles en plasma de FR α determinados mediante EIA y ECLIA en muestras de pacientes con cáncer de ovario

- 25 Las mediciones de niveles de FR α en suero se determinaron en un grupo de pacientes con cáncer de ovario (n=17) y en controles normales (n=35) utilizando ECLIA y EIA. Para las mediciones de la EIA, se empleó la combinación de anticuerpos 548908 captura/MORAb-003 detector. Para el resto de casos, el procedimiento EIA fue como se describe en el Ejemplo 9. El procedimiento ECLIA fue como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

ES 2 780 192 T3

Tabla 20: Concentraciones en plasma de FR α en pacientes con cáncer de ovario y en controles normales, determinadas usando EIA y ECLIA.

Grupo	Muestra nº	EIA	ECLIA
		pg/mL	pg/mL
Cáncer de ovario	1	245	217
	2	247	223
	3	194	229
	4	2613	1335
	5	154	153
	6	319	215
	7	516	390
	8	370	271
	9	933	449
	10	4768	4502
	11	385	266
	12	251	322
	13	404	349
	14	338	371
	15	4147	2344
	16	179	165
	17	380	296
Control	18	232	181
	19	372	173
	20	332	189
	21	380	203
	22	376	290
	23	406	217
	24	281	182
	25	348	191
	26	490	247
	27	253	137
	28	368	185
	29	338	195
	30	289	219
	31	338	206
	32	406	226
	33	365	228
	34	501	280
	35	806	388
	36	613	286
	37	380	250
	38	420	281
	39	393	280
	40	552	284
	41	664	318
	42	429	261
	43	499	286
	44	310	218
	45	281	217
	46	215	202
	47	293	217
	48	380	256
	49	270	195
	50	393	234
	51	425	308
	52	226	199

La Figura 13 muestra la distribución de concentraciones de FR α de plasma en sujetos con cáncer de ovario y en sujetos de control femeninos normales, determinadas usando EIA.

La Tabla 21 muestra las estadísticas descriptivas de resumen para las concentraciones de FR α en plasma de sujetos con cáncer de ovario y de sujetos de control normales femeninos, determinadas EIA.

Tabla 21: Resumen de concentraciones plasmáticas de FR α en sujetos con cáncer de ovario y en sujetos de control femeninos normales determinadas usando EIA.

	FR α (pg/mL)	
	Cáncer de ovario	Control normal
n	17	35
Media	967	389
SD	1438	126
Max.	4768	806
Min.	154	215

- 5 La Figura 14 representa además la correlación entre las concentraciones plasmáticas de FR α determinadas utilizando EIA y ECLIA. La correlación es alta ($r=0,95$).

EJEMPLO 13. Determinación de los niveles de FR α en muestras contrastadas de orina y suero de pacientes con cáncer de pulmón y pacientes con cáncer de ovario, medidas mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA)

- 10 Se determinaron los niveles de FR α en muestras de orina y suero de pacientes de cáncer de pulmón y de cáncer de ovario usando ECLIA, donde se tomaron las muestras del mismo paciente. También se determinó la correlación entre los niveles de FR α en suero y orina.

Materiales y métodos

- 15 La metodología ECLIA utilizada es como se describe en el Ejemplo 1. La guanidina fue utilizada para solubilizar los sedimentos de orina tal como se describe en el Ejemplo 6.

Resultados

Los resultados de los ensayos de ECLIA de suero y orina de pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de ovario se presentan en la Tabla 22.

- 20 Tabla 22: Concentraciones de FR α en las muestras de orina y suero de pacientes con cáncer pulmonar y pacientes de cáncer de ovario, determinadas por ECLIA.

Grupo	ID de conjunto	Suero	Orina
		pg/mL	pg/mL
Cáncer de pulmón	1	146	2009
	2	153	4496
	3	206	-
	4	70	3562
	5	195	12381
	6	352	21873
	7	198	11296
	8	120	18570
	9	275	4455
	10	163	8662
	11	145	5294
	12	178	-
	13	165	1106

	14	187	7446
	15	168	11167
	16	217	24448
	17	142	6724
	18	177	14514
	19	236	822
	20	101	4826
	21	145	7723
	22	213	9887
	23	143	7422
	24	253	3376
	25	421	8045
Cáncer de ovario	26	282	9414
	27	1605	7651
	28	240	13059
	29	695	10549

Los datos resumidos correspondientes a los niveles de FR α en suero y orina de pacientes con cáncer de pulmón se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23: Resumen de las estadísticas correspondientes a las concentraciones de FR α en las muestras de suero y orina de pacientes de cáncer de pulmón, determinadas por ECLIA

Cáncer de pulmón	FR α (pg/mL)	
	Suero	Orina
n	25	23
Media	191	8700
SD	75	6291
Max.	421	24448
Min.	70	822

5 Los datos resumidos correspondientes a los niveles de FR α en suero y orina de pacientes con cáncer de ovario se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24: Resumen de las estadísticas correspondientes a las concentraciones de FR α en las muestras de suero y orina de pacientes de cáncer de ovario, determinadas por ECLIA

Cáncer de ovario	FR α (pg/mL)	
	Suero	Orina
n	4	4
Media	705	10168
SD	634	2266
Max.	1605	13059
Min.	240	7651

10 La Figura 15 muestra las correlaciones entre las medidas de ECLIA de los niveles de FR α en muestras de suero y orina tomadas del mismo paciente. La correlación para pacientes con cáncer de pulmón fue de $r=0,24$ (panel superior) y la correlación para los pacientes con cáncer de ovario fue de $r=-0,76$ (panel inferior).

Estos datos demuestran la relativa falta de correlación entre las concentraciones de FR α medidas en la orina en comparación con el suero, especialmente tal como se muestra para pacientes de cáncer de pulmón. Además, estos datos demuestran que el FR α es básicamente no detectable por encima de los niveles de fondo en el suero de

pacientes con cáncer de pulmón, respecto a los controles normales, mientras que el FR α sí es detectable en la orina de dichos pacientes.

EJEMPLO 14. Evaluación de los niveles de FR α en muestras de suero de pacientes con cáncer de ovario, pacientes con cáncer de pulmón, y controles normales

5 Se evaluaron los niveles de FR α en el suero de pacientes con cáncer de ovario, de pacientes con cáncer de pulmón, y de controles normales. Los niveles de FR α en suero se evaluaron usando ECLIA con dos pares diferentes de anticuerpos de captura-detector: Par 1, en el que 9F3 era el anticuerpo de captura y 24F12 era el anticuerpo detector, y el Par 2, en el que 26B3 era el anticuerpo de captura y 19D4 era el anticuerpo detector.

10 Los pares de FR α se ensayaron con las curvas de calibrador completo y 196 sueros individuales diluidos 1:4. En un experimento, se utilizó 26B3 como anticuerpo de captura después del procesamiento CR en un lote de placa (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, +B, +T) y se usó 19D4 como anticuerpo detector a 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En otro experimento, se usó 9F3 como anticuerpo de captura y se utilizó 24F12 como anticuerpo detector a 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada uno se procesó por CR (lote 10070) con una proporción de etiqueta a proteína (L/P) de 13,3. Se utilizó diluyente 100 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) + anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) + mIgG para las muestras y el calibrador. Se utilizó diluyente 3 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) para las detecciones.

15 Se empleó el siguiente protocolo para ECLIA. Se añadieron las muestras a 50 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$. Las muestras se agitaron durante 2 horas y posteriormente se lavaron con disolución salina de tampón de fosfato (PBS) con el detergente Tween 20 (PBST). El anticuerpo detector se añadió a 25 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$. Las muestras se agitaron durante 2 horas y después se lavaron con PBST. Por último, la emisión de electroquimioluminiscencia (ECL) de las muestras se leyó con 2X MSD® Buffer T.

20 Los resultados se muestran en la Tabla 25 a continuación.

Tabla 25: Niveles de FR α en suero de pacientes con cáncer de ovario, pacientes con cáncer de pulmón y controles normales.

MSD Sample Testing Number	tipo de muestra	LLOQ ¹ = 1 pg/mL		LLOQ ¹ = 5 pg/mL		Etapa	Grado	Género	Comentarios
		FR α - Par 2		FR α - Par 1					
		Conc ² de reequipo ajustado (pg/mL)	%CV	Conc ² de reequipo ajustado (pg/mL)	%CV				
1	Suero ovario	3760	4%	3585	4%	III	2	F	Adenocarcinoma-Ovario
2	Suero ovario	223	3%	273	2%	III	3	F	Adenocarcinoma-Ovario
3	Suero ovario	950	1%	3346	8%	IIIC		F	Carcinoma seroso papilarlo
4	Suero ovario	3827	4%	968	0%	III	2	F	Adenocarcinoma-Ovario
5	Suero ovario	251	6%	468	2%	IV	2	F	Adenocarcinoma-Ovario
6	Suero ovario	199	6%	328	1%	IIIC	2	F	Cistadenocarcinoma
7	Suero ovario	166	1%	257	5%	IC	2	F	Cistadenocarcinoma
8	Suero ovario	182	4%	248	2%	IIIC	2	F	Cistadenocarcinoma
9	Suero ovario	155	6%	265	2%	IIIC	2	F	Cistadenocarcinoma
10	Suero ovario	145	9%	253	5%	IIIC	2	F	Cistadenocarcinoma
11	Suero ovario	142	5%	186	1%	IIB	1	F	Adenocarcinoma seroso
12	Suero ovario	299	5%	456	2%	IB	3	F	Adenocarcinoma seroso
13	Suero ovario	315	0%	768	8%	IIIB	alto grado	F	Cistadenocarcinoma seroso del ovario

14	Suero ovario	168	6%	351	1%	I	alto grado	F	Carcinoma seroso papilar ^a
15	Suero ovario	187	8%	263	1%	I	Diferenciado bien a moderadamente	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
16	Suero ovario	423	3%	229	5%	IA	mal diferenciado	F	Cistadenocarcinoma mucoso del ovario
17	Suero ovario	86	7%	289	1%	I	moderadamente diferenciado	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
18	Suero ovario	57	3%	255	1%	I	bien diferenciado	F	Cistadenocarcinoma mucoso del ovario
19	Suero ovario	108	1%	393	1%	III	moderadamente diferenciado	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
20	Suero ovario	207	3%	328	1%	Ausente	mal diferenciado	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
21	Suero ovario	66	0%	254	1%	Ausente	alto grado	F	Adenocarcinoma del ovario
22	Suero ovario	108	2%	197	2%	III	bajo grado	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
23	Suero ovario	201	2%	457	1%	II	alto grado	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario

24	Suero ovario	477	1%	808	11%	III	alto grado	F	Cistadenocarcinoma seroso del ovario
25	Suero ovario	423	3%	613	3%	n/a	n/a	F	carcinoma del ovario - tipo endometriode
26	Suero ovario	249	8%	432	1%	n/a	2	F	ovarian carcinoma - endometrioid type
27	Suero ovario	152	7%	235	2%	IV	2	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
28	Suero ovario	1409	5%	1287	3%	III C	3	F	carcinoma ovario - tipo seroso
29	Suero ovario	443	2%	547	2%	III C	2	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
30	Suero ovario	208	1%	298	13%	IA	1	F	carcinoma ovario - tipo seroso
31	Suero ovario	114	9%	344	1%	III B	2	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
32	Suero ovario	223	4%	157	133%	III C	1	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
33	Suero ovario	5034	1%	4405	1%	III C	3	F	carcinoma celular transicional
34	Suero ovario	32966	6%	23228	4%	IV	n/a	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
35	Suero ovario	94	6%	188	3%	n/a	3	F	adenocarcinoma de células claras
36	Suero ovario	866	6%	1317	1%	III C	3	F	adenocarcinoma poco diferenciado

37	Suero ovario	2916	8%	3121	0%	IV	3	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
38	Suero ovario	679	4%	1037	17%	IV	3	F	carcinoma ovario - tipo seroso
39	Suero ovario	294	8%	478	3%	III C	3	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
40	Suero ovario	2037	4%	12	74%	III C	3	F	carcinoma ovario - tipo seroso
41	Suero ovario	16289	6%	10431	3%	III C	2	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
42	Suero ovario	386	6%	736	6%	n/a	3	F	carcinoma ovario - tipo papilar seroso
43	Suero ovario	1474	6%	2382	3%	III C		F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del pelvico
44	Suero ovario	169	2%	438	1%	I	3	F	Adenocarcinoma-Ovario
45	Suero ovario	257	4%	635	10%	I	alto grado	F	Adenocarcinoma-Ovario
46	Suero ovario	184	6%	393	0%	III C	mal diferenciado	F	Adenocarcinoma-Ovario
47	Suero ovario	251	6%	659	1%	III A	2	F	Adenocarcinoma-Ovario
48	Suero ovario	165	2%	394	7%	I	2	F	Adenocarcinoma-Ovario
49	Suero ovario	64	7%	245	6%	III B	no diferenciado	F	Cistadenocarcinoma seroso del ovario

50	Suero ovario	90	3%	203	3%	IIIIC		F	adenocarcinoma seroso papilar nos
51	Suero ovario	167	3%	376	11%	IIIIC	alto grado	F	adenocarcinoma seroso papilar nos
52	Suero ovario	112	4%	260	5%	IIIIC	alto grado	F	adenocarcinoma seroso nos
53	Suero ovario	198	2%	340	6%	IV	alto grado	F	Cistadenocarcinoma seroso nos
54	Suero ovario	134	3%	363	6%	I	moderadamente diferenciado	F	Cistadenocarcinoma mucoso papilar del ovario
55	Suero ovario	118	5%	304	10%	IB	alto grado	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
56	Suero ovario	107	1%	326	4%	IIIIB	alto grado	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
57	Suero ovario	728	1%	1670	2%	IIIIB		F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
58	Suero ovario	2138	1%	3257	2%	IIIIC		F	adenocarcinoma papilar del ovario
59	Suero ovario	167	4%	410	1%	III		F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
60	Suero ovario	3054	4%	3285	14%	IIIIC	alto grado	F	carcinoma seroso del ovario

61	Suero ovario	97	3%	215	0%	IIIB	alto grado	F	Cistadenocarcinoma seroso papilar del ovario
63	Suero Pulmonar	61	3%	366	10%	IA	mal diferenciado moderadamente	M	Adenocarcinoma del pulmón
64	Suero Pulmonar	106	1%	319	4%	IB		M	Adenocarcinoma del pulmón
65	Suero Pulmonar	49	2%	257	1%	IB	moderadamente diferenciado	M	Adenocarcinoma of the lung
66	Suero Pulmonar	75	2%	301	2%	II	3	M	Adenocarcinoma del pulmón
67	Suero Pulmonar	79	3%	283	8%	II	2	M	Adenocarcinoma
68	Suero Pulmonar	145	2%	492	0%	II	2	F	Adenocarcinoma
69	Suero Pulmonar	142	2%	367	6%	IV	n/a	F	Adenocarcinoma
70	Suero Pulmonar	103	2%	231	7%	IV	n/a	F	Adenocarcinoma
71	Suero Pulmonar	153	1%	311	3%	IIIB	n/a	F	Adenocarcinoma
72	Suero Pulmonar	54	3%	124	6%	IIIA	Ausente	M	carcinoma de células grandes y sólidas
73	Suero Pulmonar	183	3%	391	10%	IIIB	Ausente	F	Adenocarcinoma

74	Suero Pulmonar	91	2%	199	7%	Ausente	3	M	carcinoma celular escamoso non keratinizing poco diferenciado III
75	Suero Pulmonar	89	7%	221	2%	III B	3	F	Adenocarcinoma poco diferenciado
76	Suero Pulmonar	139	1%	330	1%	I A	2	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
77	Suero Pulmonar	197	3%	452	7%	III A	2	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
78	Suero Pulmonar	52	3%	183	5%	III A	n/a	F	Carcinoma pleomorfico
79	Suero Pulmonar	80	3%	249	6%	III A	n/a	M	Carcinoma pleomorfico
80	Suero Pulmonar	72	1%	158	7%	IIIA	2	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
81	Suero Pulmonar	130	12%	221	1%	IA	3	M	carcinoma de células grandes y sólidas I
82	Suero Pulmonar	81	6%	155	1%	IB	Ausente	M	carcinoma de células grandes y sólidas
83	Suero Pulmonar	127	4%	278	3%	IIIB	Ausente	F	carcinoma de células grandes y sólidas
84	Suero Pulmonar	129	3%	240	2%	missing	Ausente	F	carcinoma de células grandes y sólidas
85	Suero Pulmonar	135	2%	231	7%	III B	2	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
86	Suero Pulmonar	235	1%	330	0%	IV	2	M	Adenocarcinoma

87	Suero Pulmonar	243	5%	396	2%	IV	3	F	Adenocarcinoma poco diferenciado
88	Suero Pulmonar	204	3%	572	6%	IA	moderadamente diferenciado	F	Carcinoma de células escamosas del pulmón
89	Suero Pulmonar	54	9%	214	4%	IB	moderadamente diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
90	Suero Pulmonar	116	7%	270	0%	IB	moderadamente diferenciado	F	adenocarcinoma mucoso del pulmón
91	Suero Pulmonar	117	3%	292	5%	IIA	moderadamente diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
92	Suero Pulmonar	248	1%	578	2%	Ausente	moderadamente diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
93	Suero Pulmonar	86	2%	300	9%	IB	mal diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
94	Suero Pulmonar	33	6%	117	5%	IIIA	moderadamente mal diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
95	Suero Pulmonar	36	3%	196	3%	IIIA	mal diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
96	Suero Pulmonar	237	3%	722	4%	IB	bien diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
97	Suero Pulmonar	82	9%	286	2%	IB	mal diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
98	Suero Pulmonar	112	1%	431	0%	IB	Diferenciado bien a moderadamente	F	Adenocarcinoma del pulmón

99	Suero Pulmonar	137	5%	379	0%	IA	moderadamente diferenciado	F	Adenocarcinoma alveolar del pulmón
100	Suero Pulmonar	65	2%	181	9%	IA	moderadamente mal diferenciado	M	Adenocarcinoma del pulmón
101	Suero Pulmonar	119	6%	290	4%	IB		M	Adenocarcinoma del pulmón
102	Suero normal	187	6%	391	2%			F	
103	Suero normal	337	4%	560	6%			F	
104	Suero normal	203	4%	405	3%			F	
105	Suero normal	97	3%	311	2%			F	
106	Suero normal	210	11%	393	6%			F	
107	Suero normal	135	9%	271	6%			M	
108	Suero normal	145	2%	225	3%			F	
109	Suero normal	182	4%	257	5%			M	
110	Suero normal	186	5%	297	2%			M	
111	Suero normal	129	8%	197	4%			M	

112	Suero normal	133	4%	254	4%			M	
113	Suero normal	136	1%	298	9%			M	
114	Suero normal	189	3%	321	1%			M	
115	Suero normal	167	1%	257	6%			M	
116	Suero normal	159	1%	315	1%			M	
117	Suero normal	166	3%	270	1%			M	
118	Suero normal	197	2%	339	0%			M	
119	Suero normal	148	1%	389	4%			M	
120	Suero normal	198	4%	833	9%			M	
121	Suero normal	101	3%	137	0%			M	
122	Suero normal	111	8%	266	1%			M	
123	Suero normal	96	0%	172	2%			M	
124	Suero normal	224	1%	249	7%			M	

125	Suero normal	203	8%	312	1%			M	
126	Suero normal	277	10%	388	5%			M	
127	Suero normal	191	4%	272	4%			F	
128	Suero normal	206	4%	297	3%			F	
129	Suero normal	204	15%	194	3%			F	
130	Suero normal	156	1%	106	2%			F	
131	Suero normal	177	5%	195	3%			F	
132	Suero normal	109	0%	148	5%			M	
134	Suero normal	116	1%	281	1%			F	
135	Suero normal	182	7%	250	6%			M	
136	Suero normal	324	2%	475	7%			F	
137	Suero normal	122	18%	191	1%			F	
138	Suero normal	135	7%	185	1%			F	

139	Suero normal	264	4%	372	2%			F
140	Suero normal	105	4%	188	5%			M
141	Suero normal	374	0%	649	0%			M
142	Suero normal	93	7%	162	7%			M
143	Suero normal	143	7%	326	4%			F
144	Suero normal	108	3%	202	2%			F
145	Suero normal	153	8%	341	3%			F
146	Suero normal	448	8%	400	5%			F
147	Suero normal	109	4%	196	3%			F
148	Suero normal	142	6%	218	1%			F
149	Suero normal	174	4%	309	9%			F
150	Suero normal	185	5%	270	2%			F
151	Suero normal	180	3%	241	0%			M

152	Suero normal	125	5%	314	4%			F	
153	Suero normal	270	0%	449	2%			F	
154	Suero normal	127	9%	232	1%			M	
155	Suero normal	251	3%	415	6%			F	
156	Suero normal	121	1%	349	0%			M	
157	Suero normal	137	8%	223	0%			M	
158	Suero normal	77	3%	173	6%			M	
159	Suero normal	143	4%	223	7%			F	
160	Suero normal	121	5%	411	8%			M	
161	Suero normal	99	8%	199	3%			F	
162	Suero normal	158	2%	236	0%			F	
163	Suero normal	138	7%	235	3%			F	
164	Suero normal	175	16%	290	2%			F	

165	Suero normal	339	4%	589	8%			M	
166	Suero normal	155	4%	372	1%			F	
167	Suero normal	166	0%	278	1%			M	
168	Suero normal	231	7%	377	3%			M	
169	Suero normal	148	10%	255	3%			F	
170	Suero normal	172	2%	312	4%			M	
171	Suero normal	146	6%	344	1%			M	
172	Suero normal	158	3%	306	4%			M	
173	Suero normal	145	2%	274	6%			F	
174	Suero normal	163	12%	279	1%			M	
175	Suero normal	83	5%	156	0%			M	
176	Suero normal	102	7%	262	5%			M	
177	Suero normal	140	3%	330	6%			M	

178	Suero normal	174	9%	277	15%			F	
179	Suero normal	295	3%	281	8%			M	
180	Suero normal	67	4%	308	13%			F	
181	Suero normal	115	3%	324	0%			F	
182	Suero normal	128	5%	287	0%			F	
183	Suero normal	128	1%	112	79%			M	
184	Suero normal	76	3%	147	53%			F	
185	Suero normal	264	7%	377	4%			F	
186	Suero normal	146	13%	258	3%			M	
187	Suero normal	132	0%	264	1%			F	
188	Suero normal	92	4%	249	1%			M	
189	Suero normal	89	11%	251	4%			F	
190	Suero normal	135	5%	268	4%			M	

191	Suero normal	177	4%	394	3%			F	
192	Suero normal	184	8%	367	2%			F	
193	Suero normal	156	3%	387	5%			F	
194	Suero normal	118	8%	275	4%			M	
195	Suero normal	74	7%	217	6%			M	
196	Suero normal	185	8%	373	5%			F	
197	Suero normal	159	3%	378	2%			F	
198	Suero normal	94	2%	245	1%			F	

¹LOQ es el límite inferior de la cuantificación
²La concentración backfit ajustada se ajusta para tener en cuenta la dilución de muestra

ES 2 780 192 T3

En base a los datos anteriores, es evidente que los anticuerpos 9F3, 2412, 26B3 y 19D4 son útiles en la detección de niveles de FR α en muestras biológicas, por ejemplo suero, derivadas de un sujeto. Además, las combinaciones particulares de (i) 9F3 como anticuerpo de captura y 24F12 como anticuerpo detector y (ii) 26B3 como anticuerpo de captura y 19D4 como anticuerpo detector son capaces y particularmente eficaces para evaluar los niveles de FR α en muestras biológicas.

EJEMPLO 15. Evaluación de los niveles de FR α en orina usando tres pares de anticuerpos detectores y de captura diferentes

Se evaluó la capacidad de los tres pares de anticuerpos anti-FR α en la detección de los niveles de FR α en muestras de orina. Los pares de anticuerpos utilizados fueron los siguientes: (1) 26B3 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura, y (2) 24F12 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura.

Método

Dos pares de anticuerpos fueron examinados con las curvas de calibrador completas y orina tratada previamente con una dilución 1:1 durante 2 minutos en guanidina 6 M, guanidina 3 M o control de PBS. Las siguientes muestras de orina fueron examinadas: tres depósitos de orina humana diluidos 1:80, y cinco orinas individuales humanas diluidas 1:80 (una masculina, cuatro femeninas).

Las placas se marcaron a 150 $\mu\text{g/mL}$, +B, +T, en 4spot STD ((Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland)), una captura por pocillo. Las detecciones se realizaron a 1 $\mu\text{g/mL}$. Se utilizó diluyente 100 + HAMA + mlgG para las muestras y el calibrador. Se utilizó diluyente 3 para las detecciones. Los diluyentes eran diluyentes disponibles comercialmente obtenidos de Meso Scale Discovery.

Se empleó el siguiente protocolo para ECLIA. Se añadieron las muestras a 50 μL /pocillo. Las muestras se agitaron durante 2 horas. Las muestras se lavaron con disolución salina de tampón de fosfato (PBS) con el detergente Tween 20 (PBST). El anticuerpo detector se añadió a 25 μL /pocillo. Las muestras se agitaron durante 2 horas y posteriormente se lavaron con PBST. Se leyó la emisión de electroquimioluminiscencia (ECL) de las muestras con 2X MSD Buffer T.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Tablas 26-27.

Tabla 26: Detección de niveles de FR α en orina usando 26B3 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura.

Detección	26B3							
	9F3							
Captura	Guanidina 6M			Guanidina 3M			Control PBS	
ID Muestra	Conc. de reequipo ajustada $\mu\text{g/mL}$	%CV	% de control	Conc. de reequipo ajustada $\mu\text{g/mL}$	%CV	% de control	Conc. de reequipo ajustada $\mu\text{g/mL}$	%CV
Depósito de orina 1	13,252	2%	114%	14,505	10%	124%	11,655	17%
Depósito de orina 2	14,827	5%	133%	17,039	4%	152%	11,187	5%
Depósito de orina 3	11,280	5%	119%	9,065	10%	96%	9,479	9%
Orina ind. 1	1,747	3%	99%	1,754	6%	100%	1,760	12%
Orina ind. 2	40,505	7%	145%	46,622	5%	167%	27,920	13%
Orina ind. 3	1,623	1%	117%	1,496	5%	108%	1,381	4%
Orina ind. 4	12,091	2%	86%	14,941	5%	107%	13,996	13%
Orina ind. 5	22,829	2%	128%	24,607	8%	137%	17,899	5%
	Media	3%	118%	Media	7%	124%	Media	10%
					Diferencia con la condición 6M	<u>6%</u>		

Tabla 27: Detección de niveles de FRα en orina usando 24F12 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura.

Detección	24F12							
Captura	9F3							
	Guanidina 6M			Guanidina 3M			Control PBS	
ID Muestra	Conc. de reequipo ajustada pg/mL	%CV	% de control	Conc. de reequipo ajustada pg/mL	%CV	% de control	Conc. de reequipo ajustada pg/mL	%CV
Depósito de orina 1	10,883	2%	53%	14,689	9%	72%	20,504	10%
Depósito de orina 2	11,763	8%	60%	16,487	7%	85%	19,468	1%
Depósito de orina 3	7,456	9%	40%	9,362	17%	50%	18,677	7%
Orina ind. 1	1,376	1%	39%	1,894	7%	54%	3,501	3%
Orina ind. 2	29,567	0%	61%	37,843	13%	78%	48,607	5%
Orina ind. 3	1,621	4%	61%	2,153	2%	81%	2,667	1%
Orina ind. 4	10,470	6%	58%	14,116	5%	78%	18,175	6%
Orina ind. 5	19,390	6%	68%	22,076	23%	78%	28,421	4%
	Media	5%	55%	Media	10%	72%	Media	5%
					Diferencia con la condición 6M	17%		

5 En base a los datos anteriores, es evidente que los anticuerpos de 9F3, 24F12, 26B3 y 19D4 son útiles en la detección de niveles de FRα en muestras biológicas derivadas de un sujeto. Además, las combinaciones de (1) 26B3 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura y (2) 24F12 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura, son capaces y particularmente eficaces para evaluar niveles de FRα en muestras biológicas.

10 Se llevó a cabo un segundo conjunto de experimentos, siguiendo el protocolo descrito anteriormente y utilizando los mismos dos pares de anticuerpos, usando cuatro orinas individuales humanas femeninas diluidas 1:80. La orina se trató previamente con una dilución 1:1 durante 2 minutos en guanidina 3M o control de PBS. Los resultados se muestran en las Tablas 28-29.

Tabla 28: Detección de niveles de FRα en la orina usando 26B3 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura.

Detección	26B3					
Captura	9F3					
	Guanidina 3M			Control PBS		
ID de muestra	Conc. de reequipo ajustada pg/mL	%CV	% de control	Conc. de reequipo ajustada pg/mL	%CV	% de control
Orina ind. 2	33,824	4%	98%	34,569	2%	
Orina ind. 3	2,086	4%	99%	2,107	3%	
Orina ind. 4	15,283	5%	97%	15,696	2%	
Orina ind. 5	24,955	4%	92%	26,991	3%	
	Media	4%	<u>97%</u>	Media		3%

Tabla 29: Detección de niveles de FR α en orina usando 24F12 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura.

Detección	24F12				
Captura	9F3				
	Guanidina 3M			Control PBS	
ID de muestra	Conc. de reequipo ajustada pg/mL	%CV	% de control	Conc. de reequipo ajustada pg/mL	%CV
Orina ind. 2	38,455	4%	106%	36,414	6%
Orina ind. 3	2,447	2%	109%	2,250	2%
Orina ind. 4	15,303	3%	81%	18,964	8%
Orina ind. 5	27,216	0%	95%	28,651	5%
	Media	2%	98%	Media	5%

5 Los resultados de este segundo conjunto de experimentos confirman adicionalmente los resultados de la primera serie de experimentos, y demuestran que el nivel de FR α que no está unido a una célula se puede evaluar de manera fiable, por ejemplo, en la orina, usando ensayos tales como el ensayo ECLIA y utilizando los anticuerpos 26B3, 9F3, 24F12. Además, los resultados demuestran que tales ensayos pueden detectar eficazmente FR α usando pares de anticuerpos detector y de captura que se unen a FR α (tales como, por ejemplo, 26B3 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura, y 24F12 como anticuerpo detector y 9F3 como anticuerpo de captura).

EJEMPLO 16. Evaluación de los niveles de FR α en suero y plasma

10 Los niveles de FR α se evaluaron en muestras de suero y plasma en dos días separados. Los sujetos de los que se derivaron las muestras eran o bien sujetos normales o bien pacientes con cáncer de ovario o pulmón.

15 El protocolo para evaluar los niveles de FR α fue igual al explicado en el Ejemplo 14 anterior. Los pares de anticuerpos usados para la evaluación de niveles FR α fueron también los mismos que en el Ejemplo 14, es decir, **Par 1**, en el que 9F3 era el anticuerpo de captura y 24F12 era el anticuerpo detector, y el **Par 2**, en el que 26B3 era el anticuerpo de captura y 19D4 era el anticuerpo detector.

Los resultados se proporcionan en la Tabla 30.

Tabla 30: Niveles de FR α evaluados en muestras de suero y plasma en diferentes días.

ID de donante	Enfermedad	Diagnosis confirmada de biomuestra	Etapa	Día 1 FR _{ca} /par 1	Día 2 FR _{ca} /par 1	Día 1 FR _{ca} /par 1	Día 2 FR _{ca} /par 1	Día 1 FR _{ca} /par 2	Día 2 FR _{ca} /par 2	Día 1 FR _{ca} /par 2	Día 2 FR _{ca} /par 2
17168	ovario	Suero FRA - Par 1 contra Par 2	I	1236	1282	1466	1183	1298	1384	1410	1336
46464	ovario	Carcinoma seroso	IIIC	1589	1848	2027	2147	1966	2018	2066	2210
47219	ovario	Adenocarcinoma	No aparece	447	432	1208	748	435	446	695	577
47721	ovario	Cistadenocarcinoma seroso papilar	IIIB	1307	1400	2291	2100	1642	1479	1940	1807
48185	ovario	Adenocarcinoma	No aparece	1058	1038	883	652	918	872	811	781
48254	ovario	Adenocarcinoma	IIIC	511	495	3030	2569	506	445	1332	1370
48258	ovario	Adenocarcinoma	No aparece	471	552	1978	1070	629	547	978	798
48282	ovario	Adenocarcinoma	No aparece	375	388	688	536	446	407	540	428
48698	ovario	Carcinoma, no diferenciado	IIIB	279	231	308	225	340	255	328	228
49028	ovario	Carcinoma seroso	IIIC	727	590	158	169	468	526	192	192
49030	ovario	Carcinoma seroso	IIIC	215	205	695	485	362	291	734	590
49033	ovario	Cistadenocarcinoma seroso	IIIC	579	457	805	717	511	451	629	668
49071	ovario	Cistadenocarcinoma seroso	IV	335	338	1884	1462	559	457	1224	1028
49092	ovario	Cistadenocarcinoma papilar	No aparece	272	228	1235	615	399	334	678	535
49258	ovario	Cistadenocarcinoma seroso papilar	IIIB	201	190	343	142	328	253	368	244
49335	ovario	Cistadenocarcinoma seroso	IIIB	1904	1698	1560	1485	1879	1503	1868	1627
49369	ovario	Carcinoma seroso	IIIC	2451	2805	2589	2641	3402	2659	2898	2605
49551	ovario	Carcinoma seroso	III	408	385	364	342	505	432	436	418
50009	ovario	Carcinoma seroso	IIIC	2887	4127	2641	3811	4466	3914	3533	3519

50370	ovary	Cistadenocarcinoma seroso	IIIB	619	570	788	611	813	762	708	758
50378	ovario	Cistadenocarcinoma seroso papilar	I	410	367	330	256	388	464	381	387
50460	ovario	Cistadenocarcinoma seroso papilar	IIIB	254	274	688	414	284	272	489	420
50467	ovario	Adenocarcinoma de célula transparente	I	427	314	414	300	272	313	292	309
50635	ovario	Cistadenocarcinoma seroso	IA	247	227	462	367	355	345	392	392
51503	ovario	Cistadenocarcinoma papilar	I	291	250	925	651	315	326	818	498
51504	ovario	Cistadenoma mucoso, malignidad borderline	I	224	184	2438	1395	225	240	916	856
51506	ovario	Cistadenoma mucoso papilar	III	270	258	713	324	335	384	457	424
52949	ovario	Adenocarcinoma	No aparece	446	436	288	257	435	483	395	390
52952	ovario	Papillary serous cystadenocarcinoma	No aparece	480	415	451	376	310	351	299	321
52957	ovario	Cistadenocarcinoma seroso papilar	III	373	334	274	221	318	374	303	330
52978	ovario	Cistadenoma mucoso papilar	II	348	318	533	429	525	559	596	624
52980	ovario	Cistadenocarcinoma seroso	III	627	630	1447	1019	834	905	964	996
DLSN-057	normal			309	402	413	394	515	527	509	531
DLSN-056	normal			273	254	483	498	480	458	522	524
DLSN-052	normal			282	289	293	298	446	483	438	401

DLSN-049	normal				282	256	351	320	363	394	430	359
DLSN-048	normal				362	399	454	434	746	722	824	639
DLSN-047	normal				188	176	208	167	275	263	251	212
DLSN-046	normal				295	321	276	240	354	310	315	257
DLSN-045	normal				259	259	259	189	292	279	273	235
DLSN-044	normal				244	236	246	254	284	273	284	271
DLSN-042	normal				245	199	210	185	328	301	285	258
DLSN-040	normal				392	376	408	406	481	499	502	413
DLSN-039	normal				463	470	469	446	617	599	567	528
DLSN-037	normal				256	231	256	223	367	338	351	289
DLSN-029	normal				285	270	348	337	453	417	418	351
DLSN-023	normal				265	254	286	298	458	402	370	386
DLSN-020	normal				237	238	311	287	530	496	504	446
DLSN-011	normal				344	328	210	207	688	603	297	267
DLSN-039	normal				196	178	204	183	259	219	242	248
DLSN-047	normal					336		385		489		429
DLSN-052	normal					226		208		346		315
DLSL-012	Pulm ón					340		220		529		375
DLSL-015	Pulm ón					199		180		236		292
DLSL-023	Pulm ón					581		347		568		523
DLSL-031	Pulm ón					400		251		415		343
DLSL-034	Pulm ón					133		138		299		331

1	Pulmón									339			462		460
3	Pulmón					238				185			203		334
6	Pulmón					295				1646			431		868
18	Pulmón					328				288			466		418
18639	Pulmón					124				333			128		216
18640	Pulmón					246				275			221		221
50666	Pulmón					372				357			405		338
2	Pulmón					214				327			274		269
4	Pulmón					347				625			526		575
7	Pulmón					224				308			421		452
12	Pulmón					409				424			778		725
13	Pulmón					509				590			1251		1360
14	Pulmón					250				250			409		357
15	Pulmón					502				466			606		594
16	Pulmón					153				274			246		275
19	Pulmón					357				905			428		576
DLS4-0002	Pulmón					234				245			410		347
DLS4-0004	Pulmón					472				520			507		538
DLSO-007	·ovario					389				593			574		544
DLSO-008	·ovario					175				295			386		364
DLSO-009	·ovario					232				331			299		349
DLSO-014	·ovario					265				300			430		467

DLSO-020	ovario									536				261			453			389
DLSO-026	ovario																			
DLSO-027	ovario									290				140			269			218
DLSO-028	ovario									357				207			397			18
DLSO-029	ovario									412				236			369			361
DLSO-030	ovario									387				498			595			616
DLSO-031	ovario									348				496			353			413
DLSO-034	ovario									197				222			308			346
DLSO-035	ovario									144				540			298			587
DLSO-023	ovario									404				216			423			337
DLSO-025	ovario									306				156			301			272
DLSO-026	ovario									231				293			406			378
DLSO-032	ovario									151				190			240			255
DLSO-018	ovario									155				340			303			343
DLSO-019	ovario									350				330						
DLSO-021	ovario									359				365			346			434
DLSO-024	ovario									260				140			338			318
10001627	ovario									1481				1396			1583			1655
11025393	ovario									5241				4069			4998			5486
11025394	ovario									473				371			488			518
110025395	ovario									3215				2920			3466			4043
110025397	ovario									109				145			245			232

110025398	ovario					476				497		613		543
110025399	ovario					166				145		234		229
110025402	ovario					219				221		369		357
110025403	ovario					7529				6990		13033		11888
110025405	ovario					510				508		836		835
5	ovario					164				328		252		375
8	ovario					251				709		473		573
9	ovario					249				743		462		561
10	ovario					288				569		412		446
11	ovario					180				417		310		397
17	ovario					296				760		342		628
110025392	ovario					1094				2210		907		1294

5 En base a los datos anteriores, es evidente que los anticuerpos 9F3, 2412, 26B3 y 19D4 son útiles en la detección de niveles de FR α en muestras biológicas, por ejemplo, de suero o plasma, derivadas de un sujeto. Además, las combinaciones particulares de (i) 9F3 como anticuerpo de captura y 24F12 como anticuerpo detector y (ii) 26B3 como anticuerpo de captura y 19D4 como anticuerpo detector son capaces y particularmente eficaces en la evaluación de los niveles de FR α en muestras biológicas.

10 Para los ensayos llevados a cabo utilizando tanto el par 1 como el par 2, se observó una alta correlación entre los niveles de FR α en suero y plasma. La Figura 16 muestra la correlación de los niveles de FR α en suero y plasma para los ensayos llevados a cabo usando el par 1 (véase el ejemplo 16). El valor R² fue de 0,8604. La Figura 17 muestra la correlación de los niveles FR α en suero y plasma para los ensayos llevados a cabo usando el par 2 (véase el Ejemplo 16). El valor R² fue de 0,9766.

15 Tanto para muestras de suero como de plasma, se observó una alta correlación entre los niveles de FR α medidos usando el par 1 y el par 2. La Figura 18 muestra la correlación en los niveles de FR α en suero para los ensayos llevados a cabo usando el par 1 frente al par 2 (véase el Ejemplo 16). El valor R² fue 0,9028. La Figura 19 muestra la correlación de los niveles de FR α en plasma para los ensayos llevados a cabo usando el par 1 frente al par 2 (véase el Ejemplo 16). El valor R² fue 0,8773.

Los resultados también mostraron que hay una alta correlación entre los niveles de FR α medidos en días diferentes. La Figura 20 muestra la correlación entre días de los niveles de FR α en suero para ensayos realizados usando el par 2. El valor R² fue 0,9839.

EQUIVALENTES

20 Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando meramente experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención aquí descritas. Se pretende que las siguientes reivindicaciones abarquen tales equivalentes. Se contempla que cualquier combinación de las realizaciones descritas en las reivindicaciones anexas entre dentro del alcance de la invención.

Tabla 33: Secuencias

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
1	CDRH1 de MORAb-003	GFTFSGYGLS
2	CDRH2 de MORAb-003	MISSGGSYTYADSVKG
3	CDRH3 de MORAb-003	HGDDPAWFAY
4	CDRL1 de MORAb-003	SVSSSISSNNLH
5	CDRL2 de MORAb-003	GTSNLAS
6	CDRL3 de MORAb-003	QQWSSYPMYT
7	Secuencia de aminoácidos de polipéptido maduro de cadena pesada de MORAb-003	1 EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM 51 ISSGGSYTY ADYKGRFAI SRDPAKNTLF LQMDSLRPED TGVYFCARHG 101 DDPWFAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY 201 ICNVNHHKPSN TKVDKKEPK SCDKHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 301 TYRVSVLTIV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNYHQ KSLSLSPGK

ES 2 780 192 T3

8	Secuencia de aminoácidos de polipéptido de cadena ligera de MORAb-003	<p>1 DIQLTQSPSS LSASVGDRV T ITCVSSSSIS SNNLHWYQQK PGKAPKPIY 51 GTSNLAGVPS SRFSGSGSGT DYTFTISSLQ PEDIATYYCQ QWSSYPMYT 101 FGQGTKEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ 151 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYLSL TLTLKADYE KHKVYACEVT 201 HQGLSSPVTK SFNRGEC</p>
9	Secuencia de aminoácidos de pre-proteína de longitud completa de cadena pesada de MORAb-003	<p>1 MGWSCIIIFL VATATGVHSE VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CSASGTFSG 51 YGLSWVRQAP GKGLEWVAMI SSGGSYTYA DSVKGRFAIS RDNKNTLFL 101 QMDSLPEDE GYVFCARHGD DPAWFAYWQ GTPVTVSSAS TKGPSVFPLA 151 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSVHT FPAVLQSSGL 201 YSLSSVTVF SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKEPKS CDKTHCPCP 251 PAPELLGGPS VFLPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH E DPEVKFNWYV 301 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP 351 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSSRDEL T KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV 401 EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH 451 EALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
10	Secuencia de aminoácidos de pre-proteína de longitud completa de cadena ligera de MORAb-003	<p>1 MGWSCIIIFL VATATGVHSD IQLTQSPSSL SASVGDRV T TCVSSSSISS 51 NNLHWYQQK GKAPKPIY TSNLAGVPS RFSGSGSGTD YFTFTISSLQ 101 EDIATYYCQ WSSYPMYTF GQGTKEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG 151 TASVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSYLSLST 201 LTLKADYE KHKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC</p>
11	Nucleótidos de cadena pesada de MORAb-003	<p>1 ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT 51 CCACTCCGAG GTCCAACTGG TGGAGAGCGG TGGAGGTGTT GTGCAACCTG 101 GCCGGTCCCT GCGCCTGTCC TGCTCCGCAT CTGGCTTCAC CTTACAGCGC 151 TATGGGTGT CTGGGTGAG ACAGGCACCT GGAAAAGGTC TTGAGTGGGT 201 TGCAATGATT AGTAGTGGTG GTAGTTATAC CTACTATGCA GACAGTGTGA 251 AGGGTAGATT TGCAATATCG CGAGACAACG CCAAGAACAC ATTGTTCTCT 301 CAAATGGACA GCCTGAGACC CGAAGACACC GGGGTCTATT TTTGTGCAAG 351 ACATGGGGAC GATCCCGCCT GGTTCGCTTA TTGGGGCCAA GGGACCCCGG 401 TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCTGGCA 451 CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT 501 CAAGGACTAC TTCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCC 551 TGACGACGG CGTGACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC 601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA</p>
		<p>651 GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA 701 AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC 751 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAA 801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG 851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTCAA CTGGTACGTG 901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA 951 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTG CACCAGGACT 1001 GGCTGAATCG CAAGGAGTAC AAGTGAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA 1051 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC 1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG 1151 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG 1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCTCC 1251 CGTGTGGAC TCCGACGGCT CTTCTTCTT ATATTCAAAG CTCACCGTGG 1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGCTT TCTCATGCTC CGTGATGCAT 1351 GAGGCTCTG ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCCGG 1401 GAAATGA</p>

ES 2 780 192 T3

12	Nucleótidos de cadena ligera de MORAb-003	<pre> 1 ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT 51 CCACTCCGAC ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG 101 TGGGTGACAG AGTGACCATC ACCTGTAGTG TCAGCTCAAG TATAAGTTCC 151 AACAACTTGC ACTGGTACCA GCAGAAGCCA GGTAAGGCTC CAAAGCCATG 201 GATCTACGGC ACATCCAACC TGGCTTCTGG TGTGCCAAGC AGATTACGCG 251 GTAGCGGTAG CGGTACCGAC TACACCTTCA CCATCAGCAG CCTCCAGCCA 301 GAGGACATCG CCACCTACTA CTGCCAACAG TGGAGTAGTT ACCCGTACAT 351 GTACACGTTT GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG 401 CACCATCTGT CTTTATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA 451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA 501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCAGGAGA 551 GTGTACACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC 601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA 651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG 701 GAGAGTGTTA A </pre>
13	LK26HuVK	<pre> DIQLTQSPSSLSASVGDRV ITCSVSSSISSNNLHWYQQ PGKAPKLLIYGTSNLAGV SRFSGSGSGTDFTFTISLQ PEDIATYYCQQWSSYPMYT FGQGTKVEIK* </pre>
14	LK26HuVKY	<pre> DIQLTQSPSSLSASVGDRV ITCSVSSSISSNNLHWYQQ PGKAPKLLIYGTSNLAGV SRFSGSGSGTDYFTFTISLQ PEDIATYYCQQWSSYPMYT FGQGTKVEIK* </pre>
15	LK26HuVKPW	<pre> DIQLTQSPSSLSASVGDRV ITCSVSSSISSNNLHWYQQ PGKAPKPIYGTNLAGV SRFSGSGSGTDFTFTISLQ PEDIATYYCQQWSSYPMYT FGQGTKVEIK </pre>
16	LK26HuVKPW, Y	<pre> DIQLTQSPSSLSASVGDRV ITCSVSSSISSNNLHWYQQ PGKAPKPIYGTNLAGV SRFSGSGSGTDYFTFTISLQ PEDIATYYCQQWSSYPMYT FGQGTKVEIK </pre>
17	LK26HuVH	<pre> QVQLQESGPGLVRSQTL TCTASGFTFSGYGLSWVR PGRGLEWVAMISGGSYTY ADSVKGRVTMLRDTSKN QFS </pre>
		<pre> LRLSSVTAADTAVYYCAR HGDPAWFAYWGQSSLVTV SS </pre>

18	LK26HuVHFAIS, N	QVQLQESGPGGLVLRPSQTL S L TCTASGFTFSGYGLSWVRQP PGRGLEWVAMISSGGSY T YY ADSVKGRFAISRDN S KNQFS LRLSSVTAADTAVYYCARHG DDPAWFAYWGQGS L VTVSS*
19	LK26HuVHSLF	QVQLQESGPGGLVLRPSQTL S L TCTASGFTFSGYGLSWVRQP PGRGLEWVAMISSGGSY T YY ADSVKGRVTMLRDT S KN S LF LRLSSVTAADTAVYYCARHG DDPAWFAYWGOGTTVTVSS*
20	LK26HuVHI, I	QVQLQESGPGGLVLRPSQTL S L TCTASGFTFSGYGLSWVRQP PGRGLEWVAMISSGGSY T YY ADSVKGRVTMLRDT S KNQFS LRLSSVTAADTAI I YICARHG DDPAWFAYWGOG S LVTVSS*
21	LK26KOLHuVH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFTFSGYGLSWVRQA PGKGLEWVAMISSGGSY T YY ADSVKGRFAISRDN A KN T LF LQMDSLRPEDTGVYFCARHG DDPAWFAYWGQGT P VTVSS*
22	Secuencia de cadena pesada de Ab LK26 de ratón	QVXLQXSGGDLVKPGGSLKL SCAASGFTFSGYGLSWVRQT PDKRLEWVAMISSGGSY T YY ADSVKGRFAISRDN A KN S LF LQMSSLKSDDTAI I YICARHG DDPAWFAYWGQGT L VTVSA*
23	Secuencia de cadena ligera de Ab LK26 de ratón	DIELTQSPALMAASPGEKVT ITCSVSSISSNNLHWYQOK SETSPKPWIYGTSNLASGVP LRF R GFGSGTSYSLT I SSME AEDAATYYCQWSSYPMYT FGG G T K LEIK*
24	Secuencia de nucleótidos de FRa humano de consenso	

ES 2 780 192 T3

		<p>tcaaggttaa acgacaagga cagacatggc tcagcggatg acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa aagccaggcc ccgaggacaa gttgcattgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac tggaaacct actgtgagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat tgcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg ttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt cccacacccc actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tctacaagg tcagcaacta cagccgaggg agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccc gggcagcctg gcctttcctg cttagcctgg ccctaagtct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac ctggaaatcc ctgcctgtt cagcccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa</p>
25	Secuencia de aminoácidos de FRα humano de consenso	<p>maqrmttqlf lllvwvavvg eaqtriawar tellnvcnna khkhekpge dklheqcrpw rknaccstnt sqeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyecs pnlgpwiqqv dqswrkervl nvlplkedce qwwedcrtsy tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaacqpfhf yfptptvlcn eiwthsykvs nysrgsgrci qmwfdpaqgn pneeevarfya aamsagapwa awpfilslal mllwlis</p>
26	Secuencia de epítipo de Mov-18	<p>TELLNVXMNAK*XKEKPPX</p>
		<p>*KLXXQX</p>
27	CDR1 de cadena ligera de 9F3	RASSTVSYSYLH
28	CDR2 de cadena ligera de 9F3	GTSNLAS
29	CDR3 de cadena ligera de 9F3	QQYSGYPLT
30	Dominio variable de cadena ligera de 9F3	<p>PAIMSASPGEKVTMTCRASSTVSYSYLHWYQQKSGASPQLWIYGTSNLAS GVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPLTFGAGTKLELK RADAAP</p>
31	CDR1 de cadena pesada de 9F3	SGYYWN
32	CDR2 de cadena pesada de 9F3	YIKSDGSNNYNPSLKN

ES 2 780 192 T3

33	CDR3 de cadena pesada de 9F3	EWKAMDY
34	Dominio variable de cadena pesada de 9F3	ESGPGLVRPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGSRLEWMGYIKSDG SNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYFCTREWKAMDYW GQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDT
35	CDR1 de cadena ligera de 19D4	RASEVDTYGNNFIH
36	CDR2 de cadena ligera de 19D4	LASNLES
37	CDR3 de cadena ligera de 19D4	QQNNGDPWT
38	Dominio variable de cadena ligera de 19D4	PASLAVSLGQRATISCRASEVDTYGNNFIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNGDPWTFGGGTKL EIKRADAAP
39	CDR1 de cadena pesada de 19D4	HPYMH
40	CDR2 de cadena pesada de 19D4	RIDPANGNTKYDPKFQG
41	CDR3 de cadena pesada de 19D4	EEVADYTMDY
42	Dominio variable de cadena pesada de 19D4	GAELVKPGASVKLSCTASGFNIKHPYMHVVKQRPDQGLEWIGRIDPANG NTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCGREEVADYTM DYWGQGTSVTVSSAKTTAPSVYPLAPV
43	CDR1 de cadena ligera de 24F12	SASQGINNFLN
44	CDR2 de cadena ligera de 24F12	YTSSLHS
45	CDR3 de cadena ligera de 24F12	QHFSKLPWT

ES 2 780 192 T3

46	Dominio variable de cadena ligera de 24F12	TSSLSASLGDRVTISCSASQGINNFLNWWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIAIYYCQHFSKLPWTFGGGKLEIKRADA AP
47	CDR1 de cadena pesada de 24F12	SYAMS
48	CDR2 de cadena pesada de 24F12	EIGSGGSYTYYPDTVTG
49	CDR3 de cadena pesada de 24F12	ETTAGYFDY
50	Dominio variable de cadena pesada de 24F12	SGGGLVRPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQSPEKRLEWVAEIGSGGS YTYYPDTVTGRFTISRDNASTLYLEMSSLRSEDTAIYYCARETTAGYFDY
		WGQGTTLTVSS
51	CDR1 de cadena ligera de 26B3	RTSENIFFSYLA
52	CDR2 de cadena ligera de 26B3	NAKTLAE
53	CDR3 de cadena ligera de 26B3	QHHYAFPWT
54	Dominio variable de cadena ligera de 26B3	PASLSASVGETVTITCRTSENIFFSYLAWYQQKQGISPQLLVYNAKTLAEGV PSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHHYAFPWTFGGGSKLEIKRA DAAP
55	CDR1 de cadena pesada de 26B3	GYFMN
56	CDR2 de cadena pesada de 26B3	RIFPYNGDTFYNQKFKG
57	CDR3 de cadena pesada de 26B3	GTHYFDY

ES 2 780 192 T3

58	Dominio variable de cadena pesada de 26B3	GPPELVKPGASVKISCKASDYSFTGYFMNWVMQSHGKSLEWIGRIFPYNGD TFYNQKFKGRATLTVDKSSSTAHMELRSLASEDSAVYFCARGTHYFDYW GQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQT
59	CDR1 de cadena ligera de 9F3	AGGGCCAGCTCAACTGTAAGTTACAGTTACTTGAC
60	CDR2 de cadena ligera de 9F3	GGCACATCCAACTTGGCTTCT
61	CDR3 de cadena ligera de 9F3	CAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCACG
62	Dominio variable de cadena ligera de 9F3	CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGC AGGGCCAGCTCAACTGTAAGTTACAGTTACTTGCACTGGTACCAGCAG AAGTCAGGTGCCTCCCCCAACTCTGGATTATGGCACATCCAACTTGG CTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTA CTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAG CTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC
63	CDR1 de cadena pesada de 9F3	AGTGGTTATTACTGGAAC
64	CDR1 de cadena pesada de 9F3	TACATAAAGTCCGACGGTAGCAATAATTACAACCCATCTCTCAAAAAT
65	CDR1 de cadena pesada de 9F3	GAGTGAAGGCTATGGACTAC
66	Dominio variable de cadena pesada de 9F3	GAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAGACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCT GCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGAAGTGGAT CCGGCAGTTTCCAGGAAGCAGACTGGAATGGATGGGCTACATAAAGTC CGACGGTAGCAATAATTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAATCTCCAT CACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAAGTTGAATTCTGTG ACTACTGAGGACACAGCTACATATTTCTGTACAAGGGAGTGGAAAGGCT ATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA ACAACACCCCATCAGTCTATCCACTGGCCCTGGGTGTGGAGATACA AC
67	CDR1 de cadena ligera de 19D4	AGAGCCAGTGAAAGTGTTGATACTTATGGCAATAATTTTATACAC
68	CDR2 de cadena ligera de	CTTGCATCCAACCTAGAATCT

ES 2 780 192 T3

	19D4	
69	CDR3 de cadena ligera de 19D4	CAGCAAATAATGGGGATCCGTGGACG
70	Dominio variable de cadena ligera de 19D4	CCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCA
		GAGCCAGTGAAAGTGTTGATACTTATGGCAATAATTTTATACTGGT ACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATTATCTTGCAT CCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTA GGACAGACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTG CAACCTATTACTGTCAGCAAATAATGGGGATCCGTGGACGTTCCGGTG GAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
71	CDR1 de cadena pesada de 19D4	CACCCCTATATGCAC
72	CDR2 de cadena pesada de 19D4	AGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCAG GGC
73	CDR3 de cadena pesada de 19D4	GAGGAGGTGGCGGACTATACTATGGACTAC
74	Dominio variable de cadena pesada de 19D4	GGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACA GCTTCTGGCTTCAACATTAACACCCCTATATGCACTGGGTGAAGCAG AGGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAAT GGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACA GCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTACAGCTCAGCAGCCTGACA TCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGAGGAGGTGGCGGAC TATACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTG
75	CDR1 de cadena ligera de 24F12	AGTGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTTTTTAAAC
76	CDR2 de cadena ligera de 24F12	TACACATCAAGTTTACTCA
77	CDR3 de cadena ligera de 24F12	CAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTGGACG
78	Dominio variable de cadena ligera de 24F12	

ES 2 780 192 T3

		ACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA GTGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTTTTTAAACTGGTATCAGCAGAAAC CAGATGGCACTGTTAAACTCCTGATCTATTACACATCAAGTTTACACTC AGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTC TCTACCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCATATACTATTGT CAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTG GAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC
79	CDR1 de cadena pesada de 24F12	AGCTATGCCATGTCT
80	CDR2 de cadena pesada de 24F12	GAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACACTGTGACG GGC
81	CDR3 de cadena pesada de 24F12	GAAACTACGGCGGGCTACTTTGACTAC
82	Dominio variable de cadena pesada de 24F12	TCTGGGGGAGGCTTAGTGAGGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCC AGTCTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAGAAATTGGTAGTGGTG GTAGTTACACCTACTATCCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTC CAGAGACAATGCCAAGAGCACCTGTACCTGGAAATGAGCAGTCTGAG GTCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGTGCAAGGGAAACTACGGCGGG CTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
83	CDR1 de cadena ligera de 26B3	CGAACAAGTGAGAATATTTTCAGTTATTTAGCA
84	CDR2 de cadena ligera de 26B3	AATGCAAAAACCTTAGCAGAG
85	CDR3 de cadena ligera de 26B3	CAACATCATTATGCTTTTCCGTGGACG
86	Dominio variable de cadena ligera de 26B3	CCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTC
		GAACAAGTGAGAATATTTTCAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAAC AGGGAATATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAG AGGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTT CTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACT GTCAACATCATTATGCTTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCTCCAAGCT GGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC

ES 2 780 192 T3

87	CDR1 de cadena pesada de 26B3	GGCTACTTTATGAAC
88	CDR2 de cadena pesada de 26B3	CGTATTTTTCTTACAATGGTGATACTTTCTACAACCAGAAGTTCAAGG GC
89	CDR3 de cadena pesada de 26B3	GGGACTCATTACTTTGACTAC
90	Dominio variable de cadena pesada de 26B3	GGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAG GCTTCTGATTACTCTTTTACTGGCTACTTTATGAACTGGGTGATGCAGA GCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTTTTCTTACAATG GTGATACTTTCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTG TAGACAAATCCTCTAGCACAGCCACATGGAGCTCCGGAGCCTGGCAT CTGAGGACTCTGCAGTCTATTTTTGTGCAAGAGGGACTCATTACTTTGA CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACTGTCTCCTCAGCCAAAACGAC ACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAA

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MORPHOTEK INC.

<120> > FOLATO RECEPTOR ALFA COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO Y DE PRONÓSTICO PARA CÁNCERES
 5 QUE EXPRESAN FOLATO RECEPTOR ALFA

<130> 118557-01420

<140> PCT/US2011/059411
 10 <141> 04-11-2011

<150> 61/508.444
 <151> 15-07-2011

15 <150> 61/410.497
 <151> 05-11-2010

<160> 90

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

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

<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Leu Ser
 1 5 10

<210> 2
 35 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 2
Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 45

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

55 <400> 3
His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

<400> 4
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

10 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 5
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
20 1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

30 <400> 6
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
1 5 10

35 <210> 7
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 7

ES 2 780 192 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

ES 2 780 192 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 8

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 8

ES 2 780 192 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9

<211> 468

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 9

ES 2 780 192 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Gly Tyr Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

ES 2 780 192 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile
 35 40 45

Ser Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
 100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

5 <210> 11
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 11

ES 2 780 192 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgag 60
 gtccaactgg tggagagcgg tggaggtggt gtgcaacctg gccggtcctt gcgcctgtcc 120
 tgctccgcat ctggcttcac cttcagcggc tatgggttgt cttgggtgag acaggcacct 180
 ggaaaaggctc ttgagtgggt tgcaatgatt agtagtggtg gtagttatac ctactatgca 240
 gacagtgtga agggtagatt tgcaatatcg cgagacaacg ccaagaacac attgttcctg 300
 caaatggaca gcctgagacc cgaagacacc ggggtctatt tttgtgcaag acatggggac 360
 gatcccgcct ggttcgctta ttggggccaa gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
 accaagggcc catcggctctt ccccctggca ccctctcca agagcacctc tgggggcaca 480
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
 tcaggcgcctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 600
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct 720
 tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcaactg aactcctggg gggaccgtca 780
 gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
 acatgcgtgg tggtagcgtg gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
 aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1080
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttctt atcccagcga catcgccgtg 1200
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
 tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag 1380
 agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1407

- 5 <210> 12
 <211> 711
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 12

ES 2 780 192 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgac 60
atccagctga cccagagccc aagcagcctg agcgccagcg tgggtgacag agtgaccatc 120
acctgtagtg tcagctcaag tataagttcc aacaacttgc actggtacca gcagaagcca 180
ggtaaggctc caaagccatg gatctacggc acatccaacc tggcttctgg tgtgccaagc 240
agattcagcg gtagcggtag cggtagccgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca 300
gaggacatcg ccacctaacta ctgccaacag tggagtagtt acccgtacat gtacacgttc 360
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagtgggata acgccctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
cagggcctga gctcgcctgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a 711

<210> 13
<211> 110
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 13
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30
Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80
Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95
15 Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 110
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 14

ES 2 780 192 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 780 192 T3

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

10 <210> 17
<211> 119

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 17

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

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

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20

ES 2 780 192 T3

<210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

 Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15

<210> 19
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 19

ES 2 780 192 T3

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

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

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 20
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"
- <400> 20

ES 2 780 192 T3

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

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

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Ile Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 21

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 780 192 T3

<210> 22
 <211> 119
 <212> PRT
 5 <213> Mus sp.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 10 <223> Cualquier aminoácido

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 15 <223> Cualquier aminoácido

 <400> 22
 Gln Val Xaa Leu Gln Xaa Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

 Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 20 115

 <210> 23
 <211> 110
 <212> PRT
 25 <213> Mus sp.

 <400> 23

ES 2 780 192 T3

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
 20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp
 35 40 45

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

Gly Phe Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

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

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 24
 <211> 962
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 24
 tcaaggttaa acgacaagga cagacatggc tcagcggatg acaacacagc tgctgctcct 60
 tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg attgcatggg ccaggactga 120
 gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa aagccaggcc ccgaggacaa 180
 gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc tgttctacca acaccagcca 240
 ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac tggaaccact gtggagagat 300
 ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc ctctacgagt gctcccccaa 360
 cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc aaagagcggg tactgaacgt 420
 gccctgtgac aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat tgtgcacact cctacacctg 480
 caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg ttaacaagt gcgcagtggg 540
 agctgcctgc caacctttcc atttctactt cccacacccc actgttctgt gcaatgaaat 600
 ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg agtggccgct gcatccagat 660
 gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggagggtg gcgaggttct atgctgcagc 720
 catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg cttagcctgg ccctaatgct 780
 gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac ctggaaatcc ctgccctgtt 840
 cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg tcgggcctct gacagccact 900
 ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat ttggaaaaaa aaaaaaaaaa 960
 aa 962

10

<210> 25
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

ES 2 780 192 T3

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Ser

<210> 26

<211> 27

ES 2 780 192 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

15 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)..(12)
 <223> /replace="His"

20 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (12)..(12)
 <223> /nota="El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dichas posiciones"

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Cualquier aminoácido

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Cualquier aminoácido

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Cualquier aminoácido

40 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (21)..(21)
 <223> /reemplazar="Glu"

45 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (21)..(21)
 <223> /nota="El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dichas posiciones"

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(25)
 <223> Cualquier aminoácido

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 <223> Cualquier aminoácido

60 <400> 26
 Thr Glu Leu Leu Asn Val Xaa Met Asn Ala Lys Trp Xaa Lys Glu Lys
 1 5 10 15
 Pro Xaa Pro Xaa Asp Lys Leu Xaa Xaa Gln Xaa
 20 25

<210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
 10
 <400> 27
 Arg Ala Ser Ser Thr Val Ser Tyr Ser Tyr Leu His
 1 5 10

 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
 20
 <400> 28
 Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 25
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
 35
 <400> 29
 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
 1 5

 <210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 45
 <400> 30
 Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 1 5 10 15

 Arg Ala Ser Ser Thr Val Ser Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30

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

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

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

ES 2 780 192 T3

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

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

5 <210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 31
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5
 15 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 32
 Tyr Ile Lys Ser Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 35 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 33
 Glu Trp Lys Ala Met Asp Tyr
 1 5

40 <210> 34
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 34

ES 2 780 192 T3

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

Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp
20 25 30

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

Ser Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser
50 55 60

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

Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Trp Lys
85 90 95

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

Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp
115 120 125

Thr

<210> 35

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 35

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

15 <210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 36

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

25 <210> 37

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

35

<400> 37
 Gln Gln Asn Asn Gly Asp Pro Trp Thr
 1 5

5 <210> 38
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 38
 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
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala
 35 40 45
 Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60
 Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala
 65 70 75 80
 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

15 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

25 <400> 39
 His Pro Tyr Met His
 1 5

30 <210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 40

ES 2 780 192 T3

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

Gly

<210> 41

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 41

Glu Glu Val Ala Asp Tyr Thr Met Asp Tyr

1 5 10

15 <210> 42

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42

Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr

1 5 10 15

25 Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys His Pro Tyr Met His Trp Val Lys Gln
 20 25 30

Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn
 35 40 45

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

Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr
 65 70 75 80

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
 100 105 110

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

30 <210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

35 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 43

ES 2 780 192 T3

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Phe Leu Asn
 1 5 10
 <210> 44
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 44
 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5
 15 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 45
 Gln His Phe Ser Lys Leu Pro Trp Thr
 25 1 5
 <210> 46
 <211> 106
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 35 <400> 46
 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
 35 40 45
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
 50 55 60
 Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Ile Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Cys Gln His Phe Ser Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 85 90 95
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105
 40 <210> 47
 <211> 5

ES 2 780 192 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 47
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

10 <210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

20 <400> 48
 Glu Ile Gly Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15

Gly

25 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 49
 Glu Thr Thr Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

35 <210> 50
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 50
 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

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

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

45 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu
 65 70 75 80

ES 2 780 192 T3

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Thr Ala
85 90 95

Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

- 5 <210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
- 15 <400> 51
Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
- 20 <210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
- 30 <400> 52
Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5
- 35 <210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
- 45 <400> 53
Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr
1 5
- 50 <210> 54
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"
- <400> 54

ES 2 780 192 T3

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

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
20 25 30

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

Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe
50 55 60

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

Cys Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys
85 90 95

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

- 5 <210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
- 15 <400> 55
Gly Tyr Phe Met Asn
1 5
- 20 <210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
- 30 <400> 56
Arg Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
- 35 Gly
<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
- <400> 57
Gly Thr His Tyr Phe Asp Tyr
1 5

ES 2 780 192 T3

<210> 58
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 10
 <400> 58
 Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 1 5 10 15
 Ala Ser Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln
 20 25 30
 Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Tyr Asn
 35 40 45
 Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr
 50 55 60
 Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Thr His Tyr Phe
 85 90 95
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 100 105 110
 Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
 115 120 125
 <210> 59
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20
 <400> 59
 aggccagct caactgtaag ttacagttac ttgcac 36
 25
 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 35
 <400> 60
 ggcacatcca acttggttc t 21
 <210> 61
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

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

<400> 61
cagcagtaca gtggttacc actcacg 27

10 <210> 62
<211> 323
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 62
ccagcaatca tgtctgcatc tccaggggaa aaggtcacca tgacctgcag ggccagctca 60
actgtaagtt acagttactt gcaactgtac cagcagaagt caggtgcctc cccccaactc 120
tggatttatg gcacatccaa cttggcttct ggagtcctctg ctgccttcag tggcagtggg 180
tctgggacct cttactctct cacaatcagc agtgtggagg ctgaagatgc tgccacttat 240
tactgccagc agtacagtgg ttaccactc acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg 300
20 aaacgggctg atgctgcacc aac 323

<210> 63
<211> 18
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 63
agtggattt actggaac 18

<210> 64
<211> 48
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 64
40 tacataaagt cgcaggtag caataattac aacctctc tcaaaaat 48

45 <210> 65
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

55 <400> 65
gagtgaagg ctatggacta c 21

ES 2 780 192 T3

<210> 66
 <211> 389
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polinucleótido sintético"
 10 <400> 66
 gagtcaggac ctggcctcgt gagaccttct cagtctctgt ctctcacctg ctctgtcact 60
 ggctactcca tcaccagtgg ttattactgg aactggatcc ggcagtttcc aggaagcaga 120
 ctggaatgga tgggctacat aaagtccgac ggtagcaata attacaacc c atctctcaa 180
 aatcgaatct ccatcactcg tgacacatct aagaaccagt ttttctgaa gttgaattct 240
 gtgactactg aggacacagc tacatatttc tgtacaaggg agtgggaaggc tatggactac 300
 tggggtcagg gaacctcagt caccgtctcc tcagcaaaa caacacccc atcagtctat 360
 ccactggccc ctgggtgtgg agatacaac 389
 15 <210> 67
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 67
 25 agagccagtg aaagtgtga tacttatggc aataattta tacac 45
 <210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 35 <400> 68
 ctgcatcca acctagaatc t 21
 <210> 69
 40 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 69
 50 cagcaaaata atgggatcc gtggacg 27
 <210> 70
 <211> 331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <221> fuente

ES 2 780 192 T3

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 70
 ccagcttctt tggctgtgtc tctagggcag agggccacca ttcctgcag agccagtgaa 60
 agtgttgata cttatggcaa taattttata cactggtacc agcagaaacc aggacagcca 120
 cccaaactcc tcatttatct tgcaccaac ctagaatctg gggccctgc caggttcagt 180
 5 ggcagtgggt ctaggacaga cttaccctc accattgatc ctgtggaggc tgatgatgct 240
 gcaacctatt actgtcagca aaataatggg gatccgtgga cgttcgggtg aggcaccaag 300
 ctggagatca aacgggctga tgctgcacca a 331

<210> 71
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 71
 caccctata tgcac 15

20 <210> 72
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

30 <400> 72
 aggattgatc ctgcgaatgg taactactaa tatgaccgga agtccaggg c 51

<210> 73
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

40 <400> 73
 gaggagggtg cggactatac tatggactac 30

<210> 74
 <211> 380
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

50 <400> 74
 ggggcagagc ttgtgaagcc aggggcctca gtcaagttgt cctgcacagc ttctggcttc 60
 aacattaaac acccctatat gcaactgggtg aagcagaggc ctgaccaggg cctggagtgg 120
 55

ES 2 780 192 T3

attggaagga ttgatcctgc gaatggtaat actaaatatg acccgaagt ccagggcaag 180

gccactataa cagcagacac atcctccaac acagcctacc tacagctcag cagcctgaca 240

tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtggt agagaggagg tggcggacta tactatggac 300

tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagcca aaacaacagc cccatcggtc 360

tatccactgg cccctgtgtg 380

<210> 75
<211> 33
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 75
atgcaagtc agggcattaa caattttta aac 33

15 <210> 76
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 76
25 tacacatcaa gtttacactc a 21

<210> 77
<211> 27
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 77
cagcacttta gtaagctcc gtggacg 27

<210> 78
40 <211> 320
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 78
acatcctccc tgtctgcctc tctgggagac agagtcacca tcagttgcag tgcaagtcag 60

ggcattaaca attttttaaa ctggtatcag cagaaaccag atggcactgt taaactcctg 120

atctattaca catcaagttt acactcagga gtcccatcaa ggttcagtgg cagtgggtct 180

gggacagatt attctctcac catcagcaac ctggaacctg aagatattgc catatactat 240

tgtcagcact ttagtaagct tccgtggacg ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 300

cgggctgatg ctgcaccaac 320

<210> 79
 <211> 15
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10
 <400> 79
 agctatgcca tgtct 15

 <210> 80
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20
 <400> 80
 gaaattggta gtggtag ttacacctac tatccagaca ctgtgacggg c 51
 25
 <210> 81
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 35
 <400> 81
 gaaactacgg cgggctactt tgactac 27

 <210> 82
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polinucleótido sintético"
 45
 <400> 82
 tctgggggag gcttagtgag gcctggaggg tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga 60
 ttcactttca gtagctatgc catgtcttgg gttcgccagt ctccagagaa gaggctggag 120
 tgggtcgcag aaattggtag tggtagtagt tacacctact atccagacac tgtgacgggc 180
 cgattcacca tctccagaga caatgccaaag agcacctgt acctggaaat gagcagtctg 240
 aggtctgagg acacggccat ctattactgt gcaaggaaa ctacggcggg ctactttgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tctca 336
 50
 <210> 83
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

ES 2 780 192 T3

<400> 83
cgaacaagtg agaataatctt cagttattta gca 33

5 <210> 84
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

15 <400> 84
aatgcaaaaa ccttagcaga g 21

<210> 85
<211> 27
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

25 <400> 85
caacatcatt atgctttcc gtggacg 27

<210> 86
30 <211> 320
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 86
ccagcctccc tatctgcatc tgtgggagaa actgtcacca tcacatgctg aacaagtgag 60
aatattttca gttatttagc atggatcag cagaaacagg gaatatctcc tcagctcctg 120
gtctataatg caaaaacctt agcagagggt gtgccatcaa ggttcagtgg cagtggatca 180
ggcacacagt tttctctgaa gatcaacagc ctgcagcctg aagatcttgg gagttattac 240
tgtcaacatc attatgcttt tccgtggacg ttcggtggag gctccaagct ggaaatcaaa 300
cgggctgatg ctgcaccaac 320

40 <210> 87
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

50 <400> 87
ggctacttta tgaac 15

<210> 88
<211> 51
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 780 192 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 88
 cgtatttttc ctacaatgg tgatactttc tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 89
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 89
 gggactcatt actttgacta c 21

20 <210> 90
 <211> 386
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 90
 ggacctgagc tggatgaagcc tggggcttca gtgaagatat cctgcaaggc ttctgattac 60
 tcttttactg gctactttat gaactgggtg atgcagagcc atggaaagag ccttgagtgg 120
 attggacgta tttttcctta caatggtgat actttctaca accagaagt caagggcagg 180
 gccacattga ctgtagacaa atcctctagc acagcccaca tggagctccg gagcctggca 240
 tctgaggact ctgcagtcta tttttgtgca agagggactc attactttga ctactggggc 300
 caaggcacca ctctcactgt ctctcagcc aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg 360
 30 gccctggat ctgctgcca aactaa 386

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar si un sujeto padece cáncer de ovario, comprendiendo el método

determinar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula, en una muestra de suero o plasma derivada de dicho sujeto realizando un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) o un inmunoensayo enzimático (EIA); y

comparar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control,

identificar un aumento en el nivel de FR α en la muestra de suero o plasma derivada de dicho sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control; y determinar que el sujeto padece cáncer de ovario en base a dicho aumento.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de FR α se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

(a) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MORAb-003;

(b) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1 (GFTFSGYGLS) como CDRH1, la SEQ ID NO: 2 (MISSGGSYTYADSVKG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 3 (HGDDPAWFAY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 4 (SVSSSISSNNLH) como CDRL1, la SEQ ID NO:5 (GTSNLAS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 6 (QQWSSYPYMYT) como CDRL3;

(c) el anticuerpo MOV18;

(d) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo MOV18;

(e) el anticuerpo 548908;

(f) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 548908;

(g) el anticuerpo 6D398;

(h) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 6D398;

(i) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 26B3;

(j) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 55 (GYFMN) como CDRH1, la SEQ ID NO: 56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 57 (GTHYFDY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 51 (RTSENIFSYLE) como CDRL1, la SEQ ID NO: 52 (NAKTLAE) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 53 (QHHYAFPWT) como CDRL3;

(k) el anticuerpo 26B3;

(l) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 19D4;

(m) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 39 (HPYMH) como CDRH1, la SEQ ID NO: 40 (RIDPANGNTKYDPKFQG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 41 (EEVADYTM DY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 35 (RASEVDTYGNNFIH) como CDRL1, la SEQ ID NO: 36 (LASNLES) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 37 (QQNNGDPWT) como CDRL3;

(n) el anticuerpo 19D4;

(o) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 9F3;

(p) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 31 (SGYYWN) como CDRH1, la SEQ ID NO: 32 (YIKSDGSNNYNPSLKN) como CDRH2, la SEQ ID NO: 33 (EWKAMDY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 27 (RASSTVSYSYLH) como CDRL1, la SEQ ID NO: 28 (GTSNLAS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 29 (QQYSGYPLT) como CDRL3;

(q) el anticuerpo 9F3;

(r) un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 24F12;

(s) un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 47 (SYAMS) como CDRH1, la SEQ ID NO: 48 (EIGSGGSYTYYPDVTG) como CDRH2, la SEQ ID NO: 49 (ETTAGYFDY) como CDRH3, la SEQ ID NO: 43 (SASQGINNFLN) como CDRL1, la SEQ ID NO: 44 (YTSSLHS) como CDRL2 y la SEQ ID NO: 45 (QHFSKLPWT) como CDRL3;

- (t) el anticuerpo 24F12;
 - (u) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de la región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVK (SEQ ID NO: 13); LK26HuVKY (SEQ ID NO: 14); LK26HuVKPW (SEQ ID NO: 15); y LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- 5
- (v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de la región variable seleccionada del grupo que consiste en LK26HuVH (SEQ ID NO: 17); LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18); LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19); LK26HuVH 1,1 (SEQ ID NO: 20); y LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21);
 - (w) un anticuerpo que comprende la región de cadena pesada variable LK26KOLHuVH (SEQ ID NO: 21) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16);
- 10
- (x) un anticuerpo que comprende la región de cadena pesada variable LK26HuVH SLF (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16); y
 - (y) un anticuerpo que comprende la región de cadena pesada variable LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO: 16).
- 15
- 3.** El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, aficuerpo, avímero, versacuerpo, nanocuerpo, y un dominio de anticuerpo, opcionalmente, en el que el anticuerpo está marcado con un marcador seleccionado del grupo que consiste en un marcador radiactivo, un marcador de biotina, un marcador cromóforo, un marcador fluoróforo, un marcador ECL y un marcador enzimático.
- 20
- 4.** El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de FR α se determina mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA).
- 5.** El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de control comprende un nivel de control estandarizado de FR α en un sujeto sano.
- 25
- 6.** El método de la reivindicación 1, en el que (i) la muestra se trata con guanidina antes de determinar el nivel de FR α en la muestra; o (ii) la muestra se diluye antes de determinar el nivel de FR α en la muestra; y/o la muestra se centrifuga, se agita con vórtex, o ambos, antes de determinar el nivel de FR α en la muestra.
- 7.** El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de FR α en la muestra derivada de dicho sujeto se evalúa poniendo en contacto la muestra con un par de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en
- (a) anticuerpo MOV18 inmovilizado a un soporte sólido y anticuerpo MORAb-003 marcado,
- 30
- (b) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y anticuerpo 24F12 marcado,
 - (c) anticuerpo 26B3 inmovilizado a un soporte sólido y el anticuerpo 19D4 marcado, y
 - (d) anticuerpo 9F3 inmovilizado a un soporte sólido y anticuerpo 26B3 marcado.
- 8.** Un método para evaluar la progresión del cáncer de ovario en un sujeto que padece cáncer de ovario, método que comprende
- 35
- determinar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula, en una muestra de suero o de plasma derivada de dicho sujeto llevando a cabo un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) o un inmunoensayo de enzima (EIA);
- comparar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula con el nivel de FR α en una muestra de control; y
- 40
- (i) identificar un aumento en la muestra de suero o plasma derivada de dicho sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control, y determinar que el cáncer de ovario progresará rápidamente en base a dicho aumento; o
 - (ii) identificar una disminución en el nivel de FR α en la muestra de suero o plasma derivada de dicho sujeto en comparación con el nivel de FR α en la muestra de control, y determinar que el cáncer de ovario progresará lentamente en base a dicha disminución.
- 45
- 9.** Un método para clasificar a un sujeto que padece cáncer de ovario en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer que comprende:

determinar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula, en una muestra de suero o de plasma derivada de dicho sujeto llevando a cabo un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) o un inmunoensayo de enzima (EIA); y

5 clasificar al sujeto en uno de al menos cuatro grupos de terapia de cáncer en base al nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula.

10. El método de la reivindicación 9, donde el sujeto se clasifica en cáncer de ovario de Estadio I, Estadio II, Estadio III o Estadio IV.

11. El uso de un kit según cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1-10 para determinar si un sujeto padece cáncer de ovario o para evaluar la progresión del cáncer de ovario en un sujeto, donde el kit comprende

10 los medios para llevar a cabo el inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) o un inmunoensayo de enzima (EIA) para determinar el nivel de receptor de folato alfa (FR α) que no está unido a una célula en una muestra derivada de dicho sujeto; y

las instrucciones para uso del kit para evaluar si el sujeto padece cáncer de ovario o para evaluar la progresión del cáncer de ovario.

Figura 1

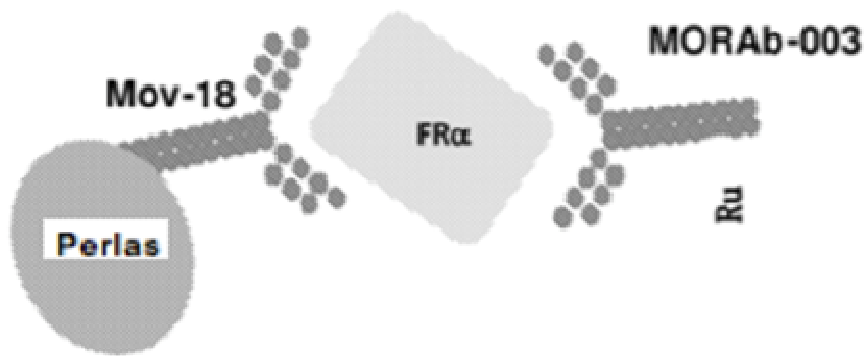


Figura 2

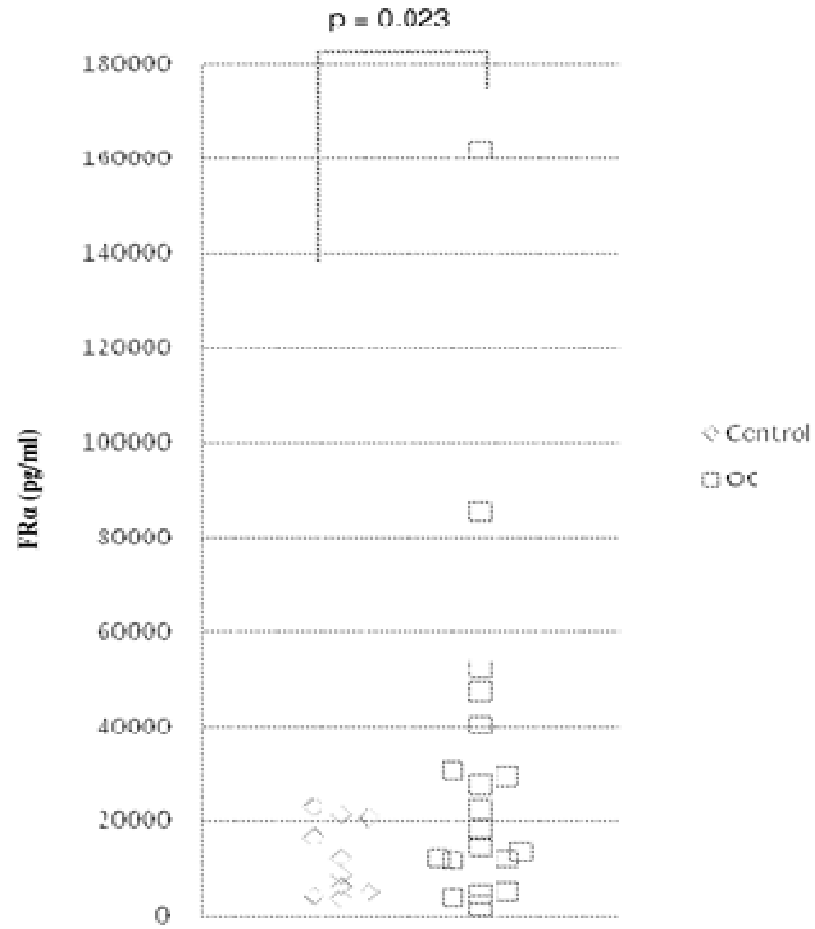


Figura 3

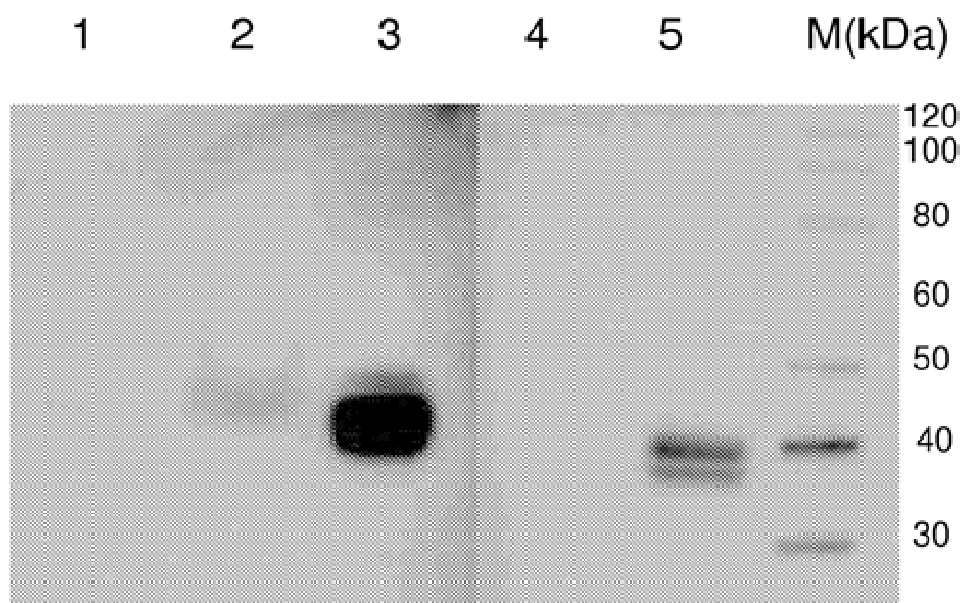


Figura 4

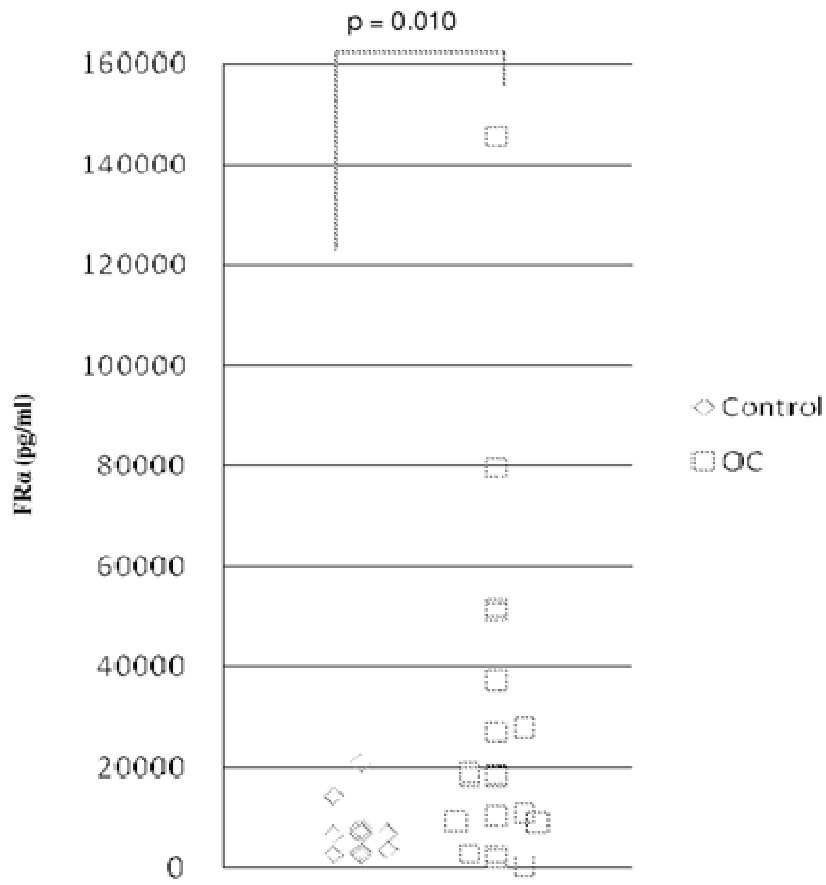


Figura 5

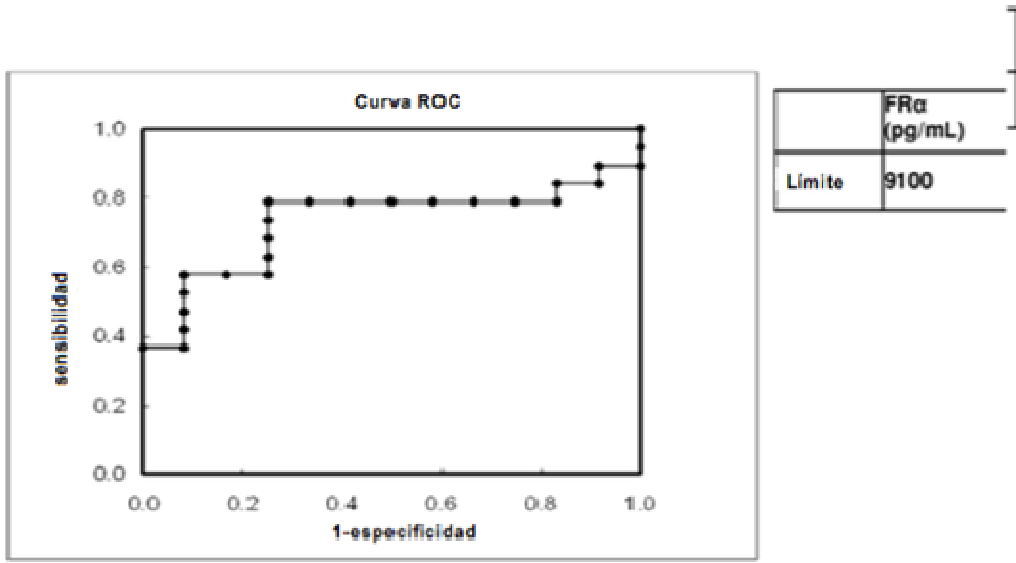


Figura 6

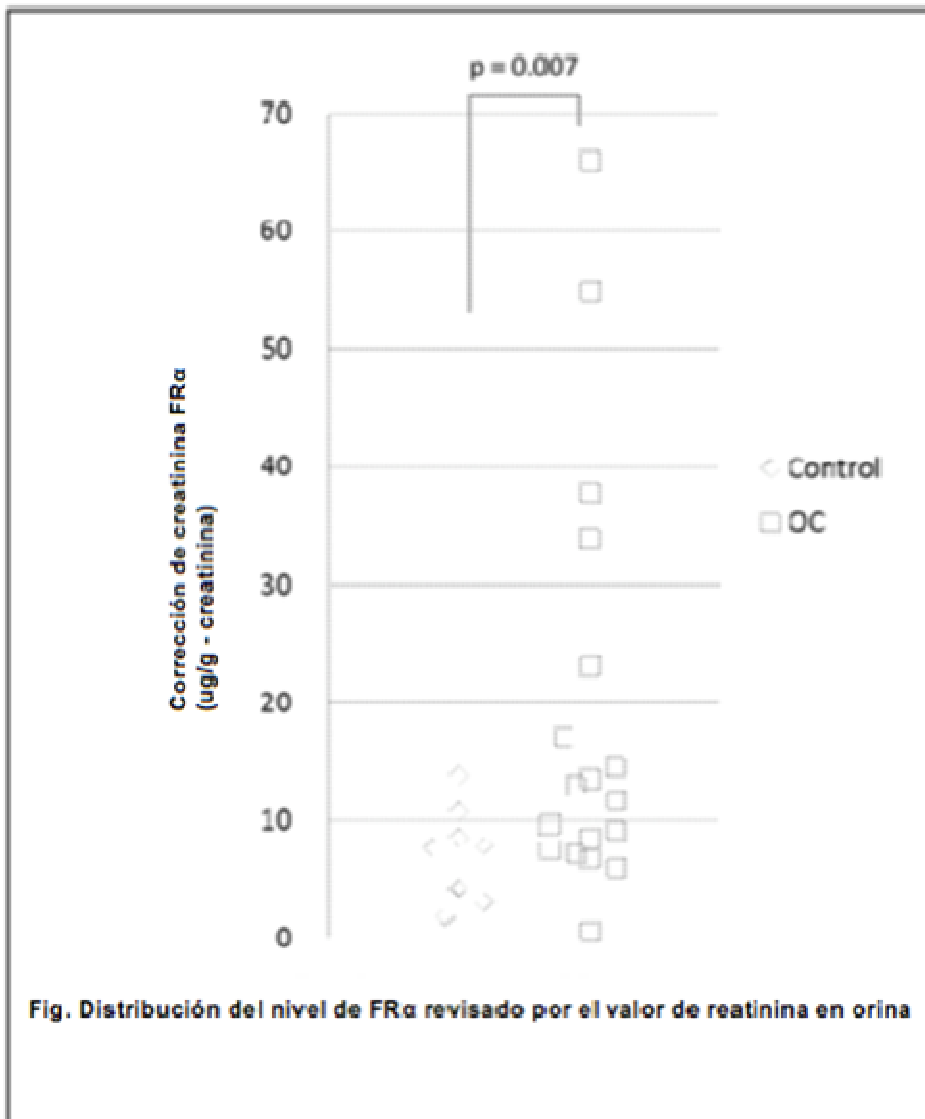


Fig. Distribución del nivel de FRα revisado por el valor de reatinina en orina

Figura 7

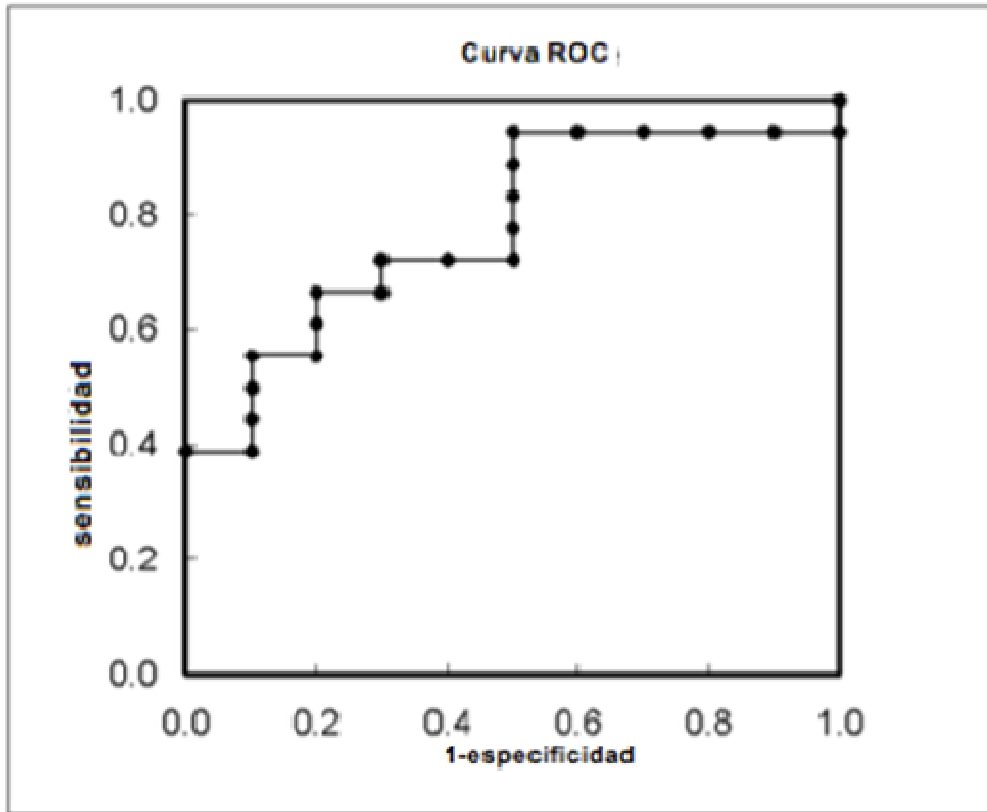


Figura 8

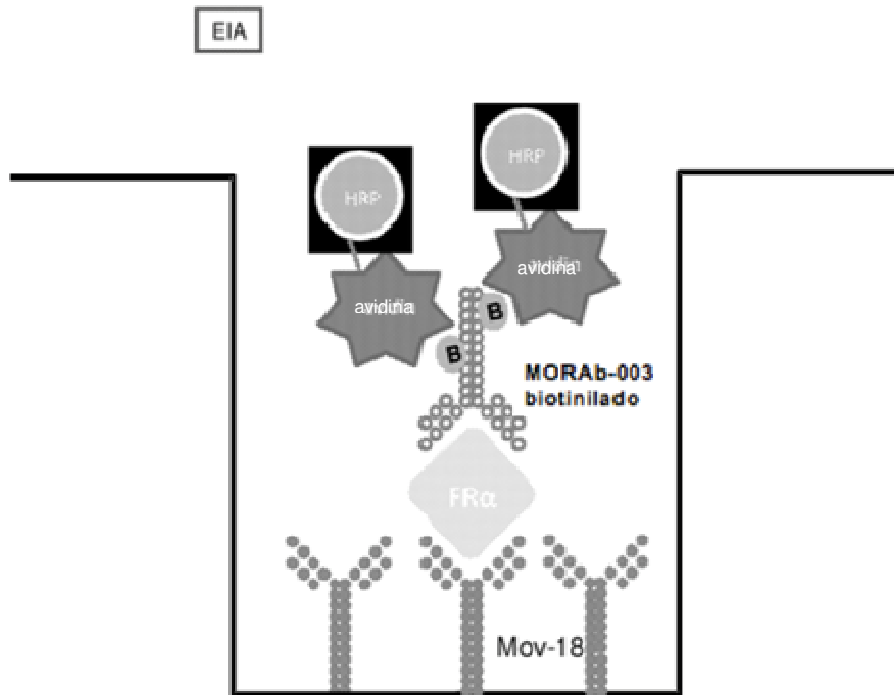


Figura 9

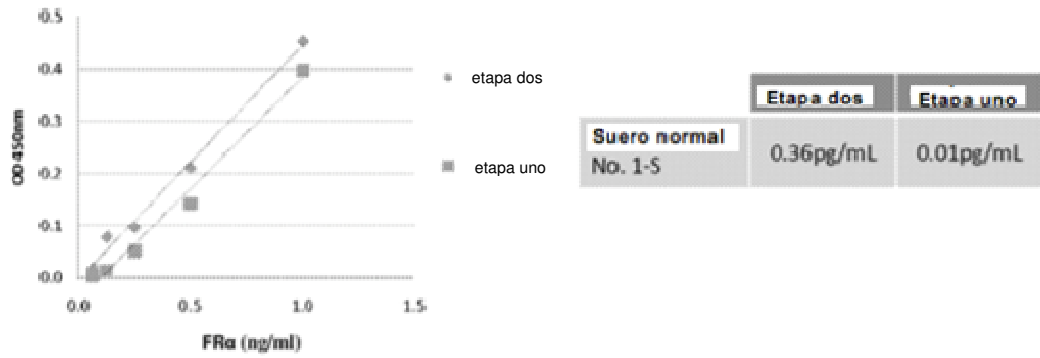


Figura 10

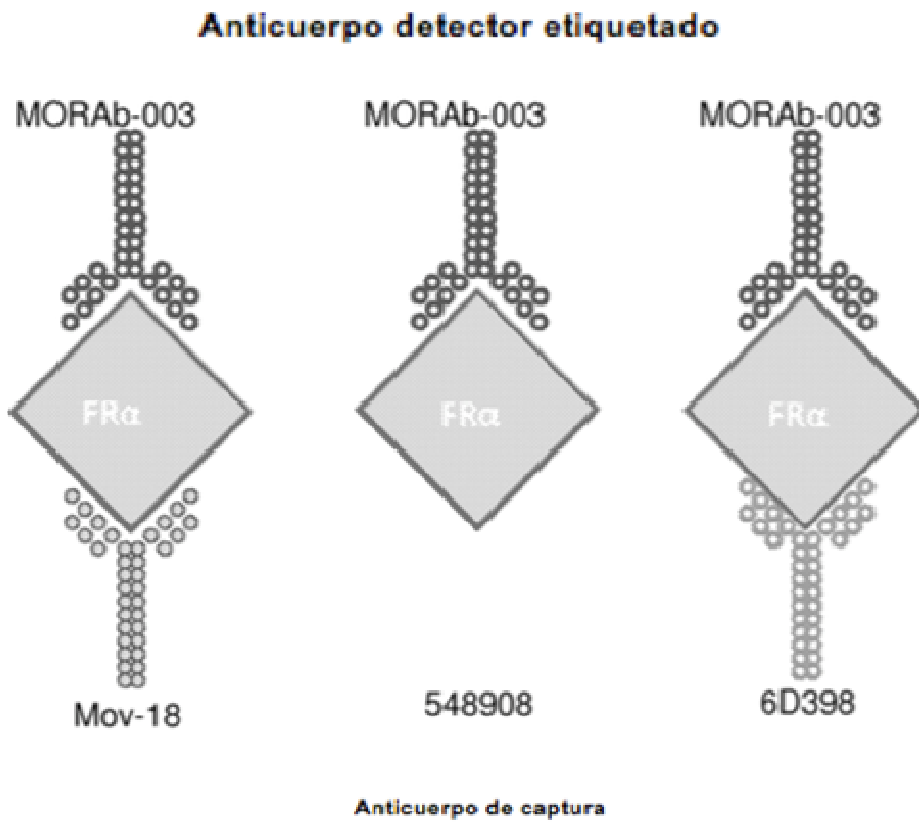


Figura 11

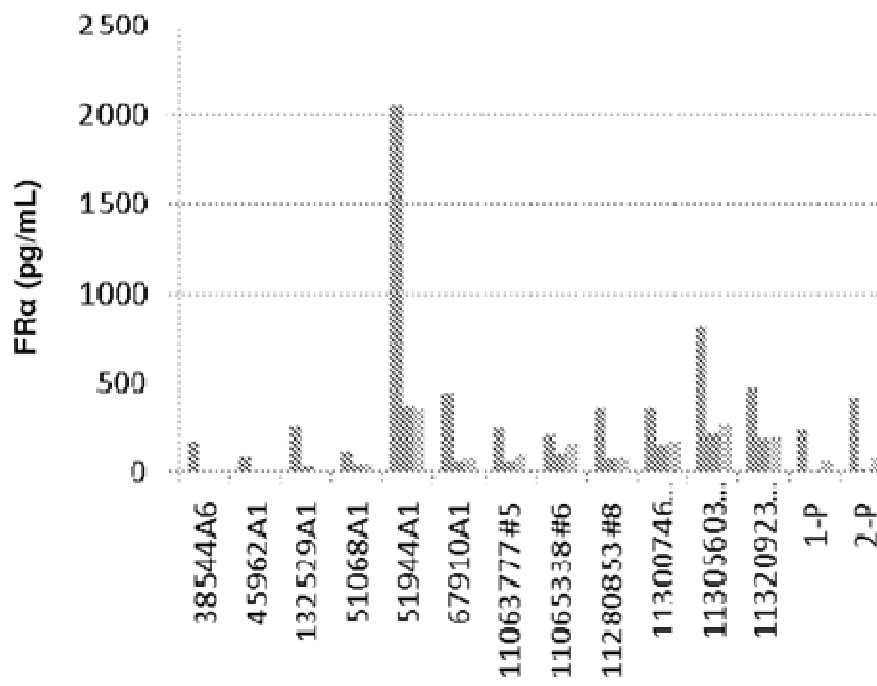


Figura 12

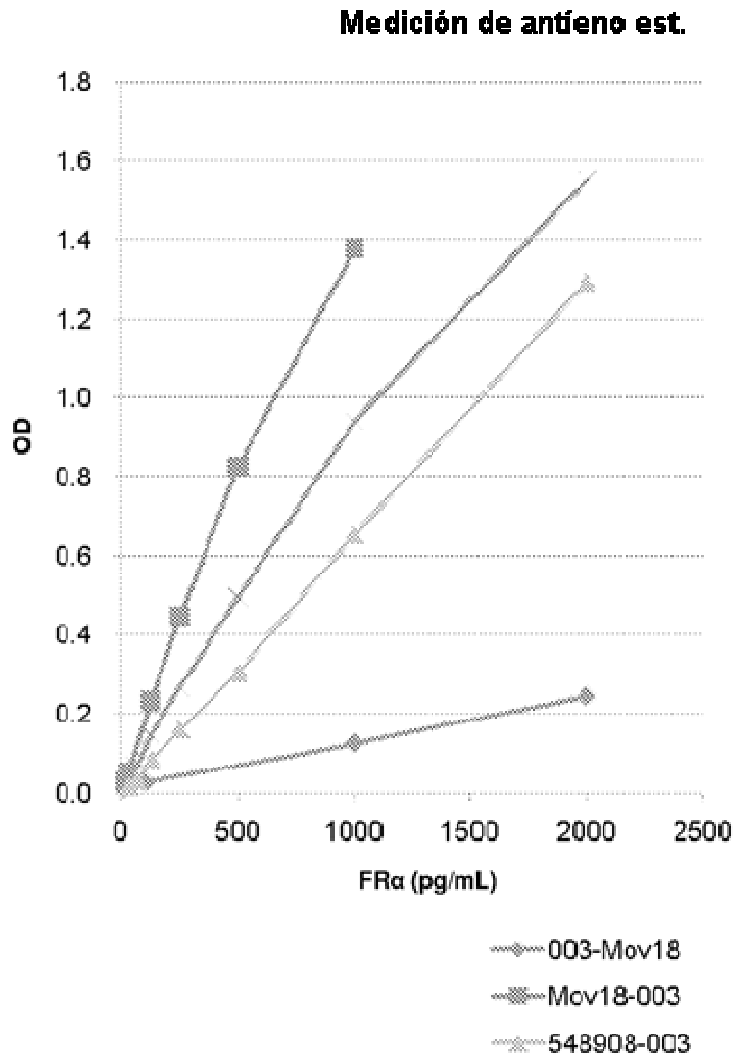


Figura 13

Distribución de plasma FR α



Figura 14

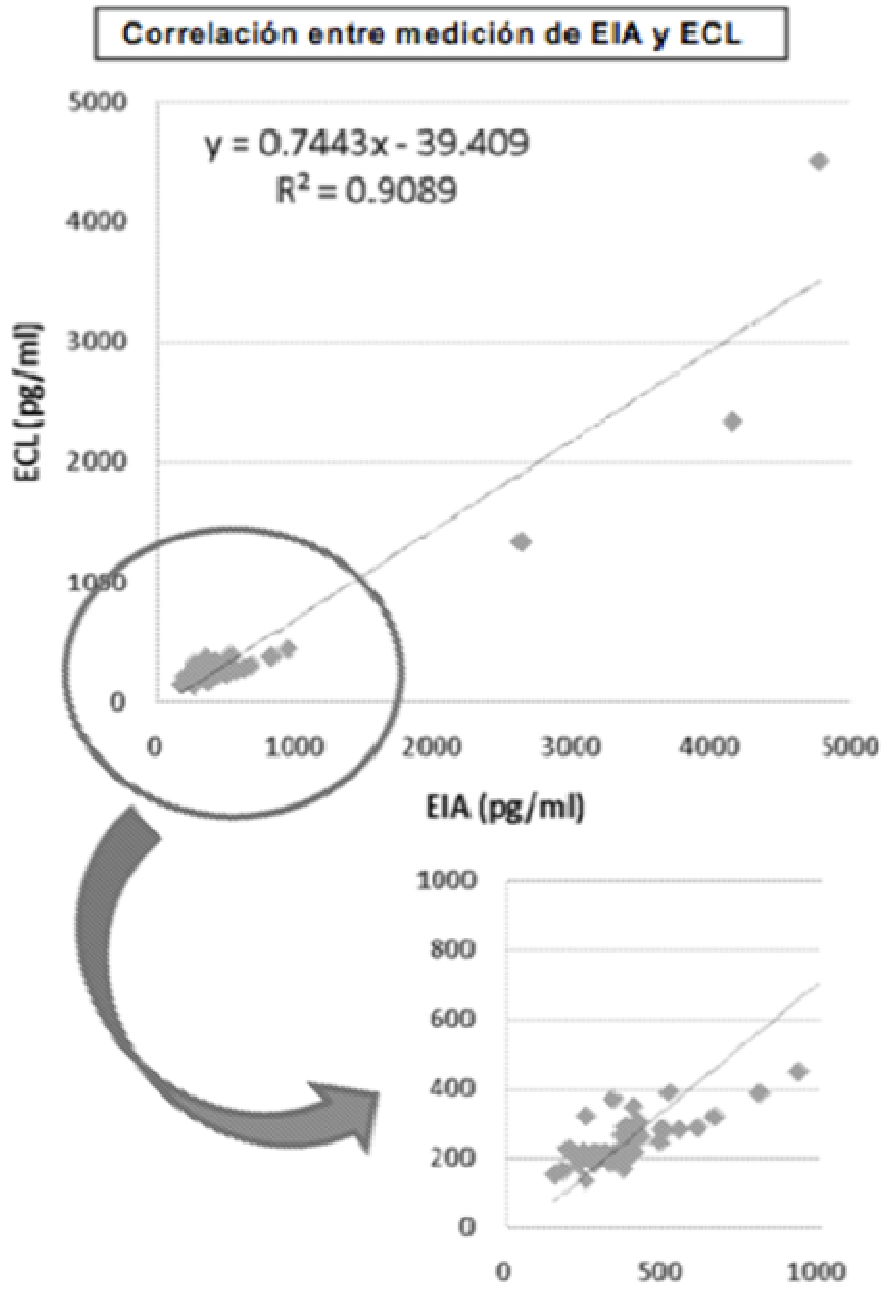


Figura 15

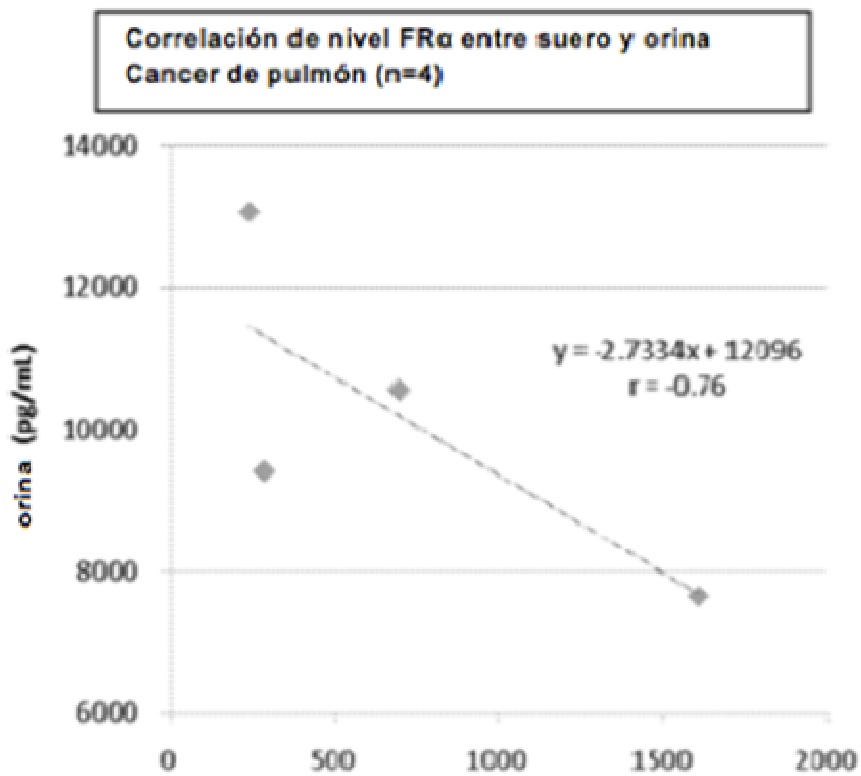
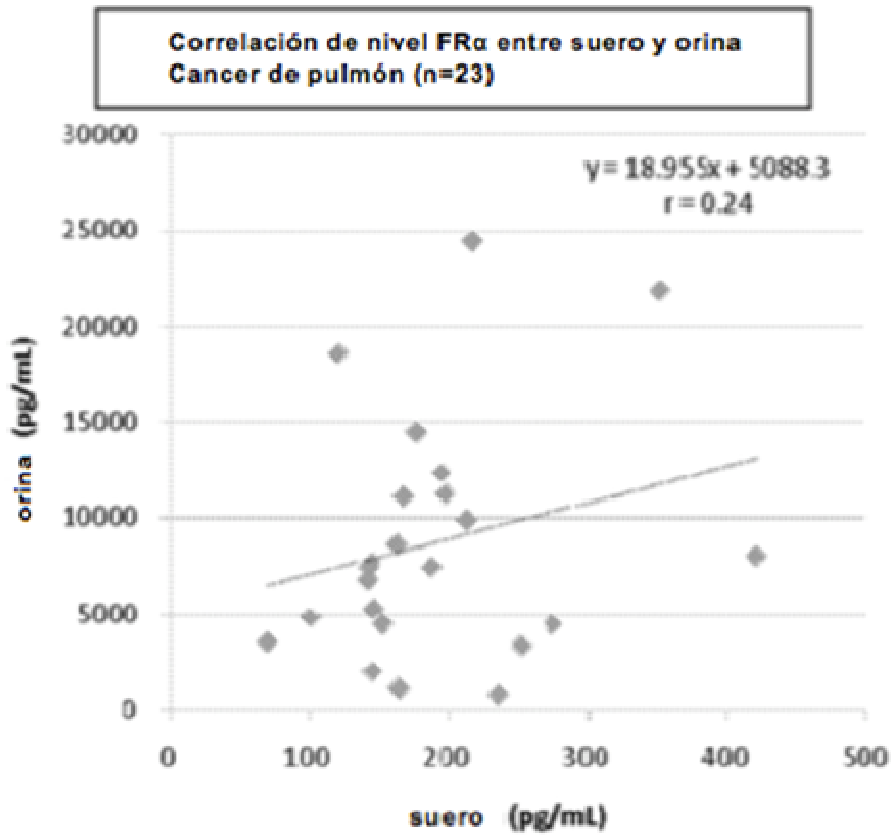


Figura 16

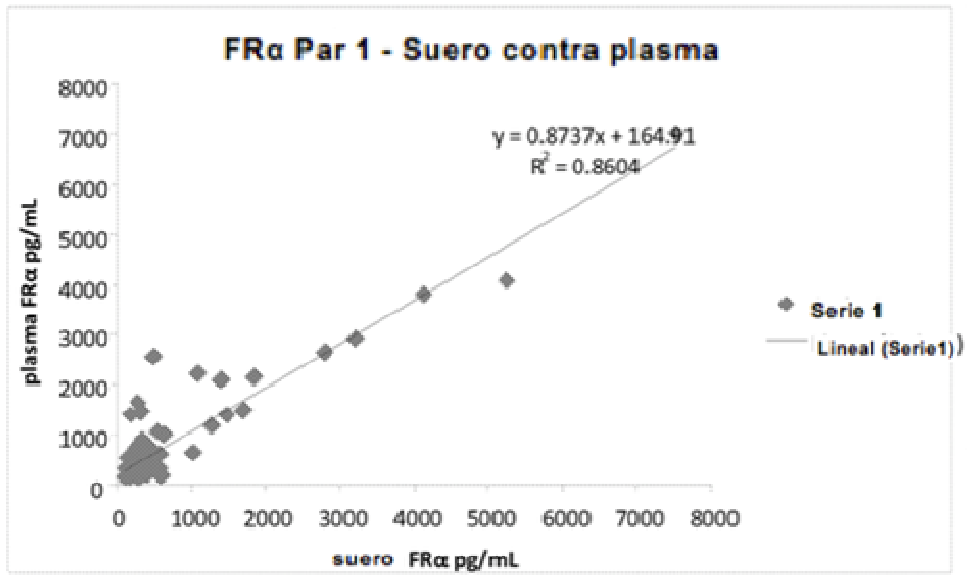


Figura 17

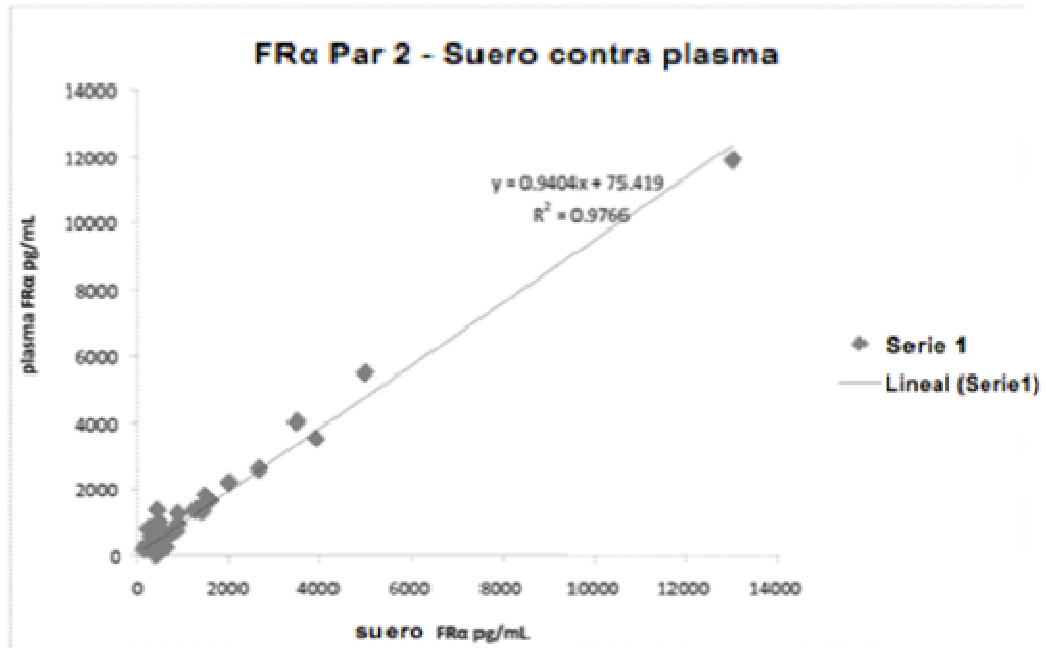


Figura 18

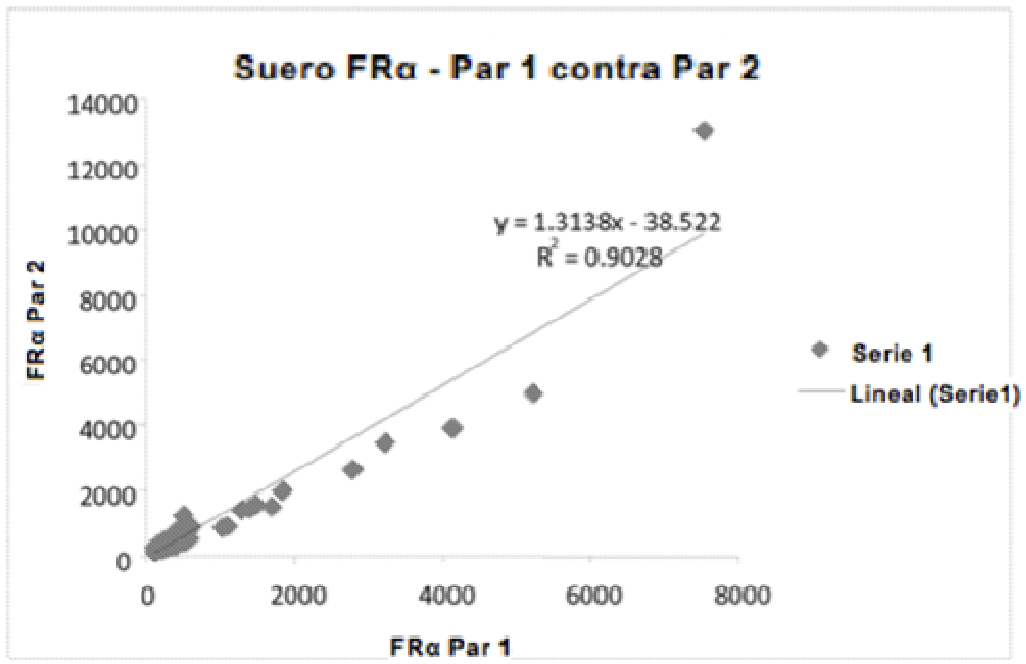


Figura 19

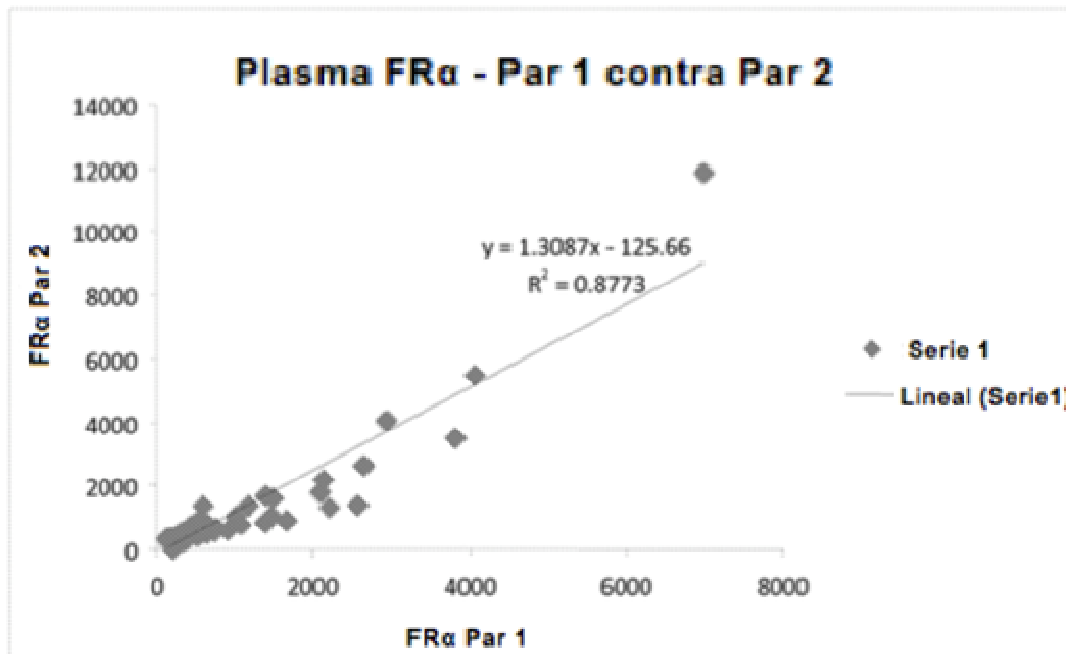


Figura 20

