

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 151**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2013 PCT/US2013/057682**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14036495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013 E 13833526 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2890717**

54 Título: **Kits y ensayos de diagnóstico para la detección del receptor 1 de folato**

30 Prioridad:

31.08.2012 US 201261695791 P

24.01.2013 US 201361756254 P

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

20.10.2020

73 Titular/es:

IMMUNOGEN, INC. (100.0%)

830 Winter Street

Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

TESTA, NATHAN E.;

CARRIGAN, CHRISTINA N.;

AB, OLGA;

TAVARES, DANIEL y

WOLF, BENI B.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 788 151 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

Kits y ensayos de diagnóstico para la detección del receptor 1 de folato

Campo de la invención

5 El campo de esta invención se refiere a anticuerpos específicos que se unen al receptor 1 de folato (FOLR1) humano o a fragmentos de unión a antígeno de los mismos, a métodos de detección del FOLR1, a métodos para preparar los anticuerpos, a un kit de inmunoensayo para detectar FOLR1, a un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1 para uso en un método para tratar cáncer que comprende la detección de FOLR1.

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

30 WO 2011/106528 describe anticuerpos e inmunoconjugados frente al receptor 1 de folato y su uso como agentes de diagnóstico y en el tratamiento de tumores. Algunos ensayos previos usados para detectar FOLR1 diseminado no son suficientemente específicos para FOLR1. Por ejemplo, algunos ensayos no distinguen entre FOLR1 y otros miembros de la familia de los receptores de folato (FOLR2, 3 y 4) o reportan valores para la FBP (proteína de unión a folato) total. Adicionalmente, algunos ensayos requieren que las muestras humanas (por ejemplo, plasma) sean tratadas previamente con una etapa de lavado con ácido suave para disociar el ácido fólico del receptor. Algunos resultados de los ensayos pueden también tener inconsistencias debido a los efectos competitivos entre la terapia de anticuerpo y el anticuerpo de diagnóstico. Adicionalmente, muchos kits disponibles comercialmente no son tradicionalmente fiables tanto en sus reactivos como en su estabilidad entre lotes. Las evaluaciones de estos kits han dado resultados muy mezclados y se prevén únicamente para uso en investigación. Muchos requieren que la muestra humana esté prediluida antes del análisis para reducir la probabilidad de falsos positivos debido al "efecto de la matriz". Por lo tanto, hay una clara necesidad de ensayos de diagnóstico precisos y altamente sensibles como una compañía para terapias basadas en FOLR-1.

45 Compendio de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 de: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15, preferiblemente dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser murino, no humano, humanizado, quimérico o estar modificado en superficie. La presente invención proporciona un polipéptido que se une específicamente a FOLR1, en donde dicho polipéptido comprende las secuencias de: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15. La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo, o el polipéptido referido anteriormente. La presente invención proporciona un método para detectar la proteína FOLR1 en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo, o el polipéptido referido anteriormente. La presente invención proporciona una célula aislada que produce el anticuerpo,

fragmento de unión a antígeno del mismo, o el polipéptido referido anteriormente, que comprende (a) cultivar la célula referida anteriormente; y (b) aislar el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo, o el polipéptido de dicha célula cultivada. La presente invención proporciona un kit de inmunoensayo para detectar la proteína FOLR1 en una muestra, comprendiendo el kit: (a) un primer reactivo, en donde el primer reactivo es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo referido anteriormente o el polipéptido referido anteriormente, y (b) un segundo reactivo, en donde el segundo reactivo es un reactivo de detección. La presente invención proporciona el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo referido anteriormente o el polipéptido referido anteriormente para uso en un método para diagnosticar cáncer.

La presente invención proporciona métodos para la detección de FOLR1 en una muestra y pueden usarse, por ejemplo, para estratificar pacientes. Se describe un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad mediada por el receptor 1 de folato que comprende: (a) medir el nivel de expresión del receptor 1 de folato (FOLR1) diseminado o FOLR1 en una célula tumoral circulante (CTC) en una muestra tomada de un paciente, relativo a un nivel de FOLR1 diseminado o en CTC en una muestra de referencia usando un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que no inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo huMov19 a FOLR1; y (b) administrar al paciente una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que module la actividad de FOLR1 si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC del paciente es elevado; en donde la dosis fija del anticuerpo o fragmento del mismo trata de manera eficaz la enfermedad o el trastorno.

Se describe un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 que comprende: (a) administrar a un paciente que padece una enfermedad o un trastorno mediado por FOLR1 una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que module la actividad de FOLR1; (b) medir el nivel de expresión de FOLR1 diseminado o en CTC del paciente relativo al nivel de FOLR1 en una muestra de referencia usando un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que no inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo huMov19 a FOLR1; y (c) aumentar la cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC del paciente es elevado; en donde un aumento (por ejemplo, debido a que el aumento de la muerte celular causa un aumento en la liberación de FOLR1 diseminado) o la disminución en los niveles de FOLR1 en el paciente indica la eficacia del tratamiento. La cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores puede aumentar si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC en el paciente disminuye.

Se describe un método para disminuir la expresión de FOLR1 en un paciente que comprende: (a) medir el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC en una muestra tomada de un paciente que padece una enfermedad o un trastorno mediado por FOLR1, en comparación con el nivel de FOLR1 en una muestra de referencia usando un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que no inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo huMov19 a FOLR1; y (b) administrar al paciente una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que module la actividad de FOLR1 si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC en el paciente es elevado; en donde la administración del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo aumenta (por ejemplo, debido a que el aumento de la muerte celular causa un aumento en la liberación de FOLR1 diseminado) o disminuye el FOLR1 en el paciente.

Se describe un método para disminuir la expresión de FOLR1 en un paciente que comprende: (a) administrar a un paciente que padece una enfermedad o un trastorno mediado por FOLR1 una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que module la actividad de FOLR1; (b) medir el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC del paciente con relación al nivel de FOLR1 en una muestra de referencia; y (c) aumentar la cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC en el paciente es elevado; en donde la administración del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo aumenta (por ejemplo, debido a que el aumento de la muerte celular causa un aumento en la liberación de FOLR1 diseminado) o disminuye los niveles de FOLR1 en el paciente.

La enfermedad puede ser cáncer. El cáncer puede ser un cáncer con FOLR1 elevado que se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de ovario, de pulmón no microcítico, uterino, de endometrio, de páncreas, de riñón, de pulmón, y de mama. El cáncer puede ser cáncer de ovario que es resistente al platino o refractario al platino.

Se describe un método para monitorear la eficacia terapéutica de una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 en un paciente que comprende: (a) medir un primer nivel de FOLR1 diseminado o en CTC en una muestra tomada de un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 usando un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que no inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo huMov19 a FOLR1; (b) administrar al paciente una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1; (c) medir un segundo nivel de FOLR1 diseminado o en CTC en una muestra tomada del paciente después de la administración del anticuerpo, usando un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que no inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo huMov19 a FOLR1; y (d) comparar el segundo nivel de FOLR1 con el primer nivel de FOLR1; en donde un aumento (por ejemplo, debido a que el aumento de la muerte celular causa un aumento en la liberación de FOLR1 diseminado) o la disminución entre el primer y el segundo valor de FOLR1 indica la eficacia del tratamiento terapéutico.

El nivel de expresión de FOLR1 puede medirse en un fluido corporal. El fluido corporal puede ser fluido de ascitis. El fluido corporal puede ser suero, sangre o plasma. El nivel de expresión de FOLR1 puede medirse en una muestra de sangre periférica.

5 El paciente puede tener cáncer. El cáncer puede ser un cáncer con FOLR1 elevado que se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico, uterino, de endometrio, de páncreas, de riñón, de pulmón y de mama. El cáncer puede ser cáncer de ovario que es resistente al platino o refractario al platino.

10 La expresión de FOLR1 puede medirse usando al menos un anticuerpo adicional anti-FOLR1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. La expresión de FOLR1 puede medirse usando dos anticuerpos anti-FOLR1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo murino, quimérico, humanizado o humano. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse a un receptor 1 de folato humano con una Kd de alrededor de 1,0 a alrededor de 10 nM. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse a un receptor 1 de folato humano con una Kd de alrededor de 0,5 nM a alrededor de 5 nM. En otra realización, la afinidad de unión se mide por citometría, Biacore, ELISA o radioinmunoensayo. La citometría puede ser citometría de flujo.

15 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede no unirse al receptor 2 de folato o al receptor 3 de folato.

20 El al menos un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede estar unido a un soporte sólido. El al menos un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede estar unido a una placa de microtitulación. El al menos un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender un agente de detección. El agente de detección puede ser un agente de detección cromogénico, un agente de detección fluorogénico, un agente de detección enzimático o un agente de detección electroquimioluminiscente. El agente de detección puede ser peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés).

Los niveles de FOLR1 pueden determinarse usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o citometría (por ejemplo, citometría de flujo). El ELISA puede ser un ELISA en sándwich.

25 El al menos un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse específicamente al mismo epítipo de FOLR1 que un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 25 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 29; (b) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 26 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 30; (c) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 27 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 31; y (d) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 28 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 32.

30 El al menos un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse específicamente a FOLR1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo inhibe de manera competitiva la unión a FOLR1 de un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 25 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 29; (b) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 26 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 30; (c) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 27 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 31; y (d) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 28 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 32.

40 El al menos un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a FOLR1, en donde el anticuerpo puede comprender secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) SEQ ID NO: 4, 5 y 6 y SEQ ID NO: 16, 17 y 18; (c) SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y SEQ ID NO: 19, 20 y 21; (d) SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y SEQ ID NO: 22, 23 y 24; y (e) variantes de (a) a (d) que comprenden 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

El al menos un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede estar etiquetado de manera detectable.

El anticuerpo administrado puede comprender el anticuerpo huMov19 de FOLR1.

45 El huMov19 puede administrarse como un conjugado de anticuerpo y maitansinoide. El conjugado de anticuerpo y maitansinoide puede comprender el maitansinoide DM4 y el enlazador sulfo-SPDB escindible (IMGN853).

50 Se describe un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR-1 que comprende: (a) administrar a un paciente que padece una enfermedad o un trastorno mediado por FOLR1 una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que module la actividad de FOLR1; (b) entregar una muestra tomada del paciente para medir un nivel de expresión de FOLR1; (c) determinar a partir de los resultados de la medición si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC del paciente es elevado en relación con el nivel de FOLR1 en una muestra de referencia; y, (d) aumentar la cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC del paciente es elevado.

55 Se describe un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR-1 que comprende: (a) administrar a un paciente que padece una enfermedad o un trastorno mediado por FOLR1 una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que module la actividad de FOLR1; (b) entregar una

muestra tomada del paciente para medir un nivel de FOLR1 diseminado o en CTC y compararlo con un nivel de FOLR1 en una muestra de referencia; y (c) aumentar la cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC en el paciente es elevado; en donde un aumento (por ejemplo, debido a que el aumento de la muerte celular causa un aumento en la liberación de FOLR1 diseminado) o la disminución de los niveles de FOLR1 en el paciente indica la eficacia del tratamiento.

El anticuerpo administrado puede comprender el anticuerpo huMov19 de FOLR1. El huMov19 puede administrarse como un conjugado de anticuerpo y maitansinoide. El conjugado de anticuerpo y maitansinoide puede comprender el maitansinoide DM4 y el enlazador sulfo SPDB escindible (IMGN853).

Se describe un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR-1 que comprende: (a) obtener una muestra de un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, donde el paciente ha recibido una dosis fija de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1; (b) medir un nivel de FOLR1 diseminado o en CTC a partir de la muestra usando un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que no inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo huMov19 a FOLR1; (c) determinar si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC del paciente es elevado en relación con el nivel de FOLR1 en una muestra de referencia; (d) instruir a un profesional sanitario para que aumente la cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de FOLR1 diseminado o en CTC del paciente es elevado; en donde un aumento (por ejemplo, debido a que el aumento de la muerte celular causa un aumento en la liberación de FOLR1 diseminado) o disminución de FOLR1 en el paciente indica la eficacia del tratamiento.

Se describe un kit de inmunoensayo para detectar FOLR1 diseminado o en CTC en una muestra, el kit comprende: (a) un anticuerpo de captura contra el FOLR1 humano, en donde el anticuerpo de captura o el fragmento de unión al antígeno del mismo no inhibe de manera competitiva la unión de huMov19 a FOLR1, y (b) un reactivo de detección. El kit puede comprender además un soporte sólido para el reactivo de captura. El reactivo de captura puede inmovilizarse sobre el soporte sólido. El reactivo de captura puede utilizarse para recubrir una placa de microtitulación. El reactivo de detección puede ser un segundo anticuerpo de FOLR1. El primer y/o segundo anticuerpo de FOLR1 puede comprender las secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) SEQ ID NO: 4, 5 y 6 y SEQ ID NO: 16, 17 y 18; (c) SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y SEQ ID NO: 19, 20 y 21; (d) SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y SEQ ID NO: 22, 23 y 24; y (e) variantes de (a) a (d) que comprenden 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

El reactivo de detección puede detectarse usando un anticuerpo específico de la especie. El kit puede comprender además un medio de detección para los anticuerpos detectables. El medio de detección puede ser colorimétrico. El kit puede comprender además un polipéptido FOLR1 como un estándar de antígeno. El polipéptido FOLR1 puede ser FOLR1-Fc.

Se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al mismo epítipo de FOLR1 que un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 25 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 29; (b) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 26 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 30; (c) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 27 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 31; y (d) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 28 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 32.

Se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo inhibe de manera competitiva la unión a FOLR1 de un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 25 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 29; (b) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 26 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 30; (c) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 27 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 31; y (d) un anticuerpo que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 28 y el polipéptido de la SEQ ID NO: 32.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de polipéptidos: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15. Se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de polipéptidos (a) SEQ ID NO: 4, 5 y 6 y SEQ ID NO: 16, 17 y 18; (b) SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y SEQ ID NO: 19, 20 y 21; (c) SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y SEQ ID NO: 22, 23 y 24; y (d) variantes de (a) a (c) que comprenden 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Se describe un anticuerpo que comprende secuencias de polipéptidos que son al menos un 90 % idénticas a las secuencias de polipéptidos que se seleccionan del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29; (b) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 30; (c) SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 31; y (d) SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 32. Las secuencias de polipéptidos pueden ser al menos un 95 % idénticas a las secuencias de polipéptidos que se seleccionan del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29; (b) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 30; (c) SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 31; y (d) SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 32. Las secuencias de polipéptidos pueden ser al menos un 99 % idénticas a las secuencias de polipéptidos que se seleccionan del grupo que consiste en: (a) SEQ

ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29; (b) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 30; (c) SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 31; y (d) SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 32.

5 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es murino, no humano, humanizado, quimérico, o modificado en superficie. En otra realización, el anticuerpo se une al FOLR1 humano, pero no al FOLR2 o FOLR3. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión al antígeno. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv de cadena simple o scFv, Fv unido por disulfuro, dominio V-NAR, IgNar, intracuerpo, IgGΔCH2, minicuerpo, F(ab')₃, tetracuerpo, triacuerpo, diacuerpo, anticuerpo de dominio simple, DVD-Ig, Fcab, mAb2, (scFv)₂ o scFv-Fc.

10 La invención también proporciona un polipéptido que se une específicamente a FOLR1, en donde el polipéptido comprende las secuencias: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15. Se describe un polipéptido que se une específicamente a FOLR1, en donde el polipéptido comprende las secuencias (a) SEQ ID NO: 4, 5 y 6 y SEQ ID NO: 16, 17 y 18; (b) SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y SEQ ID NO: 19, 20 y 21; (c) SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y SEQ ID NO: 22, 23 y 24; y (d) variantes de (a) a (c) que comprenden 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos. Se describe un polipéptido que comprende secuencias que son al menos un 90 % idénticas a las secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29; (b) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 30; (c) SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 31; y (d) SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 32. Las secuencias pueden ser al menos un 95 % idénticas a las secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29; (b) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 30; (c) SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 31; y (d) SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 32. Las secuencias pueden ser al menos un 99 % idénticas a las secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29; (b) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 30; (c) SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 31; y (d) SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 32.

25 El anticuerpo o polipéptido puede unirse a un receptor 1 de folato humano con una K_d de alrededor de 1,0 a alrededor de 10 nM. El anticuerpo o polipéptido puede unirse a un receptor 1 de folato humano con una K_d de alrededor de 1,0 nM o mejor. La afinidad de unión puede medirse por citometría, Biacore, ELISA o radioinmunoensayo. La citometría puede ser citometría de flujo.

30 La invención también proporciona un método para detectar la expresión de FOLR1 en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo o polipéptido de la invención. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo está etiquetado de manera detectable. En otra realización, la etiqueta se selecciona del grupo que consiste en etiqueta inmunofluorescente, etiqueta quimioluminiscente, etiqueta fosforescente, etiqueta enzimática, radioetiqueta, avidina/biotina, partículas de oro coloidal, partículas de color y partículas magnéticas. En otra realización, la expresión de FOLR1 se determina por radioinmunoensayo, ensayo de transferencia Western, ensayo de inmunofluorescencia, inmunoensayo de enzimas, ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de quimioluminiscencia o ensayo de inmunohistoquímica. En otra realización, la expresión de FOLR1 se determina usando un ensayo de células tumorales circulantes (CTC), donde las CTC se enriquecen a partir de una muestra de sangre, plasma o suero y se tiñen para detectar la expresión de FOLR1 usando un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos útiles para el ensayo de CTC incluyen FR1-9 y FR1-13. Los ensayos de CTC que usan anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles para identificar a un sujeto como probable de responder a una terapia basada en FOLR1.

40 La invención también proporciona una célula aislada que produce un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo o polipéptido de la invención.

La invención también proporciona un método para preparar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o polipéptido de la invención que comprende (a) cultivar una célula que exprese el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o polipéptido de la invención, y (b) aislar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o polipéptido de la invención de dicha célula cultivada.

45 Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, en donde la expresión aumentada de la proteína FOLR1 ha sido medida en una muestra de cáncer del sujeto usando un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o polipéptido proporcionado en la presente memoria antes de la administración del agente activo.

50 Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, que comprende: (a) medir el nivel de la proteína FOLR1 en una muestra del paciente usando un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o un polipéptido proporcionado en la presente memoria; y (b) administrar al paciente una dosis fija del agente activo si el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente es elevado en relación con un nivel de la proteína FOLR1 de referencia.

55 Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, que comprende: (a) administrar a un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 una dosis fija del agente activo; (b) medir el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente usando el anticuerpo, fragmento

de unión al antígeno del mismo, o polipéptido proporcionado en la presente memoria; y (c) aumentar la cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente es elevado en relación con un nivel de la proteína FOLR1 de referencia.

5 Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, en donde (a) el nivel de la proteína FOLR1 medido en una muestra tomada de un paciente se compara con un nivel de la proteína FOLR1 de referencia usando un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo, o un polipéptido proporcionado en la presente memoria; y (b) una dosis fija del agente activo se administra si el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente es elevado en relación con el nivel de la proteína FOLR1 de referencia, en donde la
10 administración del agente activo disminuye el nivel de la proteína FOLR1.

Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, en donde las células que expresan FOLR1 en un paciente disminuyen, en donde (a) se administra al paciente una dosis fija del agente activo; (b) el nivel de la proteína FOLR1 medido en una muestra obtenida del paciente se
15 compara con un nivel de la proteína FOLR1 de referencia usando un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo, o un polipéptido proporcionado en la presente memoria; y (c) la cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores aumenta si el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente es elevado en relación con el nivel de la proteína FOLR1 de referencia; en donde la administración del agente activo disminuye el nivel de la proteína FOLR1.

Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para monitorear la eficacia terapéutica de una dosis fija del agente activo en un paciente, que comprende: (a) medir un primer nivel de la proteína FOLR1 en una muestra de un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 usando un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo, o un polipéptido proporcionado en la presente memoria; (b) administrar al paciente una dosis fija del agente activo; (c) medir un segundo nivel de la proteína FOLR1 en una muestra tomada del paciente después de la
20 administración del agente activo, usando un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo o un polipéptido proporcionado en la presente memoria; y (d) comparar el segundo nivel de la proteína FOLR1 con el primer nivel de la proteína FOLR1; en donde una disminución entre el primer y segundo nivel de la proteína FOLR1 indica eficacia terapéutica.

Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 en un paciente, que comprende: (a) administrar una dosis fija del agente activo a un paciente que padece una enfermedad o un trastorno mediado por FOLR1; (b) entregar una muestra tomada del paciente para medir un nivel de la proteína FOLR1 usando un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o un polipéptido proporcionado en la presente memoria; (c) determinar a partir de los resultados de la medición si el nivel de la proteína FOLR1 en el
25 paciente es elevado en relación con un nivel de la proteína FOLR1 de referencia; y, (d) aumentar la cantidad y/o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente es elevado en relación con el nivel de la proteína FOLR1 de referencia.

Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, que comprende: (a) administrar una dosis fija del agente activo a un paciente que padece una enfermedad o un trastorno mediado por FOLR1; (b) entregar una muestra tomada del paciente para medir un nivel de la proteína FOLR1 usando un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o un polipéptido proporcionado en la presente memoria y comparar el nivel de la proteína FOLR1 medido con un nivel de la proteína FOLR1 de referencia; y (c) aumentar la cantidad o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente es
40 elevado en relación con el nivel de la proteína FOLR1 de referencia; en donde una disminución en los niveles de FOLR1 en el paciente indica la eficacia del tratamiento.

Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, que comprende: (a) obtener una muestra de un paciente que padece una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, donde el paciente ha recibido una dosis fija del agente activo; (b) medir un nivel de la proteína FOLR1 a partir de la muestra usando un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o un polipéptido proporcionado en la presente memoria; (c) determinar si el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente es elevado en relación con un nivel de la proteína FOLR1 de referencia; (d) aumentar o instruir a un profesional sanitario para que aumente la cantidad y/o frecuencia de las dosis fijas posteriores si el nivel de la proteína FOLR1 en el paciente es elevado en
45 relación con el nivel de la proteína FOLR1 de referencia; en donde una disminución de FOLR1 en el paciente indica la eficacia del tratamiento.

Se describe un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1, en donde la expresión aumentada de FOLR1 ha sido medida en una muestra del sujeto usando un anticuerpo,

fragmento de unión al antígeno del mismo o polipéptido proporcionado en la presente memoria antes de la administración del agente activo.

La proteína FOLR1 medida puede ser FOLR1 diseminado. La proteína FOLR1 medida puede estar en una célula tumoral circulante.

- 5 El nivel de la proteína FOLR1 puede medirse en un fluido corporal. El fluido corporal puede ser fluido de ascitis. El fluido corporal puede ser suero, sangre o plasma. En algunas realizaciones, el nivel de la proteína FOLR1 se mide en una muestra de sangre periférica.

10 La enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 en los aspectos del agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 para su uso en un método de tratamiento referido anteriormente es cáncer. Así, el paciente tiene cáncer. El cáncer puede ser un cáncer con FOLR1 elevado que se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de ovario, cáncer pulmón no microcítico, uterino, de endometrio, de páncreas, de riñón, de pulmón, y de mama. El cáncer de ovario puede ser resistente al platino o refractario al platino. El cáncer de pulmón puede ser cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC, por sus siglas en inglés). El cáncer puede ser cáncer de endometrio.

- 15 El nivel de la proteína FOLR1 puede medirse usando dos anticuerpos diferentes o fragmentos de unión al antígeno de estos o polipéptidos que se unen específicamente a FOLR1. El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o polipéptido usado para detectar la proteína FOLR1 puede estar unido a un soporte sólido. El soporte sólido puede ser una placa de microtitulación.

20 El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o polipéptido usado para detectar la proteína FOLR1 puede comprender un agente de detección. El agente de detección puede ser un agente de detección cromogénico, un agente de detección fluorogénico, un agente de detección enzimático o un agente de detección electroquimioluminiscente. El agente de detección puede ser peroxidasa de rábano picante (HRP).

Los niveles de la proteína FOLR1 pueden determinarse usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). El ELISA puede ser un ELISA en sándwich.

- 25 Se describe que el agente activo comprende el anticuerpo huMov19 de FOLR1. El huMov19 puede estar conjugado con un agente citotóxico. El huMov19 puede administrarse como un conjugado de anticuerpo y maitansinoide que comprende adicionalmente el maitansinoide DM4 y el enlazador sulfo-SPDB escindible (IMGN853).

Se describe un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo o un polipéptido para su uso como un diagnóstico.

- 30 Se describe un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo o un polipéptido proporcionado en, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que no inhibe de manera competitiva la unión a FOLR1 de un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 con un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 y/o para monitorear la eficacia terapéutica de una dosis fija de un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1.

35 Se describe un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo o un polipéptido para su uso en un método para diagnosticar (i) una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 y/o (ii) la respuesta al tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por FOLR1 con una dosis fija de un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1 y/o (iii) la eficacia terapéutica de un tratamiento con una dosis fija de un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad de FOLR1. El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o polipéptido puede ser para uso en un método para diagnosticar cáncer en un paciente que padece este. El cáncer puede estar asociado con niveles de FOLR1 elevados. El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o polipéptido puede comprender un agente de detección. El agente de detección puede ser un agente de detección cromogénico, un agente de detección fluorogénico, un agente de detección enzimático o un agente de detección electroquimioluminiscente.

40 Se describen métodos en donde la enfermedad mediada por FOLR-1 es cáncer, en donde el agente activo comprende IMGN853, y en donde el nivel de la proteína FOLR1 diseminada se mide utilizando un ensayo ELISA utilizando al menos dos anticuerpos anti-FOLR1 que no inhiben de forma competitiva la unión del agente activo a FOLR1, en donde cada uno de al menos dos anti-FOLR1 comprende secuencias de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) SEQ ID NO: 4, 5 y 6 y SEQ ID NO: 16, 17 y 18; (c) SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y SEQ ID NO: 19, 20 y 21; y (d) SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y SEQ ID NO: 22, 23 y 24.

45 Se describen métodos en donde la enfermedad mediada por FOLR1 es cáncer, en donde el agente activo comprende IMGN853, en donde el anticuerpo anti FOLR1 que no inhibe de manera competitiva la unión del agente activo a FOLR1 comprende la secuencias de aminoácidos (a) SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) SEQ ID NO: 4, 5 y

6 y SEQ ID NO: 16, 17 y 18; (c) SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y SEQ ID NO: 19, 20, y 21; o (d) SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y SEQ ID NO: 22, 23 y 24; y en donde la proteína FOLR1 se detecta por citometría.

En los métodos, el cáncer puede ser cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede ser resistente al platino o refractario al platino. El cáncer puede ser NSCLC. El cáncer puede ser cáncer de endometrio.

5 Se describen agentes activos en donde la enfermedad mediada por FOLR-1 es cáncer, en donde el agente activo comprende IMGN853, y en donde el nivel de la proteína FOLR1 diseminada se mide utilizando un ensayo ELISA utilizando al menos dos anticuerpos anti-FOLR1 que no inhiben de forma competitiva la unión del agente activo a FOLR1, en donde cada uno de al menos dos anti-FOLR1 comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) SEQ ID NO: 4, 5 y 6 y SEQ ID NO: 16, 17 y 18; (c) SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y SEQ ID NO: 19, 20 y 21; y (d) SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y SEQ ID NO: 22, 23 y 24.

10 Se describen agentes activos en donde la enfermedad mediada por FOLR-1 es cáncer, en donde el agente activo comprende IMGN853, y en donde el nivel de la proteína FOLR1 diseminada se mide utilizando un ensayo ELISA utilizando al menos dos anticuerpos anti-FOLR1 que no inhiben de forma competitiva la unión del agente activo a FOLR1, en donde cada uno de al menos dos anti-FOLR1 comprende secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) SEQ ID NO: 4, 5 y 6 y SEQ ID NO: 16, 17 y 18; (c) SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y SEQ ID NO: 19, 20 y 21; y (d) SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y SEQ ID NO: 22, 23 y 24.

Respecto a los agentes activos, el cáncer puede ser cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede ser resistente al platino o refractario al platino. El cáncer puede ser NSCLC. El cáncer puede ser cáncer de endometrio.

20 Se describe un método para tratar cáncer que comprende administrar un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo este que modula la actividad FOLR1 a un paciente con niveles elevados de proteína FOLR1 diseminada con relación a un nivel de la proteína FOLR1 de referencia, en donde los niveles de proteína FOLR1 del paciente se midieron utilizando un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, o polipéptido.

25 Se describe un método para tratar cáncer que comprende administrar un agente activo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula la actividad FOLR1 a un paciente con niveles elevados de proteína FOLR1 en células tumorales circulantes con relación a un nivel de la proteína FOLR1 de referencia, en donde los niveles de proteína FOLR1 del paciente se midieron utilizando un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, o polipéptido proporcionado en la presente memoria. El agente activo puede comprender IMGN853. El cáncer puede ser cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede ser resistente al platino o refractario al platino. El cáncer puede ser NSCLC. El cáncer puede ser cáncer de endometrio.

30 Se describe el uso de un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o polipéptido proporcionado en la presente memoria o como se describe para medir el nivel de la proteína FOLR1 en una muestra *in vitro*.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática del ensayo de antígeno FOLR1 diseminado.

35 Figura 2. (A) Representación esquemática del ensayo ELISA de competición con Mov19. (B) Determinación de la afinidad de unión de muFR1-13 mediante análisis ELISA en sándwich utilizando Mov19.

Figura 3. (A) Representación esquemática de ELISA de competición de unión directa para determinar los epítomos de unión no competitiva de FOLR1. (B) Gráfica de transformación logarítmica de los resultados de ELISA de competición para cribar la interferencia de unión de los anticuerpos anti-FOLR1 con Mov19.

40 Figura 4. Gráfica de transformación logarítmica de los resultados de ELISA de competición para cribar la interferencia de unión de los anticuerpos anti-FOLR1 con muFR1-13.

Figura 5. Afinidad de unión de los anticuerpos anti-FOLR1 mediante ELISA en sándwich.

Figura 6. Afinidad de unión de FR1-13 mediante (A) citometría de flujo y (B) ELISA en sándwich.

Figura 7. Gráfica de transformación logarítmica de resultados para (A) unión de anticuerpo a FOLR2 y (B) FOLR3 mediante ELISA en sándwich.

45 Figura 8. Efecto del ácido fólico unido previamente a FOLR1 en la detección del antígeno de FOLR1 diseminado utilizando FR1-9 y FR1-13.

Figura 9. Análisis de muestras de ascitis humana para determinar la presencia de FOLR1 y la presencia de proteínas de interferencia en el ensayo.

50 Figura 10. Análisis de muestras combinadas de plasma humano normal para determinar la presencia de FOLR1 y la presencia de proteínas de interferencia en el ensayo.

Figura 11. Determinación de la concentración de FOLR1 en muestras de plasma de ovarios de pacientes humanos utilizando ELISA en sándwich de FOLR1.

Figura 12. Representación esquemática para interpolar la cantidad de FOLR1 en una muestra de paciente basándose en un ajuste de la curva de respuesta a la dosis sigmoidea 4PL del estándar de proteína de fusión FOLR1-Fc purificada diluido de forma seriada.

Figura 13. Titulación de los anticuerpos anti-FOLR1 utilizando líneas celulares con un rango de niveles de expresión de FOLR1. Para cada línea celular y dilución, se realizó una tinción en triplicado. Se midió y promedió la intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) para la expresión de FRA y se muestran en la tabla (el error representa el SEM).

Figura 14. Histogramas que muestran la expresión de FOLR1 en las líneas celulares utilizando diluciones óptimas de los anticuerpos anti-FOLR1.

Figura 15. Gráfica que muestra la competición entre anticuerpos anti-FOLR1 e IMG853.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método novedoso para detectar el receptor 1 de folato humano (FOLR1) diseminado o FOLR1 en células tumorales circulantes en una muestra de un paciente. El FOLR1 se puede detectar utilizando anticuerpos que no inhiben de forma competitiva la unión de un agente activo anti-FOLR1 (por ejemplo, un agente activo que comprende el anticuerpo huMov19) al FOLR1. Los anticuerpos que no inhiben de forma competitiva la unión de un agente activo anti-FOLR1 son especialmente útiles para detectar FOLR1 (por ejemplo, FOLR1 diseminado o FOLR1 en células tumorales circulantes) en muestras de pacientes que han sido tratados con el agente activo anti-FOLR1. Se puede utilizar FOLR1 diseminado o FOLR1 en células tumorales circulantes para monitorear o determinar la eficacia terapéutica, o la probabilidad de respuesta al tratamiento de cánceres caracterizados por la sobreexpresión de FOLR1. También se describen nuevos polipéptidos de unión a FOLR1, tales como anticuerpos, que son útiles en los métodos de detección de FOLR1 diseminado, así como los métodos adicionales de detección de FOLR1 (por ejemplo, IHC para ensayos de CTC y FOLR1 asociados a células y unidos a membranas). También se proporcionan polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes de unión a FOLR1 y métodos para preparar los agentes de unión a FOLR1. Además, los métodos proporcionados en la presente memoria se pueden utilizar para la estratificación de los pacientes.

I. Definiciones

Para facilitar el entendimiento de la presente invención, se definen a continuación varios términos y expresiones.

Los términos "receptor 1 de folato humano", "FOLR1" o "receptor de folato alfa (FR- α)," tal y como se usan en la presente memoria, se refieren a cualquier FOLR1 humano nativo, a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, todos estos términos se pueden referir ya sea a una secuencia de ácido nucleico o proteína tal como se indica en la presente memoria. El término "FOLR1" engloba FOLR1 "de longitud completa" no procesado, así como también cualquier forma de FOLR1 que resulte del procesamiento dentro de la célula. El término también engloba las variantes de FOLR1 que ocurren naturalmente, por ejemplo, variantes de corte y empalme (excepto aquellas variantes que engloban FOLR2, FOLR3, o FOLR4), variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos FOLR1 descritos en la presente memoria pueden aislarse de una variedad de fuentes, tal como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos. Los ejemplos de secuencias de FOLR1 incluyen, pero no se limitan a, los números de referencia NCBI, P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1 y NP_057936.1 La secuencia de FOLR1 humano es la siguiente:

```
MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQAHAH
KDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLEYECSPNLGPWQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQWVEDCRTS
YTCKSNWHKGNWNTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTSHSYKVSNSYRSGSRGRCIQMWFDPAQGNPNE
EVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS (SEQ ID NO:49).
```

Los términos "antígeno diseminado" y "FOLR1 diseminado" se usan de manera intercambiable en la presente memoria. Estos términos se refieren a una proteína FOLR1 que es soluble y que no está asociada a la célula. Puede incluir el dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) y el enlazador de glicosilfosfatidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés). El FOLR1 diseminado puede incluir solo el ECD. El FOLR1 incluye un péptido señal (aminoácidos 1-24), la cadena de proteínas FOLR1 (aminoácidos 25-233 o 234) y un propéptido que se puede escindir (aminoácidos 235 a 257). El FOLR diseminado puede incluir los aminoácidos 1 a 257, 1 a 233, 1 a 234, 25 a 233, 25 a 234 o cualesquiera otros fragmentos de estos. En algunas realizaciones, la secuencia señal está escindida. La parte de GPI y de ECD puede estar incluida en una membrana (por ejemplo, una balsa lipídica soluble). El FOLR1 diseminado puede incluir los aminoácidos 1-233 o un fragmento de estos.

El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de

inmunoglobulina. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" engloba anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una parte de determinación del antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede pertenecer a cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de estas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de acuerdo a la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada a los que se hace referencia como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas, tales como toxinas, radioisótopos, etc.

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo de origen no natural. El anticuerpo puede purificarse a partir de componentes naturales. Un anticuerpo puede producirse de forma recombinante. Un anticuerpo puede producirse mediante un hibridoma.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une, tal como FOLR1. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas pueden inhibir sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. De manera deseable, la actividad biológica se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso un 100 %.

El término "anticuerpo anti-FOLR1" y "un anticuerpo que se une a FOLR1" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a FOLR1 con suficiente afinidad, de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a FOLR1. El grado de la unión de un anticuerpo anti-FOLR1 a una proteína distinta de FOLR1 no relacionada es menor de alrededor del 10 % de la unión del anticuerpo a FOLR1 tal como se midió, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). Un anticuerpo que se une a FOLR1 puede tener una constante de disociación (K_d) de ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM o ≤0,1 nM. El anticuerpo anti-FOLR1 puede no unirse a FOLR2, FOLR3, FOLR4, o al ácido fólico. De este modo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1 de la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 de: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos discretos. Dichos anticuerpo monoclonal puede incluir típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos que une una diana, en donde la secuencia de polipéptidos de unión a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia de polipéptidos de unión a la diana de una pluralidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a la diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad para la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc. y el anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención o como se describe. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas ya que típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo al ser obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo a través de ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a ser utilizados de acuerdo con la presente invención o como se describe pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. No. 4.816.567), tecnología de exposición en fagos (ver, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a los humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican las secuencias de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); Pat. de EE. UU. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas específicas de inmunoglobulina, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas, que contienen secuencias no humanas mínimas (por ejemplo, murinas). Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas donde los residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana de consenso. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de un dominio o región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la Pat. de EE. UU. 5.225.539 o 5.639.641. Los anticuerpos "modificados en superficie" implican generalmente la identificación de los residuos de la superficie del marco de la región variable en las cadenas ligeras y en las pesadas, y su reemplazo con equivalentes humanos. Los métodos para modificar anticuerpos en superficie se han proporcionado, por ejemplo, en Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994) y Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996).

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

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

La numeración de las posiciones de aminoácidos como en Kabat se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Al usar este sistema de numeración, la secuencia de aminoácido lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento, o inserción en, una FR o una CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir la inserción de un solo aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y los residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia de numeración de Kabat "estándar". Chothia, en cambio, se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia, cuando se enumera usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat ubica las inserciones en H35A y H35B; si 35A y 35B no están presentes, el bucle finaliza en 32; si solo 35A está presente, el bucle termina en 33; si tanto 35A como 35B están presentes, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

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

El término "anticuerpo humano" significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano preparado empleando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o cadena ligera humano tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murinos y polipéptidos de cadena pesada humanos.

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de anticuerpos que derivan de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, a la vez que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos que derivan de otras (generalmente humanas) para evitar incitar una respuesta inmunitaria en esa especie.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se usa de manera intercambiable en la presente memoria y se refieren a esa parte de un antígeno capaz de ser reconocida y de unirse específicamente por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítipos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Generalmente, los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen durante el proceso de desnaturalización de la proteína, mientras que los epítipos formados a partir del plegamiento terciario generalmente se pierden durante la desnaturalización de la proteína. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

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

"O mejor", cuando se usa en la presente memoria para hacer referencia a la afinidad de unión, se refiere a una unión más fuerte entre una molécula y su compañero de unión. "O mejor", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a una unión más fuerte representada por un valor Kd numérico menor. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una afinidad para un antígeno de "0,6 nM o mejor", la afinidad del anticuerpo para el antígeno es <0,6 nM, es decir, 0,59 nM, 0,58 nM, 0,57 nM etc. o cualquier otro valor menor de 0,6 nM. La afinidad del anticuerpo tal como lo determina por una Kd puede ser entre alrededor de 10⁻³ a alrededor de 10⁻¹² M, entre alrededor de 10⁻⁶ a alrededor de 10⁻¹¹ M, entre alrededor de 10⁻⁶ a alrededor de 10⁻¹⁰ M, entre alrededor de 10⁻⁶ a alrededor de 10⁻⁹ M, entre alrededor de 10⁻⁶ a alrededor de 10⁻⁸ M, o entre alrededor de 10⁻⁶ a alrededor de 10⁻⁷ M.

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", tal y como se usa en la presente memoria, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación) de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca significancia biológica y/o estadística o ninguna dentro del contexto de las características biológicas medidas por dichos valores (por ejemplo, los valores de Kd). La diferencia entre dichos

dos valores es menor de alrededor del 50 %, menor de alrededor del 40 %, menor de alrededor del 30 %, menor de alrededor del 20 %, o menor de alrededor del 10 % en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparación.

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

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

10 El término "expresión aumentada" de FOLR1 se refiere a una muestra que contiene niveles elevados de expresión de FOLR1 en comparación con una muestra de referencia, un nivel de FOLR1 de referencia o un nivel de FOLR1 previo detectado del mismo sujeto. Por lo tanto, por ejemplo, los "niveles de proteína FOLR1 aumentados" en una muestra de un paciente pueden tener niveles de proteína FOLR1 que son mayores que los niveles de proteína FOLR1 en una muestra de referencia no cancerosa. Los "niveles de proteína FOLR1 aumentados" en una muestra de un paciente también pueden, por ejemplo, tener niveles de proteína FOLR1 que son iguales a los niveles de proteína FOLR1 en una muestra cancerosa. Pueden detectarse "niveles de proteína FOLR1 aumentados" en donde el nivel de la proteína FOLR1 de un paciente es al menos alrededor del 5 %, al menos alrededor del 10 %, al menos alrededor del 15 %, al menos alrededor del 20 %, o al menos alrededor del 25 %, al menos alrededor del 30 %, o al menos alrededor del 50 % más que, por ejemplo, un nivel de FOLR1 previo detectado del mismo sujeto. En ensayos de células tumorales circulantes, los "niveles de proteína FOLR1 aumentados" se pueden referir a muestras en las que se detecta FOLR1 en un porcentaje mayor de células o muestras en las que se detecta FOLR1 en niveles mayores en las células. Por lo tanto, pueden detectarse "niveles de proteína FOLR1 aumentados" en ensayos en CTC donde al menos alrededor del 5 %, al menos alrededor del 10 %, al menos alrededor del 15 %, al menos alrededor del 20 %, o al menos alrededor del 25 %, al menos alrededor del 30 %, o al menos alrededor del 50 % o más de las células muestran expresión de FOLR1. Además, puede detectarse "niveles de proteína FOLR1 aumentados" en ensayos en CTC donde al menos alrededor del 5 %, al menos alrededor del 10 %, al menos alrededor del 15 %, al menos alrededor del 20 %, o al menos alrededor del 25 %, al menos alrededor del 30 %, o al menos alrededor del 50 % más de FOLR1 se detecta en las células.

30 Se puede utilizar una "muestra de referencia" para correlacionar y comparar los resultados obtenidos en los métodos de una muestra de ensayo. Las muestras de referencia pueden ser células (por ejemplo, líneas celulares, sedimentos celulares), fluidos corporales o tejido. Los niveles del FOLR1 en la "muestra de referencia" pueden ser una cantidad absoluta o relativa, un rango de cantidad, una cantidad mínima y/o máxima, una cantidad media y/o una cantidad mediana de FOLR1. Una "muestra de referencia" también puede servir como línea base de la expresión de FOLR1 con el cual se compara la muestra de ensayo. La "muestra de referencia" puede incluir una muestra anterior o muestra de línea base del mismo paciente, una referencia normal, o una referencia de una población de pacientes relevante. Generalmente, los niveles FOLR1 se expresan como valores en una curva estándar. Una curva estándar es un método cuantitativo de representar datos de ensayo para determinar la concentración de FOLR1 en una muestra. La muestra de referencia puede ser un estándar de antígeno que comprende FOLR1 purificado FOLR1-Fc. Los métodos de diagnóstico implican una comparación entre niveles de expresión del FOLR1 en una muestra de ensayo y un "valor de referencia" o "nivel de referencia". El valor de referencia puede ser el nivel de expresión del FOLR1 en una muestra de referencia. Un valor de referencia puede ser un valor predeterminado y también se puede determinar a partir de muestras de referencia (por ejemplo, muestras biológicas de control) ensayadas en paralelo con las muestras de ensayo. Un valor de referencia puede ser un valor de corte individual, tal como un valor mediano o media o un rango de valores, tal como un intervalo de confianza. Los valores de referencia se pueden establecer para varios subgrupos de individuos, tales como individuos predispuestos al cáncer, individuos que tienen cáncer en un estadio temprano o tardío, individuos masculinos y/o femeninos o individuos sometidos a terapia contra el cáncer. Los ejemplos de muestras o valores de referencia normales y muestras o valores de referencia positivos se describen en la presente memoria.

50 El término "anticuerpo primario" se refiere en la presente memoria a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de la proteína diana en una muestra. Un anticuerpo primario es generalmente el primer anticuerpo utilizado en un ensayo ELISA. El anticuerpo primario puede ser el único anticuerpo utilizado en un procedimiento IHC. El término "anticuerpo secundario" se refiere en la presente memoria a un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo primario, formando así un puente entre el anticuerpo primario y un reactivo posterior, si hubiera. El anticuerpo secundario es generalmente el segundo anticuerpo usado en un procedimiento inmunohistoquímico.

55 Tal y como se usa en la presente memoria, "inmunohistoquímica" se refiere a métodos histoquímicos e inmunológicos utilizados para analizar, por ejemplo, células o tejidos. Por lo tanto, los términos "inmunohistoquímica", "inmunocitoquímica" e "inmunoquímica" se utilizan de manera intercambiable.

60 Una "muestra" o "muestra biológica" es de origen biológico, tal como de organismos eucariotas. La muestra puede ser una muestra humana, pero también se pueden usar muestras de animales. Las fuentes no limitantes de una muestra incluyen tejido sólido, aspirados de biopsia, ascitis, extractos de fluidos, sangre, plasma, suero, líquido raquídeo, linfa,

las secciones externas de la piel, de los tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, tumores, órganos, cultivos celulares y/o constituyentes de cultivos celulares, por ejemplo. La presente invención es particularmente útil para muestras de cáncer que generalmente comprenden fluidos corporales, tal como ascitis, donde la cantidad de material disponible es pequeña. El método se puede utilizar para examinar un aspecto de la expresión del FOLR1 o un estado de una muestra incluyendo, pero no limitado a, la comparación de diferentes tipos de células o tejidos, la comparación de diferentes estadios de desarrollo y la detección o determinación de la presencia y/o tipo de enfermedad o anormalidad.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "reactivo de captura" se refiere a un reactivo capaz de unir y capturar una molécula diana en una muestra de modo que, en condiciones adecuadas, el complejo reactivo de captura-molécula diana se pueda separar del resto de la muestra. El reactivo de captura puede estar inmovilizado. El reactivo de captura en un inmunoensayo en sándwich puede ser un anticuerpo o una mezcla de diferentes anticuerpos contra un antígeno diana.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo detectable" se refiere a un anticuerpo que es capaz de ser detectado ya sea directamente a través de un marcaje amplificado por un medio de detección o indirectamente a través, por ejemplo, otro anticuerpo que esté marcado. Para el marcaje directo, el anticuerpo normalmente se conjuga con un resto que es detectable mediante algunos medios. El anticuerpo detectable puede ser un anticuerpo biotinilado.

El término "marcaje" cuando se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, de manera que se genera un anticuerpo "marcado". El marcaje puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcajes de radioisótopos o marcajes fluorescentes) o, en el caso de un marcaje enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "medio de detección" se refiere a un resto o técnica utilizada para detectar la presencia del anticuerpo detectable en el ELISA en la presente memoria e incluye agentes de detección que amplifican el marcaje inmovilizada tal como un marcaje capturado en una placa de microtitulación. El medio de detección puede ser un agente de detección fluorimétrico tal como avidina o estreptavidina.

Comúnmente, un análisis "ELISA en sándwich" emplea las siguientes etapas: (1) la placa de microtitulación se recubre con un anticuerpo de captura; (2) se añade la muestra y cualquier antígeno presente se une al anticuerpo de captura; (3) se añade el anticuerpo de detección y se une al antígeno; (4) se añade el anticuerpo secundario unido a la enzima y se une al anticuerpo de detección; y (5) se añade el sustrato y es convertido por la enzima hasta obtener una forma detectable.

Por "correlacionar" o "que correlaciona" se quiere decir comparar, de cualquier modo, el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis con el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis. Por ejemplo, se pueden usar los resultados de un primer análisis al realizar el segundo análisis y/o se pueden usar los resultados de un primer análisis para determinar si se debería realizar un segundo análisis y/o se pueden comparar los resultados de un primer análisis con los resultados de un segundo análisis. La expresión del FOLR1 aumentada puede correlacionarse con la probabilidad aumentada de la eficacia de una terapia anticancerosa dirigida a FOLR1.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen las afecciones fisiológicas en mamíferos donde una población de células se caracteriza por tener un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cánceres de origen endotelial, mesenquimal o epitelial, tal como cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de células escamosas, cáncer microcítico de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer del peritoneo (por ejemplo, peritoneal primario), cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, endometrial (por ejemplo, adenocarcinoma endometrial) o carcinoma uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de la vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma, tumores del plexo coroideo) y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello, y también tumores de vasos sanguíneos y trompas de falopio. Los cánceres también engloban cánceres que contienen células que tienen niveles de expresión de FOLR1 elevados. Tales cánceres con FOLR1 elevado incluyen, pero no están limitados a, cáncer de ovario, cáncer de pulmón microcítico, cáncer uterino, del endometrio, pancreático, renal, pulmonar y de mama.

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

Los términos "célula cancerosa", "célula tumoral" y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células que derivan de un tumor o de una lesión precancerosa, que incluyen células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales y células madre tumorigénicas (células madre cancerosas). Tal y como se usa en la presente memoria, el término "célula tumoral" se modificará por el término "no tumorigénico" cuando

se hace referencia solamente a aquellas células tumorales que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse para distinguir esas células tumorales de las células madre cancerosas.

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

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

10 Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo tal y como se describe en la presente memoria es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria, en relación al propósito establecido.

15 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis fija" se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y en un determinado contexto, detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y en un determinado contexto, detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento del tumor; aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; y/o dar lugar a una respuesta favorable tal como un aumento en la supervivencia sin progresión (PFS, por sus siglas en inglés), en la supervivencia sin enfermedad (DFS, por sus siglas en inglés), o en la supervivencia global (OS, por sus siglas en inglés), respuesta completa (CR, por sus siglas en inglés), respuesta parcial (PR, por sus siglas en inglés), o en algunos casos, enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés), una disminución en la enfermedad progresiva (PD, por sus siglas en inglés), un tiempo reducido hasta la progresión (TTP, por sus siglas en inglés), una disminución en CA125 en el caso de cáncer de ovario, o cualquier combinación de los mismos. Véase la definición en la presente memoria de "tratar". En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento de y/o pueda matar a las células cancerosas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, con dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Comúnmente, aunque no necesariamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica en los sujetos antes de o en un estadio temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

30 PFS, DFS, y OS se pueden medir por estándares establecidas por el Instituto Nacional del Cáncer y por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. para la aprobación de nuevos fármacos. Véase Johnson et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411.

35 La "supervivencia sin progresión" (PFS) se refiere al tiempo desde la inclusión en el estudio hasta la progresión de la enfermedad o la muerte. La PFS generalmente se mide utilizando el método de Kaplan-Meier y los estándares de los Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST, por sus siglas en inglés) 1.1. Generalmente, la supervivencia sin progresión se refiere a la situación donde un paciente permanece vivo, sin que el cáncer empeore.

El "tiempo hasta la progresión del tumor" (TTP) se define como el tiempo desde la inclusión en el estudio hasta la progresión de la enfermedad. El TTP se mide generalmente utilizando los criterios RECIST 1.1.

40 Una "respuesta completa" o "remisión completa" o "CR" indica la desaparición de todos los signos de tumor o cáncer en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.

Una "respuesta parcial" o "PR" se refiere a una disminución en el tamaño o el volumen de uno o más tumores o lesiones, o en la extensión del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento.

45 "Enfermedad estable" se refiere a la enfermedad sin progresión o recidiva. En la enfermedad estable no hay suficiente encogimiento del tumor para que sea calificada como respuesta parcial ni un suficiente aumento del tumor para que sea calificada como enfermedad progresiva.

50 "Enfermedad progresiva" se refiere a la aparición de una o más lesiones o tumores nuevos y/o a la progresión inequívoca de lesiones no diana existentes. La enfermedad progresiva también se puede referir a un crecimiento tumoral de más del 20 por ciento desde que comenzó el tratamiento, ya sea debido a un aumento en la masa o a la diseminación del tumor.

"Supervivencia sin enfermedad" (DFS, por sus siglas en inglés) se refiere a la duración de tiempo durante y después del tratamiento en la que el paciente permanece sin enfermedad.

55 "Supervivencia global" (OS, por sus siglas en inglés) se refiere al tiempo desde la inclusión del paciente en el estudio hasta su muerte o se censura en la última fecha en la que estaba vivo. La OS incluye una prolongación de la expectativa de vida en comparación con individuos o pacientes sin tratamiento previo. La supervivencia global se

refiere a la situación donde un paciente permanece vivo durante un período de tiempo definido, tal como un año, cinco años, etc., por ejemplo, a partir del momento del diagnóstico o tratamiento.

Una "disminución en los niveles de CA125" se puede evaluar de acuerdo con las pautas del Intergrupo de Cáncer Ginecológico (GCIG). Por ejemplo, los niveles de CA125 se pueden medir antes del tratamiento para establecer un nivel de CA125 en la línea base. Los niveles de CA125 se pueden medir una o más veces durante o después del tratamiento, y una reducción en los niveles de CA125 con el tiempo en comparación con el nivel de la línea base se considera una disminución en los niveles de CA125.

Los términos tales como "que trata" o "tratamiento" o "tratar" o "que alivia" o "aliviar" se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado, como a 2) medidas profilácticas o preventivas que evitan y/o ralentizan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana. Por lo tanto, las personas que necesitan tratamiento incluyen aquellas que ya padecen el trastorno; las propensas a padecer el trastorno; y aquellas en las cuales se desea prevenir el trastorno. El sujeto puede ser "tratado" exitosamente contra el cáncer de acuerdo con los métodos incorporados por la presente invención o como describe, si el paciente muestra uno o más de los siguientes: reducción de caquexia, aumento en el tiempo de supervivencia, extensión del tiempo hasta la progresión del tumor, reducción de la masa tumoral, reducción de la carga tumoral y/o una prolongación del tiempo hasta la metástasis tumoral, tiempo hasta la recurrencia tumoral, respuesta tumoral, respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable, enfermedad progresiva, supervivencia sin progresión (PFS), supervivencia global (OS), cada una de las cuales según se mide por los estándares establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer y la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. para la aprobación de nuevos fármacos. Véase Johnson et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411.

Los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico", tal y como se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante la polimerasa de ADN o ARN. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. De estar presente, la modificación de la estructura del nucleótido se puede impartir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "casquetes", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas, tal como, por ejemplo, los que tienen enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquiladores, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del o de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes comúnmente en los azúcares se puede reemplazar, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores estándar o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH del extremo 5' o 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos orgánicos protectores de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivatizar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como, arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranososa, azúcares de furanososa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como, ribósido de metilo. Se puede reemplazar uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no están limitados a, realizaciones donde el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), donde cada R o R' es independientemente H o un alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (--O--), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No necesariamente todos los enlaces en un polinucleótido son idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente memoria, incluyendo ARN y ADN.

El término "vector" significa una construcción que es capaz de administrar y expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no están limitados a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados a agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos

que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de esta invención o como se describe se basan en anticuerpos, los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas simples o cadenas asociadas. Un polipéptido, péptido o proteína puede no ser natural. Un polipéptido, péptido o proteína puede purificarse a partir de otros componentes de origen natural. El polipéptido, péptido o proteína puede producirse de forma recombinante.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o de residuos aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si fuera necesario) para una máxima correspondencia, sin considerar ninguna sustitución conservativa de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse utilizando software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En la técnica se conocen varios algoritmos y software que se pueden usar para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Uno de estos ejemplos no limitativos de un algoritmo de alineamiento de secuencias es el algoritmo descrito en Karlin et al, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, según modificación en Karlin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877 e incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). Puede usarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (DNASTAR) son otros programas de software públicamente disponibles adicionales que se pueden usar para alinear secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el programa GAP en el software GCG (por ejemplo, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 o 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). El programa GAP en el paquete de software GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) se puede usar para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, usando o bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). De manera alternativa, el porcentaje de identidad entre secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede determinar usando el programa ALIGN (versión 2.0) y usando una PAM120 con tabla de residuos, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Un experto en la técnica puede determinar los parámetros apropiados para un máximo alineamiento por software de alineamiento particular. Pueden usarse los parámetros por defecto del software de alineamiento. El porcentaje de identidad "X" de una primera secuencia de aminoácidos con respecto a una segunda secuencia de aminoácidos puede calcularse como $100 \times (Y/Z)$, donde Y es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas en el alineamiento de la primera y la segunda secuencia (tal como se alinean por inspección visual o por un programa de alineamiento de secuencias particular) y Z es el número total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia respecto a la segunda secuencia será mayor que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia respecto a la primera secuencia.

A modo de ejemplo no limitante, si algún polinucleótido particular tiene un determinado porcentaje de identidad de secuencia (por ejemplo, es al menos un 80 % idéntica, al menos un 85 % idéntica, al menos un 90 % idéntica y opcionalmente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica) con respecto a una secuencia de referencia puede determinarse usando el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482 489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95 % idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se fijan de forma tal que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permiten huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

Dos ácidos nucleicos o polipéptidos pueden ser sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90% y en algunos contextos al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de nucleótidos o de residuos de aminoácidos, cuando se comparan y alinean para obtener una máxima correspondencia, tal como se mide utilizando un algoritmo de comparación de secuencia o mediante inspección visual. Puede existir identidad sobre una región de las secuencias que tiene una longitud de al menos 10, alrededor de 20, alrededor de 40-60 residuos o cualquier valor entero entre ellos, o sobre una región más larga de 60-80 residuos, al menos alrededor de 90-100 residuos o las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan, tal como la región codificadora de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es una en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina,

alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservativa. Las sustituciones conservativas en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos pueden no suprimir la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos al o a los antígenos, es decir, el FOLR1 al que se une el polipéptido o anticuerpo. Se conocen en la técnica métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999) y Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

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

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

15 El término "y/o" tal y como se usa en una expresión tal como "A y/o B" en la presente memoria pretende incluir: tanto "A y B", "A o B", "A" y "B". Asimismo, el término "y/o" tal y como se usa en la expresión tal como "A, B y/o C" pretende englobar cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo) y C (solo).

II. Ensayo de antígeno diseminado

20 El conjugado de anticuerpo y maitansinoide (AMC, por sus siglas en inglés), IMG853, comprende el anticuerpo monoclonal de unión a FOLR1, huMov19 (M9346A), conjugado al maitansinoide, DM4 (N(2')-deacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina), unido a través del enlazador sulfo-SPDB (N-succinimidil 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato) escindible. IMG853 y huMov19 se describen en la Pub. de Solic, de EE. UU. en tramitación con la presente No. 2012/0009181. El antígeno FOLR1 contiene un solo epítopo reconocido por Mov19. El anticuerpo huMov19 puede comprender las cadenas pesada y ligera con las siguientes secuencias:

SEQ ID NO:46: huMov19 vHC

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTG YFMNWWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQ GKATLTVDKSS
NTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:47 - huMov19 vLCv1.00

30 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNI
SPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:48 - huMov19 vLCv1.60

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTI
SPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR.

35 Un agente activo anti-FOLR1 tal como IMG853 puede modular la actividad de FOLR1, por ejemplo, disminuye la actividad de la proteína FOLR1.

40 IMG853 se encuentra actualmente en desarrollo clínico para varias indicaciones terapéuticas que incluyen cáncer de ovario con FOLR1 positivo, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer endometrial, cáncer renal y otras malignidades epiteliales. Los cánceres de ovario presentan la mayor penetrancia de FOLR1 y se consideran las indicaciones principales para el tratamiento con IMG853 (Antony AC. *Ann Rev Nutr* 16:501-21 (1996); Yuan Y et al. *Hum Pathol* 40(10):1453-1460 (2009)).

45 La medición de los niveles de antígeno en circulación en muestras de plasma de pacientes (antígeno diseminado) puede ayudar a identificar las poblaciones de pacientes con mayor probabilidad de responder al tratamiento con AMC. Se ha informado que los niveles altos de antígeno diseminado afectan de forma marcada la farmacocinética de los anticuerpos terapéuticos (Tolcher A. et al. 20th Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics; octubre 21-24, 2008; Génova, Suiza: EORTC-NCI-AACR, p163, #514; Baselga J, et al. *J Clin Oncol* 14:737-744 (1996)). Es probable que los niveles de antígeno diseminado de las muestras de plasma de pacientes serán variables dependiendo de factores tales como diana del antígeno, indicaciones de la enfermedad y curso de la enfermedad. Los niveles de antígeno diseminado actualmente en indicaciones de enfermedad para IMG853 han sido examinados de forma insuficiente mientras que la correlación con la expresión del tumor sólido es limitada. Aunque se ha informado de la elevación de FOLR1 en adenocarcinomas de ovario, los datos sugieren que no está elevado en otras indicaciones de tumor FOLR1+, tal como carcinoma de pulmón de células pequeñas (Mantovani LT, et al. *Eur J Cancer* 30A(3):363-9 (1994); Basal E, et al. *PLoS ONE* 4(7): e6292 (2009)). El presente método permite la detección del receptor FOLR1 en la presencia de ácido fólico alto. Los ensayos anteriores han utilizado Mov19 en el diseño del

ensayo. Dado que IMG853 contiene Mov19, es vital que el método detecte FOLR1 en presencia o ausencia de Mov19 donde IMG853 se administra antes de la detección de FOLR1. Los ensayos anteriores que utilizan Mov19 tienen efectos competitivos y detectarán considerablemente menos FOLR1 o nada en pacientes que reciben el tratamiento con IMG853

- 5 El método para detectar FOLR1 en muestras de fluido de fuente humana pueden utilizar un formato de ELISA en sándwich tradicional (Figura 1). El método puede utilizar un agente de captura (es decir, anticuerpo, otra proteína) para FOLR1 unido a un soporte sólido. El soporte sólido puede ser una placa de microtitulación. A esto, se añade la muestra (fluidos de ascitis, sangre, suero, plasma, etc.) sin dilución, y se detecta por un agente de detección diferente (un anticuerpo o proteína diferente) que no interfiere con la unión del primer agente de captura. El agente de detección se detecta entonces a través del uso de un agente de detección secundario (biotina / estreptavidina, anticuerpo secundario mono o policlonal anti-humano, etc.) que pueden unirse más de una vez al primer agente de detección, por lo tanto amplificando la señal de detección. El agente de detección secundario se cuantifica entonces mediante el uso de algunos otros medios (por ejemplo, TMB/peroxidasa, conteo de centelleo, sondas fluorescentes, etc.). De manera adicional, el ensayo detecta FOLR1 y no se ve influido de forma negativa por la presencia de Mov19, IMG853, otros miembros de la familia FOLR1 o ácido fólico.

Los ensayos como se describen incluyen ensayos para seleccionar pacientes elegibles para recibir terapia a base de FOLR1 y ensayos para monitorear la respuesta del paciente. Los ensayos para la predicción de la respuesta se realizan antes de la selección de la terapia, y los niveles de FOLR1 diseminado pueden impactar en las decisiones de la terapia. Para monitorear la respuesta del paciente, el ensayo se realiza al comienzo de la terapia para establecer los niveles de la línea base (o predeterminados) de FOLR1 en la muestra. La misma muestra se ensaya entonces y los niveles de FOLR1 se comparan con los niveles de la línea base o predeterminados. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "nivel predeterminado" generalmente se refiere a un valor de corte del ensayo que se utiliza para evaluar los resultados diagnósticos al comparar los resultados del ensayo con el nivel predeterminado, y donde el nivel predeterminado ya se ha ligado o asociado con varios parámetros clínicos (por ejemplo, monitorear si un sujeto que se está tratando con un fármaco ha alcanzado un nivel del fármaco en sangre eficaz, monitorear la respuesta de un sujeto que recibe tratamiento para el cáncer con un fármaco anticanceroso, monitorear la respuesta de un tumor en un sujeto que recibe el tratamiento para dicho tumor, etc.). El nivel predeterminado puede ser un valor absoluto o un valor normalizado al sustraer el valor obtenido de un paciente antes del comienzo de la terapia. Un ejemplo de un nivel predeterminado que se puede utilizar es un nivel de línea base obtenido de uno o más sujetos que pueden opcionalmente estar padeciendo una o más enfermedades o afecciones. La comparación (o análisis informacional) del nivel del biomarcador ensayado con el nivel de la línea base o predeterminado se puede realizar por un sistema automatizado, tal como un programa de software o sistema de inteligencia que es parte de, o es compatible con, el equipo (por ejemplo, una plataforma de computadora) sobre el cual se lleva a cabo el ensayo. De manera alternativa, esta comparación o el análisis informacional puede ser realizado por un doctor. Cuando los niveles siguen iguales o disminuyen, la terapia puede ser eficaz y se puede continuar. Cuando ocurre un aumento significativo sobre el nivel de la línea base (o nivel predeterminado), el paciente puede que no esté respondiendo. Un aumento en los niveles de FOLR1 diseminado puede ser indicativo de muerte celular aumentada y liberación aumentada del FOLR1 diseminado. Un aumento en el FOLR1 diseminado puede ser indicativo de eficacia terapéutica. Por consiguiente, puede medirse el FOLR1 diseminado y puede medirse la muerte celular. En la técnica se conocen los ensayos para medir la muerte celular e incluyen, por ejemplo, la detección del antígeno M30 (citoqueratina escindida con caspasa), marcadores del daño en el ADN tal como γ -H2AX, o características morfológicas de las células tales como núcleos teñidos con DAPI fragmentados y/o condensados.

Los ensayos incorporados por la presente invención o como se describen pueden ser realizados por cualesquiera métodos de ensayo de proteínas. Los métodos de ensayo de proteínas útiles son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos de inmunoensayo que implican la unión de un anticuerpo o proteína específico no marcado o marcado a la proteína o fragmento de FOLR1 expresado. Los métodos de inmunoensayos útiles incluyen ensayos en fase de disolución que se llevan a cabo utilizando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero no limitado a, Biacore, transferencia de energía resonante de fluorescencia en tiempo resuelto (TR-FRET, por sus siglas en inglés), un formato ELISA, (sándwich, inhibición competitiva directa o inversa) o un formato de polarización de fluorescencia, y ensayos en fase sólida tal como inmunohistoquímica. Los agentes de unión FOLR1 proporcionados más adelante son particularmente útiles para estos métodos de inmunoensayo.

III. Agentes de unión a FOLR1

Se describen agentes que se unen específicamente a FOLR1 humano. Estos agentes se refieren en la presente memoria como "agentes de unión a FOLR1".

- 55 Los agentes de unión a FOLR1 incluyen agentes de unión a FOLR1 que comprenden las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera de μ FR1-9, μ FR1-13, μ FR1-53, μ FR1-62, y μ FR1-64. Las secuencias de CDR μ FR1-9, μ FR1-13, μ FR1-53 y μ FR1-62 se describen en las Tablas 1 y 2 a continuación. Así, μ FR1-9 es según la invención.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada variable

Anticuerpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
muFR1-9	SFGMH (SEQ ID NO:1)	YISSGSSTFYADTVKG (SEQ ID NO:2)	ELTGT Fay (SEQ ID NO:3)
muFR1-13	RYSVH (SEQ ID NO:4)	MIWSGGNTDYNVFKS (SEQ ID NO:5)	FDGKVSWFAY (SEQ ID NO:6)
muFR1-53	DYDIS (SEQ ID NO:7)	EIYPGSGRTYYNERFKG (SEQ ID NO:8)	SYYYGTNSPFAY (SEQ ID NO:9)
muFR1-62	TYTMH (SEQ ID NO:10)	YINPTSGYNNYNQKFKE (SEQ ID NO:11)	GGAYGRRPVDY (SEQ ID NO:12)

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera variable

Anticuerpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
muFR1-9	RASQSINNNLH (SEQ ID NO:13)	YASQSI (SEQ ID NO:14)	QQNSWPQVT (SEQ ID NO:15)
muFR1-13	KASQSVSNDVL (SEQ ID NO:16)	YAYNRY (SEQ ID NO:17)	QQDHSSPFT (SEQ ID NO:18)
muFR1-53	RASQDISNYLH (SEQ ID NO:19)	YTSRLQS (SEQ ID NO:20)	QQGNSLPPT (SEQ ID NO:21)
muFR1-62	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO:22)	SASSRY (SEQ ID NO:23)	HQYNSYPYT (SEQ ID NO:24)

5 Las moléculas de unión a FOLR1 pueden ser anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de muFR1-9, muFR1-13, muFR1-53, muFR1-62, o muFR1-64 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR.

10 Los polipéptidos pueden comprender una de las cadenas ligeras variables o cadenas pesadas variables individuales que se describen en la presente memoria. Los anticuerpos y polipéptidos también pueden comprender una cadena ligera variable y una cadena pesada variable. Las secuencias de cadena ligera variable y cadena pesada variable de los anticuerpos murinos muFR1-9, muFR1-13, muFR1-53 y muFR1-62 se proporcionan en las Tablas 3 y 4, a continuación. Así, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29.

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de cadena pesada variable

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de VH (SEQ ID NO)
muFR1-9HCvar	QVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAY ISSGSSTFYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKELTGT FAYWGQGT LTVSA (SEQ ID NO:25)
muFR1-13HCvar	QVQLKESGPD L VAPSQSL SITCTVSGFSLSRYSVHWIRQPPGKGLEWLGMIW SGGNTDYNVFKSRLNITKDNKSKVFLKMNSLQTD DTAIYYCATFDGKVS FAYWGQGT LTVSA (SEQ ID NO:26)
muFR1-53HC	QVQLQQSGPELV R PGASVKMSCKASGYKFTDYDISWVLRQTGQGLEWIGE YPGSGRTYYNERFKGKATLTADKSSNTVYMQLSLTS EDSAVYFCASSYYY GTNSPFAYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:27)
muFR1-62HC	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPGQGLEWIA YINPTSGYNNYNQKFKEKATLTADKSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYFCASGGAY GRRPVDYWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO:28)

15 Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de VL (SEQ ID NO)
muFR1-9LCvar	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSINNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRF SGSGSGTDF L SINSVETEDFGMYFCQQNSWPQVTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO:29)
muFR1-13LCvar	SIVMTQTPKFLVSTGDRFTITCKASQSVSNDVLWYQQKPGQSPKLLIYYAYNRYSGVPDR FTGSGYGTDF TITTVQSEDLAVYFCQQDHSSPFTFGSGTKLEIKR (SEQ ID NO:30)

muFR1-53LC	DIQMTQTTSSLSASLGDRTVISCASQDISNYLHWYQRKPDGTVKLLVYYTSRLQSGVPSR FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNSLPPTFGSGTKLEIKR (SEQ ID NO:31)
muFR1-62LC	DIVMTQSQKFMSISVGDRTVSVTCKASQNVGTNAVWYQQKPGQSPKTLIYSASSRYSGVP DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCHQYNSYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:32)

- 5 Se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos alrededor del 90 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:25-28; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos alrededor del 90 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:29-32. El polipéptido puede comprender un polipéptido que tiene al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:25-32. Por lo tanto, el polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene al menos alrededor del 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:25-28, y/o (b) un polipéptido que tiene al menos alrededor del 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:29-32. El polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25-28; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29-32. El polipéptido puede ser un anticuerpo y/o el polipéptido se une específicamente a FOLR1. El polipéptido puede ser un anticuerpo murino, quimérico o humanizado que se une específicamente a FOLR1. El polipéptido que tiene un determinado porcentaje de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:25-32 puede diferir de las SEQ ID NO:25-32 solo por sustituciones de aminoácidos conservativas.
- 10
- 15 Los polipéptidos pueden comprender una de las cadenas ligeras o cadenas pesadas individuales que se describen en la presente memoria. Los anticuerpos y polipéptidos también pueden comprender tanto una cadena ligera como una cadena pesada. Las secuencias de la cadena ligera y cadena variable de los anticuerpos murinos muFR1-9, muFR1-13, muFR1-53 y muFR1-62 se proporcionan en las Tablas 5 y 6, a continuación.

Tabla 5: Secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa (SEQ ID NO)
muFR1-9HC	QVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGFT FSSFGMHVWRQAPEKGLEWVAYISSGSS TFYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSED TAMYYCAKELTGTTFAYWGQGLVT VSAAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFP AVLESDLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPE VSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQ FNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVN SAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK (SEQ ID NO:33)
muFR1-13HC	QVQLKESGPD LVAPSQSL SITCTVSGFSLSRYSVHWIRQPPGKGLEWLGMIVSGGNT DYNVFKSRLNITKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCATFDGKVSWFAYWGQGLVT VSAAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPA LLQSGLYTMSSSVTPSSTWPSQT VTCVAHPASSTVDKLEPSGPISTINPCPPCKE CHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEV HTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIGLV RAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVG FNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSD GSYFIYSKLN MKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYL KKTISRSPGK (SEQ ID NO:34)
muFR1-53HC	QVQLQQSGPELV RPGASVKMSCKASGYKFTDYDISWVLQRTGQGLEWIGEIYPGSGR TYYNERFKGKATLTADKSSNTVYMQLSLTS EDSAVYFCASSYYYGTNSPFAYWGQG TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVH TFPVAVLESDLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICT VPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPR EEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVN SAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYS KLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK (SEQ ID NO:35)
muFR1-62HC	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPGQGLEWIAIYINPTSG YNNYNQKFKEKATLTADKSSSTAYMQLSLTS EDSAVYYCASGGAYGRRPVDYWGQ GTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPVAVLESDLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQ PREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVN SAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQV YTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFV YSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK (SEQ ID NO:36)

Tabla 6: Secuencias de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa (SEQ ID NO)
muFR1-9LC	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSINNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSI SGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVETEDFGMYFCQQSNSWPQVTFGAGTKLELK RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLN SWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:37)
muFR1-13LC	SIVMTQTPKFLVSTGDRFTITCKASQSVSNDVLWYQQKPGQSPKLLIYYAYNR YSGVPDRFTGSGYGTDFITITVQSEDLAVYFCQQDHSSPFTFGSGTKLEIKR ADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:38)
muFR1-53LC	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLHWYQRKPDGTVKLLVYYTSRL QSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNSLPPTFGSGTKLEIKR ADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:39)
muFR1-62LC	DIVMTQSQKFMSISVGDVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKTIYSASS RYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCHQYNSYPYTFGGGKLEI KRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:40)

5 Se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos alrededor del 90 % de identidad de
 secuencia con las SEQ ID NO:33-36; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos alrededor del 90 % de identidad de
 secuencia con las SEQ ID NO:37-40. El polipéptido puede comprender un polipéptido que tiene al menos alrededor
 del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor
 del 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:33-40. Por lo tanto, el polipéptido puede comprender (a) un
 polipéptido que tiene al menos alrededor del 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:33-36, y/o (b) un
 10 polipéptido que tiene al menos alrededor del 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO:37-40. El polipéptido
 puede comprender (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33-36; y/o (b) un
 polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37-40. El polipéptido puede ser un anticuerpo y/o
 el polipéptido que se une específicamente a FOLR1. El polipéptido puede ser un anticuerpo murino, quimérico o
 humanizado que se une específicamente a FOLR1. El polipéptido que tiene un determinado porcentaje de identidad
 15 de secuencia con las SEQ ID NO:33-40 puede diferir de las SEQ ID NO:33-40 solo por sustituciones de aminoácidos
 conservativas.

La afinidad o avidéz de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar de forma experimental utilizando cualquier
 método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, citometría (que incluye citometría de flujo), ensayo
 inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA), o cinética (por ejemplo, análisis de
 20 espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (BIACORE™). Se pueden emplear fácilmente los ensayos de
 unión directa, así como los formatos de ensayo de unión competitiva. (Ver, por ejemplo, Berzofsky, et al., "Antibody-
 Antigen Interactions," En Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby,
 Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y los métodos descritos en la presente
 memoria. La afinidad medida de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes
 25 condiciones (por ejemplo, concentración de sal, pH, temperatura). Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros
 parámetros de unión al antígeno (por ejemplo, KD o Kd, K_{asoc}, K_{disoc}) se realizan con disoluciones estandarizadas de
 anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado, tal como se conoce en la técnica y tal como el tampón descrito en
 la presente memoria.

En un aspecto, los ensayos de unión se pueden realizar utilizando citometría (por ejemplo, citometría de flujo) en
 30 células que expresan el antígeno FOLR1 en la superficie. Por ejemplo, las células positivas para FOLR1 tales como
 SKOV3 se incubaron con concentraciones variadas de anticuerpos anti-FOLR1 utilizando 1 x 10⁵ células por muestra
 en 100 µL de tampón FACS (medio RPMI-1640 suplementado con suero de cabra normal al 2 %). Después, las células
 se sedimentaron, se lavaron e incubaron durante 1 hora con 100 µL de anticuerpo IgG de cabra-antihumano o cabra-
 35 antirratón conjugado con FITC (el cual se obtiene de, por ejemplo, Jackson Laboratory, 6 µg/mL en tampón FACS).
 Las células se sedimentaron una vez más, se lavaron con tampón FACS y se suspendieron nuevamente en 200 µl de

PBS que contenía formaldehído al 1 %. Las muestras se adquirieron, por ejemplo, utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador multipocillos de HTS y se analizaron utilizando CellQuest Pro (todos de BD Biosciences, San Diego, EE. UU.). Para cada muestra, la intensidad media de fluorescencia para FL1 (MFI, por sus siglas en inglés) se exportó y se representó frente a la concentración de anticuerpo en una gráfica semilogarítmica para generar una curva de unión. Se ajusta una curva de respuesta a la dosis sigmoideal para las curvas de unión y los valores CE50 se calculan utilizando programas tales como GraphPad Prism v4 con parámetros por defecto (GraphPad software, San Diego, CA). Los valores CE50 se pueden utilizar como una medida para la constante de disociación aparente "Kd" o "KD" para cada anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. Usando el método de hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal huésped adecuado, tal como se describe anteriormente para incitar la producción por los linfocitos de anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. Los linfocitos también se pueden inmunizar in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que se pueden seleccionar entonces de las células de mieloma y linfocitos no fusionados. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno seleccionado según se determina por inmunoprecipitación, inmunotransferencia o por un ensayo de unión in vitro (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)) se pueden propagar en cultivo in vitro usando métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o in vivo como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar entonces a partir del medio de cultivo o fluido de ascitis tal como se describe para los anticuerpos policlonales.

De manera alternativa, los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar usando métodos de ADN recombinante tal como se describe en la Patente de EE. UU. 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de células B maduras o células de hibridoma, tal como por RT-PCR usando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas ligera y pesada se clonan entonces en vectores de expresión adecuados que, cuando se transfectan en células huésped, tales como las células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otra forma no producen proteína de inmunoglobulina, las células huésped generan anticuerpos monoclonales. Además, los anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de la especie deseada se pueden aislar de las bibliotecas de exposición en fagos que expresan las CDR de la especie deseada, como se describe (McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628; y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

El o los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se pueden modificar adicionalmente de distintas maneras usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. Los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón se puede sustituir 1) por las regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) por un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. Las regiones constantes pueden truncarse o eliminarse para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Se puede usar mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo monoclonal contra FOLR1 humano puede ser un anticuerpo humanizado. Dichos anticuerpos pueden usarse terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas del HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administran a un sujeto humano.

También se pueden usar métodos para preparar por ingeniería, humanizar o modificar en superficie anticuerpos no humanos o humanos también y son conocidos en la técnica. Un anticuerpo humanizado, modificado en superficie o preparado por ingeniería de forma similar puede tener uno o más residuos de aminoácidos de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero no limitado a, de ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos de aminoácidos no humanos son reemplazados por residuos que usualmente son denominados residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio constante, variable de "importación" u otro dominio de una secuencia humana conocida.

Dichas secuencias importadas se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad o para reducir, aumentar o modificar la unión, afinidad, tasa de asociación, tasa de disociación, avidéz, especificidad, semivida y cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influir en la unión al FOLR1. Por consiguiente, parte o la totalidad de las secuencias de CDR humanas o no humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones constante y variable se pueden reemplazar con aminoácidos humanos u otros.

Opcionalmente, los anticuerpos también pueden ser anticuerpos humanizados, modificados en superficie, preparados por ingeniería o humanos preparados por ingeniería con retención de alta afinidad para el antígeno FOLR1 y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, los anticuerpos anti-FOLR1 preparados por ingeniería o humanizados (o humanos) y los anticuerpos modificados en superficie se pueden preparar opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados y preparados por ingeniería

conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales, preparadas por ingeniería y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles comúnmente y son conocidos para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras de conformación tridimensional probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del posible rol de los residuos en la función de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno, tal como FOLR1. De esta forma, los residuos marco (FR) se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de consenso e importadas, de forma tal que se logre la característica del anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el o los antígenos diana.

La humanización, modificación en superficie o preparación por ingeniería de los anticuerpos se puede realizar utilizando cualquier método conocido, tal como, pero no limitado a, aquellos descritos en Winter (Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239:1534 (1988)), Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993), Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91(3):969-973 (1994), Roguska et al., *Protein Eng.* 9(10):895-904 (1996), Pat. de EE. UU. Nos. 5.639.641, 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; 4.816.567; WO99/06834; WO97/20032; WO92/11272; WO92/03461; WO94/18219; WO90/05370; WO92/01047; WO93/06213; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; EP 229246; 7.557.189; 7.538.195; y 7.342.110.

El anticuerpo frente a FOLR1 como se describe puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden preparar directamente usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados in vitro o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (ver, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; y la Patente de EE. UU. 5.750.373). Además, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una biblioteca de fagos, donde dicha biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos, como se describe, por ejemplo, en Vaughan et al., 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314, Sheets et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:6157-6162, Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381, y Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Las técnicas para la generación y uso de las bibliotecas de fagos de anticuerpos también se describen en las Patentes de EE. UU. Nos. 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793, 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081; 6.300.064; 6.653.068; 6.706.484 y 7.264.963; y Rothe et al., 2007, *J. Mol. Bio.*, doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018. Las estrategias de maduración por afinidad y las estrategias de transposición de cadena (Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783), son conocidas en la técnica y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

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

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

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos distintos, de los cuales al menos uno se origina en un polipéptido de la invención o como se describe. De manera alternativa, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina se puede combinar con un brazo que se une a una molécula activadora en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG de modo que se centran los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el antígeno particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para dirigir los agentes citotóxicos a las células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelante radionucleido, tales como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Las técnicas para preparar anticuerpos biespecíficos son comunes en la técnica (Millstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science* 229:81; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.* 152:5368; y la Patente de EE. UU. 5.731.168). También se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos (Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991)). Por lo tanto, los anticuerpos frente a FOLR1 pueden ser multiespecíficos.

Un fragmento de anticuerpo puede, por ejemplo, aumentar la penetración del tumor. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto et al., 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81). Los fragmentos de anticuerpo pueden producirse de

manera recombinante. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli* u otras células huésped, permitiendo así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Dichos fragmentos de anticuerpo también se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpo discutidas anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser anticuerpos lineales tal como se describe en la Patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo, y puede ser monoespecífico o biespecífico. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica.

Se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena simple específicos para el receptor 1 de folato humano (ver, la Pat. de EE. UU. No. 4.946.778). Además, los métodos se pueden adaptar para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989)) para permitir una identificación rápida y eficaz de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un receptor 1 de folato, o los derivados, fragmentos, análogos u homólogos de estos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante métodos en la técnica que incluyen, pero no están limitados a: (a) un fragmento F(ab')₂ producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado mediante reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂, (c) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (d) fragmentos Fv.

Adicionalmente se puede desear, en especial en el caso de los fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo para aumentar su semivida sérica. Esto también puede lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión al receptor de salvamento en el fragmento de anticuerpo mediante la mutación de la región adecuada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo en una etiqueta peptídica que se fusiona entonces con el fragmento de anticuerpo en cualquiera de los extremos o en el medio (por ejemplo, mediante síntesis de ADN o peptídica).

Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran dentro del alcance de la presente invención o se describen. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirijan células inmunes a células no deseadas (Pat. de EE. UU. No. 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se puedan preparar in vitro usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, que incluyen los que involucran agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuros o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15, preferiblemente en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29. No obstante, en principio, los anticuerpos modificados como se describe pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con los polipéptidos de un FOLR1 humano. En este sentido, la región variable puede comprender o derivar de cualquier tipo de mamífero al que se puede inducir para que produzca una respuesta humoral y genere inmunoglobulinas contra el antígeno asociado al tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, de primate no humano (por ejemplo, monos cinomolgos, macacos, etc.) o lupino. Tanto las regiones variables como las constantes de las inmunoglobulinas modificadas pueden ser humanas. Las regiones variables de anticuerpos compatibles (en general derivadas de una fuente no humana) se pueden preparar por ingeniería o adaptarse específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. En lo que a esto respecta, las regiones variables se pueden humanizar o alterar de otro modo a través de la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

Con referencia a los anticuerpos modificados como se describe, los dominios variables tanto en la cadena pesada como en la ligera pueden estar alterados por el reemplazo al menos parcial de una o más CDR y, de ser necesario, por el reemplazo parcial de la región marco y cambio de la secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo a partir del cual derivan las regiones marco, se prevé que las CDR derivarán de un anticuerpo de una clase diferente y opcionalmente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR por las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. En cambio, solo puede ser necesario transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión al antígeno. Dadas las explicaciones proporcionadas en las Pat. de EE. UU. Nos. 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, será competencia de aquellos expertos en la técnica, ya sea realizando experimentos de rutina o mediante el método de prueba y error, obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos modificados comprenderán anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos de longitud completa o los fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante han sido delecionados o de otro modo alterados para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tales como el aumento de la ubicación del tumor o la reducción de la semivida sérica cuando se compara con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. La región constante de los anticuerpos modificados puede comprender una región constante humana. Las modificaciones en la

región constante comprenden adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados descritos en la presente memoria pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). Pueden contemplarse las regiones constantes modificadas en donde uno o más dominios se delecionan parcial o totalmente. Los anticuerpos modificados pueden comprender construcciones o variantes con el dominio delecionado en donde se eliminó todo el dominio CH2 (construcciones Δ CH2). En algunas realizaciones, el dominio de región constante omitido se reemplazará por un espaciador de aminoácidos corto (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular típicamente impartida por la región constante ausente.

Se observará que los anticuerpos modificados se pueden preparar por ingeniería para fusionar el dominio CH3 directamente con la región bisagra de los anticuerpos modificados respectivos. En otras construcciones, puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, se podrían expresar construcciones compatibles en donde se ha delecionado el dominio CH2 y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Dicho espaciador se puede añadir, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra permanezca flexible. Sin embargo, debe indicarse que los espaciadores de aminoácidos pueden resultar, en algunos casos, inmunogénicos e incitar respuestas inmunitarias no deseadas contra la construcción. Por consiguiente, cualquier espaciador añadido a la construcción será relativamente no inmunogénico, o incluso se omitirá por completo, de manera de que se mantengan las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la deleción total de los dominios de región constante, se apreciará que los anticuerpos se pueden proporcionar mediante la deleción o sustitución parcial de unos pocos aminoácidos o incluso un único aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente como para reducir de manera sustancial la unión de Fc y de esa manera aumentar la ubicación del tumor. De modo similar, puede ser deseable delecionar simplemente esa parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión de complemento C1Q) que se va a modular. Dichas deleciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida sérica) mientras se dejan otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante del sujeto intactas. Asimismo, tal como se mencionó anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos se pueden modificar mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos, que aumenta el perfil de la construcción resultante. En este sentido, puede ser posible la interrupción de la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, la unión de Fc) mientras se mantienen de manera sustancial la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Determinados anticuerpos modificados pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para aumentar las características deseables, tales como la disminución o el incremento de la función efectora o para proporcionar más uniones de citotoxinas o carbohidratos. En dichos anticuerpos modificados, puede ser deseable la inserción o replicación de secuencias específicas derivadas de los dominios de regiones constantes seleccionados.

Se describen además variantes y equivalentes que son básicamente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, mostrados en la presente memoria. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservativa, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro dentro de la misma clase general, tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. Se conoce bien en la técnica lo que se pretende con una sustitución conservativa de aminoácidos.

Los polipéptidos pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra un FOLR1 humano. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos pueden variarse sin efecto significativo en la estructura o función de la proteína. Se describen además variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra una proteína del receptor de folato humano. Dichos mutantes incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo.

Los polipéptidos y análogos se pueden modificar adicionalmente para contener restos químicos adicionales que no son normalmente parte de la proteína. Estos restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Los restos también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y similares. Una visión global de dichos restos se puede encontrar en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

Los polipéptidos aislados pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Dichos métodos oscilan entre métodos sintéticos de proteína directos para construir una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptido aislado y expresar esas secuencias en un huésped transformado adecuado. Puede construirse una secuencia de ADN utilizando tecnología recombinante por el aislamiento o síntesis de una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo salvaje de interés. Opcionalmente, la secuencia de los polipéptidos como se describe se puede mutagenizar por medio de mutagénesis específica del sitio para proporcionar análogos

funcionales de la misma. Ver, por ejemplo, Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) y Pat. de EE. UU. No. 4.588.585.

5 Se podría construir una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés mediante síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos se pueden diseñar de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionar esos codones que son favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Se pueden emplear métodos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, una secuencia completa de aminoácidos puede ser utilizada para construir un gen retrotraducido. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, se pueden sintetizar y luego ligar varios oligonucleótidos pequeños que codifican partes del polipéptido deseado. Típicamente, los oligonucleótidos individuales contienen protuberancias en 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

15 Una vez ensambladas (por medio de síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se unirán operativamente a una secuencia de control de la expresión adecuada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. Se puede confirmar el ensamblaje adecuado por medio de secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Tal como se conoce en la técnica, para obtener niveles elevados de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen debe encontrarse operativamente unido a las secuencias de control de la expresión de transcripción y traducción que son funcionales en el huésped de expresión elegido.

20 Pueden usarse vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar el ADN que codifica los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, contra FOLR1 humano. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones reproducibles de ADN que tienen fragmentos de ADN sintético o derivados de ADNc que codifican una cadena de polipéptido de un anticuerpo anti-FOLR1, o fragmento del mismo, unido operativamente a elementos adecuados de regulación de la transcripción o traducción que derivan de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. En general, una unidad de transcripción comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que desempeñan un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores de la transcripción, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en una proteína y (3) secuencias adecuadas de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, tal como se describe detalladamente a continuación. Dichos elementos de regulación pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Asimismo, se puede incorporar adicionalmente la capacidad de replicarse en un huésped, normalmente otorgada por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN se encuentran unidas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN de un péptido señal (líder de secreción) se encuentra operativamente unido al ADN de un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a un ribosoma se encuentra operativamente unido a una secuencia codificante si se encuentra ubicado de manera que permite la traducción. Los elementos estructurales destinados a ser utilizados en los sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteínas traducidas por una célula huésped. De manera alternativa, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Opcionalmente, este residuo se puede escindir posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

45 La elección de la secuencia de control de la expresión y del vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de vector/huésped de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus de papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Escherichia coli*, que incluyen pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de rango más amplio de huésped, tal como M13 y fagos filamentosos de ADN de cadena simple.

50 Las células huésped adecuadas para la expresión de un polipéptido o anticuerpo de unión a FOLR1 (o una proteína FOLR1 para usar como antígeno) incluyen células de procariotas, levadura, insecto o eucariotas superiores bajo el control de promotores adecuados. Las procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares de origen mamífero establecidas tal como se describe a continuación. También podrían utilizarse sistemas de traducción sin células. Los vectores de clonación y de expresión adecuados para el uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero están descritos por Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985). La información adicional con respecto a los métodos de producción de proteínas, incluyendo la producción de anticuerpos, se puede encontrar, por ejemplo, en la Publicación de la Patente de EE. UU. No. 2008/0187954, Patente de EE. UU. Nos. 6.413.746 y 6.660.501, y Publicación de Patente Internacional No.. WO 04009823.

60 También se utilizan ventajosamente varios sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto para expresar proteínas recombinantes. Se puede realizar la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero debido

a que dichas proteínas generalmente se pliegan correctamente, se modifican apropiadamente y son completamente funcionales. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares que incluyen, por ejemplo, células L, líneas celulares C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuados unidos al gen que se va a expresar y otras secuencias flanqueantes en 5' o 3' no transcritas, y secuencias en 5' o 3' no traducidas, tales como sitios de unión al ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto se revisan en Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

Las proteínas producidas por un huésped transformado se pueden purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Dichos métodos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad y exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad, tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de recubrimiento de influenza y glutatión S-transferasa, se pueden unir a la proteína para permitir una fácil purificación al pasar por una columna de afinidad adecuada. Asimismo, las proteínas aisladas pueden caracterizarse físicamente utilizando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteínas recombinantes en medios de cultivo se pueden concentrar en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado en una matriz de purificación adecuada. De manera alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato con grupos dietilaminoetil (DEAE) laterales. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos utilizados normalmente en la purificación de proteínas. De manera alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Por último, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) utilizando medios hidrofóbicos de RP-HPLC, por ejemplo, gel de sílice con cadenas laterales metilo u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente un agente de unión a FOLR1. Se pueden emplear también algunas o todas las etapas de purificación mencionadas anteriormente, en varias combinaciones, para obtener una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, por extracción inicial de sedimentos celulares, seguido por una o más etapas de concentración, separación por adición de sales, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. También se puede usar cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación finales. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden disrupirse por cualquier método conveniente, que incluye ciclos de congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica o uso de agentes de lisis celular.

Los métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, los que se describen en las Publicaciones de Patentes de EE. UU. Nos. 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

IV. Polinucleótidos

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 de: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15, preferiblemente dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29. la presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une específicamente a FOLR1, en donde dicho polipéptido comprende las secuencias de: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15. Se describen polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido que se une específicamente a un receptor FOLR1 humano o un fragmento de dicho polipéptido. Por ejemplo, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo frente a un FOLR1 humano o codifica un fragmento de dicho anticuerpo. Los polinucleótidos pueden encontrarse en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y puede ser bicatenario o monocatenario, y, si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido). El polinucleótido puede ser un ADNc o un ADN que carece de uno o más intrones endógenos.

Un polinucleótido puede ser un polinucleótido de origen no natural. Un polinucleótido puede producirse de forma recombinante.

Los polinucleótidos pueden estar aislados. Los polinucleótidos pueden ser sustancialmente puros. Un polinucleótido puede purificarse de componentes naturales.

La invención proporciona o describe un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-40. Se describe un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % con las SEQ ID NO: 1-40.

Los polinucleótidos pueden comprender la secuencia codificante para el polipéptido maduro fusionada en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que asiste, por ejemplo, en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped (por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido de la célula). El polipéptido con una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula huésped para producir la forma madura del polipéptido. Asimismo, los polinucleótidos pueden codificar una proproteína que es la proteína madura más residuos de aminoácidos en 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que se escinde la prosequencia, permanece una proteína madura activa.

Los polinucleótidos pueden comprender la secuencia codificante para el polipéptido maduro fusionada en el mismo marco de lectura a una secuencia de marcador que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia de marcador puede ser una etiqueta de hexa-histidina proporcionada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un huésped bacteriano, o la secuencia de marcador puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína hemaglutinina de influenza cuando se usa un huésped mamífero (por ejemplo, células COS-7).

Se describen variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos y/o derivados.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, no codificantes o ambas. Las variantes del polinucleótido pueden contener alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Las variantes de nucleótidos pueden producirse por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polinucleótido pueden producirse por una variedad de motivos, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón de un huésped particular (cambiar los codones del ARNm humano a aquellos preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*).

Asimismo, se proporcionan o describen los vectores y células que comprenden los polinucleótidos, respectivamente.

V. Detección

Cuando se usa un formato de ELISA en sándwich, el anticuerpo de captura no estará marcado. El anticuerpo de detección estará marcado directamente o se detectará indirectamente mediante la adición (después de eliminar por lavado el exceso de anticuerpo de detección) de un exceso molar de un segundo anticuerpo marcado dirigido contra el primer anticuerpo.

El marcaje utilizado para el anticuerpo de detección es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de los anticuerpos de FOLR1. Los ejemplos de marcaje adecuados son los numerosos marcajes conocidos por su uso en inmunoensayos, incluyendo restos que pueden ser detectados directamente, tales como fluorocromo, marcajes quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que deben reaccionar o derivatizarse para ser detectados. Los ejemplos de dichos marcajes incluyen los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Pat. de EE. UU. No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, biotina/estreptavidina, biotina/estreptavidina- β -galactosidasa con MUG, marcajes de rotación, marcajes bacteriófagos, radicales libres estables y similares. Tal como se mencionó anteriormente, la detección fluorimétrica es un ejemplo.

Se encuentran disponibles métodos convencionales para unir estos marcajes covalentemente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, pueden emplearse agentes de acoplamiento tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, benzidina bis-diazotizada y similares para etiquetar los anticuerpos con los marcajes fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos descritos anteriormente. Véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. Nos. 3.940.475 (fluorimetría) y 3.645.090 (enzimas); Hunter et al. *Nature* 144:945 (1962); David et al. *Biochemistry* 13:1014-1021 (1974); Pain et al. *J. Immunol. Methods* 40:219-230 (1981); y Nygren J. *Histochem. and Cytochem.* 30:407-412 (1982). Los marcajes pueden ser fluorescentes para aumentar la amplificación y sensibilidad a 8 pg/ml, más preferentemente biotina con estreptavidina- β -galactosidasa y MUG para amplificar la señal. Puede usarse un marcaje colorimétrico, por ejemplo, donde el anticuerpo detectable se biotinila y el medio de detección es avidina o estreptavidina-peroxidasa y 3,3',5,5'-tetrametil bencidina.

La conjugación de dicho marcaje, que incluye las enzimas, con el anticuerpo es un procedimiento de manipulación estándar para alguien con experiencia en las técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan et al. "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone y H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nueva York, N.Y., 1981), p. 147-166.

- 5 Después de la adición del último anticuerpo marcado, se determina la cantidad de anticuerpo unido mediante la eliminación del exceso de anticuerpo marcado sin unir con lavados y la posterior medición de la cantidad de marcaje unido usando un método de detección adecuado para el marcaje, y la correlación de la cantidad medida con la cantidad de FOLR1 diseminado o FOLR1 en células tumorales circulantes en la muestra biológica. Por ejemplo, en el caso de las enzimas, la cantidad de color desarrollado y medido representará una medición directa de la cantidad de FOLR1 diseminado presente o FOLR1 presente en células tumorales circulantes. Específicamente, si el marcaje es con HRP, el color puede detectarse usando el sustrato 3,3',5,5'-tetrametil bencidina mediante absorbancia a 450 nm.

VI. Ensayos en células tumorales circulantes

- 15 Los anticuerpos anti-FOLR1 pueden usarse también para la detección de FOLR1 en un ensayo de células tumorales circulantes. Las células tumorales circulantes (CTC) son células que se han diseminado en la vasculatura desde un tumor y circulan en el torrente sanguíneo. Las CTC están presentes en la circulación en concentraciones extremadamente bajas. En general, las CTC se enriquecen a partir de la sangre o plasma del paciente mediante varias técnicas conocidas en la técnica. Las CTC pueden teñirse para detectar marcadores específicos usando métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, métodos basados en la citometría (por ejemplo, citometría de flujo) y métodos basados en IHC. Las CTC pueden teñirse para detectar marcadores de proteínas únicos para las células tumorales lo que permite la identificación y distinción de las CTC de las células sanguíneas normales. Las CTC también pueden teñirse para detectar FOLR1 usando los anticuerpos de la invención o como se describe, incluyendo, pero no limitado a, FR1-9, que es según la invención, y FR1-13. El análisis de las CTC también puede incluir el análisis cuantitativo del número de CTC y/o del número de CTC positivas para FOLR1. Los anticuerpos de FOLR1 de la invención o descritos en la presente memoria pueden usarse para teñir las CTC aisladas a partir de un sujeto que padece cáncer para medir el FOLR1 presente en las CTC. Un aumento en las CTC que expresan FOLR1 puede ayudar a identificar que el sujeto tiene un cáncer que posiblemente responda a una terapia basada en FOLR1 o permita la optimización de un régimen terapéutico con un anticuerpo o inmunoconjugado de FOLR1. La cuantificación de FOLR1 en CTC puede proporcionar información sobre el estadio del tumor, respuesta a la terapia y/o progresión de la enfermedad. Puede usarse como biomarcador de pronóstico, predictivo o farmacodinámico. Además, puede usarse la tinción de las CTC para detectar marcadores particulares incluyendo, pero no limitado a, FOLR1, como una biopsia líquida ya sea sola o en combinación con el análisis de marcadores tumorales adicionales de muestras de biopsia sólidas.

VII Kits

- 35 Con fines de conveniencia, el método de ensayo puede proporcionarse en forma de un kit. Dicho kit es una combinación empaquetada que incluye los elementos básicos de: (a) un primer reactivo, que puede ser un reactivo de captura, compuesto por anticuerpos monoclonales contra el FOLR1 humano; y/o (b) un segundo reactivo que es un reactivo de detección. El reactivo de detección también puede comprender anticuerpos monoclonales frente a FOLR1, pero también puede comprender anticuerpos detectables (marcados o no marcados) que se unen a FOLR1. Los elementos básicos se definen anteriormente en la presente memoria y en los Ejemplos a continuación.

- 40 Cuando el primer reactivo y el segundo reactivo son anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos, o polipéptidos que se unen a FOLR1, el primer y segundo reactivos son anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos o polipéptidos diferentes. El primer reactivo puede unirse a un epítipo de FOLR1 diferente del segundo reactivo de FOLR1. Ni el primer reactivo ni el segundo reactivo pueden inhibir de manera competitiva la unión de un agente activo (por ejemplo, un agente activo que comprende un anticuerpo huMOv19 o un fragmento de unión al antígeno del mismo) de unirse a FOLR1.

El kit puede comprender adicionalmente un soporte sólido para los reactivos de captura, que puede proporcionarse como un elemento independiente o en el que los reactivos de captura ya se encuentran inmovilizados. De esta forma, los anticuerpos de captura en el kit pueden inmovilizarse en un soporte sólido o pueden inmovilizarse en dicho soporte que está incluido en el kit o proporcionado independientemente del kit.

- 50 El reactivo de captura puede utilizarse para recubrir una placa de microtitulación. El reactivo de detección puede ser anticuerpos marcados detectados directamente o anticuerpos no marcados que se detectan por anticuerpos marcados dirigidos contra los anticuerpos no marcados producidos en una especie diferente. Cuando el marcaje es una enzima, el kit incluirá normalmente sustratos y cofactores requeridos por la enzima, y cuando el marcaje es un fluoróforo, un precursor de color que proporciona el cromóforo detectable. Cuando el reactivo de detección no está marcado, el kit puede comprender adicionalmente un medio de detección para los anticuerpos detectables, tales como los anticuerpos marcados dirigidos a los anticuerpos no marcados, por ejemplo, en un formato detectado de manera fluorimétrica. Normalmente, cuando el marcaje es una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima, cuando la etiqueta es un fluoróforo, un precursor de color que proporciona un cromóforo detectable y cuando el marcaje es biotina, una avidina tal como avidina, estreptavidina o estreptavidina conjugada con HRP o β -galactosidasa con MUG.

El reactivo de captura puede ser el anticuerpo FR1-9 de FOLR1 y el reactivo de detección puede ser el anticuerpo FR1-13 de FOLR1. El FR1-13 puede estar biotinilado.

Además, el kit contiene típicamente instrucciones para llevar a cabo el ensayo, y/o proteína FOLR1, o fragmentos de la misma (por ejemplo, el dominio extracelular de FOLR1 o el dominio extracelular de FOLR1 y todo o una parte del dominio de enlace GPI) como un estándar de antígeno, así como otros aditivos tales como estabilizadores, tampones de incubación o lavado, y similares. El estándar de antígeno de FOLR1 puede ser una inmunoadhesina de FOLR1-Fc. El kit también puede incluir instrucciones para la detección y puntuación de la expresión del FOLR1.

Los componentes del kit se proporcionarán en relaciones predeterminadas y las cantidades relativas de los diversos reactivos variarán de forma adecuada para proporcionar concentraciones de los reactivos en disolución que maximicen de forma sustancial la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, usualmente liofilizados, que incluyen excipientes que, en disolución, proporcionarán una disolución de reactivo con la concentración adecuada para combinarse con la muestra que va a ensayarse.

Las realizaciones de la presente descripción se pueden definir adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que describen en detalle la preparación de determinados anticuerpos y métodos para usar los anticuerpos.

Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria son solo para propósitos ilustrativos.

Ejemplo 1

Desarrollo de anticuerpos anti-FOLR1 murinos

Hubo dos series diferentes de inmunización/cribado. En la primera serie, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con aproximadamente 5×10^6 células KB que expresaban FOLR1 (American Tissue Culture Collection, ATCC CCL-17). En la segunda serie, se usaron 300-19 células que expresaban el FOLR1 humano en su superficie para inmunizar a los ratones. Para preparar estas células, se obtuvo la secuencia de aminoácidos de FOLR1 humano del sitio web de NCBI (acceso NP_057937), luego se optimizó por codones y se sintetizó por Blue Heron biotechnologies, flanqueada por sitios de restricción EcoRI y Xba1 para facilitar la clonación en el vector de expresión de mamíferos pSRa. Se transfectaron 300-19 células, una línea celular pre-B derivada de un ratón Balb/c (Reth et al., *Nature*, 317:353-355 (1985)), con el plásmido de expresión pSRa-FolR1 para expresar de manera estable los altos niveles de FOLR1 humano en la superficie de la célula. Los protocolos de inmunización estándar conocidos para los expertos, por ejemplo, tales como aquellos usados en ImmunoGen, Inc. se aplicaron para ambas series. Los ratones inmunizados se reforzaron con antígeno tres días antes de ser sacrificados para la generación de hibridomas. Los bazo de los ratones se recogieron de conformidad con los protocolos animales estándar, tales como, por ejemplo, triturar el tejido entre dos portaobjetos microscópicos esmerilados estériles para obtener una suspensión celular única en un medio RPMI-1640. Las células del bazo se centrifugaron, sedimentaron, lavaron y fusionaron con un mieloma murino, tal como, por ejemplo, células P3X63Ag8.653 (Kearney et al., *J. Immunol.*, 123:1548-1550 (1979)) usando polietilén glicol-1500 (Roche 783 641). Las células fusionadas se suspendieron nuevamente en un medio de selección RPMI-1640 que contenía hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma H-0262) y se seleccionaron para el crecimiento en placas de cultivo con fondo plano de 96 pocillos (Corning-Costar 3596, 0,2 ml de suspensión celular por pocillo) a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de 5 días de incubación, se retiraron 0,1 ml del sobrenadante del cultivo de cada pocillo y se reemplazaron con 0,1 ml del medio RPMI-1640 que contenía el suplemento de hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). Se continuó la incubación a 37 °C con CO₂ al 5 % hasta que los clones del hibridoma estaban listos para el cribado de anticuerpos. También pueden usarse otras técnicas de inmunización y producción de hibridomas, incluyendo las descritas en Langone et al. (Eds., "Immunochemical Techniques, Parte I", *Methods in Enzymology*, Academic Press, volumen 121, Florida) y Harlow et al. ("Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1988)).

Ejemplo 2

Cribado y selección de hibridomas.

Se utilizaron 300-19 células de FOLR1 transfectadas con FOLR1 humano y células KB en la primera y segunda serie de cribados correspondientes. Los sobrenadantes del cultivo del hibridoma se cribaron mediante citometría de flujo para detectar la secreción de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen a células positivas para FOLR1, tal como las células 300-19 que expresan FOLR1 o células KB, pero no a las células negativas para FOLR1, tal como las células 300-19 no transfectadas. Se incubaron 0,1 ml de sobrenadantes de hibridoma durante 3 horas con o bien células positivas para FOLR1 o bien las células 300-19 no transfectadas (1×10^5 células por muestra) en 0,1 ml de tampón FACS (medio RPMI-1640 suplementado con suero de cabra normal al 2 %). Luego, las células se centrifugaron, se sedimentaron, se lavaron e incubaron durante 1 hora con 0,1 ml de anticuerpo IgG antirratón de cabra conjugado con PE (el cual se obtiene de, por ejemplo, Jackson Laboratory, 6 µg/mL en tampón FACS). Las células se centrifugaron, se sedimentaron una vez más, se lavaron con tampón FACS y se suspendieron nuevamente en 0,2 ml de PBS que contenía formaldehído al 1 %. La fluorescencia asociada a las células se midió utilizando un

citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador multipocillos de HTS o un citómetro de flujo de barrido FACS y se analizó utilizando CellQuest Pro (todos de BD Biosciences, San Diego, EE. UU.). Los clones de hibridoma positivos se subclonaron mediante dilución limitante. Se eligió un subclón de cada hibridoma, que mostró la misma reactividad contra FOLR1 que las células parentales mediante citometría de flujo, para análisis sucesivos. Los subclones estables se cultivaron y el isotipo de cada anticuerpo anti-FOLR1 secretado se identificó utilizando reactivos de isotipado comerciales (Roche 1493027). Los anticuerpos murinos se purificaron con proteína A a partir de medio de hibridoma aclarado tal como se describe anteriormente. Estos anticuerpos se designaron anticuerpos FR-1.

Un clon, muFR1-13, se identificó como un clon anti-FOLR1 que (1) no compitió o perjudicó la unión de Mov19 simultáneamente al mismo antígeno, y (2) tuvo una especificidad de unión alta para la diana tal como se demostró mediante técnicas de citometría de flujo comunes (Figura 2A y 2B). Estas dos características eran necesarias en el desarrollo de este ensayo, y por lo tanto, el clon muFR1-13 fue elegido para ser utilizado en el ensayo.

Del panel de 64 clones anti-FOLR1 restantes, se requirió un segundo anticuerpo para el ensayo que mantuviera los mismos criterios que fueron necesarios para muFR1-13. De manera adicional, el segundo anticuerpo no podría competir o perjudicar la unión de muFR1-13 simultáneamente al mismo antígeno (es decir, Mov19, muFR1-13 y el clon final deben tener epítomos separados de forma distinta). Para satisfacer estas condiciones, se llevaron a cabo una serie de experimentos de ELISA de competición en el panel de 65 clones antifolato restantes (Figura 3A). Si un anticuerpo comparte el mismo epítopo, o uno estéricamente similar, con el anticuerpo que se está detectando, se observa una reducción en la señal (Figura 3B). Utilizando este método, se identificaron 5 anticuerpos de los 64 ensayados que poseían epítomos que compiten con Mov19, y por lo tanto se obviaron de cualquier consideración adicional.

El mismo método se repitió sustituyendo biotina conjugada con Mov19 con biotina conjugada con muFR1-13 (Figura 4). Utilizando este método, se identificaron 6 clones adicionales que poseían epítomos que compiten con muFR1-13, y por lo tanto se obviaron de cualquier consideración adicional. De los 53 clones restantes, 13 clones más mostraron tener poca afinidad y se obviaron de cualquier consideración adicional.

Los 40 clones restantes se cribaron utilizando un formato de ELISA similar tal como se muestra en la Figura 1. Los 40 clones se utilizaron para recubrir alternativamente la placa de ensayo en lugar de muFR1-9 en el diagrama, y las curvas de unión resultantes se analizaron como se muestra en la Figura 5. Se consideró que los anticuerpos que contenían la respuesta mitad de la máxima (CE50) más baja tenían la especificidad de unión más alta para FOLR1, y fueron por lo tanto elegidos como los candidatos principales para el ensayo. Las afinidades de unión de los 4 clones principales ensayados en este método variaron de $\sim 1\text{-}5 \times 10^{-9}$ M una vez que se encontraban disponibles materiales nuevos y de mejor calidad para los ensayos.

Ejemplo 3

Purificación de los anticuerpos monoclonales murinos

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

Ejemplo 4

Caracterización de la unión mediante citometría de flujo

La especificidad de unión se ensayó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos purificados. Cada anticuerpo se incubó durante 3 horas con o bien células 300-19 que expresan FOLR1 o bien las células 300-19 no transfectadas (1×10^5 células por muestra) en 0,1 ml de tampón FACS (medio RPMI-1640 suplementado con suero de cabra normal al 2 %). Luego, las células se sedimentaron, se lavaron e incubaron durante 1 hora con 0,1 ml de anticuerpo IgG antiratón de cabra conjugado con FITC (el cual se obtiene de, por ejemplo, Jackson Laboratory, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón FACS). Las células se sedimentaron una vez más, se lavaron con tampón FACS y se suspendieron nuevamente en 200 μl de PBS que contenía formaldehído al 1 %. Las muestras se adquirieron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador multipocillos de HTS o un citómetro de flujo de barrido FACS y se analizaron utilizando CellQuest Pro (todos de BD Biosciences, San Diego, EE. UU.). Los histogramas de FACS de los anticuerpos anti-FOLR1 mostraron un cambio de fluorescencia, mientras que las células 300-19 parentales no lo hicieron. Además, no se detectó un cambio de fluorescencia significativo cuando cualquiera de las líneas celulares se incubó solo con anticuerpo IgG antihumano de cabra conjugado con FITC.

Ejemplo 5

Clonación y secuenciación de las regiones VL y VH de muFR1-9 y FR1-53

El ARN celular total se preparó a partir de 5×10^6 células de hibridoma utilizando un kit Rneasy (QIAGEN) de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente, se sintetizó el ADNc a partir del ARN total utilizando el kit de síntesis de ADNc SuperScript II (Invitrogen). El procedimiento para la primera ronda de la reacción de PCR degenerada en el ADNc derivado de las células de hibridoma se basó en métodos descritos en Wang et al. (2000) *J Immunol Methods*. 13 de enero; 233(1-2):167-77) y Co et al. (1992) *J Immunol*. 15 de febrero; 148(4):1149-54). Las secuencias de VH se amplificaron mediante PCR utilizando los siguientes cebadores degenerados: EcoMH1 CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID NO:45), EcoMH2 CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID NO:41), y BamIlgG1 GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGCTGTTTTGGC (SEQ ID NO:42). Las secuencias de VL se amplificaron mediante PCR utilizando los siguientes cebadores degenerados: SacIMK GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID NO:43) y HindKL TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO:44). (las bases mixtas se definen de la siguiente manera: N=G+A+T+C, S=G+C, Y=C+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T).

Las mezclas de reacción de PCR se pasaron entonces por un gel de agarosa de baja fusión al 1 %, las bandas de 300 a 400 pb se escindieron, se purificaron utilizando mini columnas de ADN Zymo y se enviaron a Agencourt Biosciences para secuenciación. Los cebadores de PCR 5' y 3' respectivos se utilizaron como cebadores de secuenciación para secuenciar los ADNc de región variable de ambas direcciones. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL se obtuvieron al traducir los resultados de la secuenciación de ADN con software de VectorNTI.

Las secuencias de ADNc de la región variable preliminares incluyeron secuencias de extremo 5' derivadas de los cebadores de PCR degenerados en lugar del ARNm del anticuerpo murino para que las comparaciones de secuencias con secuencias de la línea germinal del anticuerpo de ratón facilitaran la identificación y eliminación de estos artefactos de secuenciación. El sitio de IgBlast de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) se utilizó para buscar las secuencias de líneas germinales murinas a partir de las cuales se derivaron las secuencias de ADNc de anticuerpo preliminares y las secuencias de extremo 5' derivadas de cebadores se reemplazaron con las secuencias de líneas germinales correspondientes. Las secuencias de región variable limpiadas se combinaron entonces con las secuencias de referencia de NCBI para las regiones constantes IgG1 y la kappa murina (números de acceso AJ294736.1 y D78344.1 respectivamente) para ensamblar secuencias de anticuerpos murinos de longitud completa esperadas. El peso molecular de las cadenas ligeras y pesadas de FR1-9 y FR1-53 murinos esperadas se calculó entonces y se comparó con la masa medida mediante análisis de cromatografía líquida/espectrofotometría de masa (LC/MS).

Los esfuerzos iniciales para secuenciar la cadena ligera de FR1-9 murina, siguiendo los métodos descritos anteriormente, no fueron exitosos por lo tanto se emplearon métodos alternativos. Se utilizaron las secuencias de cadena ligera de hibridomas relacionados con FR1-9 para diseñar el cebador de PCR KS77LClead (tttgagctctggattccagctccagaggt) para hibridarlo a la secuencia líder presumida del marco de cadena ligera de FR1-9. Esta reacción de PCR y secuenciación del cebador líder se llevó a cabo tal como se describe anteriormente y proporcionó una secuencia de ADNc completa que codifica una cadena ligera que concuerda con la masa de la cadena ligera de FR1-9 medida mediante LC/MS.

Ejemplo 6

Muestra de control de fusión Fc FOLR1

Se construyó una molécula de fusión Fc receptor 1 de folato humano como una fuente de antígeno soluble alternativa a la proteína de unión al folato humano típicamente derivada de la leche humana. El extremo amino del ADNc del FOLR1 humano, descrito en el ejemplo de inmunización anterior, fue escindido de la secuencia de longitud completa con una digestión de restricción EcoRI y Pst1. Este fragmento contenía el ADNc que codifica los 233 aminoácidos desde el péptido señal N terminal hasta los residuos justo en 5' del sitio de unión GPI de huFolR1 (acceso NM_016731.2 de NCBI). Un enlazador de oligonucleótido Pst1 a BamHI facilitó la clonación del fragmento FoIR1 en marco con las secuencias de región constante de anticuerpo IgG2A murino CH3, CH2 y bisagra (P01863 de NCBI) en el plásmido de expresión de mamífero pmuFc2ANL-EK. Después, la proteína de fusión FoIR1-Fc humana se expresó mediante transfecciones transitorias o estables en líneas celulares huésped de mamífero tales como las células CHO o HEK-293T. Dado que la proteína de fusión de 475 aminoácidos contiene la región constante de IgG2A murina, la molécula se purificó siguiendo los procedimientos de purificación de anticuerpos murinos estándares descritos anteriormente.

Ejemplo 7

Ensayo ELISA de antígeno diseminado

Para asegurar que el rendimiento de los materiales era continuo tal como se esperaba, a todos los anticuerpos se cribaron para determinar la unión mediante métodos de citometría de flujo y ELISA conocidos en la técnica. La

citometría de flujo se realizó utilizando células T47D humanas que expresaban FOLR1 cultivadas utilizando técnicas de cultivo celular in-vitro conocidas en la técnica. Los anticuerpos se unieron a estas células y se detectaron indirectamente utilizando un anticuerpo de detección anti-murino de cabra con Alexa-fluor 488 en una máquina FACScalibur (Figura 6A-B). Se aplicaron los mismos métodos a los otros anticuerpos y se determinó que los anticuerpos seleccionados finales FR1-13 y FR1-9 mostraban una afinidad de unión de aproximadamente 1.3×10^{-9} M y 2.4×10^{-9} M respectivamente en ambos métodos.

Es importante que el ensayo solo detecte FOLR1, y no FOLR2 o especialmente FOLR3 (encontrados comúnmente como una proteína diseminada en el plasma humano), ya que el Mov19 es específico para FOLR1 solamente. Para determinar esto, los cuatro clones principales se cribaron mediante kits de ELISA comercialmente disponibles (Figuras 7A-B). El anticuerpo de detección de control positivo muestra una señal positiva sobre el fondo que indica la detección de FOLR2 o FOLR3. Los anticuerpos restantes (FR1-9, FR1-53, FR1-62, FR1-64, y Mov19) no producen una señal en el ensayo, y por lo tanto no se unen a FOLR2 o FOLR3.

De manera adicional, la presencia de ácido fólico unido a FOLR1 podría ocultar potencialmente el epítipo de los anticuerpos elegidos. Para asegurar que el ensayo detectara FOLR1 en cantidades fisiológicas de ácido fólico en sangre humana, el ácido fólico se incubó previamente con la proteína purificada estándar FOLR1 y se añadió a la placa de ensayo. Tal como se muestra en la Figura 8, la presencia de ácido fólico tuvo un impacto insignificante en la afinidad de detección del ensayo en comparación con los controles positivos que no contenían ácido fólico. Por lo tanto, se concluyó que el ensayo podría detectar FOLR1 incluso en la presencia de ácido fólico unido.

Dado que ninguno de los cuatro clones de anticuerpos principales (FR1-9, 53, 62, o 64) mostraron interferencia con la unión de Mov19 o FR1-13, y dado que no se observaron propiedades de unión adversas en presencia de FOLR2, FOLR3, o ácido fólico, estos cuatro candidatos de los 64 clones originales fueron viables para ser utilizados en el ensayo. De estos cuatro clones, se determinó que los clones FR1-9 y FR1-53 tenían afinidades de unión más altas en comparación con FR1-62 y FR1-64. La producción del anticuerpo FR1-53 a partir de su hibridoma parental produjo un rendimiento consistentemente más bajo, y por lo tanto se eligió al clon FR1-9 por su facilidad para producir anticuerpos, pureza de anticuerpos más alta y porcentaje de monómeros.

En los esfuerzos para optimizar el ensayo, se utilizó un enfoque sistemático en el que se optimizaron las concentraciones de FR1-9, FR1-13 biotilado, Strp-HRP y sus respectivos tiempos de incubación utilizando la proteína de fusión FOLR1-Fc como el estándar de antígeno. La fusión FOLR1-Fc es un péptido de fusión de huFOLR1 y bisagra, CH2, CH3 de IgG2A murino. El criterio para establecer las condiciones optimizadas fueron las señales reproducibles con una relación de señal-ruido alta, efectos de matriz mínimos en muestras de plasma humana, alta repetitividad y precisión y el límite de detección más bajo.

Más específicamente, el ensayo se realizó al recubrir una placa de ensayo con muFR1-9 a $2 \mu\text{g/mL}$ e incubando. Después de bloquear con una proteína no específica, se añadieron las muestras (incluyendo los estándares de antígeno y muestras de plasma humano) a las placas de ensayo para incubarlas. Las placas se lavaron entonces y se añadió anticuerpo de detección muFR1-13b ($2 \mu\text{g/mL}$) a cada pocillo. Las placas se lavaron nuevamente antes de añadir un exceso molar de peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (1:5.000). La placa se lavó una vez más antes de añadir 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). La TMB reaccionó con la peroxidasa para formar un color azul, con una intensidad proporcional a la cantidad de FOLR1 presente en la muestra. La reacción se detuvo con una disolución que contenía ácido, que volvió el color amarillo. El ensayo se leyó entonces en un lector de placas Spectramax para determinar la intensidad de la reacción de color en cada muestra (absorbancia). Cuando fue necesario, se generó una curva de respuesta a la dosis sigmoidea (pendiente variable) con el software Graphpad Prism v5.04 utilizando la ecuación 4PL: $Y = \text{parte inferior} + (\text{parte superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{-(\text{LogCE50-X}) \times \text{pendiente de Hill}})$ para todas las series de diluciones.

Para determinar la adecuación del formato ELISA final, se ensayaron las muestras de ascitis humana provenientes de una fuente que no es un tumor y de plasma de pacientes con cáncer de ovario humano. En pacientes con fluido de ascitis que no tienen tumores, se analizaron 15 muestras para determinar la presencia de FOLR1. No se detectó FOLR1 por el ensayo en ninguna de las 15 muestras, y no se observaron falsos positivos debido a efectos de la matriz (Figura 9). De manera alternativa, a estas muestras de ascitis se les añadió proteína FOLR1 humana purificada y se realizó la detección posterior. La recuperación de la proteína FOLR1 tal como se determina por el ensayo fue mayor del 85 % de la cantidad añadida conocida (no mostrado). Por lo tanto, se asumió que no había proteínas que interfirieran en el fluido de ascitis humano no asociado a tumores incluso sin dilución de la muestra.

El mismo análisis se realizó en plasma humano normal combinado (el combinado fue $n=10$ pacientes por lote). No se detectó FOLR1 endógeno a través del ensayo, y no se descubrieron proteínas que interfirieran en las muestras no diluidas de plasma humano con proteína huFOLR1-Fc purificada añadida (Figura 10). Las muestras de plasma con cáncer de ovario humano fueron proporcionadas por el Dana Farber Cancer Institute o Mass General Hospital. De las 72 muestras analizadas hasta la fecha, se identificó que 7 muestras poseían niveles detectables de FOLR1 con un intervalo de 0,7 a 30,6 nM. Se muestra un análisis representativo de estos datos en la Figura 11. Aquí, tres de ocho muestras contenían niveles detectables de FOLR1 que exhibían 0,74, 0,91 y 30,6 nM para las muestras PB105, PB106 y PB109, respectivamente. El método para la interpolación de estos datos a partir de una curva estándar relevante generada utilizando huFOLR1-Fc se muestra en la Figura 12.

Ejemplo 8

Ensayo de células tumorales circulantes

Se seleccionaron tres líneas celulares con niveles variados de expresión de FOLR1 como representativas de expresión alta (KB), expresión baja (OVCAR3) y sin expresión (A549). Se titularon FR1-9 y FR1-13 sin marcar, así como el anticuerpo anti-FOLR1 comercial ("FRA comercial") y se determinaron las titulaciones óptimas para cada uno de los anticuerpos utilizando detección de citometría de barrido láser (LSC, por sus siglas en inglés) sobre las líneas celulares seleccionadas. La fluorescencia se midió como intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) y se muestra en la Figura 13. Los tres anticuerpos mostraron expresión del receptor de folato en las células KB. Las diluciones óptimas se identificaron para cada anticuerpo de la siguiente manera: 1:5 para el FRA comercial, 1:100 para muFR1-9, y 1:200 para muFR1-13. De los anticuerpos ensayados, el anticuerpo comercial proporcionó la mejor relación entre señal y fondo (8,0 frente a 4,07 (muFR1-9) y 4,19 (muFR1-13)), pero solo muFR1-9 mostró una señal en las células OVCAR3 (aproximadamente 30 % más señal que las células A549). Véase la Figura 14.

Para las aplicaciones que incluyen monitorear el tratamiento o eficacia con IMGN853, el anticuerpo seleccionado para ser utilizado en un ensayo CTC no debería competir con el componente del anticuerpo de IMGN853 (es decir, huMov19 (M9346A)) para la unión a FOLR1. Se llevaron a cabo ensayos de competición para determinar si cualquiera de los anticuerpos competía con el anticuerpo IMGN853 para la unión a FOLR1. Para estos ensayos, las células A549 (negativas) y KB (con expresión alta) se trataron con el anticuerpo M9346A o solo el vehículo. Las células se lavaron entonces y se tiñeron con cada uno de los tres anticuerpos, y la expresión se analizó utilizando LSC. Los resultados se proporcionan en la Figura 15. Las barras claras (izquierda) representan solo el vehículo, y las barras oscuras (derecha) representan las células tratadas IMGN853. Si existe competición con el IMGN853 terapéutico, entonces la barra oscura (derecha) será menor que la barra más clara (izquierda) en las células KB. Los resultados en la Figura 15 muestran que el anticuerpo FRA comercial compite para la unión con IMGN853 (disminución de ~66 % en la señal FRA), mientras que los anticuerpos muFR1-9 y muFR1-13 no se vieron afectados por el tratamiento de IMGN853.

Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran que muFR1-9 y muFR1-13 no compitieron con IMGN853, lo que los convierte en candidatos más deseables para su uso en un ensayo que monitorea los niveles de FOLR1 en un fluido corporal (por ejemplo, sangre o plasma), célula tumoral circulante o muestra de tejido, después del tratamiento con IMGN853. Además, muFR1-9 fue más sensible y demostró la capacidad única de detectar la expresión en células OVCAR3 que tenían niveles de expresión bajos y es el anticuerpo candidato preferido para estos tipos de ensayos.

Ejemplo 9

30 Detección de FOLR1 en las células tumorales circulantes (CTC) aisladas de pacientes con cáncer de ovario y NSCLC.

Se toman muestras de sangre de pacientes con cáncer de ovarios o con cáncer NSCLC en los siguientes puntos de tiempo: cribado (hasta 28 días antes de la línea base); línea base; antes del ciclo 3; y al finalizar el ciclo 4. Las CTC están enriquecidas de las muestras y teñidas para CK, CD45, núcleos y FOLR1 utilizando los anticuerpos y las diluciones descritos en el Ejemplo 8, anteriormente. El número de CTC (es decir, células nucleadas CK+/CD45-), el número de células nucleadas CK-/CD45-, la expresión de FOLR1 en CTC, el número de células nucleadas con CK-/CD45-, y el porcentaje de CTC positivas para FOLR1 y células nucleadas CK-/CD45- se determinan por LSC para cada muestra. Los datos se utilizan para determinar los niveles de expresión de FOLR1 en CTC en varios puntos de tiempo durante el ensayo clínico de Fase I para IMGN853.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TESTA, NATHAN E.

CARRIGAN, CHRISTINA N.

AB, OLGA

5 TAVARES, DANIEL

WOLF, BENI B.

<120> Kits y ensayos de diagnóstico para la detección del receptor 1 de folato

<130> 2921.037PC02/EKS/CLD

10

<140> Para ser asignado

<141> Con la presente

<150> 61/695.791

15 <151> 31-08-2012

<150> 61/756.254

<151> 24-01-2013

20 <160> 49

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> muFR1-9 (VH-CDR1)

<400> 1

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 2

35 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-9 (VH-CDR2)

5

<400> 2

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

Gly

<210> 3

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> muFR1-9 (VH-CDR3)

<400> 3

Glu Leu Thr Gly Thr Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-13 (VH-CDR1)

25

<400> 4

Arg Tyr Ser Val His
1 5

<210> 5

<211> 16

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

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

Glu

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-62 (VH-CDR3)

<400> 12

Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Arg Pro Val Asp Tyr
1 5 10

10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> muFR1-9 (VL-CDR1)

<400> 13

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

20

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> muFR1-9 (VL-CDR2)

<400> 14

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

30

<210> 15

ES 2 788 151 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> muFR1-9 (VL-CDR3)

<400> 15

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Gln Val Thr
1 5 10

10 <210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> muFR1-13 (VL-CDR1)

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Leu
1 5 10

20 <210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> muFR1-13 (VL-CDR2)

<400> 17

Tyr Ala Tyr Asn Arg Tyr Ser
1 5

30 <210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-13 (VL-CDR3)

5 <400> 18

Gln Gln Asp His Ser Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-53 (VL-CDR1)

15 <400> 19

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

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-53 (VL-CDR2)

25 <400> 20

Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-53 (VL-CDR3)

ES 2 788 151 T3

<400> 21

Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 22

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-62 (VL-CDR1)

10

<400> 22

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

<210> 23

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-62 (VL-CDR2)

20

<400> 23

Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser
1 5

<210> 24

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-62 (VL-CDR3)

30

<400> 24

His Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25

ES 2 788 151 T3

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> muFR1-9HCvar

<400> 25

```

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Glu Leu Thr Gly Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100          105          110

Val Thr Val Ser Ala
115
    
```

10 <210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> muFR1-13HCvar

<400> 26

ES 2 788 151 T3

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Val Phe Lys
 50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 27

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-53HC

10 <400> 27

ES 2 788 151 T3

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

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-62HC

10 <400> 28

ES 2 788 151 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-9LCvar

10 <400> 29

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

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

ES 2 788 151 T3

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

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

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

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

Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 30

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-13LCvar

10 <400> 30

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

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

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

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

ES 2 788 151 T3

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

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

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

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-53LC

10 <400> 31

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Val
35 40 45

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

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

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

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

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

ES 2 788 151 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-62LC

5

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33

<211> 441

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-9HC

15 <400> 33

ES 2 788 151 T3

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

ES 2 788 151 T3

210	215	220
Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys 225 230 235 240		
Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val 245 250 255		
Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe 260 265 270		
Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu 275 280 285		
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His 290 295 300		
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala 305 310 315 320		
Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg 325 330 335		
Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met 340 345 350		
Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro 355 360 365		
Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn 370 375 380		
Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val 385 390 395 400		
Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr 405 410 415		
Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu 420 425 430		
Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys 435 440		

<210> 34

<211> 454

ES 2 788 151 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> muFR1-13HC

<400> 34

```

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
                20                      25                      30

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

Gly Met Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Val Phe Lys
 50                    55                      60

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

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

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

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

Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
130                    135                    140

```

ES 2 788 151 T3

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

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

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

Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile
 210 215 220

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

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

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

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

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

Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile
 435 440 445

Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 35

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-53HC

10 <400> 35

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Ser Ser Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320

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

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

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
 385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
 405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
 420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 36

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-62HC

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 788 151 T3

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300
 Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

ES 2 788 151 T3

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

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
 355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 37

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-9LC

10 <400> 37

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

ES 2 788 151 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-13LC

5

<400> 38

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 788 151 T3

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

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

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

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

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-53LC

10 <400> 39

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Val
 35 40 45

ES 2 788 151 T3

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

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-62LC

ES 2 788 151 T3

<400> 40

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

ES 2 788 151 T3

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

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

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 41

<211> 35

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EcoMH2

10 <220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(35)

<223> n es A, C, G, o T

15 <220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(35)

<223> s es G o C

20 <220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(35)

<223> m es A o C

25 <220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(35)

<223> r es A o G

<220>

30 <221> característica_misc

<222> (1)..(35)

<223> w es A o T

<400> 41

5

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg

35

<210> 42

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> BamIlg1

<400> 42

15

ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt tttggc

36

<210> 43

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> SacIMK

<220>

25

<221> característica_misc

<223> (1)..(31)

<220>

<221> característica_misc

30

<223> (1)..(31)

<220>

<221> característica_misc

<223> (1)..(31)

35

<220>

<221> característica_misc

<223> (1)..(31)

<220>

5 <221> característica_misc

<223> (1)..(31)

<400> 43

ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a

31

10 <210> 44

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> HindKL

<400> 44

tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tggatgc

46

20 <210> 45

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> EcoMH1

<220>

<221> característica_misc

30 <223> (1)..(31)

<220>

<221> característica_misc

<223> (1)..(31)

35

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(31)

<223> s es G o C

5 <400> 45

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc

32

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vHC

15 <400> 46

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47

ES 2 788 151 T3

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> huMov19 vLCv1.00

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> huMov19 vLCv1.60

<400> 48

ES 2 788 151 T3

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu 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

Ser

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a FOLR1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 de: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es murino, no humano, humanizado, quimérico, o está modificado en superficie.
4. Un polipéptido que se une específicamente a FOLR1, en donde dicho polipéptido comprende las secuencias de: SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 13, 14 y 15.
5. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo, o polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 15 6. Un método para detectar la proteína FOLR1 en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo, o polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la proteína FOLR1 se detecta por radioinmunoensayo, ensayo de transferencia Western, ensayo inmunofluorescente, inmunoensayo enzimático, ensayo de inmunoprecipitación, ensayo quimioluminiscente, citometría, o ensayo inmunohistoquímico.
- 20 8. El método de la reivindicación 7, en donde la proteína FOLR1 se detecta por citometría, inmunoensayo enzimático, o ensayo inmunohistoquímico, en donde la citometría es citometría de flujo, y en donde el inmunoensayo enzimático es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).
9. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde dicha proteína FOLR1 es proteína FOLR1 diseminada.
- 25 10. Una célula aislada que produce el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo, o polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
11. Un método para preparar el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende (a) cultivar la célula de la reivindicación 10; y (b) aislar dicho anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o polipéptido de dicha célula cultivada.
- 30 12. Un kit de inmunoensayo para detectar la proteína FOLR1 en una muestra, comprendiendo el kit: (a) un primer reactivo, en donde el primer reactivo es anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el polipéptido de la reivindicación 4, y (b) un segundo reactivo, en donde el segundo reactivo es un reactivo de detección.
13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el polipéptido de la reivindicación 4 para uso en un método para diagnosticar cáncer.

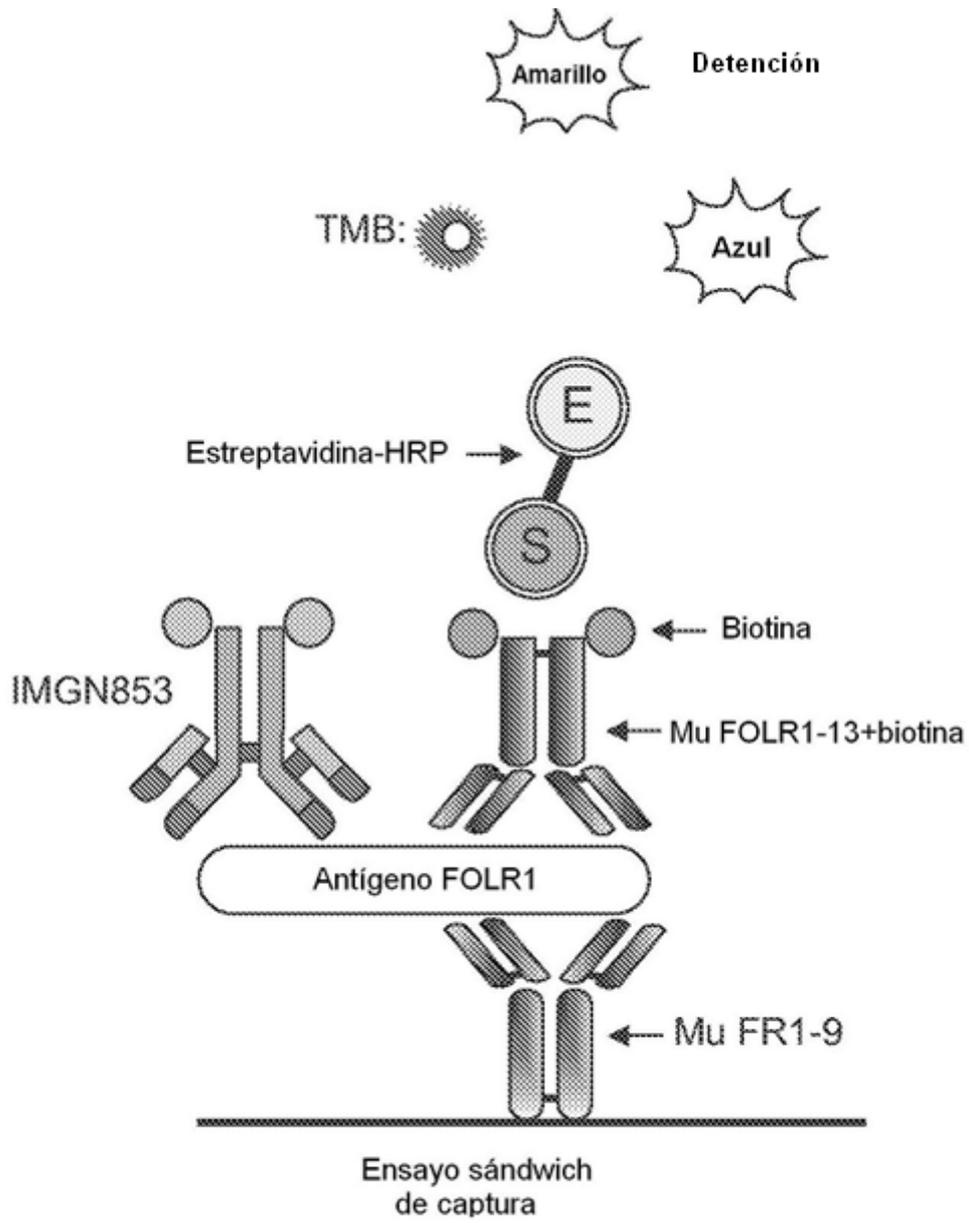


FIG. 1

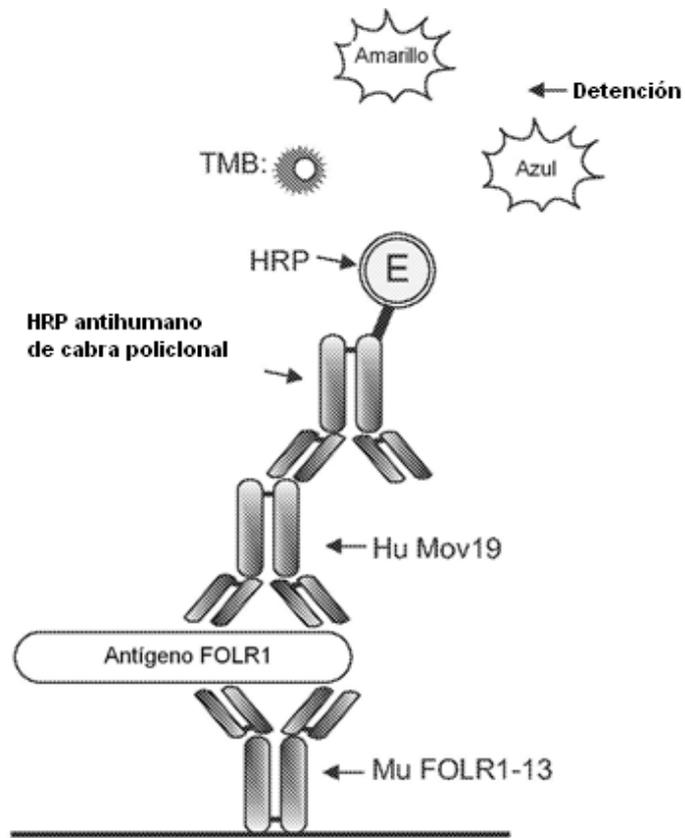


FIG. 2A

Determinación de la afinidad de unión de muFR1-13 tal como se determinó por ELISA sándwich

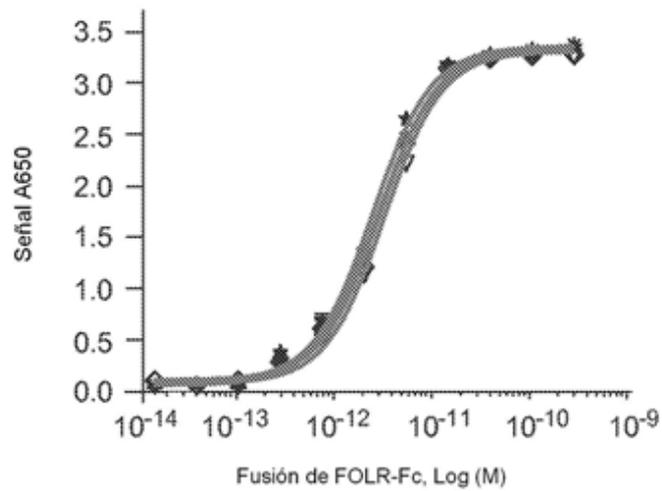


FIG. 2B

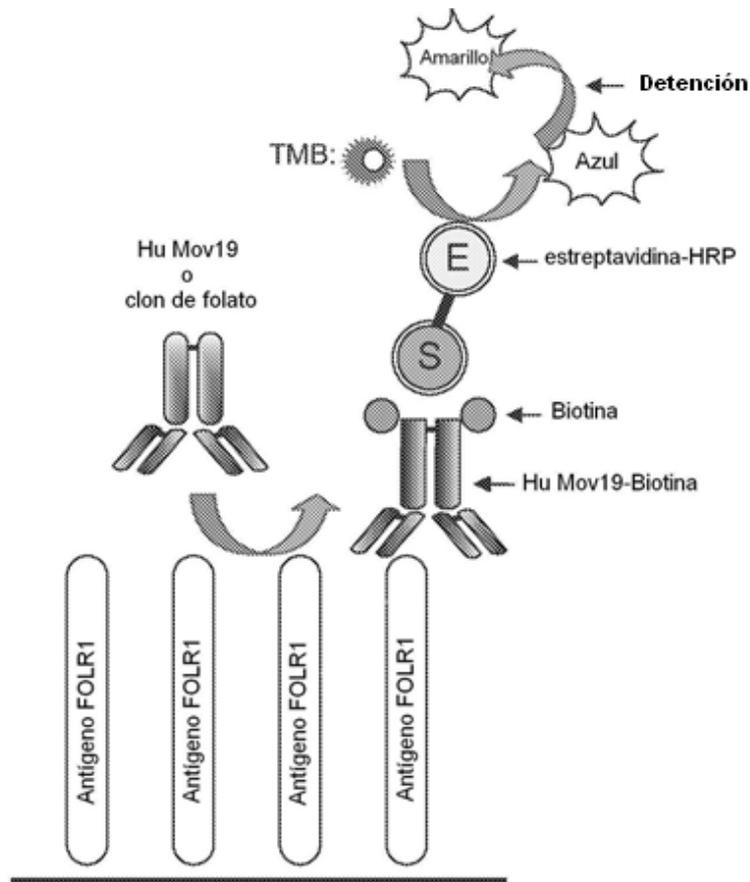


FIG. 3A

ELISA de competición para la unión de huMov19 con prep de membrana de KB

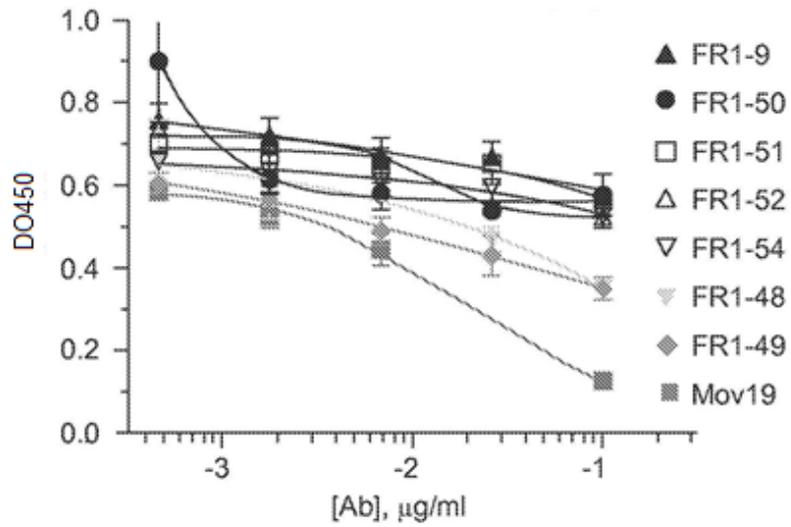


FIG. 3B

ELISA de competición de concentraciones seriadas de clones de anti-FOLR1 con concentración constante de muFR1-13

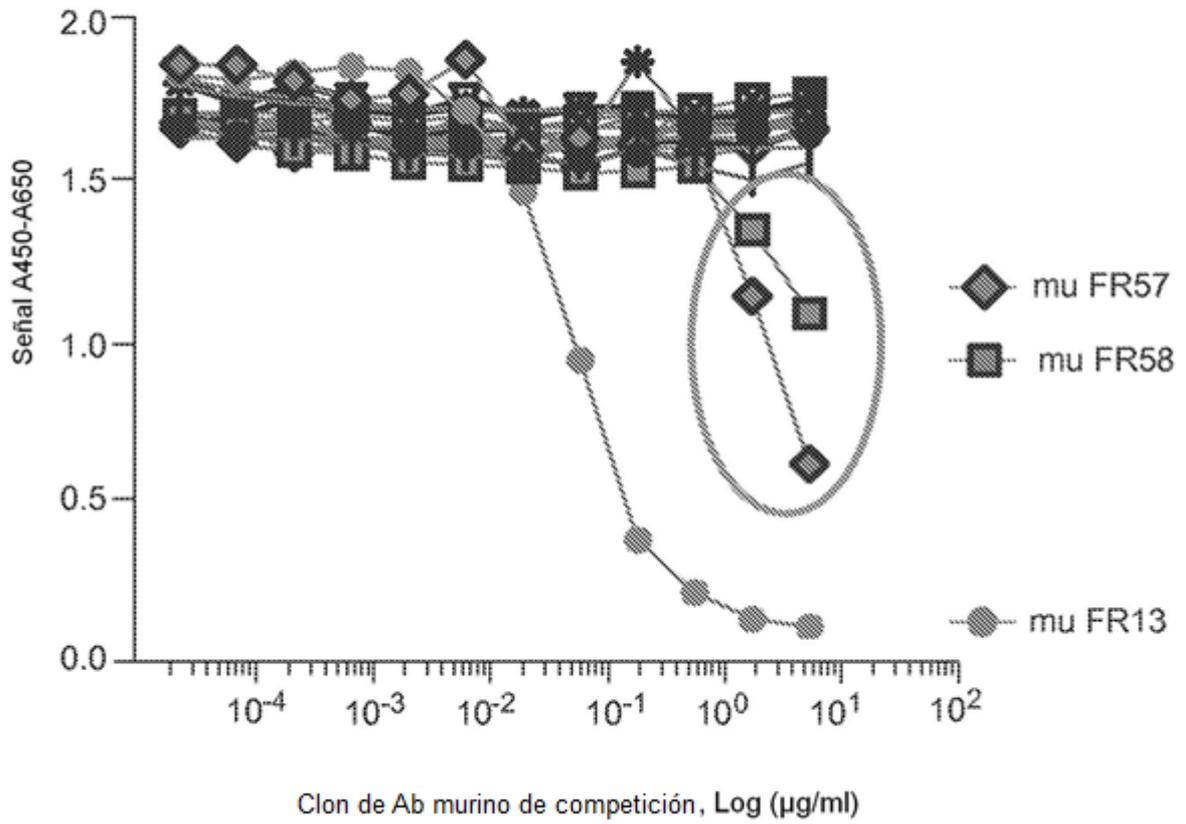


FIG. 4

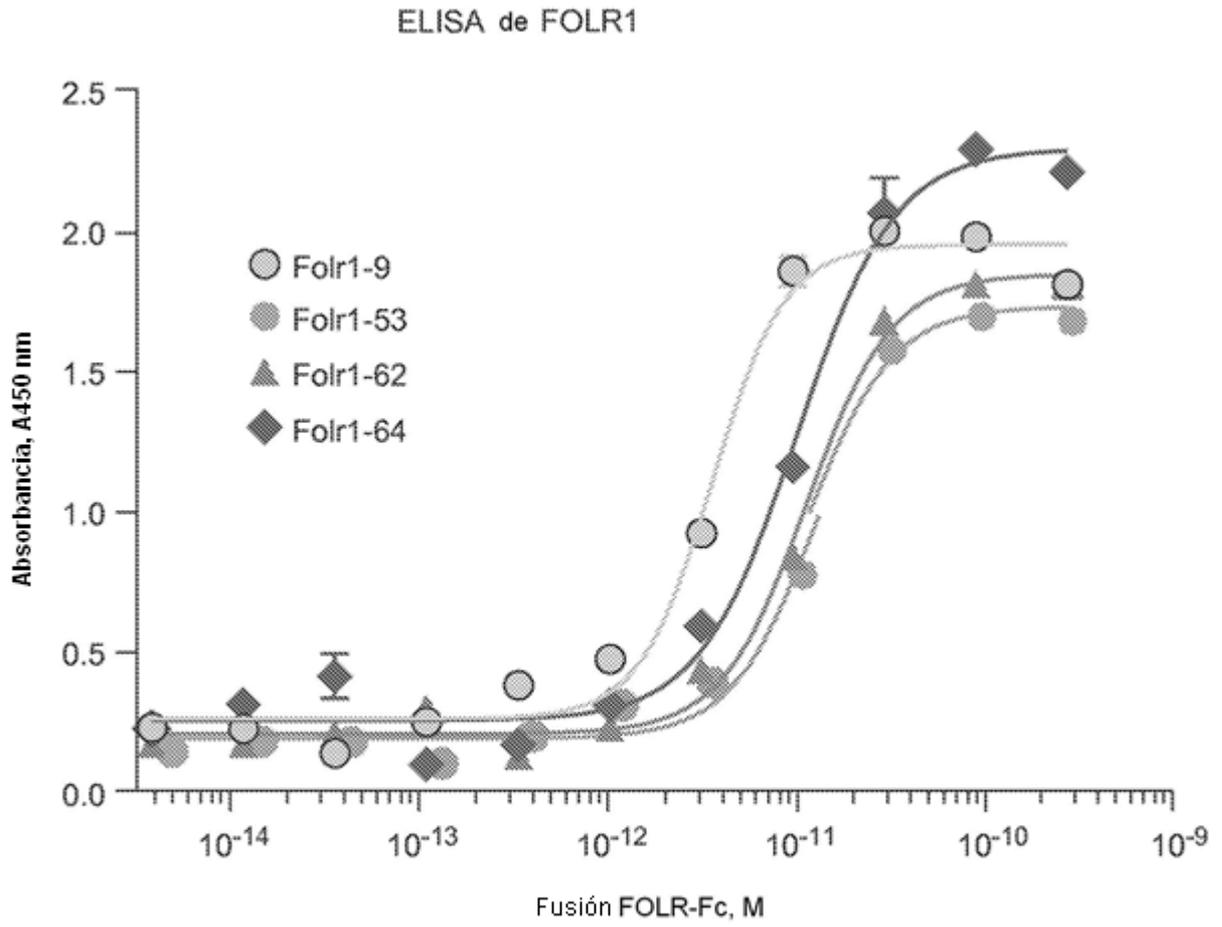


FIG. 5

Citometría de flujo indirecta
de células T47D Alexa-488
GaMu

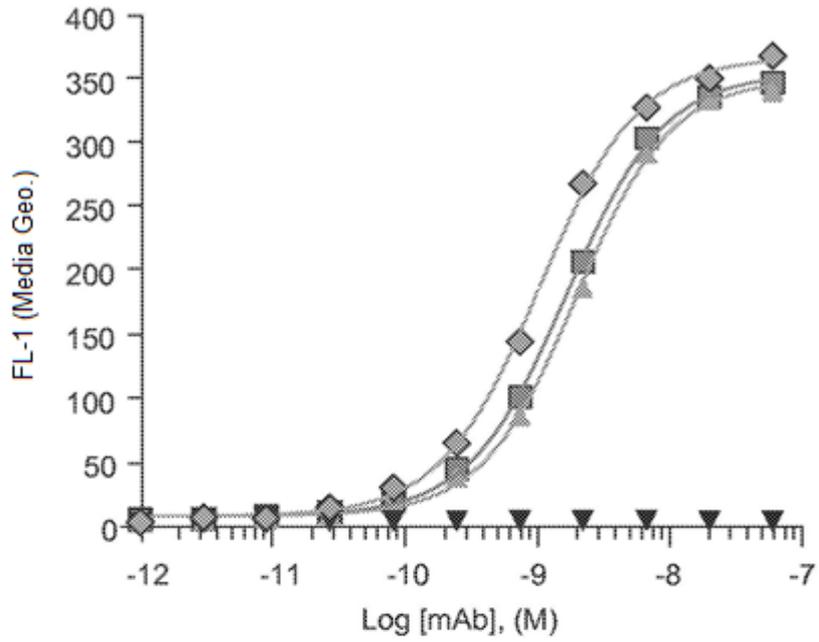


FIG. 6A

ELISA de folato
1 ug/ml FR1-64
1 ug/ml FR1-13-Biotina

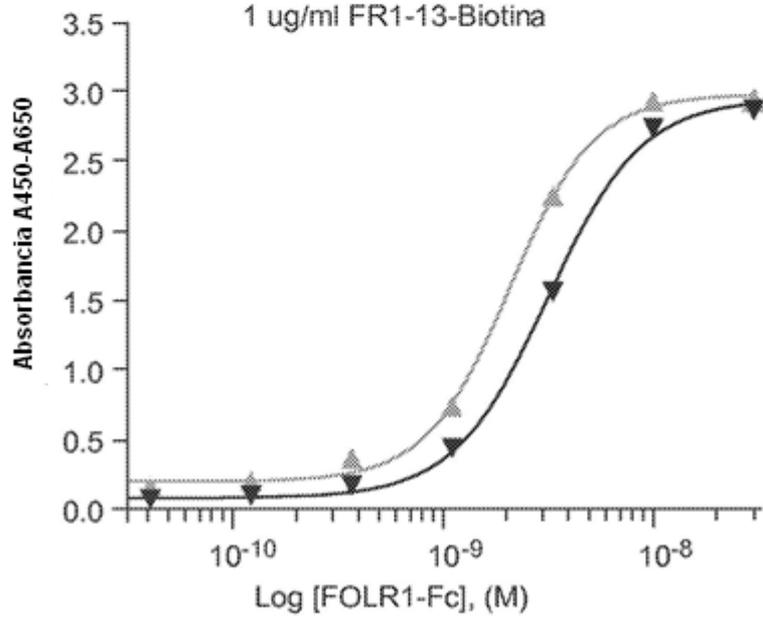


FIG. 6B

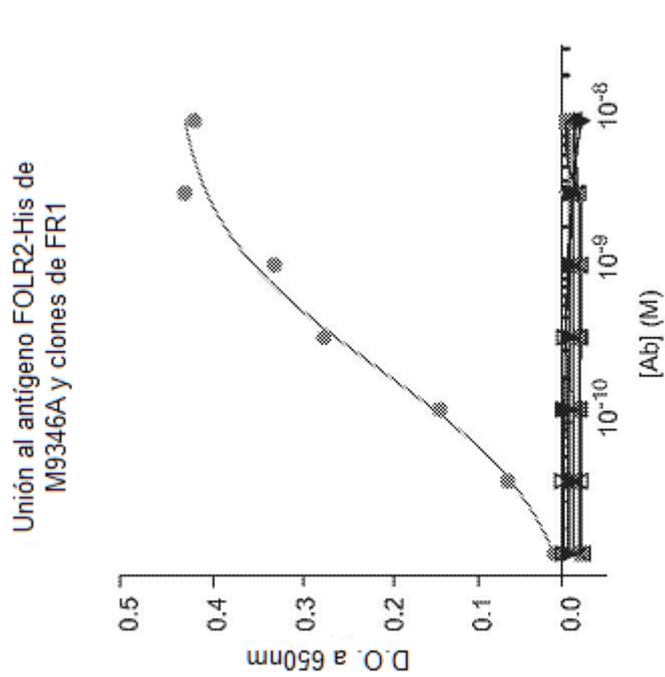
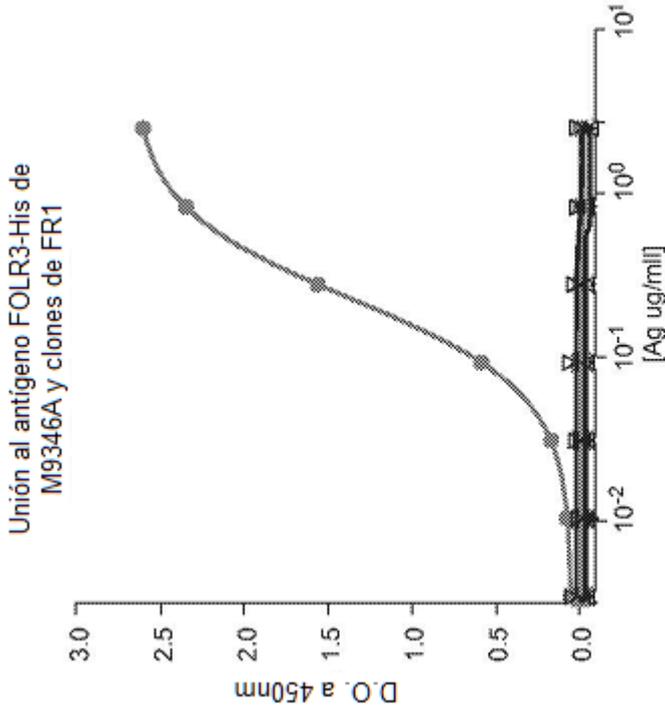


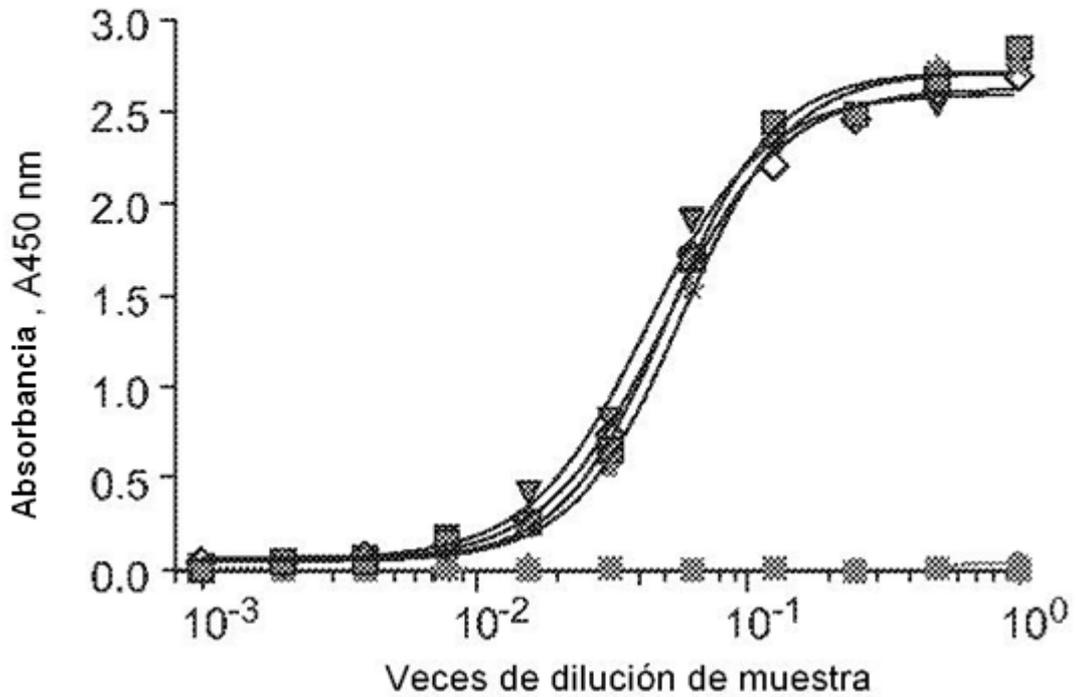
FIG. 7A

- FOLR2-His w – FR2 Ab
- ▼ FOLR2-His w – M9346A Ab
- △ FOLR2-His w – FR1-9 Ab
- ▽ FOLR2-His w – FR1-13 Ab
- FOLR3-His w – FR2 Ab
- ▼ FOLR3-His w – FR1-53 Ab
- △ FOLR3-His w – FR1-62 Ab
- ▽ FOLR3-His w – FR1-64 Ab

FIG. 7B

Nota: Curva FR3= desarrollo de 3 min
todas las otras curvas= desarrollo de 20 min

Efecto del ácido fólico en la unión de FR1-9 y FR1-13



●	Plasma de individuo normal #1	
■	Plasma de individuo normal #2	
▲	Plasma hu agrupado	<u>CE50</u>
	60nM FOLR1-Fc (en grupo de plasma hu)	<u>0.05020</u>
▼	60nM FOLR1-Fc (en caseína al 0,5%)	<u>0.04277</u>
◇	FOLR1-Fc + 1000nM ácido fólico	<u>0.04936</u>
■	FOLR1-Fc + 500nM ácido fólico	<u>0.05141</u>
★	FOLR1-Fc + 100 nM ácido fólico	<u>0.05734</u>

FIG. 8

ELISA sándwich de FOLR1 con muestras de ascitis humana

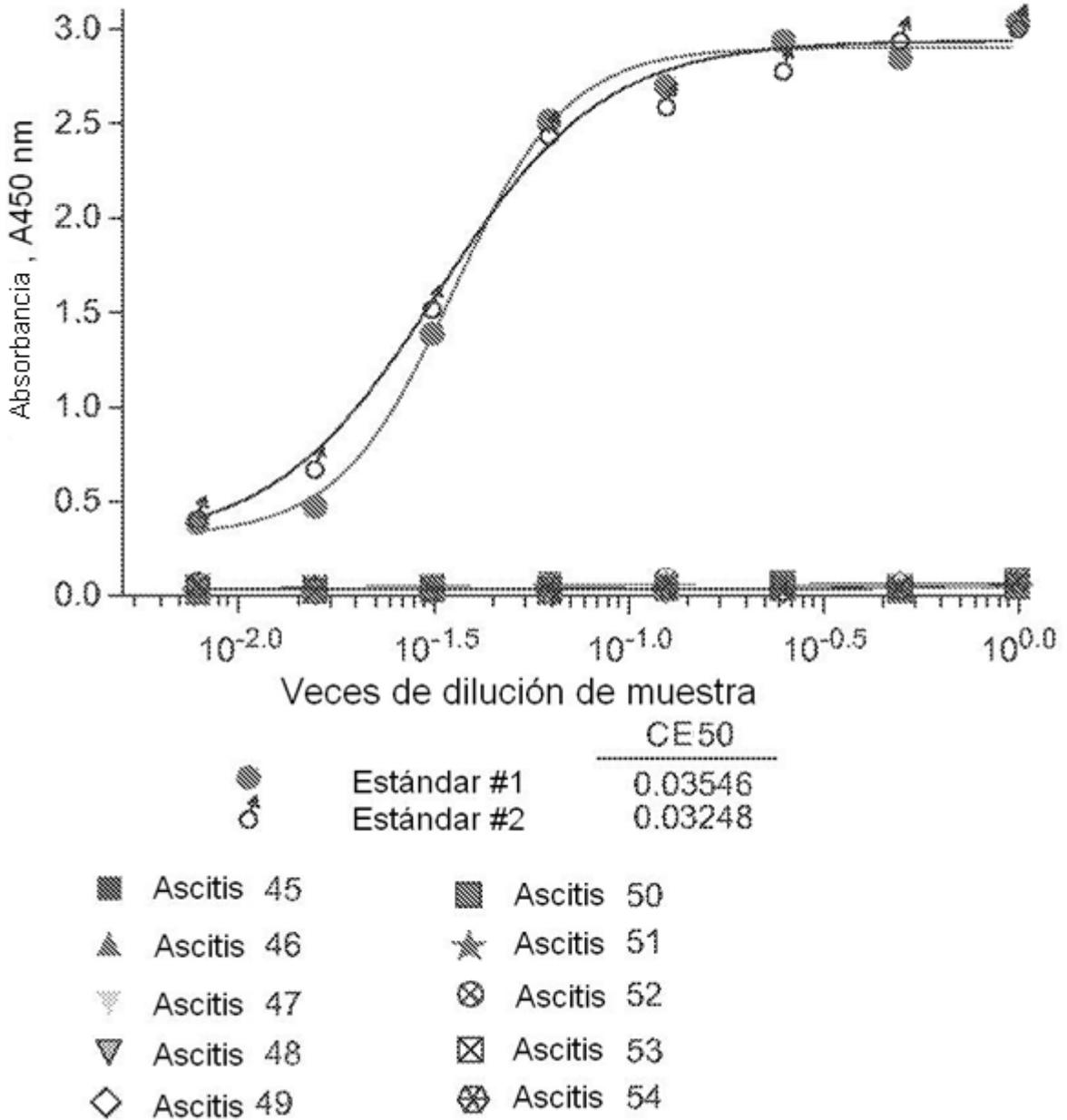


FIG. 9

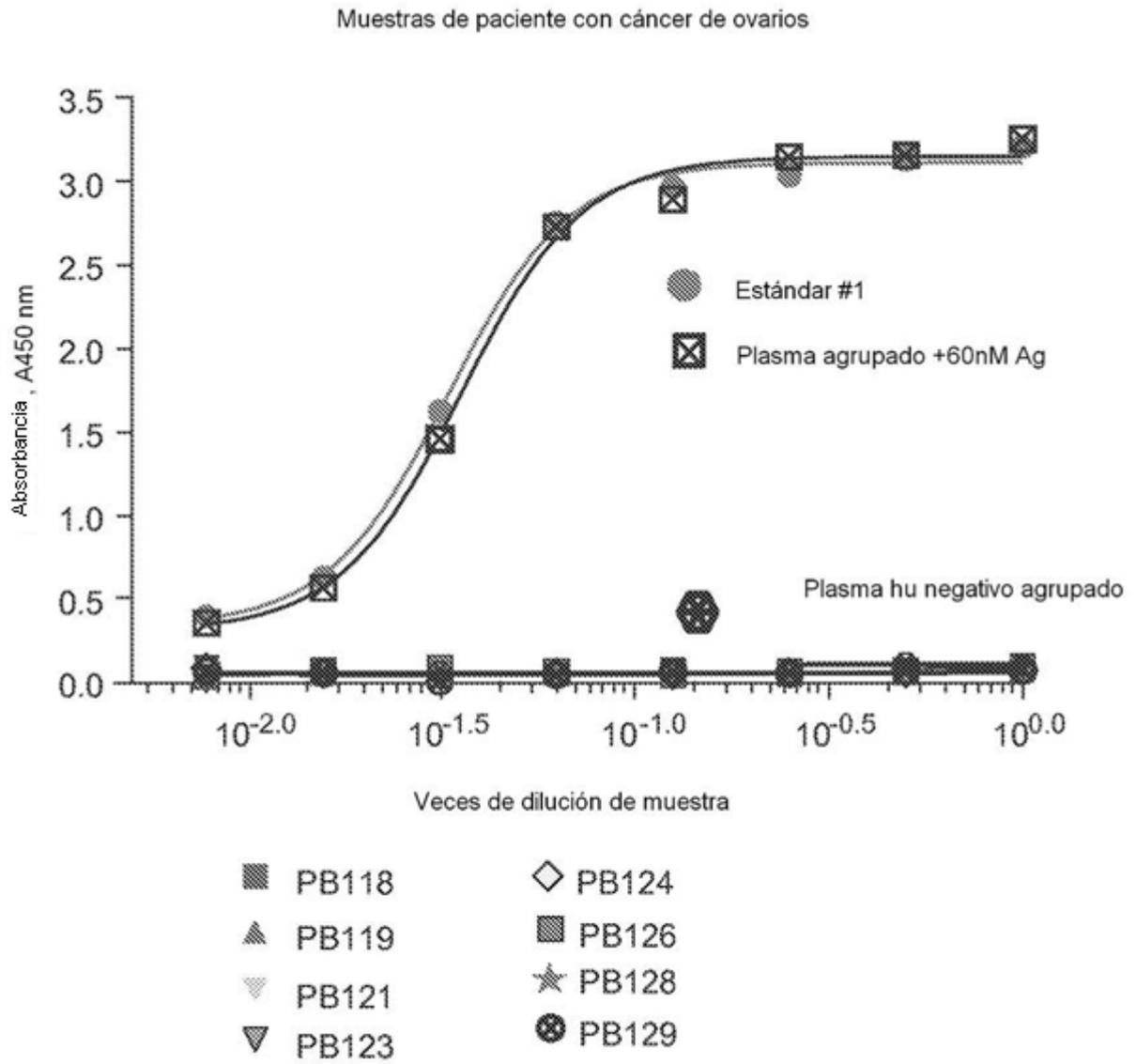


FIG. 10

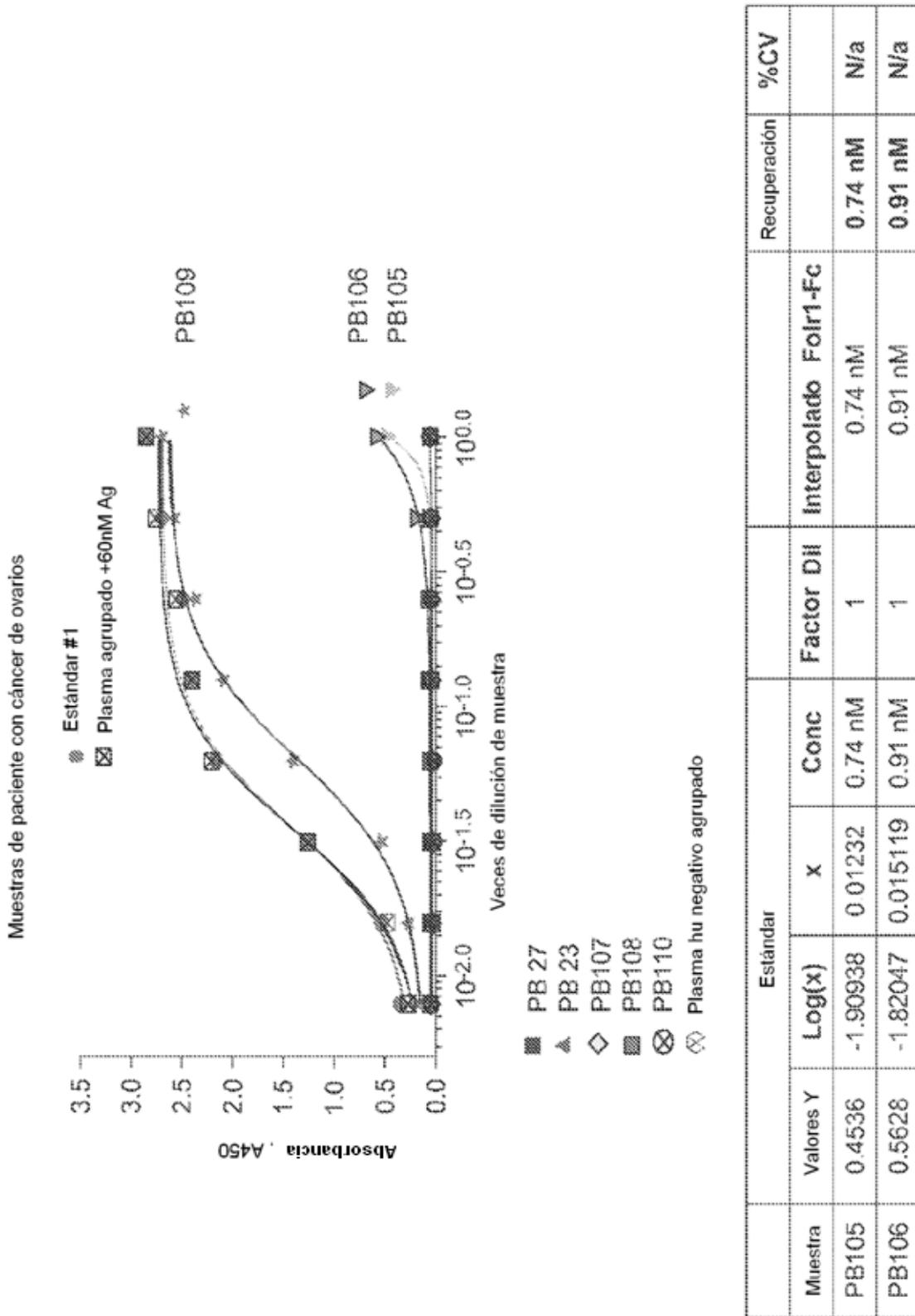


FIG. 11

Cálculo propuesto de muestra de paciente desconocido:

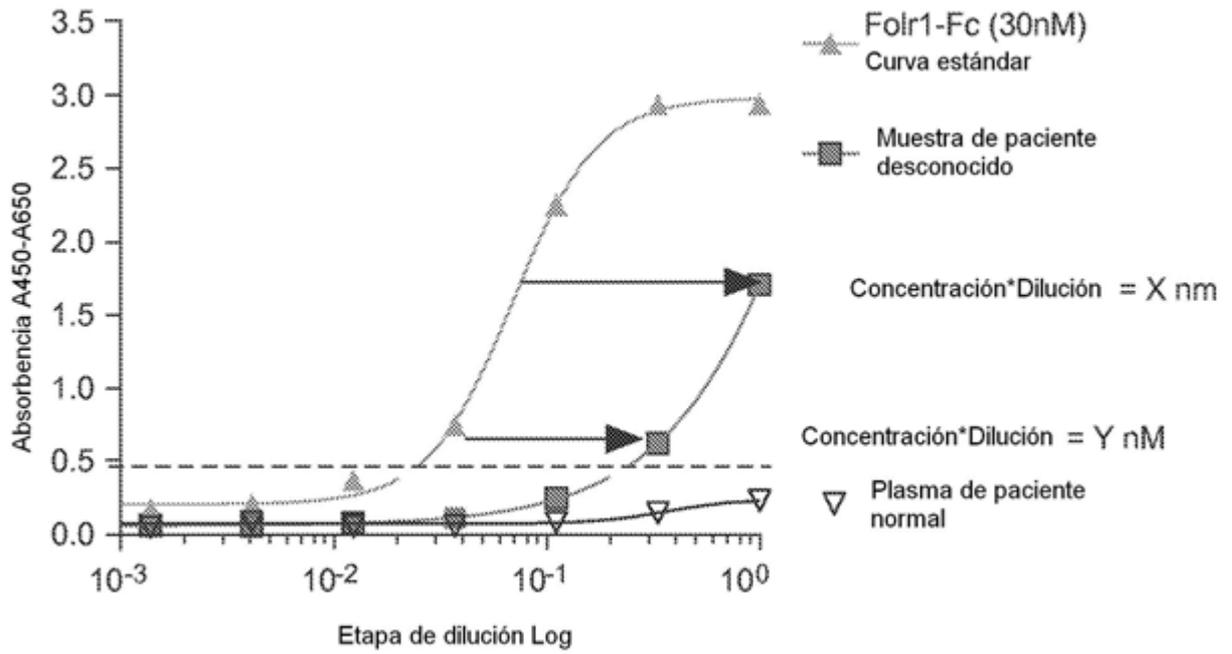


FIG. 12

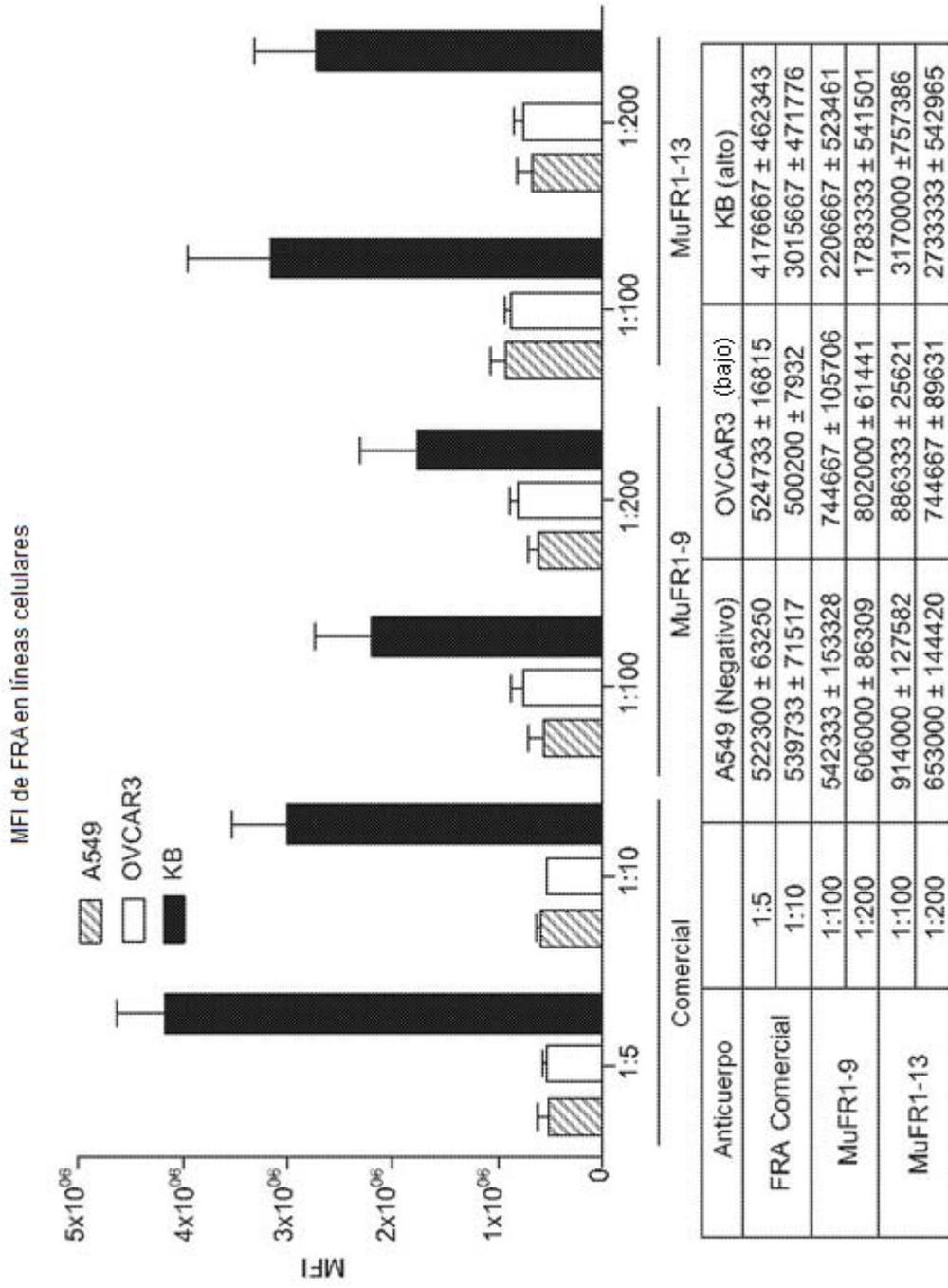


FIG. 13

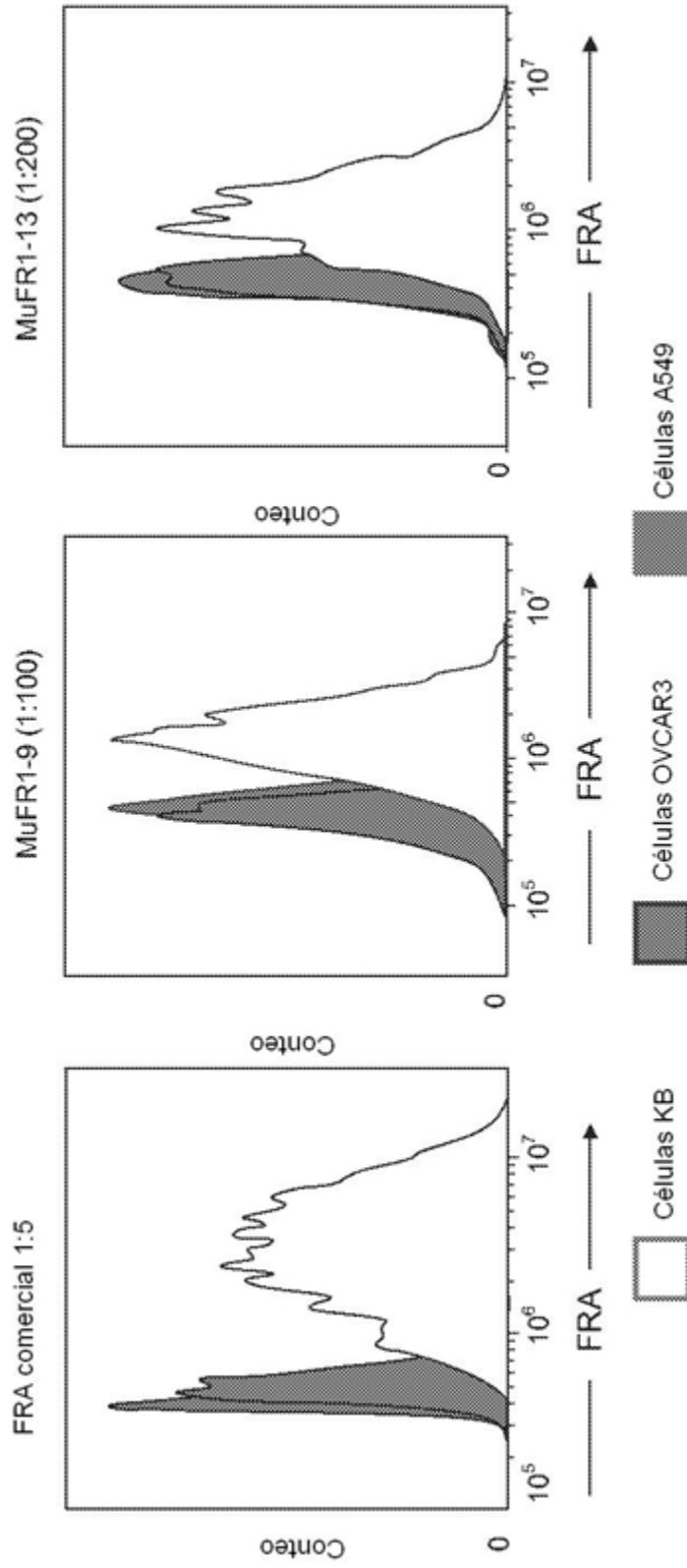
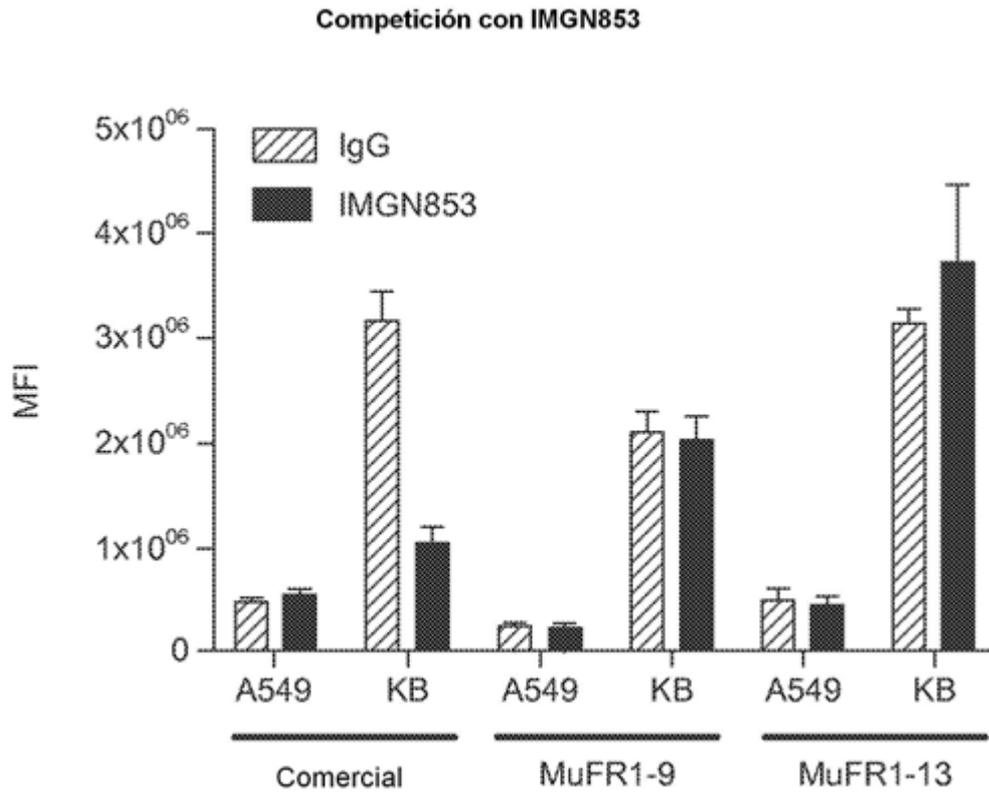


FIG. 14



Anticuerpo	Células	Tratamiento	
		IgG (MFI)	IMGN853 (MFI)
FRA Comercial	A549	458333 ± 36085	524333 ± 62307
	KB	3173333 ± 298124	1006333 ± 195297
MuFR1-9	A549	224667 ± 27936	221667 ± 32380
	KB	2076667 ± 202759	2010000 ± 225167
MuFR1-13	A549	459000 ± 129230	404667 ± 117689
	KB	3113333 ± 190117	3726667 ± 768339

FIG. 15