(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 813 549**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2011 E 16002534 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3196212**

(54) Título: **Inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo del receptor 1 de folato**

(30) Prioridad:

24.02.2010 US 307797 P
20.05.2010 US 346595 P
12.11.2010 US 413172 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

AB, OLGA;
TAVARES, DANIEL;
RUI, LINGYUN;
PAYNE, GILLIAN y
GOLDMAKHER, VIKTOR S.

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo del receptor 1 de folato

Campo de la invención

El campo de esta invención se refiere en general a inmunoconjugados que se unen al receptor 1 de folato humano, así como a inmunoconjugados para uso en el tratamiento de enfermedades, tales como el cáncer.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo desarrollado, con más de un millón de personas diagnosticadas con cáncer y 500.000 muertes al año sólo en los Estados Unidos. En total, se estima que más de 1 de cada 3 personas desarrollarán algún tipo de cáncer durante su vida. Existen más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro de los cuales - mama, pulmón, colorrectal y próstata - representan más de la mitad de todos los nuevos casos (Jemal et al., 2003, *Cancer J. Clin*. 53: 5-26).

El receptor 1 de folato (FOLR1), también conocido como Receptor-alfa de Folato 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 distribución del folato fisiológico, 5-metiltetrahidrofolato, al interior de las células.

El FOLR1 está sobreexpresado en la gran mayoría de los cánceres de ovario, así como en muchos cánceres uterinos, de endometrio, pancreáticos, renales, de pulmón y de mama, mientras que la expresión del FOLR1 en los tejidos normales se restringe a la membrana apical de las células epiteliales en los túbulos proximales del riñón, en los neumocitos alveolares del pulmón, en la vejiga, en los testículos, en el plexo coroideo y en la tiroides (Weitman SD, *et al*., *Cancer Res* 52: 3396-3401 (1992); Anthony 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 del cáncer dirigida contra el FOLR1.

Debido a que el cáncer de ovario es típicamente asintomático hasta un estadio avanzado, a menudo se diagnostica en un estadio tardío y tiene un mal pronóstico cuando se trata con los procedimientos actualmente disponibles, típicamente fármacos quimioterapéuticos después de la citorreducción quirúrgica (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 ello, existe una clara necesidad médica no satisfecha de terapias más eficaces para los cánceres de ovario.

Se han examinado tres anticuerpos anti-FOLR1 como posibles fármacos contra el cáncer. Los anticuerpos monoclonales murinos Mov18 y Mov19 se aislaron a finales de los años 80 (Miotti S *et al*., *Int J Cancer* 39: 297-303 (1987)), se confirmó que se dirigían al FOLR1 (Coney LR *et al*., *Cancer Res* 51: 6125-6132 (1991)), y se ensayaron en estudios preclínicos para determinar su capacidad para erradicar las células cancerosas que expresan antígenos como conjugados con una proteína citotóxica inactivadora de ribosomas (Conde FP *et al*., *Eur J Biochem* 178: 795-802 (1989)).

El Mov19 se ensayó como un anticuerpo bi-específico dirigido a células T citotóxicas y a células asesinas naturales (Mezzanzanica D *et al*., *Int J Cancer* 41: 609-615 (1988); Ferrini S *et al*., *Int J Cancer Supl* 4: 53-55, 1989); Ferrini S *et al*., *Int J Cancer* 48: 227-233 (1991)), y como una proteína de fusión del Fv de cadena sencilla (scFv) de Mov19 con interleucina-2 *in vivo* (Melani C *et al*., *Cancer Res* 58: 4146-4154 (1998)). Los anticuerpos anti-FOLR1 quiméricos (variable murina/constante humana) Mov18 y Mov19 se han examinado preclínicamente para determinar su capacidad para mediar en la muerte, dependiente de células inmunitarias citotóxicas, de células tumorales que expresan FOLR1 *in vitro* (Coney LR *et al*., *Cancer Res* 54: 2448-2455 (1994)), y se ensayó un Mov18-IgE quimérico en modelos preclínicos inmunoterapéuticos dependientes de IgE (Karagiannis SN *et al*., *J Immunol* 179: 2832-2843 (2007); Gould HJ *et al*., *Eur J Immunol* 29: 3527-3537 (1999)).

El Mov18 se estudió en forma de conjugados con diversos radionúclidos en estudios preclínicos y luego, a principios de los años noventa, en pruebas clínicas (Zacchetti A *et al*., *Nucl Med Biol* 36: 759-770 (2009)), que terminaron sin que ningún fármaco fuera aprobado para uso clínico.

El MORAb003, una forma humanizada del anticuerpo anti-FOLR1 monoclonal murino LK26 se evaluó preclínicamente como un anticuerpo no modificado (Ebel W *et al*., *Cancer Immun* 7: 6 (2007)) y como un conjugado con el radionúclido ^{111}In (Smith-Jones PM *et al*., *Nucl Med Biol* 35: 343-351 (2008)), y está actualmente siendo sometido a ensayos clínicos como un anticuerpo no modificado (D. K. Armstrong *et al*., *J. Clin. Oncol*. 26: 2008, suplemento de 20 de mayo; resumen 5500).

En la técnica (WO 2005/080431) se han descrito los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al receptor alfa-folato y bloquean la actividad biológica de un antígeno tumoral. En la técnica (WO 2006/116592) se han descrito los anticuerpos que se unen específicamente a, y llegan a ser internalizados por, las células que expresan o que llevan el receptor alfa de folato, induciendo de ese modo una actividad efectora inmune tal como citotoxicidad

celular dependiente de anticuerpo.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona inmunoconjugados que comprenden nuevos anticuerpos humanizados que se unen al receptor 1 de folato humano, y su uso. Específicamente, la presente invención proporciona un inmunoconjugado que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde: (A) es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor 1 de folato humano; (L) es un conector; y (C) es un maitansinoide o un análogo de maitansinoide, en donde el conector (L) enlaza (A) a (C), en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada (HC) que comprende: una CDR1 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTGYFMN; una CDR2 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de RIHPYDGDTF; y una CDR3 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera (LC) que comprende: una CDR1 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9).

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, caracterizado además porque (L) es un conector seleccionado del grupo que consiste en: un conector no escindible, un conector hidrófilo y un conector basado en ácido dicarboxílico; o porque (L) es un conector escindible; o en donde el conector se selecciona del grupo que consiste en: 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB), 4-(2-piridilditio)-butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB), éster (NHS-PEG4-maleimida) de *N*-succinimidil-[(*N*-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol], 4-(2-piridilditio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP), 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPP), 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de *N*-succinimidilo (SMCC); 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de *N*-sulfosuccinimidilo (sulfoSMCC), y 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de *N*-succinimidilo (SIAB).

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, en donde el maitansinoide es N(2')-desacetil-N(2')-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina o N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, en donde (L) puede ser 4-(2-piridilditio)-butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB), y en donde (C) es N(2')-desacetil-N(2')-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina o N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina.

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, en donde el dominio variable de HC del anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en particular en donde la HC del anticuerpo comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10772; o en donde el dominio variable de LC del anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11, en particular en donde la LC del anticuerpo comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10773 o PTA-10774.

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado, como se ha referido inicialmente anteriormente, en donde la HC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10772, en donde: i) la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10774; (L) es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB); y (C) es N(2')-desacetil-N(2')-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4); ii) la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10773; (L) es éster (NHS-PEG4-maleimida) de *N*-succinimidil-[(*N*-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol]; y (C) es N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1), iii) la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10774; (L) es 4-(2-piridilditio)-butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB); y (C) es N(2')-desacetil-N(2')-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4), o iv) la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10774; (L) es 4-(2-piridilditio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP); y (C) es N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1), en donde el conector (L) conecta (A) con (C), en particular, en donde la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10774; (L) es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB); y (C) es N(2')-desacetil-N(2')-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4); en donde (L) conecta (A) con (C).

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, que comprende además 2-6 (C), en particular i) que comprende además un segundo (C), ii) que comprende además un segundo y un tercer (C), o iii) que comprende además un segundo, un tercer y un cuarto (C), preferiblemente que comprende además 3-4 (C).

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, en donde el

anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno comprende un Fab, un Fab', un F(ab')2, un scFv, un Fv unido por disulfuro, un intracuerpo, un IgG-CH2, un minicuerpo, un F(ab')3, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, DVD-Ig, mAb2, un (scFv)2, o un scFv-Fc.

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno se une al receptor 1 de folato humano con una Kd de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 nM, preferiblemente, se une al receptor 1 de folato humano con una Kd de aproximadamente 1,0 nM o mejor, en particular, en donde la afinidad de unión se mide por citometría de flujo, Biacore, o radioinmunoensayo.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente, en donde los inmunoconjugados tienen un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 (C) por (A), en particular, en donde los inmunoconjugados tienen un promedio de aproximadamente 3,5 ± 0,5 (C) por (A).

Además, la presente invención proporciona un reactivo de diagnóstico que comprende el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, en donde el reactivo de diagnóstico comprende además un marcador, preferiblemente, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste en un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de imagenología y un ion metálico.

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado, como se ha referido anteriormente, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto o para uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto.

Además, la presente invención proporciona el inmunoconjugado para uso, como se ha referido anteriormente, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer del peritoneo y cáncer de pulmón, en particular, en donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer de peritoneo o cáncer de pulmón, más en particular, en donde el cáncer es cáncer de ovario.

Se describen nuevos polipéptidos, tales como los anticuerpos que se unen al receptor 1 de folato humano, fragmentos de tales anticuerpos y otros polipéptidos relacionados con dichos anticuerpos. También se describen polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, como los vectores que comprenden los polinucleótidos. Adicionalmente, se describen las células que comprenden los polipéptidos y/o polinucleótidos. También se proporcionan composiciones (p. ej., composiciones farmacéuticas) que comprenden los nuevos anticuerpos del receptor 1 de folato o inmunoconjugados. Además, también se describen métodos para preparar y usar los nuevos anticuerpos del receptor 1 de folato o inmunoconjugados, tales como métodos para usar los nuevos anticuerpos del receptor 1 de folato o inmunoconjugados para inhibir el crecimiento tumoral y/o tratar el cáncer.

Se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa$_1$FXaa$_2$Xaa$_3$ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa$_1$ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa$_2$ se selecciona de Q, H, N, y R; y Xaa$_3$ se selecciona de G, E, T, S, A y V. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse a un receptor 1 de folato humano con sustancialmente la misma afinidad que el anticuerpo Mov19 quimérico. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender la secuencia de CDR2 de cadena pesada RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2).

La afinidad de unión puede medirse por citometría de flujo, Biacore o radioinmunoensayo.

Se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 6. El anticuerpo humanizado o un

fragmento de unión al antígeno del mismo puede estar codificado por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene los nos. de depósito de ATCC PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.

Se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que compite por la unión a FOLR1 con un anticuerpo que comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa_1F$Xaa_2$$Xaa_3$ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa_1 se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa_2 se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa_3 se selecciona de G, E, T, S, A y V. El anticuerpo humanizado puede comprender la secuencia RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2) de la CDR2 de cadena pesada.

Se describe un polipéptido, un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio variable de la cadena pesada al menos aproximadamente un 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 4, y un dominio variable de la cadena ligera al menos aproximadamente un 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 10 o a la SEQ ID NO: 11. El anticuerpo humanizado o el fragmento de unión al antígeno puede comprender un dominio variable de la cadena pesada al menos aproximadamente un 95 % idéntico a la SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de la cadena ligera al menos aproximadamente un 95 % idéntico a la SEQ ID NO: 10 o a la SEQ ID NO: 11. El anticuerpo humanizado puede comprender un dominio variable de la cadena pesada al menos aproximadamente un 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de la cadena ligera al menos aproximadamente un 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 10 o a la SEQ ID NO: 11. El anticuerpo humanizado puede comprender el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11. Se describe un polipéptido, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno al menos aproximadamente un 90 % idéntico a las SEQ ID NO: 88-119. Se describe un polipéptido, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno al menos aproximadamente un 95 % idéntico a las SEQ ID NO: 88-119. Se describe un polipéptido, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno al menos aproximadamente un 99 % idéntico a las SEQ ID NO: 88-119.

El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede expresarse al menos diez veces más que chMov19 en células eucariotas. Las células eucariotas pueden ser células HEK-293T.

Se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSYGMS (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29). Se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMQ (SEQ ID NO: 60); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RDGNYAAY (SEQ ID NO: 62); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57); una CDR2 de cadena ligera que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 58); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59). Se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMY (SEQ ID NO: 66); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RHDYGAMDY (SEQ ID NO: 68); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYTNLA (SEQ ID NO: 63); una CDR2 de cadena ligera que comprende TASNLAD (SEQ ID NO: 64); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65). Se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSFGMH (SEQ ID NO: 72); una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQNINNNLH (SEQ ID NO: 69); una CDR2 de cadena ligera que comprende YVSQSVS (SEQ ID NO: 70); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71). Se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TSYTMH (SEQ ID NO: 78); una CDR2 de cadena pesada que comprende YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GGAYGRKPMDY (SEQ ID NO: 80); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQNVGPNVA (SEQ ID NO: 75); una CDR2 de cadena ligera que comprende SASYRYS (SEQ ID NO: 76); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 77).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos comprendidos por la invención son anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión al antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fd, un Fv de cadena sencilla o scFv, un Fv unido por disulfuro, un dominio V NAR, un IgNar, un intracuerpo, un IgG-CH2, un minicuerpo, un F(ab')3, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo de dominio simple, un DVD-Ig, Fcab, mAb2, un (scFv)2 o un scFv-Fc.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprendido por la invención se une a un receptor 1 de folato humano con una Kd de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 nM. En una realización, el anticuerpo o polipéptido se une a un receptor 1 de folato humano con una Kd de aproximadamente 1,0 nM o mejor. La afinidad de unión puede medirse por citometría de flujo, Biacore o radioinmunoensayo.

Se describe un método para preparar un anticuerpo que comprende cultivar una célula que expresa dicho anticuerpo; y (b) aislar el anticuerpo de dicha célula cultivada. La célula puede ser una célula eucariota.

Se describe un inmunoconjugado que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde: (A) es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o polipéptido; (L) es un conector; y (C) es un agente citotóxico, en donde dicho conector (L) enlaza (A) a (C).

En una realización, el conector se selecciona del grupo de un conector escindible, un conector no escindible, un conector hidrófilo y un conector basado en ácido dicarboxílico. En una realización adicional, el conector se selecciona del grupo que consiste en: 4-(2-piridilditio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPP); 4-(2-piridilditio)-butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB); 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de *N*-succinimidilo (SMCC); 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de *N*-sulfosuccinimidilo (sulfoSMCC); 4-(yodoacetil)aminobenzoato de *N*-succinimidilo (SIAB); y éster de *N*-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] (NHS-PEG4-maleimida). En una cierta realización, el conector es éster de *N*-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol-(NHS-PEG4-maleimida).

Según la invención, los inmunoconjugados comprenden un agente citotóxico seleccionado del grupo de un maitansinoide, o un análogo de maitansinoide. Se describen como agentes citotóxicos la benzodiazepina, yaxoide, CC-1065, análogo de CC-1065, duocarmicina, análogo de duocarmicina, caliqueamicina, dolastatina, análogo de dolastatina, auristatina, derivado de tomaimicina, y derivado de leptomicina o un profárrmaco del agente. En una realización, el agente citotóxico es un maitansinoide. En otra realización, el agente citotóxico es N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina o N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina.

En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) éster de *N*-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] (NHS-PEG4-maleimida); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPP); y (C) N(2')-desacetil-N (2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende: (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP); y (C) N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además un segundo agente anticanceroso.

La invención también proporciona un reactivo de diagnóstico que comprende un inmunoconjugado de la invención que está marcado. En una realización, el marcador se selecciona del grupo de un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de imagenología y un ion metálico.

La invención también proporciona un inmunoconjugado de la invención para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto o para uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto.

Se describe un kit que comprende el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, polipéptido o inmunoconjugado de la invención.

Se describe un método para inhibir el crecimiento del tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, polipéptido, inmunoconjugado, o composición farmacéutica. Se describe un método para inhibir el crecimiento del tumor en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunoconjugado que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde: (A) es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano; (L) es un conector; y (C) es una citotoxina seleccionada del grupo que consiste en un maitansinoide y un análogo de maitansinoide; en donde (L) enlaza (A) a (C) y en donde el inmunoconjugado reduce el volumen tumoral medio al menos dos veces en un modelo de xenoinjerto de KB. El método puede comprender administrar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa$_1$FXaa$_2$Xaa$_3$ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa$_1$ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa$_2$ se selecciona de Q, H, N, y R; y Xaa$_3$ se selecciona de G, E, T, S, A y V. El anticuerpo puede comprender una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2).

En una cierta realización, la invención proporciona un inmunoconjugado de la invención que comprende un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo codificado por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene los nos. de depósito de ATCC PTA-10772 y PTA-10773 o 10774 para uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral.

En otra realización, el método comprende administrar un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) éster de *N*-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] (NHS-PEG4-maleimida); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina.

En otra realización, el método comprende administrar un inmunoconjugado que comprende (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

En otra realización, el método comprende administrar un inmunoconjugado que comprende (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB); y (C) N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

En otra realización, el método comprende administrar un inmunoconjugado que comprende (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPP); y (C) N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

En otra realización, el método comprende administrar un inmunoconjugado que comprende (A) un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 11; (L) 4-(2-piridiltio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP); y (C) N(2')-desacetil-N (2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; en donde (L) enlaza (A) a (C).

Se describe un método que comprende administrar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo huFR-1-21 depositado en ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene los nos. de depósito ATCC PTA-10775 y PTA-10776. El anticuerpo huFR1-21 puede comprender (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSYGMS (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31); y una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29). El método puede comprender administrar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que es el anticuerpo huFR1-48 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMQ (SEQ ID NO: 60); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61); y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDGNYAAY (SEQ ID NO: 62); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57); una CDR2 de cadena ligera que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 58); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59). El método puede comprender administrar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que es el anticuerpo huFR1-49 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMY (SEQ ID NO: 66); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67); y una CDR3 de cadena pesada que comprende RHDYGAMDY (SEQ ID NO: 68); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYTNLA (SEQ ID NO: 63); una CDR2 de cadena ligera que comprende TASNLAD (SEQ ID NO: 64); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65). El método puede comprender administrar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que es el anticuerpo huFR1-57 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSFGMH (SEQ ID NO: 72); una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSGSSTIS (SEQ ID NO:

73); y una CDR3 de cadena pesada que comprende EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQNINNNLH (SEQ ID NO: 69); una CDR2 de cadena ligera que comprende YVSQSVS (SEQ ID NO: 70); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71). El método puede comprender administrar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que es el anticuerpo huFR1-65 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TSYTMH (SEQ ID NO: 78); una CDR2 de cadena pesada que comprende YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79); y una CDR3 de cadena pesada que comprende GGAYGRKPMDY (SEQ ID NO: 80); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQNVGPNVA (SEQ ID NO: 75); una CDR2 de cadena ligera que comprende SASYRYS (SEQ ID NO: 76); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYNSYPYT (SEQ ID N O: 77).

En una realización, el inmunoconjugado de la invención es para uso en el tratamiento del cáncer, en donde el cáncer se selecciona del crecimiento de tumor de ovario, tumor cerebral, tumor de mama, tumor uterino, tumor de endometrio, tumor pancreático, tumor renal o tumor de pulmón. En una cierta realización, el inmunoconjugado es para uso en la inhibición del crecimiento de tumores de ovario. En otra realización, la invención inhibe el crecimiento del tumor de pulmón. En una cierta realización, la inhibición del crecimiento del tumor se usa para tratar el cáncer. El método puede comprender administrar un segundo agente anticanceroso al sujeto. El segundo agente anticanceroso puede ser un agente quimioterapéutico.

Se describe una célula aislada que produce el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o el polipéptido. Se describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia al menos un 90 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. El polinucleótido aislado puede ser al menos un 95 % idéntico a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. El polinucleótido aislado puede ser al menos un 99 % idéntico a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. Se describe un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos de las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. Se describe una célula huésped que comprende un vector que contiene un polinucleótido de las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Residuos superficiales de Mov19 murino (muMov19) y humanizado (huMov19). (A) Residuos superficiales de cadena ligera de Mov19 murino y humanizado. Se proporcionan los residuos superficiales del marco de región variable de cadena ligera de Mov19 murino y humanizado y el número de posición (sistema de Kabat). Los residuos humanos que son diferentes de las secuencias murinas originales están subrayados. La *posición 74 no es una posición de superficie, pero para eliminar un sitio de glicosilación de consenso enlazado a N en la versión 1.00, esta posición se cambió a una Treonina (el residuo humano más común en esta posición), dando como resultado la versión 1.60. (B) Residuos superficiales de cadena pesada de Mov19 Murino y Humano. Se proporcionan residuos superficiales del marco de la región variable de cadena pesada de Mov19 murino y humanizado y el número de posición (sistema Kabat). Los residuos humanos que son diferentes de las secuencias murinas originales están subrayados. Los residuos superficiales similares se proporcionan para FR1-21 (C) y (D).

Figura 2. Alineamientos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de Mov19 quimérico y huMov19 y de dominios variables de cadena pesada y ligera muFR1-21 y huFR1-21. Alineamiento de secuencias modificadas en superficie para las regiones variables de Mov19 y de Fr1-21 con sus homólogos murinos. Dominios variables de cadena ligera A) y C); dominios variables de cadena pesada B) y D). Los guiones "-" indican identidad con la secuencia murina. Las CDR (definición de Kabat) están subrayadas.

Figura 3. Expresión de Mov19 quimérico y huMov19 en células HEK. Los plásmidos de expresión de Mov19 quimérico y humano se transfectaron transitoriamente en células HEK293-T en suspensión, se recolectaron 7 días más tarde y el anticuerpo expresado se determinó mediante ELISA cuantitativo. Los plásmidos de cadena ligera y de cadena pesada se transfectaron en relaciones molares respectivas de 3:1 o 6:1.

Figura 4. Especificidad de unión de anticuerpos anti-FOLR1, como se detecta por su unión a células 300-19 que expresan FOLR1. La unión de huMov19 a células 300-19-FOLR1 mediante citometría de flujo. Células parentales 300-19 que expresan FOLR-1. El sombreado continuo gris representa la autofluorescencia celular; las líneas discontinuas negras representan células incubadas con anticuerpo secundario antihumano conjugado con FITC, las líneas continuas negras representan células incubadas con el anticuerpo huMov-19 y el anticuerpo secundario antihumano conjugado con FITC.

Figura 5. Afinidades de unión y actividad citotóxica *in vitro* de anticuerpos anti-FOLR1 e inmunoconjugados. La afinidad de unión de huMov19 y diversos anticuerpos FR-1 murinos y humanizados se midió en células SKOV3. También se ensayó la actividad citotóxica *in vitro* de conjugados de PEG4-Mal-DM4 de los anticuerpos enumerados.

Figura 6. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de inmunoconjugados. La actividad ADCC de huMov19, huFR1-21 y Mor003 se ensayó contra células Igrov1. Las Igrov 1 se incubaron a 15.000 células/pocillo en una proporción de células Diana:NK de 1:4.

Figura 7. Actividad citotóxica de exposición continua de huFR1-21-PEG4-mal-DM4 y huMov19-PEG4-mal-DM4 en

células KB. Un exceso de anticuerpos no conjugados suprimió la actividad de los inmunoconjugados cuando se incubaron conjuntamente en presencia de células KB, lo que indica que la actividad citotóxica es dependiente del antígeno.

Figura 8. Eficacia *in vivo* de conjugados dirigidos a huMov19 en un modelo de xenoinjerto de KB. El conjugado huMov19-SPDB-DM4 (B) escindible dirigido a FOLR1 en comparación con el huC242-SPDB-DM4 (D) no dirigido a FOLR1, y el conjugado huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C) no escindible en comparación con el huC242-PEG4Mal-DM4 (E) sin diana se ensayaron usando un modelo de xenoinjerto establecido de células KB implantadas subcutáneamente en ratones SCID. La toma como diana de FOLR1 por huMov19 dio como resultado una reducción significativa en el volumen tumoral medio.

Figura 9. Eficacia *in vivo* de huMov19-PEG4-Mal-DM4 en comparación con anticuerpos anti-FOLR1 del FR-1 de murino en un modelo de xenoinjerto de KB. Se analizaron los anticuerpos de las series FR-1, no conjugados, o conjugados con PEG4-Mal-DM4, para determinar su capacidad para reducir el volumen tumoral medio en comparación con huMov19-PEG4-Mal-DM4 en un modelo de tumor de xenoinjerto de KB. (A) FR-1-9, (B) FR-1-13, (C) FR-1-22, y (D) FR-1-23.

Figura 10. Eficacia *in vivo* de huMov19-PEG4-Mal-DM4 y huFR1-21-PEG4-Mal-DM4 en un modelo de xenoinjerto de KB. Se realizaron inyecciones únicas de 10 mg/kg de huMov19-PEG4-Mal-DM4 y de huFR1-21-PEG4-Mal-DM4 en el día 6 después de la inoculación. Tanto huMov19-PEG4-Mal-DM4 como huFR1-21-PEG4-Mal-DM4 mostraron una reducción significativa en el volumen tumoral medio. "VT Medio" se refiere al volumen tumoral medio.

Figura 11. HuMov19-PEG4-mal-DM4 muestra actividad dependiente de la dosis en el modelo de xenoinjerto de KB. La actividad dependiente de la dosis del inmunoconjugado se ensayó a lo largo del intervalo de dosis ensayadas. La dosificación semanal dio como resultado una mejora de la actividad antitumoral. Las altas cargas de fármacos sólo mejoraron marginalmente la actividad en los grupos de dosis de 10 mg/kg, con actividad reducida en los grupos de dosis más bajas. 3,7 DAR se refiere a 3,7 moléculas de fármaco por anticuerpo.

Figura 12. Eficacia *in vivo* de huMov19 conjugado con DM1 y DM4 con varios conectores. HuMov19 se conjugó con SMCC-DM1 a 3,9 moléculas de fármaco por anticuerpo; sulfo-mal-DM4 a 3,7 moléculas de fármaco por anticuerpo (B), y sulfo-mal-DM4 a 8,23 moléculas de fármaco por anticuerpo (C) y se analizó su capacidad para reducir el volumen tumoral medio a varias concentraciones en comparación con huMov19-PEG4-mal-DM4.

Figura 13. Eficacia *in vivo* de huMov19 conjugado con DM1 y DM4 con varios conectores. HuMov19 se conjugó con SPP-DM1 a 4,3 moléculas de fármaco por anticuerpo; sulfo-SPDB-DM4 a 3,8 moléculas de fármaco por anticuerpo, SPDB-DM4 a 3,8 moléculas de fármaco por anticuerpo y sulfo-SPDB-DM4 a 6,8 moléculas de fármaco por anticuerpo y se analizó su capacidad para reducir el volumen tumoral medio. Los ratones se trataron con 5 mg/kg (A) y 2,5 mg/kg (B) de uno de los conjugados enumerados anteriormente o sólo con PBS.

Figura 14. Eficacia *in vivo* de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 en el modelo de tumor de xenoinjerto OVCAR-3. Los ratones se trataron con 25, 50 o 100 µg/kg de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 o sólo con PBS.

Figura 15. Eficacia *in vivo* de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 en el modelo de tumor de xenoinjerto IGROV-1. Los ratones se trataron con 25, 50 o 100 µg/kg de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 o solo con PBS

Figura 16. Eficacia *in vivo* de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 en el modelo de tumor de xenoinjerto OV-90. Los ratones se trataron con 25, 50 o 100 µg/kg de huMov19-sulfo-SPDB-DM4 o sólo con PBS.

Figura 17. Efecto de los conectores escindibles y no escindibles sobre la eficacia de los inmunoconjugados en modelos de xenoinjerto de KB.

Figura 18. Efecto de los conectores escindibles sobre la eficacia de los inmunoconjugados en el modelo de xenoinjerto KB (A) y en el modelo de xenoinjerto OVCAR-3 (B).

Figura 19. Eficacia *in vitro* e *in vivo* de huFR1-48, huFR1-49, huFR1-57 y huFR1-65-SMCC-DM1 en modelos de tumor de KB y de xenoinjerto. Los ratones se trataron con dosis únicas de 200 µg/kg.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona nuevos agentes que son anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos en forma de inmunoconjugados que se unen al receptor 1 de folato humano (FOLR1). Se describen polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes de unión a FOLR1, y métodos para preparar los agentes de unión a FOLR1. Se proporcionan adicionalmente nuevos agentes de unión a FOLR1 para uso en métodos, tales como métodos para inhibir el crecimiento de los tumores y/o tratar el cáncer.

I. Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación, se definen una serie de términos y

expresiones.

La expresión "receptor 1 de folato humano" o el término "FOLR1", tal y como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier FOLR1 humano nativo, a menos que se indique lo contrario. El término "FOLR1" abarca FOLR1 sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de FOLR1 que resulte del procesamiento dentro de la célula. El término también abarca variantes de FOLR1 de origen natural, p. ej., variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos FOLR1 descritos en el presente documento pueden aislarse a partir de una diversidad de fuentes, tales 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 P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1 y NP_057936.1 del NCBI.

El término “anticuerpo” significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, hidrato de carbono, 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 el presente documento, el término “anticuerpo” abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab’, F(ab’)2 y Fv), mutantes Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación del antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno siempre y cuando los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

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

La expresión "anticuerpo anti-FOLR1" o "un anticuerpo que se une a FOLR1" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a FOLR1 con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al tomar como diana FOLR1. El grado de unión de un anticuerpo anti-FOLR1 a una proteína no FOLR1 no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a FOLR1 según se mide, p. ej., mediante un radioinmunoensayo (RIA). Un anticuerpo que se une a FOLR1 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤10 nM, ≤ 1 nM o ≤ 0,1 nM.

La expresión “fragmento de anticuerpo” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab’, F(ab’)2 y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea implicada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de un determinante antigénico simple, o epítopo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término “anticuerpo monoclonal” abarca anticuerpos monoclonales tanto intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fab’, F(ab’)2, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos preparados de cualquier cantidad de maneras incluyendo, pero sin limitarse a, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, de murino). Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) son reemplazados por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo ratón, rata, conejo y hámster) que tienen 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 Fv de la región marco (FR) de una inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede ser modificado adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales 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 las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en las Pat. de EE. UU. 5.225.539 o 5.639.641.

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, bien sola o en combinación. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera constan cada una de cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con 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 la variabilidad de la secuencia entre 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, a veces se utilizan en la técnica combinaciones de estos dos enfoques para determinar las CDR.

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

La numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat, se refiere al sistema de numeración utilizado para 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, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (resto 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (p. ej., residuos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después del residuo 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por el alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat “estándar”. Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numeran 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 coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si sólo está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de los AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan 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	H26-H32..34
		(Numeración de Kabat)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Numeración de Chothia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

La expresión “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 usando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada y/o ligera tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera de murino y cadena pesada de ser humano.

La expresión “anticuerpos quiméricos” se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable tanto de las cadenas ligera como pesada corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (p. ej., ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otra (usualmente humano) para evitar la provocación de una respuesta inmune en esa especie.

El término "epítopo" o "determinante antigénico" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la porción de un antígeno capaz de ser reconocida y específicamente unida por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos después de la desnaturalización de las proteínas, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente tras la desnaturalización de las proteínas. Un epítopo incluye, típicamente, al menos 3, y más usualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

La "afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo) y su pareja de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse, en general, mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen, en general, al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen, en general, al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conoce una diversidad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede utilizar para los fines de la presente descripción. A continuación, se describen aspectos ilustrativos específicos.

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

La frase "substancialmente similar", o "sustancialmente igual", tal y como se usa en el presente documento, indica 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/comparador) de tal manera que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de las características biológicas medidas por dichos valores (p. ej., valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es menor de aproximadamente el 50 %, menor de aproximadamente el 40 %, menor de aproximadamente el 30 %, menor de aproximadamente el 20 %, o menor de aproximadamente el 10 % como una función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está "aislado" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está 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 están 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 el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a material que es puro (es decir, exento de contaminantes) en al menos un 50 %, puro en al menos un 90 %, puro en al menos un 95 %, puro en al menos un 98 % o puro en al menos un 99 %.

El término "inmunoconjugado" o "conjugado" tal y como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o un derivado del mismo que está unido a un agente de unión a células (es decir, un anticuerpo anti-FOLR1 o un fragmento del mismo) y está definido por una fórmula genérica: C-L-A, en donde C = citotoxina, L = conector, y A = agente de unión a células o anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento de anticuerpo. Los inmunoconjugados pueden definirse también mediante la fórmula genérica en orden inverso: A-L-C.

Un "conector" es cualquier resto químico que es capaz de enlazar un compuesto, usualmente un fármaco, tal como un maitansinoide, con un agente de unión a células tal como un anticuerpo anti-FOLR1 o un fragmento del mismo de

una manera covalente estable. Los conectores pueden ser susceptibles de, o ser sustancialmente resistentes a, la escisión inducida por ácido, a la escisión inducida por la luz, a la escisión inducida por peptidasa, a la escisión inducida por esterasa y a la escisión por enlace disulfuro, en condiciones bajo las cuales el compuesto o anticuerpo permanece activo. Los conectores adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa y grupos lábiles de esterasa. Los conectores también incluyen conectores cargados, y formas hidrófilas de los mismos como se describe en el presente documento y se conocen en la técnica.

Los términos “cáncer” y canceroso” se refieren a, o describen, la afección fisiológica en mamíferos en la que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

"Tumor" y "neoplasia" se refieren a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento o proliferación celular excesivo, 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 derivadas de un tumor o de una lesión precancerosa, incluyendo tanto células no tumorogénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales, como células madre tumorogénicas (células madre del cáncer). Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "célula tumoral" se modificará por el término "no tumorogénica" cuando se refiere únicamente a aquellas células tumorales que carecen de la capacidad para renovares y diferenciares, para distinguir esas células tumorales de las células madre del cáncer.

El término “sujeto” se refiere a cualquier animal (p. ej., un mamífero), incluyendo, pero no limitándose a, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

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

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dicha formulación puede ser estéril.

Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo tal y como se describe en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin específicamente declarado. Una "cantidad eficaz" se puede determinar empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el propósito declarado.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, retardar en cierta medida y en determinados casos, detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, retardar en cierta medida y en determinados casos, detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de "tratando" en el presente documento. En la medida en que el fármaco puede impedir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, puesto que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (p. ej., marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que sea detectable.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales con actividad antimitótica, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de cinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en “terapia dirigida” y quimioterapia convencional.

Los términos tales como "tratando" o "tratamiento" o "tratar" o "aliviando" o "aliviar" se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas de, y/o frenan la progresión de, una afección o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que impiden y/o retardan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana. Así, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en los que el trastorno se va a impedir. Un sujeto es “tratado” con éxito contra el cáncer si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción en el número o la ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejido blando y en hueso; inhibición de o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento del tumor; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad; mejora de la calidad de vida; reducción de la tumorogenicidad, frecuencia tumorogénica o capacidad tumorogénica, de un tumor; reducción en el número o frecuencia de células madre del cáncer en un tumor; diferenciación de células tumorogénicas a un estado no tumorogénico; o alguna combinación de efectos.

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", tal y como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda ser incorporado en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, se puede impartir una modificación a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede ser modificado adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "protecciones", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (p. ej., fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (p. ej., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (p. ej., nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, pli-L-lisina, etc., aquellos con intercaladores (p. ej., acridina, psolareno, etc.), aquellos que contienen quelantes (p. ej., metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos que tienen enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos alfa-anoméricos), así como formas no modificadas del o de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede ser reemplazado, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH terminal en 5’ y 3' puede ser fosforilado o sustituido con aminas o restos de grupos de protección orgánicos de entre 1 y 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden ser reemplazados por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, grupos en donde el fosfato es reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S (“ditioato”), (O)NR_2 (“amidato”), P(O)R, P(O)OR’, CO o CH_2 (“formacetal”), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluidos el ARN y el 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 se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento 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 incluyen también un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se comprende que, debido a que los polipéptidos se basan en anticuerpos, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas simples o cadenas asociadas.

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad” en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de residuos de nucleótidos o aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna sustitución conservativa de aminoácidos como

parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir utilizando software de comparación de secuencias o algoritmos o mediante inspección visual. En la técnica se conocen varios algoritmos y software que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Uno de tales 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, modificado 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). BLAST con huecos puede usarse 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 programas de software accesibles al público adicionales que se pueden utilizar para alinear secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en software GCG (p. ej., usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de huecos de 40, 50, 60, 70 o 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Como alternativa, se puede usar el programa GAP en el paquete de software GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol*. (44): 444-453 (1970)) para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos (p. ej., utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de huecos de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). Como alternativa, el porcentaje de identidad entre las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)). Por ejemplo, se puede determinar el porcentaje de identidad utilizando el programa ALIGN (versión 2.0) y utilizando un PAM120 con tabla de residuos, una penalización por longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Los parámetros apropiados para el alineamiento máximo por un software de alineamiento particular se pueden determinar por un experto en la técnica. Se pueden usar 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 x (Y/Z), donde Y es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas en el alineamiento de la primera y segunda secuencias (alineadas mediante inspección visual o 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 con respecto a la segunda secuencia será mayor que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia con respecto a la primera secuencia.

Como ejemplo no limitativo, si cualquier polinucleótido particular tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia (p. ej., es al menos un 80 % idéntico, al menos un 85 % idéntico, al menos un 90 % idéntico, y algunas veces, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos) 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 utiliza 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 utiliza 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 establecen de manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre toda la longitud de la secuencia nucleotídica de referencia y que 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 algunas veces al menos un 95 %, un 96 % 97 %, 98 %, 99 % de identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, medida utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. La identidad puede existir sobre una región de las secuencias que tiene una longitud de al menos aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 40-60 residuos o cualquier valor integral entre ellos, o sobre una región más larga de 60-80 residuos, al menos aproximadamente 90-100 residuos, o las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud 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 es reemplazado por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluidas las cadenas laterales básicas (p. ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano e 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 no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno o a los antígenos, es decir, al FOLR1 al que se une el polipéptido o anticuerpo. Los métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Brummell et al., *Biochem*. 32: 1180-1187 (1993), Kobayashi et al., *Protein Eng*. 12(10): 879-884 (1999); y Burks et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)).

Tal y como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, las formas en singular "un", "una", "el" y “la”

incluyen formas en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Se entiende que siempre que se use la expresión "que comprende", también se proporcionan otras análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

El término "y/o", tal y como se usa en una frase tal como "A y/o B" en el presente documento, pretende incluir tanto "A y B", "A o B", "A" y "B". Del mismo modo, el término "y/o", tal y como se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C", pretende abarcar cada uno de los siguientes: 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. Agentes de unión al FOLR1

La presente invención proporciona agentes que se unen específicamente al FOLR1 humano. Estos agentes se denominan en el presente documento como "agentes de unión al FOLR1". Las secuencias de aminoácidos (aa) y nucleótidos (nt) de longitud completa para FOLR1 son conocidas en la técnica y también se proporcionan en el presente documento representadas por las SEQ ID NO: 25 y 26, respectivamente.

Los agentes de unión al FOLR1 de la presente invención son inmunoconjugados que comprenden anticuerpos humanizados específicos o fragmentos de unión a antígeno, como se ha referido anteriormente, unidos mediante un conector a un maitansinoide o un análogo del mismo. En ciertos aspectos, los agentes de unión al FOLR-1 comprenden versiones humanizadas del anticuerpo Mov19 murino (cadena pesada y ligera variable mostradas como SEQ ID NO: 17 y 18, respectivamente).

Los agentes de unión a FOLR1 tienen uno o más de los siguientes efectos: inhiben la proliferación de células tumorales, reducen la tumorogenicidad de un tumor reduciendo la frecuencia de las células madre del cáncer en el tumor, inhiben el crecimiento de tumores, aumentan la supervivencia, desencadenan la muerte celular de las células tumorales, diferencian las células tumorogénicas a un estado no tumorogénico, o impiden la metástasis de las células tumorales.

Los inmunoconjugados que se unen específicamente al FOLR1 humano pueden desencadenar la muerte celular a través de un agente citotóxico. Un anticuerpo contra un anticuerpo FOLR1 humano puede conjugarse con un maitansinoide que se activa en células tumorales que expresan el FOLR1 por internalización de proteínas..

Los agentes de unión a FOLR1 pueden ser capaces de inhibir el crecimiento del tumor. Los agentes de unión a FOLR1 pueden ser capaces de inhibir el crecimiento del tumor *in vivo* (p. ej., en un modelo de ratón de xenoinjerto y/o en un ser humano que tiene cáncer). Los agentes de unión a FOLR1 pueden ser capaces de inhibir el crecimiento de tumores en un ser humano.

Se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa$_1$FXaa$_2$Xaa$_3$ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa$_1$ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa$_2$ se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa$_3$ se selecciona de G, E, T, S, A y V. El anticuerpo puede ser el anticuerpo huMov19, que es el anticuerpo descrito anteriormente que comprende la CDR2 de cadena pesada RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2).

Se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huMov19 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácido; y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Se describe un anticuerpo humanizado (huFR1-21) o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSYGMS (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31); y una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32); y/o (b) una

CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29).

Se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-21 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSYGMS o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-48 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMQ (SEQ ID NO: 60) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende IYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RDGNYAAY (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 58) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-49 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMY (SEQ ID NO: 66) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RHDYGAMDY (SEQ ID NO: 68) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYTNLA (SEQ ID NO: 63) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende TASNLAD (SEQ ID NO: 64) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-57 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSFGMH (SEQ ID NO: 72) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQNINNNLH (SEQ ID NO: 69) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende YVSQSVS (SEQ ID NO: 70) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a FOLR1 que comprenden las CDR de huFR1-65 con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas de aminoácidos por CDR. Por lo tanto, se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno que

se unen específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TSYTMH (SEQ ID NO: 78) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GGAYGRKPMDY (SEQ ID NO: 80) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQNVGPNVA (SEQ ID NO: 75) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende SASYRYS (SEQ ID NO: 76) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 77) o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

También se describen Los polipéptidos que comprenden una de las cadenas ligeras o cadenas pesadas individuales descritas en el presente documento, así como los polipéptidos (p. ej., anticuerpos) que comprenden tanto una cadena ligera como una cadena pesada. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 4 y 6 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huMov19, y la cadena pesada de huMov19, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 10-13 comprenden la versión 1.00 de cadena ligera de dominio variable, la versión 1.60 de cadena ligera de dominio variable, la versión 1.00 de cadena ligera y la versión 1.60 de cadena ligera de huMov19, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 42 y 46 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-21 y la cadena pesada de huFR1-21, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 41 y 45 comprenden la cadena ligera del dominio variable y la cadena ligera de huFR1-21, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 97 y 113 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-48 y la cadena pesada de huFR1-48, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 96 y 112 comprenden la cadena ligera de dominio variable y la cadena ligera de huFR1-48, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 99 y 115 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-49 y la cadena pesada de huFR1-49, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 98 y 114 comprenden la cadena ligera de dominio variable y la cadena ligera de huFR1-49, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 101 y 117 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-57 y la cadena pesada de huFR1-57, respectivamente. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 100 y 116 comprenden la cadena ligera de dominio variable y la cadena ligera de huFR1-57, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 103 y 119 comprenden el dominio variable de la cadena pesada de huFR1-65 y la cadena pesada de huFR1-65, respectivamente. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 102 y 118 comprenden la cadena ligera de dominio variable y la cadena ligera de huFR1-65, respectivamente.

También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 o 6; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 10-13. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 42 o 46; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41 y 45. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 97 o 113; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 96 o 112. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 99 o 115; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 98 o 114. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 101 o 117; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 100 o 116. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 103 o 119; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 102 o 118. El polipéptido puede comprender un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 10-13, 41, 42, 45 o 46. Así, el polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 o 6, y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10-13. El polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 42 o 46, y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 41 o 45 También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 97 o 113; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 96 o 112. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 99 o 115; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 98 o 114. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 101 o 117; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 100 o 116. También se describen polipéptidos que comprenden: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 103 o 119; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos

aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 102 o 118. El polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. El polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 46. El polipéptido puede comprender (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y/o (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. El polipéptido puede ser un anticuerpo y/o el polipéptido puede unirse específicamente al receptor 1 de folato humano. El polipéptido puede ser un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano. Por ejemplo, se describe un anticuerpo o anticuerpo humanizado que específicamente se une a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. El polipéptido que comprende SEQ ID NO: 4 puede ser una región variable de cadena pesada. El polipéptido que comprende SEQ ID NO: 10 o 11 puede ser una región variable de cadena ligera. También se describe un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. También se describe un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. También se describe un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113. También se describe un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115. También se describe un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117. También se describe un anticuerpo o anticuerpo humanizado que se une específicamente a un FOLR1 humano que comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118; y (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119. El polipéptido que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 10-13, 41, 42, 45, 46, 96-103 y 112-119 puede diferir de SEQ ID NO: 4, 6, 10-13, 41, 42, 45, 46, 96-103 y 112-119 solo por sustituciones conservativas de aminoácidos.

El agente de unión a FOLR1 puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en un anticuerpo anti-FOLR1 seleccionado de entre el grupo que consiste en los anticuerpos huMov19, FR-1-21, FR1-48, FR1-49, FR1-57 y FR1-65.

El anticuerpo huMov19 puede estar codificado por los plásmidos depositados en la American Type Culture Collection (ATCC) el 7 de abril de 2010 y que tienen los no. de depósito ATCC de PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.

El anticuerpo FR-1-21 está codificado por los plásmidos depositados en la ATCC el 7 de abril de 2010 y se le asignan los números de designación de depósito PTA-10775 y 10776.

Los anticuerpos humanizados pueden unirse a FOLR1 con sustancialmente la misma afinidad que el anticuerpo quimérico Mov19. La afinidad o avidez de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado bien conocido en la técnica, p. ej., citometría de flujo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA), o cinética (p. ej., análisis BIACORE^{TM}). Pueden emplearse fácilmente ensayos de unión directa, así como formatos de ensayo de unión competitiva. (Véanse, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press, Nueva York, NY, 1984; Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y los mçetodos descritos en el presente documento. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones (p. ej., concentración de sal, pH, temperatura). Así, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno (p. ej., KD o Kd, K_{asoc}, K_{disoc}) se hacen 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 el presente documento.

Los ensayos de unión se pueden realizar usando citometría de flujo en células que expresan el antígeno FOLR1 en la superficie. Por ejemplo, células positivas en FOLR1 como SKOV3 se incubaron con concentraciones variables de anticuerpos anti-FOLR1 usando 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 y se incubaron durante 1 h con 100 µl de anticuerpo IgG de cabra anti-ratón o de cabra anti-humano conjugado con FITC (tal como se puede obtener de, por ejemplo, Jackson Laboratory, 6 µg/ml en tampón FACS). Las células se sedimentaron de nuevo, se lavaron con tampón FACS y se resuspendieron 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 HTS de múltiples pocillos y se analizaron usando CellQuest Pro (todos ellos de BD Biosciences, San Diego, EE. UU.). Para cada muestra, se exportó la intensidad de fluorescencia media para FL1 (MFI) y se representó gráficamente frente a la concentración de anticuerpo en un gráfico semilogarítmico para generar una curva de unión. Se ajusta una curva sigmoidal de respuesta a la dosis para las curvas de unión y los valores de CE50 se calculan usando programas tales como GraphPad Prism v4 con parámetros por defecto (software de GraphPad, San Diego, CA). Se pueden

usar los valores de CE50 como una medida de 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. Utilizando el método del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, como se ha descrito anteriormente, para hacer que los linfocitos produzcan anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. Los linfocitos también pueden inmunizarse *in vitro*. Después de la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que pueden después ser seleccionadas de los linfocitos y células de mieloma no fusionados. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno escogido, como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o mediante un ensayo de unión *in vitro* (p. ej., radioinmunoensayo (RIA); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)) pueden propagarse después ya sea por cultivo usando métodos estándar *in vitro* (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales pueden entonces purificarse a partir del medio de cultivo o del fluido ascítico como se describe para los anticuerpos policlonales anteriores.

Como alternativa, también pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando métodos de ADN recombinante como se describe en la Patente de EE. UU. 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan a partir de células B maduras o células de hibridoma, tales como por RT-PCR usando cebadores oligonucleotídicos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesadas y ligeras se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, los cuales cuando se transfectan en células huésped tales como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo inmunoglobulina, los anticuerpos monoclonales son generados por las células huésped. También pueden aislarse anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de las especies deseadas a partir de bibliotecas de presentación de fagos que expresan las CDR de la especie deseada tal 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 pueden modificarse adicionalmente en una serie de diversas maneras utilizando 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, pueden ser sustituidos 1) para aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) para un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. Las regiones constantes pueden truncarse o se eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. La mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable puede usarse para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

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

También se pueden usar métodos para el diseño, humanización o modificación en superficie de anticuerpos no humanos o humanos y son bien conocidos en la técnica. Un anticuerpo humanizado, modificado en superficie o diseñado de forma similar puede tener uno o más residuos de aminoácidos de un origen que no sea humano, p. ej., pero sin limitarse a, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos de aminoácidos no humanos son reemplazados por residuos que se denominan, a menudo, residuos de "importación", que se toman típicamente de una variable "de importación", de una constante o de otro dominio de una secuencia humana conocida.

Tales secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, tasa de asociación, tasa de disociación, avidez, especificidad, semivida, o 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 de FOLR1. Por consiguiente, una parte o la totalidad de las secuencias de CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se pueden reemplazar con aminoácidos humanos u otros.

Los anticuerpos pueden también, opcionalmente, ser anticuerpos humanizados, modificados en superficie, de ingeniería o humanos preparados por ingeniería con retención de alta afinidad para el antígeno FOLR1 y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos anti-FOLR1 humanizados (o humanos) o de ingeniería y los anticuerpos modificados en superficie pueden prepararse opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados y de ingeniería utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales, de ingeniería y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están normalmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran las estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el

análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno, tal como FOLR1. Así, pueden seleccionarse residuos de marco (FR) y combinarse a partir de las secuencias de consenso y de importación de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el antígeno o los antígenos diana.

La humanización, modificación en superficie o ingeniería de anticuerpos se pueden realizar usando cualquier método conocido, tal como, pero sin limitarse a, los descritos en Winter (Jones et al., Nature 321: 522 (1986), Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988), Verhoeyen 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), Pat. de EE. UU. no. 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; documentos PCT/: US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; EP 229246; 7.557.189; 7.538.195; y 7.342.110.

El anticuerpo contra FOLR1 puede ser también un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden prepararse directamente utilizando varias técnicas conocidas en la técnica. Pueden generarse linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (Véanse, p. ej., Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95 y Patente de EE. UU. 5.750.373). Además, el anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde esa 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. Nat'l. 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 bibliotecas de fagos de anticuerpos también se describen en las Patentes de EE. UU. no. 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 intercambio de cadenas (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10: 779-783) son conocidas en la técnica y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

También pueden prepararse anticuerpos humanizados en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que son capaces, tras la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. 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.

También se describen anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente un receptor 1 de folato humano. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse específicamente al menos a dos epítopos diferentes. Los diferentes epítopos pueden estar dentro de la misma molécula (p. ej., el mismo receptor 1 de folato humano) o en diferentes moléculas de tal manera que ambos, por ejemplo, los anticuerpos pueden reconocer y unirse específicamente a un receptor 1 de folato humano así como, por ejemplo, 1) una molécula efectora en un leucocito tal como un receptor de células T (p. ej., CD3) o receptor Fc (por ejemplo, CD64, CD32, o CD16) o 2) un agente citotóxico como se describe con detalle a continuación.

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido descrito en el presente documento. Como alternativa, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG con el fin de enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el antígeno particular. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a 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 un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Las técnicas para preparar anticuerpos biespecíficos son normales 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 Patente de EE. UU. 5.731.168). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos (Tutt et al., J. Immunol., 147: 60 (1991)). Así, los anticuerpos para FOLR1 pueden ser multiespecíficos.

Se describe un fragmento de anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la penetración del tumor. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan mediante la 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 se pueden producir de forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden ser expresados en y secretados a partir de E. coli u otras células huésped, permitiendo así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Tales fragmentos de anticuerpos también se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos expuestas anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser anticuerpos lineales como se describe en la

Patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo, y puede ser monoespecíficos o biespecíficos. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica.

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

Además, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítopo de unión al receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítopo en una etiqueta de péptido que se fusiona a continuación al fragmento de anticuerpo en un extremo o en el medio (p. ej., mediante síntesis de ADN o péptido).

También se describen anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos de forma covalente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células inmunitarias a células no deseadas (Pat. de EE. UU. no. 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden ser preparados *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluidos aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

Debe apreciarse que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con los polipéptidos de un FOLR1 humano. A este respecto, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que pueda ser inducido para montar una respuesta humoral y generar 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, primate no humano (p. ej., monos cynomolgus, macacos, etc.) o lupino. Tanto las regiones variables como las constantes de las inmunoglobulinas modificadas pueden ser humanas. Las regiones variables de anticuerpos compatibles (generalmente derivadas de una fuente no humana) también pueden ser diseñadas o adaptadas específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables útiles en la presente descripción pueden ser humanizadas o, si no, alteradas mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

Los dominios variables tanto en la cadena pesada como ligera pueden ser alterados mediante la sustitución al menos parcial de una o más CDR y, si es necesario, mediante la sustitución parcial de la región marco y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase como el anticuerpo del que derivan las regiones marco, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de diferente clase y puede derivarse de un anticuerpo de una especie diferente. Puede que no sea necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede que solo sea necesario transferir los residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión al antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las Pat. de EE. UU. no. 5.585.069, 5.693.761 y 5.693.762, estará bien dentro de la competencia de los expertos en la técnica, ya sea llevando a cabo experimentos de rutina o por ensayos de prueba y error la obtención de 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 (p. ej., anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante ha sido suprimida o, si no, alterada con el fin de proporcionar las características bioquímicas deseadas tales como una mayor localización en el tumor o una semivida reducida en suero cuando se compara con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no alterada. La región constante de los anticuerpos modificados puede comprender una región constante humana. Las modificaciones en la región constante pueden comprender adiciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados descritos en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio constante de cadena ligera (CL). Se contemplan las regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios están parcial o totalmente eliminados. Los anticuerpos modificados pueden comprender construcciones o variantes con dominio eliminado, en donde se ha eliminado todo el dominio CH2 (construcciones ΔCH2). El dominio de la región constante omitido puede ser reemplazado por un espaciador corto de aminoácidos (p. ej., 10 residuos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular impartida típicamente por la región constante ausente.

Además de su configuración, se sabe en la técnica que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a los anticuerpos, activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a las células a través de la región Fc, con un sitio receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluidos IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen engullimiento y destrucción de partículas revestidas de anticuerpos, eliminación de complejos inmunes, lisis de células diana revestidas de anticuerpo por células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulinas.

Los anticuerpos de unión a FOLR1 pueden proporcionar funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando de este modo la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de regiones constantes moderen la unión del complemento y, por tanto, reduzcan la semivida en suero y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, pueden usarse otras modificaciones de la región constante para eliminar enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permitan una localización mejorada debido al aumento de la especificidad del antígeno o la flexibilidad del anticuerpo. De manera similar, las modificaciones en la región constante pueden hacerse fácilmente utilizando técnicas bioquímicas o de ingeniería molecular bien conocidas, bien dentro del alcance del experto en la técnica.

Un agente de unión a FOLR1 que es un anticuerpo puede que no tenga una o más funciones efectoras. Por ejemplo, el anticuerpo puede que no tenga actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). El anticuerpo puede que no se una a un receptor Fc y/o a factores del complemento. El anticuerpo puede que no tenga función efectora.

Se observará que los anticuerpos modificados se pueden diseñar por ingeniería para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra de los respectivos anticuerpos modificados. En otras construcciones, puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, podrían expresarse construcciones compatibles en donde el dominio CH2 se ha suprimido y el dominio CH3 que queda (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Un espaciador de este tipo 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 observarse que los espaciadores aminoácidos pueden, en algunos casos, demostrar ser inmunogénicos y provocar una respuesta inmune no deseada contra la construcción. Por consiguiente, cualquier espaciador añadido a la construcción será relativamente no inmunogénico, o incluso omitido en conjunto, con el fin de mantener las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la eliminación de dominios de región constante completa, se apreciará que los anticuerpos pueden proporcionarse mediante la eliminación o sustitución parcial de unos pocos o incluso de un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y, de este modo, aumentar la localización del tumor. De manera similar, puede desearse simplemente eliminar la parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (p. ej., la unión de C1Q del complemento) a modular. Dichas supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero) mientras dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante del sujeto. Además, como se ha mencionado anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden modificarse mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que aumentan el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (p. ej., unión a Fc) manteniendo sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Puede estar comprendida la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para aumentar las características deseables tales como disminuir o aumentar la función efectora o proporcionar más unión a citotoxina o hidrato de carbono. Puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

Se describen variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o a los fragmentos de anticuerpos de los mismos, proporcionados o descritos en el presente documento. 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 conservativa 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. Lo que se pretende mediante una sustitución conservativa de aminoácidos es bien conocido en la técnica.

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 se pueden variar sin efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Así, se describen variaciones de los polipéptidos que muestran una actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra una proteína receptora de folato humano. Tales mutantes incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo.

Los polipéptidos y análogos pueden modificarse adicionalmente para contener restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Los restos derivados 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. Se puede encontrar una descripción general de estos restos en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

Los polipéptidos aislados descritos en el presente documento pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tales métodos van desde métodos sintéticos de proteínas directos hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos aislados y expresan esas secuencias en un huésped transformado adecuado. Se puede construir una secuencia de ADN utilizando tecnología recombinante aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína de interés de tipo salvaje. Opcionalmente, la secuencia puede ser mutagenizada por mutagénesis específica en el sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Véanse, p. ej., Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81: 5662-5066 (1984) y la Pat. de EE. UU. 4.588.585.

Una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se construiría mediante síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos se pueden diseñar basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que son favorecidos en la célula huésped en donde se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse métodos estándar para sintetizar una secuencia polinucleotídica aislada que codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, se puede usar una secuencia completa de aminoácidos para construir un gen traducido de nuevo. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido particular aislado. Por ejemplo, se pueden sintetizar varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y después se ligan. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente protuberancias en 5’ o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (mediante 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 expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje adecuado puede confirmarse mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como es bien conocido en la técnica, para obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen debe estar operativamente unido a secuencias de control de expresión de transcripción y de traducción que sean funcionales en el huésped de expresión elegido.

Se usan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar ADN que codifica anticuerpos, o fragmentos de los mismos, contra FOLR1 humano. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una cadena polipeptídica de un anticuerpo anti-FOLR1, o fragmento de la misma, operativamente unidos a elementos reguladores de transcripción o de traducción adecuados derivados de genes de mamíferos, microbianos, víricos o de insectos. Una unidad de transcripción comprende generalmente un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen 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 apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción, como se describe con detalle a continuación. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia de operador para controlar la transcripción. Además, se puede incorporar la capacidad de replicarse en un huésped, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes. Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) está operativamente unido al ADN para 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 al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está posicionado de manera que permita la traducción. Los elementos estructurales destinados a ser utilizados en sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Como alternativa, cuando la proteína recombinante se expresa sin un líder o secuencia de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Opcionalmente, este residuo puede escindirse posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

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 huésped/vector 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 del 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 con un rango de huéspedes más amplio, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario.

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 procariotas, de levaduras, de insectos o células eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gram-negativos o gram positivos, por ejemplo E. coli o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe a continuación. También podrían emplearse sistemas de traducción sin células. Los vectores apropiados de clonación y expresión para uso con huéspedes bacterianos, fúngicos, de levadura y de células de mamíferos están descritos por Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985). Se puede encontrar información adicional con respecto a los métodos de producción de proteínas, que incluyen la producción de anticuerpos, p. ej., en la Publicación de Patente de EE. UU. no. 2008/0187954, Patentes de EE. UU. no. 6.413.746 y 6.660.501, y Publicación de Patente Internacional no. WO 04009823.

También se emplean ventajosamente varios sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar proteína recombinante. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero puede realizarse porque dichas proteínas están generalmente plegadas correctamente, adecuadamente modificadas 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 incluidas, por ejemplo, las células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados unidos al gen a expresar y otras secuencias no transcritas flanqueantes en 5' o 3' y secuencias no traducidas en 5' o 3', tales como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios dador y aceptor 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 son revisados por Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

Las proteínas producidas por un huésped transformado pueden purificarse según cualquier método adecuado. Dichos métodos estándar incluyen cromatografía (p. ej., intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. A la proteína se pueden unir etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de cubierta de influenza y glutatión-S-transferasa para permitir una fácil purificación por paso sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente usando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en el medio de cultivo pueden, en primer lugar, concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Como alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) laterales. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos normalmente empleados en la purificación de proteínas. Como alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios RP-HPLC hidrófobos, p. ej., gel de sílice que tiene metilo u otros grupos alifáticos laterales, para purificar adicionalmente un agente de unión a FOLR1. También se pueden emplear algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, mediante extracción inicial de los sedimentos de células, seguida de una o más etapas de concentración, desalado, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden ser disrumpidas por cualquier método conveniente, incluidos 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 descritos en la Publicación de Patente de EE. UU. no. 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

Se describe un agente de unión a FOLR1 que es un polipéptido que no es un anticuerpo. En la técnica se conocen una diversidad de métodos para identificar y producir polipéptidos no anticuerpos que se unen con alta afinidad a una proteína diana. Véanse, por ejemplo, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18: 295-304 (2007), Hosse et al., Protein Science, 15: 14-27 (2006), Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17: 653-658 (2006), Nygren, FEBS J., 275: 2668-76 (2008) y Skerra, FEBS J., 275: 2677-83 (2008). La tecnología de exposición en fagos se ha utilizado para identificar/producir el polipéptido de unión a FOLR1. El polipéptido puede comprender un armazón de proteínas de

un tipo seleccionado del grupo que consiste en proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición de consenso de anquirina y tiorredoxina.

El agente también puede ser una molécula no proteica. El agente puede ser una molécula pequeña. Las bibliotecas de química combinatoria y las técnicas útiles en la identificación de agentes de unión a FOLR1 no proteínicos son conocidas por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Kennedy et al., J. Comb. Chem, 10: 345-354 (2008), Dolle et al, J. Comb. Chem., 9: 855-902 (2007), y Bhattacharyya, Curr. Med. Chem., 8: 1383-404 (2001). El agente puede ser un hidrato de carbono, un glicosaminoglicano, una glicoproteína o un proteoglicano.

El agente también puede ser un aptámero de ácido nucleico. Los aptámeros son moléculas polinucleotídicas que han sido seleccionadas (p. ej., de conjuntos aleatorios o mutagenizados) basándose en su capacidad para unirse a otra molécula. El aptámero puede comprender un polinucleótido de ADN. El aptámero puede comprender un polinucleótido de ARN. El aptámero puede comprender uno o más residuos de ácido nucleico modificados. Los métodos de generación y cribado de aptámeros de ácido nucleico para la unión a proteínas son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. no. 5.270.163, la Patente de EE. UU. no. 5.683.867, la Patente de EE. UU. no. 5.763.595, la Patente de EE. UU. no. 6.344.321, la Patente de EE. UU. no. 7.368.236, la Patente de EE. UU. no. 5.582.981, la Patente de EE. UU. no. 5.756.291, la Patente de EE. UU. no. 5.840.867, la Patente de EE. UU. no. 7.312.325, la Patente de EE. UU. no. 7.329.742, la Publicación de Patente Internacional No. WO 02/077262, la Publicación de Patente Internacional No. WO 03/070984, la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. no. 2005/0239134, la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. no. 2005/0124565, y la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. no. 2008/0227735.

III. Inmunoconjugados

La presente invención está dirigida a conjugados (también denominados inmunoconjugados en el presente documento), como se hace referencia en las reivindicaciones. Además, se describen conjugados (también denominados inmunoconjugados en el presente documento), que comprenden los anticuerpos anti-FOLR1, fragmentos de anticuerpo, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus aspectos como se describe en el presente documento, unidos o conjugados a una citotoxina (fármaco) o profármaco. Así, se describe un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa$_1$FXaa$_2$Xaa$_3$ (SEQ ID NO: 56); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9); en donde Xaa$_1$ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa$_2$ se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa$_3$ se selecciona de G, E, T, S, A y V. En ciertos aspectos de los inmunoconjugados, el anticuerpo es el anticuerpo huMov19, que es el anticuerpo descrito anteriormente que comprende la CDR2 de cadena pesada RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 2). Se describe que el anticuerpo puede ser FR1-21 que comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSYGMS (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de cadena pesada que comprende TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de cadena ligera que comprende GATSLET (SEQ ID NO: 28); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29). También se describe que el anticuerpo puede ser FR1-48 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMQ (SEQ ID NO: 60); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RDGNYAAY (SEQ ID NO: 62); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57); una CDR2 de cadena ligera que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 58); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59). También se describe que el anticuerpo puede ser FR1-49 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TNYWMY (SEQ ID NO: 66); una CDR2 de cadena pesada que comprende AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende RHDYGAMDY (SEQ ID NO: 68); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASENIYTNLA (SEQ ID NO: 63); una CDR2 de cadena ligera que comprende TASNLAD (SEQ ID NO: 64); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65). También se describe que el anticuerpo puede ser FR1-57 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSFGMH (SEQ ID NO: 72); una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQNINNNLH (SEQ ID NO: 69); una CDR2 de cadena ligera que comprende YVSQSVS (SEQ ID NO: 70); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71). También se describe que el anticuerpo puede ser FR1-65 que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TSYTMH (SEQ ID NO: 78); una CDR2 de cadena pesada que comprende YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79); y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GGAYGRKPMDY (SEQ ID NO: 80); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQNVGPNVA (SEQ ID NO: 75); una CDR2 de cadena ligera que comprende SASYRYS (SEQ ID NO: 76); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 77).

En la técnica se conocen fármacos o profármacos adecuados. Los fármacos o profármacos pueden ser agentes citotóxicos. El agente citotóxico usado en el conjugado citotóxico puede ser cualquier compuesto que produzca la muerte de una célula, o induzca la muerte celular, o disminuya de alguna manera la viabilidad celular, e incluye, por

ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoides, benzodiazepinas, taxoides, CC-1065 y análogos de CC-1065, duocarmicinas y análogos de duocarmicina, enediinas, tales como caliqueamicinas, dolastatina y análogos de dolastatina, incluyendo auristatinas, derivados de tomaimicina, derivados de leptomicina, metotrexato, cisplatino, carboplatino, daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo y morfolino doxorrubicina. Según la presente invención, los agentes citotóxicos son maitansinoides y análogos de maitansinoides.

Tales conjugados se pueden preparar usando un grupo de enlace para unir un fármaco o profármaco al anticuerpo o equivalente funcional. Los grupos de enlace adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa y grupos lábilesa esterasa.

El fármaco o profármaco puede, por ejemplo, estar enlazado al anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo a través de un enlace disulfuro. La molécula conectora o agente reticulador comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo. Los grupos químicos reactivos para la reacción con el agente de unión a células pueden ser ésteres de *N*-succinimidilo y ésteres de *N*-sulfosuccinimidilo. Adicionalmente, la molécula conectora puede comprender un grupo químico reactivo, un grupo ditiopiridilo que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. Las moléculas conectoras pueden incluir, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)-propionato de *N*-succinimidilo (SPDP) (véase, p. ej., Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978), 4-(2-piridilditio)-butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB) (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. no. 4.563.304), 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB) (véase la Publicación de EE. UU. no. 20090274713), 4-(2-piridiltio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP) (véase, p. ej., número de registro CAS 341498-08-6), 2-iminotiolano o anhídrido acetilsuccínico. Por ejemplo, el anticuerpo o agente de unión a células puede estar modificado con reactivos de reticulación y el anticuerpo o agente de unión a células que contiene grupos tiol libres o protegidos así derivados se hace reaccionar después con un maitansinoide que contiene disulfuro o tiol para producir conjugados. Los conjugados se pueden purificar por cromatografía, que incluye, pero sin limitarse a, HPLC, exclusión por tamaño, adsorción, intercambio iónico y captación por afinidad, diálisis o filtración de flujo tangencial. El anticuerpo anti-FOLR1 puede estar enlazado a la citoxina a través de un conector SPDB o sulfo-SPDB. El anticuerpo huMov19 puede estar enlazado a una citotoxina a través de un conector SPDB o sulfo-SPDB.

El anticuerpo anti-FOLR1 puede estar enlazado a fármacos citotóxicos a través de enlaces disulfuro y un espaciador de polietilenglicol para aumentar la potencia, la solubilidad o la eficacia del inmunoconjugado. Dichos conectores hidrófilos escindibles se describen en el documento WO2009/0134976. El beneficio adicional de este diseño de conector es la deseada elevada proporción de monómero y la mínima agregación del conjugado anticuerpo-fármaco. En este aspecto, se contemplan específicamente los conjugados de agentes de unión a células y fármacos ligados a través del grupo disulfuro (-S-S-) que llevan espaciadores de polietilenglicol ($(CH_2CH_2O)_{n=1-14}$) con un estrecho intervalo de carga de fármaco de 2-8 que se describe que muestra una actividad biológica potente relativamente alta hacia las células cancerosas y tienen las propiedades bioquímicas deseadas de alto rendimiento de conjugación y elevada proporción de monómeros con una mínima agregación de proteínas.

En este aspecto, se contempla específicamente un conjugado de fármaco anticuerpo anti-FOLR1 de fórmula (I) o un conjugado de fórmula (I'):

$$A\text{-}[X_1\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2O\text{-})_n\text{-}Y\text{-}C]_m \qquad (I)$$

$$[C\text{-}Y\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2O\text{-})_n\text{-}X_l]_m\text{-}A \qquad (I')$$

en donde:

A representa un anticuerpo o fragmento anti-FOLR1;

C representa una citotoxina o fármaco;

X representa una unidad alifática, aromática o heterocíclica unida al agente de unión a células a través de un enlace tioéter, un enlace amida, un enlace carbamato o un enlace éter;

Y representa una unidad alifática, aromática o heterocíclica unida al fármaco a través de un enlace disulfuro;

l es 0 o 1;

m es un número entero de 2 a 8; y

n es un número entero de 1 a 24.

m puede ser un número entero de 2 a 6.

m puede ser un número entero de 3 a 5.

Además, n puede ser un número entero de 2 a 8. Como alternativa, tal como se describe en, por ejemplo, las

Patentes de EE. UU. No. 6.441.163 y 7.368.565, el fármaco puede, en primer lugar, modificarse para introducir un éster reactivo adecuado para reaccionar con un agente de unión a células. La reacción de estos fármacos que contienen un resto conector activado con un agente de unión a células proporciona otro método para producir un conjugado de fármaco y agente de unión a células. Los maitansionoides también pueden estar enlazados a un anticuerpo o fragmento anti-FOLR1 usando grupos de enlace PEG, como se expone por ejemplo en la Patente de EE. UU. 6.716.821. Estos grupos no escindibles de enlace PEG son solubles tanto en agua como en disolventes no acuosos, y pueden usarse para unir uno o más agentes citotóxicos a un agente de unión a células. Los ejemplos de grupos de enlace PEG incluyen conectores PEG heterobifuncionales que reaccionan con agentes citotóxicos y agentes de unión a células en extremos opuestos de los conectores a través de un grupo funcional sulfhidrilo o disulfuro en un extremo y un éster activo en el otro extremo. Como un ejemplo general de la síntesis de un conjugado citotóxico usando un grupo de enlace PEG, se hace referencia de nuevo a la Patente de EE. UU. 6.716.821. La síntesis comienza con la reacción de uno o más agentes citotóxicos que portan un resto reactivo PEG con un agente de unión a células, dando como resultado el desplazamiento del éster activo terminal de cada resto reactivo de PEG por un resto de aminoácido del agente de unión a células, para rendir conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células a través de un grupo de enlace PEG. Como alternativa, la unión celular puede modificarse con el reticulador bifuncional de PEG para introducir un resto disulfuro reactivo (tal como un disulfuro de piridilo), que puede tratarse después con un maitansinoide que contiene tiol para proporcionar un conjugado. En otro método, la unión celular puede modificarse con el reticulador PEG bifuncional para introducir un resto tiol que puede tratarse después con un maitansinoide que contiene disulfuro reactivo (tal como un disulfuro de piridilo), para proporcionar un conjugado.

También se pueden preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide con enlaces no escindibles. Dichos reticuladores se describen en la técnica (véase el ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbook y la Publicación de la Solicitud de Patente de EE. UU. no. 2005/0169933) e incluyen, pero no se limitan a, 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de *N*-succinimidilo (SMCC), 4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de *N*-succinimidilo que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster *N*-succinimidílico del ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), éster *N*-succinimidílico del ácido β-maleimidopropanoico (BMPS), éster *N*-succinimidílico del ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster *N*-hidroxisuccinimídico del ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), éster *N*-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), 6-(β-maleimidopropionamido)-hexanoato de succinimidilo (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de *N*-succinimidilo (SMPB), e isocianato de *N*-(p-maleimidofenilo) (PMPI), 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de *N*-succinimidilo (SIAB), yodoacetato de *N*-succinimidilo (SIA), bromoacetato de *N*-succinimidilo (SBA) y 3-(bromoacetamido)-propionato de *N*-succinimidilo (SBAP). El anticuerpo puede modificarse con reactivos de reticulación tales como 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), sulfo-SMCC, éster maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS o yodoacetato de succinimidilo, como se describe en la bibliografía, para introducir 1-10 grupos reactivos (Yoshitake et al., Eur. J. Biochem., 101: 395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem., 56-63 (1984); y Liu et al., Biochem., 18: 690-697 (1979)). El anticuerpo modificado se hace reaccionar a continuación con el derivado de maitansinoide que contiene tiol para producir un conjugado. El conjugado puede ser purificado por filtración en gel a través de una columna de Sefadex G25 o por diálisis o filtración en flujo tangencial. Los anticuerpos modificados se tratan con el maitansinoide que contiene tiol (1 a 2 equivalentes molares/grupo maleimido) y los conjugados anticuerpo-maitansinoide son purificados por filtración en gel a través de una columna Sefadex G-25, cromatografía sobre una columna de hidroxiapatita cerámica, diálisis o filtración en flujo tangencial o una combinación de estos métodos. Típicamente, se unen un promedio de 1-10 maitansinoides por anticuerpo. Un método es modificar anticuerpos con 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para introducir grupos maleimido seguido por la reacción del anticuerpo modificado con un maitansinoide que contiene tiol para dar un conjugado ligado por tioéter. De nuevo, se producen conjugados con 1 a 10 moléculas de fármaco por molécula de anticuerpo. De la misma manera, se preparan conjugados de maitansinoide de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hormonas proteicas, factores de crecimiento proteicos y otras proteínas.

El anticuerpo de FOLR1 (p. ej., huMov19, FR1-21, FR1-48, FR1-49, FR1-57 o FR1-65) puede estar enlazado también al fármaco a través de un enlace no escindible a través de la intermediación de un espaciador de PEG. Los reactivos de reticulación adecuados que comprenden cadenas de PEG hidrófilas que forman conectores entre un fármaco y el anticuerpo o fragmento anti-FOLR1 son también bien conocidos en la técnica, o están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Quanta Biodesign, Powell, Ohio). Los reticuladores adecuados que contienen PEG se pueden sintetizar también a partir de los propios PEG disponibles comercialmente usando técnicas de química sintética estándares conocidas por el experto en la técnica. Los fármacos pueden hacerse reaccionar con reticuladores bifuncionales que contienen PEG para dar compuestos de la siguiente fórmula, $Z\text{-}X_1\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_n\text{-}Y_p\text{-}D$, por métodos descritos en detalle en la Publicación de Patente de EE. UU. 20090274713 y en WO2009/0134976, que pueden entonces reaccionar con el agente de unión a células para proporcionar un conjugado. Como alternativa, la unión celular puede modificarse con el reticulador bifuncional de PEG para introducir un grupo reactivo con tiol (tal como una maleimida o haloacetamida) que puede tratarse después con un maitansinoide que contiene tiol para proporcionar un conjugado. En otro método, la unión celular puede modificarse con el reticulador bifuncional con PEG para introducir un resto tiol que puede tratarse después con un maitansinoide reactivo con tiol (tal como un maitansinoide que lleva una maleimida o haloacetamida), para proporcionar un conjugado.

Además, se describe un conjugado de fármaco anticuerpo anti-FOLR1 de fórmula (II) o de fórmula (II'):

$$A\text{-}[X_1\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_n\text{-}Y_p\text{-}C]_m \qquad (II)$$

$$[C\text{-}Y_p\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_n\ X_1]_m\text{-}A \qquad (II')$$

en donde, A representa un anticuerpo o fragmento anti-FOLR1;

C representa una citotoxina o fármaco;

X representa una unidad alifática, aromática o heterocíclica unida al agente de unión a células a través de un enlace tioéter, un enlace amida, un enlace carbamato o un enlace éter;

Y representa una unidad alifática, aromática o heterocíclica unida al fármaco a través de un enlace covalente seleccionado del grupo que consiste en un enlace tioéter, un enlace amida, un enlace carbamato, un enlace éter, un enlace amina, un enlace carbono-carbono y un enlace hidrazona;

l es 0 o 1;

p es 0 o 1;

m es un número entero de 2 a 15; y

n es un número entero de 1 a 2.000.

m puede ser un número entero de 2 a 8; y

n es un número entero de 1 a 24.

m puede ser un número entero de 2 a 6.

n puede ser un número entero de 2 a 8.

m puede ser un número entero de 3 a 5. En un cierto aspecto, el anticuerpo es huMov19. Como se describe, el anticuerpo puede ser FR1-21. Como se describe, el anticuerpo puede ser FR-1-48. El anticuerpo puede ser FR-1-49. Como se describe, el anticuerpo puede ser FR-1-57. Como se describe, el anticuerpo puede ser FR-1-65.

Los ejemplos de conectores que contienen PEG adecuados incluyen conectores que tienen un resto de éster de *N*-succinimidilo o de éster de *N*-sulfosuccinimidilo para la reacción con el anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo, así como un resto basado en maleimido o haloacetilo para la reacción con el compuesto. Puede incorporarse un espaciador de PEG en cualquier reticulador conocido en la técnica por los métodos descritos en el presente documento.

Muchos de los conectores descritos en el presente documento se describen con detalle en las Publicaciones de Patente de EE. UU. no. 20050169933 y 20090274713 y en WO2009/0134976.

La presente invención incluye aspectos en donde aproximadamente 2 a aproximadamente 8 moléculas de fármaco ("carga de fármaco"), por ejemplo, maitansinoide, están enlazadas a un anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo, el efecto antitumoral del conjugado es mucho más eficaz en comparación con una carga de fármaco de un número menor o mayor de fármacos enlazados al mismo agente de unión a células. "Carga de fármaco", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al número de moléculas de fármaco (p. ej., un maitansinoide) que se puede unir a un agente de unión a células (p. ej., un anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo). El número de moléculas de fármaco que se pueden unir a un agente de unión a células puede promediar de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 (p. ej., 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1). En ciertos aspectos, el fármaco es $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4). Así, en un cierto aspecto, el anticuerpo huMov19 se conjuga con DM1 o DM4. También se describe que el anticuerpo FR-1-21 puede conjugarse con DM1 o DM4. También se describe que el anticuerpo FR-1-48 puede conjugarse con DM1 o DM4. Adicionalmente, se describe que el anticuerpo FR-1-49 puede conjugarse con DM1 o DM4. Todavía se describe adicionalmente que el anticuerpo FR-1-57 puede conjugarse con DM1 o DM4. También se describe que el anticuerpo FR-1-65 puede conjugarse con DM1 o DM4.

Así, un inmunoconjugado puede comprender 1 maitansinoide por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender 2 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender 3 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender 4 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender 5 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender 6 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender 7 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender 8 maitansinoides por anticuerpo.

Un inmunoconjugado puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 maitansinoides por anticuerpo Un inmunoconjugado puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender aproximadamente 2 a aproximadamente 5 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 maitansinoides por anticuerpo. Un inmunoconjugado puede comprender de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 maitansinoides por anticuerpo.

Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 (p. ej., 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1) moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) unidos por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo.

Una composición que comprende inmunoconjugados puede tener un promedio de aproximadamente 2 ± 0,5, aproximadamente 2,5 ± 0,5, aproximadamente 3 ± 0,5, aproximadamente 3,5 ± 0,5, aproximadamente 4 ± 0,5, aproximadamente 4,5 ± 0,5, aproximadamente 5 ± 0,5, aproximadamente 5,5 ± 0,5, aproximadamente 6 ± 0,5, aproximadamente 6,5 ± 0,5, aproximadamente 7 ± 0,5, aproximadamente 7,5 ± 0,5, o aproximadamente 8 ± 0,5 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) unidas por anticuerpo. Una composición que comprende inmunoconjugados tiene un promedio de aproximadamente 3,5 ± 0,5 moléculas de fármaco (p. ej., maitansinoides) por anticuerpo.

El anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo puede modificarse haciendo reaccionar un reactivo de reticulación bifuncional con el anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo, dando como resultado de este modo la unión covalente de una molécula conectora al anticuerpo anti-FOLR1 o fragmento del mismo. Tal y como se utiliza en el presente documento, un “reactivo de reticulación bifuncional” es cualquier resto químico que enlaza covalentemente un agente de unión a células a un fármaco, tal como los fármacos descritos en el presente documento. En otro método, una porción del resto de enlace es proporcionado por el fármaco. A este respecto, el fármaco comprende un resto de enlace que es parte de una molécula conectora más grande que se usa para unir el agente de unión a células al fármaco. Por ejemplo, para formar el maitansinoide DM1, la cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de la maitansina se modifica para que tenga un grupo sulfhidrilo libre (SH). Esta forma tiolada de la maitansina puede reaccionar con un agente de unión a células modificado para formar un conjugado. Por lo tanto, el conector final se ensambla a partir de dos componentes, uno de los cuales es proporcionado por el reactivo de reticulación, mientras que el otro es proporcionado por la cadena lateral de DM1.

Las moléculas de fármaco también pueden estar enlazadas a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula vehicular intermediaria tal como seroalbúmina.

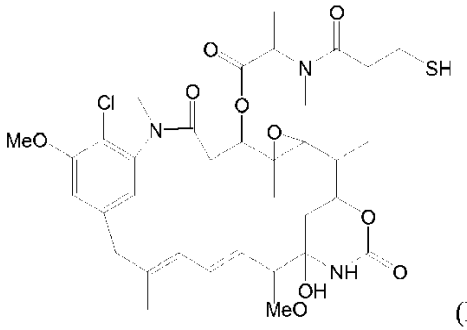
Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "enlazado a un agente de unión a células" o "enlazado a un anticuerpo o fragmento anti-FOLR1" se refiere a la molécula de conjugado que comprende al menos un derivado de fármaco unido a un agente de unión a células, anticuerpo o fragmento anti-FOLR1, a través de un grupo de enlace adecuado, o un precursor del mismo. El grupo de enlace puede ser SMCC.

Los agentes citotóxicos útiles en la presente invención son maitansinoides y análogos de maitansinoides. Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen ésteres de maitansinol y análogos de maitansinol. Se incluyen todos los fármacos que inhiben la formación de microtúbulos y que son altamente tóxicos para las células de mamífero, al igual que el maitansinol y los análogos de maitansinol.

Los ejemplos de ésteres de maitansinol adecuados incluyen los que tienen un anillo aromático modificado y los que tienen modificaciones en otras posiciones. Tales maitansinoides adecuados se describen en las Patentes de EE. UU. no. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 5.208.020; 5.416.064; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545; 6.333.410; 7.276.497 y 7.473.796.

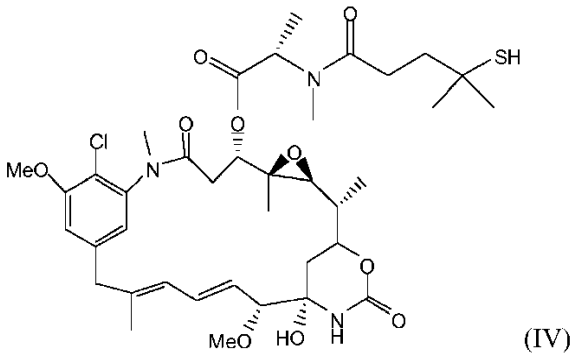
En un cierto aspecto, los inmunoconjugados de la invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), denominado formalmente $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. DM1

está representado por la siguiente fórmula estructural (III):



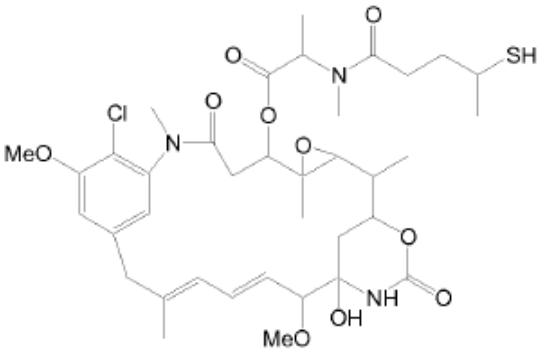
(III)

En otro aspecto, los conjugados de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol, $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (p. ej., DM4) como el agente citotóxico. DM4 está representado por la siguiente fórmula estructural (IV):



(IV)

Otro maitansinoide que comprende una cadena lateral que contiene un enlace tiol estéricamente impedido es $N^{2'}$-desacetil-N-$^{2'}$(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM3), representado por la siguiente fórmula estructural (V):

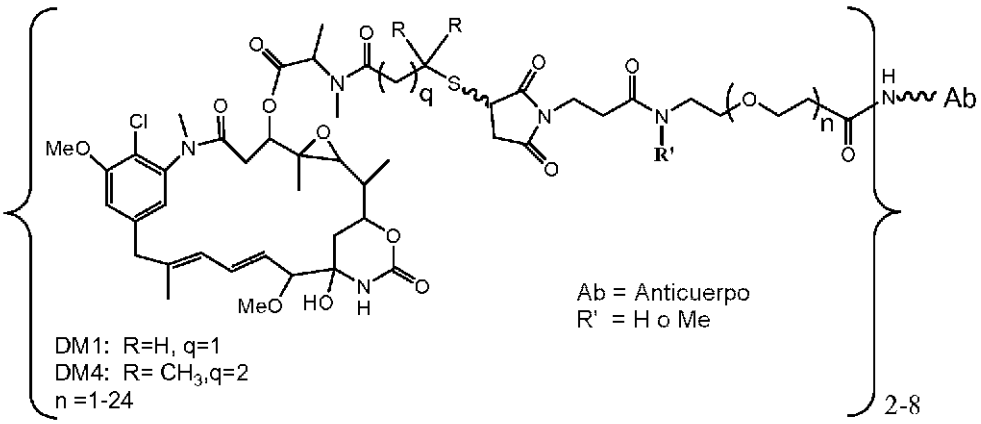


(V)

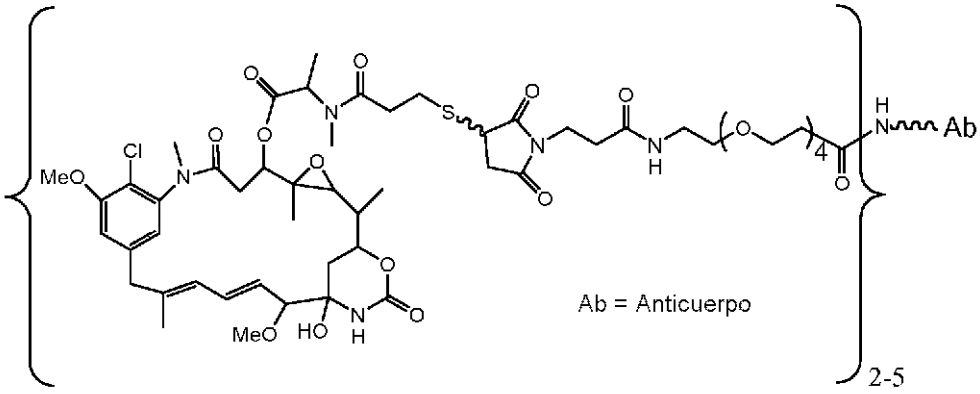
En el conjugado de la presente descripción se pueden utilizar también cada uno de los maitansinoides descritos en las Patentes de EE. UU. no. 5.208.020 y 7.276.497.

Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como la posición para enlazar químicamente el resto de enlace. Por ejemplo, se espera que sean útiles todos los de la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxi y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxi. En ciertos aspectos, se utiliza la posición C-3. En ciertos aspectos, se utiliza la posición C-3 del maitansinol.

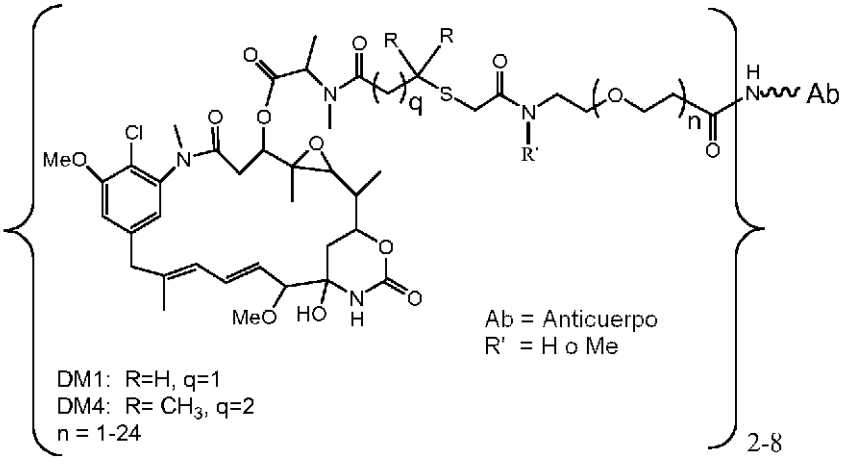
Las representaciones estructurales de ciertos conjugados se muestran a continuación:



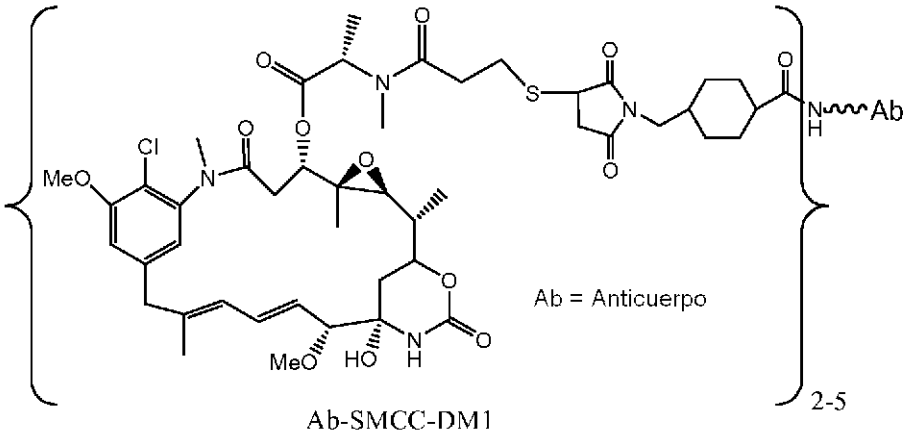
Ab-PEG-Mal-DM1/DM4 (VI)



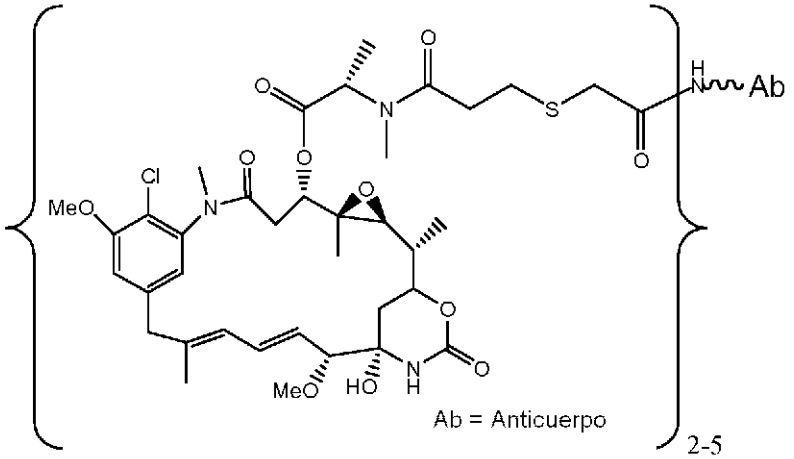
Ab-PEG4-Mal-DM1 (VII)



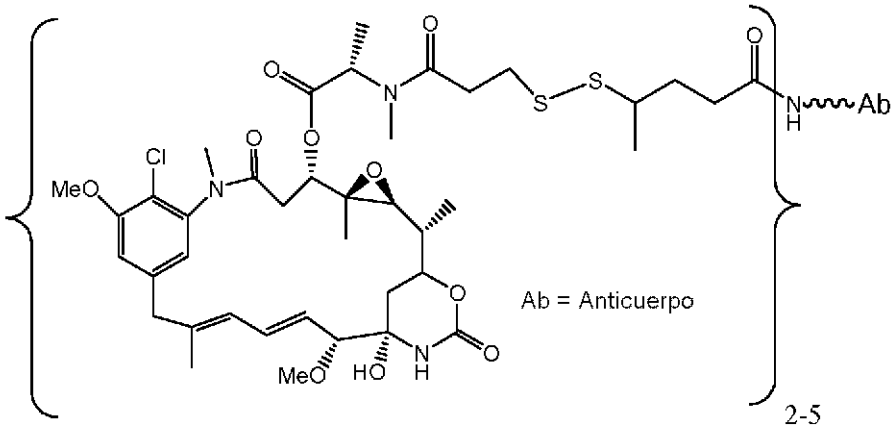
Ab-PEG-SIA-DM1/DM4 (VIII)



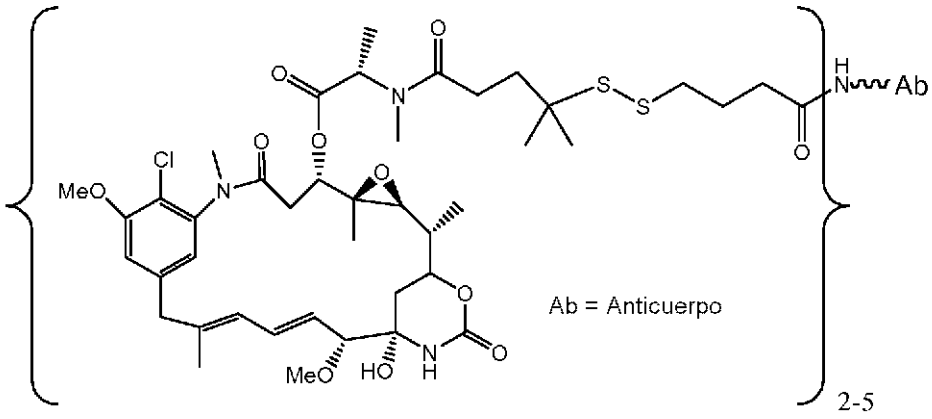
Ab-SMCC-DM1 (IX)



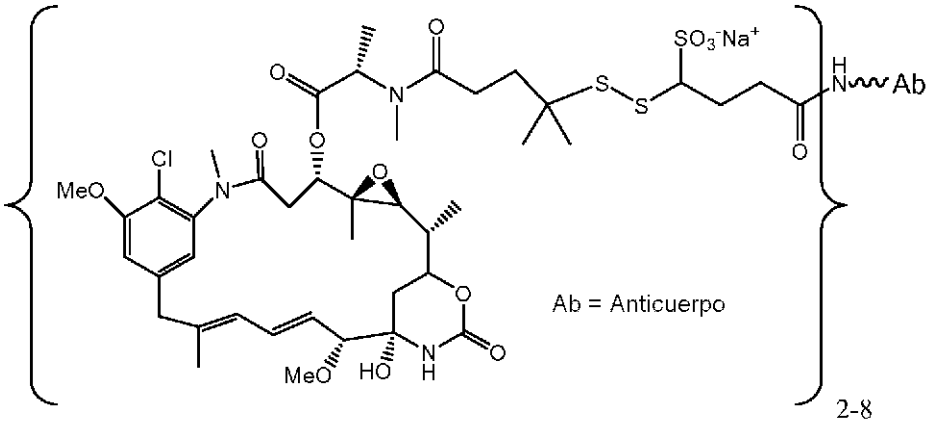
Ab-SIA-DM1 (X)



Ab-SPP-DM1 (XI)



Ab-SPDB-DM4 (XII)



Ab-sulfo-SPDB-DM4 (XIII)

En un cierto aspecto, el anticuerpo es huMov19.

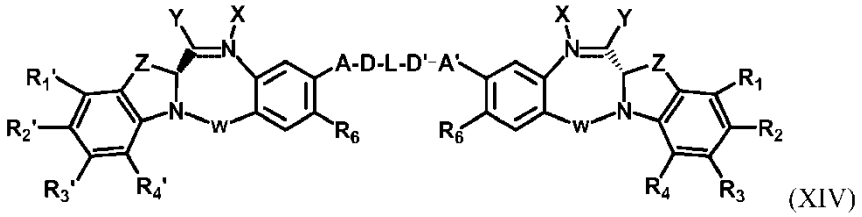
Se proporcionan varias descripciones para producir tales conjugados de anticuerpo-maitansinoide en las Patentes de EE. UU. no. 6.333.410, 6.441.163, 6.716.821 y 7.368.565.

En general, una disolución de un anticuerpo en tampón acuoso puede incubarse con un exceso molar de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo. La mezcla de reacción se puede parar por adición de amina en exceso (tal como etanolamina, taurina, etc.). El conjugado de maitansinoide-anticuerpo puede entonces purificarse por filtración en gel. El número de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo espectrofotométricamente la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Se usa un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo y se usa también un promedio de 2-5 en ciertos aspectos. El número promedio de moléculas de maitansinoides/anticuerpo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1-10, 2-5, 3-4, 3,5-4 o 3,5. En un aspecto, el número promedio de moléculas de maitansinoides/anticuerpo es de aproximadamente 3,5 ± 0,5. En un aspecto, el número promedio de moléculas de maitansinoides/anticuerpo es de aproximadamente 3,5-4.

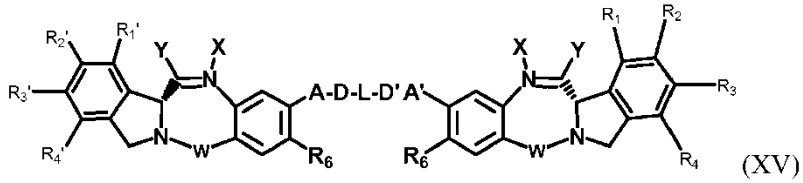
Los conjugados de anticuerpos con fármacos maitansinoides pueden evaluarse por su capacidad para suprimir la proliferación de varias líneas celulares no deseadas *in vitro*. Por ejemplo, las líneas celulares tales como la línea de células KB humanas, pueden usarse fácilmente para la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos. Las células a evaluar pueden exponerse a los compuestos durante 4 a 5 días y medirse las fracciones de células supervivientes en ensayos directos por métodos conocidos. Los valores de CI_{50} pueden calcularse entonces a partir de los resultados de los ensayos.

También se pueden utilizar compuestos de benzodiazepina descritos, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. no. 2010/0203007 (p. ej., indolinobenzodiazepinas u oxazolidinobenzodiazepinas), derivados de los mismos, intermedios de los mismos para preparar fragmentos o conjugados de anticuerpos anti-FOLR1.

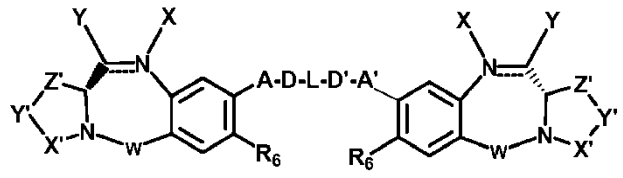
Las benzodiazepinas útiles incluyen compuestos de fórmula (XIV), (XV) y (XVI), en los que los compuestos díméros llevan opcionalmente un grupo de enlace que permite la unión a los agentes de unión a células.



(XIV)



(XV)



(XVI)

en donde la doble línea = entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, con la condición de que cuando es un enlace doble, X está ausente e Y es H, y cuando es un enlace sencillo, X es H o un resto protector de amina que transforma el compuesto en un profármaco;

Y se selecciona de -OR, un éster representado por -OCOR', un carbonato representado por -OCOOR', un carbamato representado por -OCONR'R'', una amina o una hidroxilamina representada por NR'R'', amida representada por -NRCOR', un péptido representado por NRCOP, en donde P es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 y 20 unidades de aminoácido, un tioéter representado por SR', un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por $-SO_2R'$, un sulfito $-SO_3$, un bisulfito $-OSO_3$, un halógeno, ciano, un azido o un tiol, en donde R, R' y R'' son iguales o diferentes y se seleccionan entre H, alquilo, alquenilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000, arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono en donde el sustituyente se selecciona de halógeno, OR_7, NR_8R_9, NO_2, NRCOR', SR_{10}, un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por $-SO_2R'$, un sulfito $-SO_3$, un bisulfito $-OSO_3$, una sulfonamida representada por SO_2NRR', ciano, un azido, $-COR_{11}$, $OCOR_{11}$ u $OCONR_{11}R_{12}$, en donde las definiciones de R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} y R_{12} son como se han dado anteriormente, opcionalmente R'' es OH;

W es C=O, C=S, CH_2, BH, SO o SO_2;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' se seleccionan cada uno independientemente entre H, alquilo, alquenilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico, sustituido o no sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-COCH_2CH_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000, o un sustituyente seleccionado entre un halógeno, guanidinio [$-NH(C=NH)\ NH_2$], OR_7, NR_8R_9, NO_2, NRCOR', SR_{10}, un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por $-SO_2R'$, un sulfito $-SO_3$, un bisulfito $-OSO_3$, una sulfonamida representada por SO_2NRR', ciano, un azido, $-COR_{11}$, $OCOR_{11}$ u $OCONR_{11}R_{12}$, en donde R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} y R_{12} se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000, arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, R_{10} opcionalmente es SR_{13} o COR_{13}, donde R_{13} se selecciona de alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, donde n es un número entero de 1 a 2.000, arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, opcionalmente R_{11} es OR_{14}, donde R_{14} tiene la misma definición que R, opcionalmente uno cualquiera de R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' o R_4' es un grupo de enlace que permite la unión a un agente de unión a células a través de un enlace covalente o se selecciona de una unidad de polipirrolo, poliindolilo, poliimidazolilo, polipirrolo-imidazolilo, polipirrolo-indolilo o poliimidazol-indolilo que llevan opcionalmente un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión a células;

Z se selecciona de $(CH_2)_n$, donde n es 1, 2 o 3, $CR_{15}R_{16}$, NR_{17}, O o S, en donde R_{15}, R_{16} y R_{17} se seleccionan cada uno independientemente entre H, alquilo lineal, ramificado o cíclico, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una

unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000;

R_6 es OR, SR o NRR', en donde R y R' tienen la misma definición que se ha dado anteriormente;

X' se selecciona de CH_2, NR, CO, BH, SO o SO_2 en donde R tiene la misma definición que la dada anteriormente;

Y' es O, CH_2, NR o S, donde R tiene la misma definición que la dada anteriormente;

Z' es CH_2 o $(CH_2)_n$, en donde n es 2, 3 o 4, con la condición de que X', Y' y Z' no sean todos CH_2 al mismo tiempo;

A y A' son iguales o diferentes y se seleccionan entre O, -CRR'O, S, -CRR'S, $-NR_{15}$ o CRR'NHR_{15}, en donde R y R' tienen la misma definición que la dada anteriormente y en donde R_{15} tiene la misma definición que la dada anteriormente para R;

D y D' son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno cualquiera de halógeno, OR_7, NR_8R_9, NO_2, NRCOR', SR_{10}, un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por $-SO_2R'$, un sulfito $-SO_3$, un bisulfito $-OSO_3$, una sulfonamida representada por SO_2NRR', ciano, un azido, $-COR_{11}$, $OCOR_{11}$ u $OCONR_{11}R_{12}$, en donde las definiciones de R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} y R_{12} son como se han dado anteriormente, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000;

L es un grupo fenilo opcional o un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono que está opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es un grupo enlazante que permite el enlace con un agente de unión a células a través de un enlace covalente, o se selecciona de alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno cualquiera de halógeno, OR_7, NR_8R_9, NO_2, NRCOR', SR_{10}, un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por $-SO_2R'$, un sulfito $-SO_3$, un bisulfito $-OSO_3$, una sulfonamida representada por SO_2NRR', ciano, un azido, $-COR_{11}$, $OCOR_{11}$ u $OCONR_{11}R_{12}$, en donde las definiciones de R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} y R_{12} son como se han dado anteriormente, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000; opcionalmente, el propio L es un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión a células a través de un enlace covalente; o sus solvatos, sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros, enantiómeros o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos; siempre que el compuesto no tenga más de un grupo de enlace que permita el enlace con un agente de unión a células a través de un enlace covalente.

La línea doble = entre N y C puede representar un enlace sencillo o un enlace doble, siempre que cuando es un enlace doble, X está ausente e Y es H, y cuando es un enlace sencillo, X es H o un grupo protector de amina que transforma el compuesto en un profármaco;

Y se selecciona de -OR, NR'R", un sulfito $-SO_3$, o un bisulfito $-OSO_3$, en donde R se selecciona de H, alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000, arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono;

W es C=O, CH_2 o SO_2;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' se seleccionan cada uno independientemente de H, NO_2 o un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión a células a través de un enlace covalente;

R_6 es OR_{18}, donde R_{18} tiene la misma definición que R;

Z se selecciona de $(CH_2)_n$, en donde n es 1, 2 o 3, $CR_{15}R_{16}$, NR_{17}, O o S, en donde R_{15}, R_{16} y R_{17} se seleccionan cada uno independientemente entre H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, en donde n es un número entero de 1 a 2.000;

X' se selecciona de CH_2, o C=O;

Y' es O, NR o S, en donde R es como se ha definido anteriormente;

Z' es CH_2 o $(CH_2)_2$;

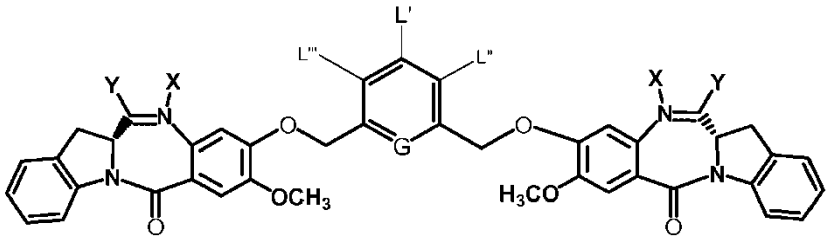
A y A' son cada uno O;

D y D' son iguales o diferentes e independientemente seleccionados de alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

L es un grupo fenilo opcional o un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono que está opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es un grupo enlazante que permite la unión a un agente de unión a células a través de un enlace covalente, o se selecciona de alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico

que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con uno cualquiera de halógeno, OR_7, NR_8R_9, NO_2, NRCOR', SR_{10}, un sulfóxido representado por SOR', una sulfona representada por $-SO_2R'$, un sulfito $-SO_3$, un bisulfito $-OSO_3$, una sulfonamida representada por SO_2NRR', ciano, un azido, $-COR_{11}$, $OCOR_{11}$ u $OCONR_{11}R_{12}$, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)$ n, en donde n es un número entero de 1 a 2.000; opcionalmente, el propio L es un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión a células a través de un enlace covalente; o sus solvatos, sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros, enantiómeros o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos.

El compuesto puede estar representado por la fórmula (XVII):



(XVII)

en donde la doble línea = entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, con la condición de que cuando es un enlace doble, X está ausente e Y es H, y cuando es un enlace simple, X es H o un grupo protector de amina que transforma el compuesto en un profármaco, e Y se selecciona de OH, un éter representado por -OR, un sulfito $-SO_3$, o un bisulfito $-OSO_3$, en donde R se selecciona de alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico de 1 a 10 átomos de carbono

uno de R_2, R_3 es un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión a células a través de un enlace covalente y el otro es H,

uno de L', L'' o L''' es un grupo de enlace que permite el enlace con un agente de unión a células, mientras que los otros son H; L' puede ser el grupo de enlace y G es CH o N. Otros ejemplos se describen en la Solicitud de Patente de EE. UU. no. 61/150.201. Así, el anticuerpo huMov19 puede conjugarse con un benzodiazepeno que tiene una estructura mostrada en las XIX-XXII anteriores. El anticuerpo FR-1-21 puede conjugarse con un benzodiazepeno que tiene una estructura mostrada en las XIX-XXII anteriores.

IV. Polinucleótidos

Se describen polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido que se une específicamente a un receptor FOLR1 humano o a un fragmento de dicho polipéptido. Por ejemplo, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo para un FOLR1 humano o que codifica un fragmento de dicho anticuerpo. Los polinucleótidos pueden estar en la forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y pueden ser bicatenarios o monocatenarios, y si son monocatenarios pueden ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido).

Los polinucleótidos pueden aislarse. Los polinucleótidos pueden ser sustancialmente puros.

Se describe un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GYTFTGYFMN, RIHPYDGDTF y las SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9, 10 y 11. Se describe un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41, 42, y 88-103. También se describe un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 10, 11, 41, 42 y 88-103.

Los polinucleótidos SEQ ID NO: 5, 14 y 15 comprenden la secuencia codificante para la cadena pesada de dominio variable huMov19, la versión 1.00 de cadena ligera de dominio variable y la versión 1.60 de cadena ligera de dominio variable, respectivamente.

Se describe un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. También se describe un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48 y 120-127. Así, el polinucleótido puede comprender (a) un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, y/o (b) un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14 o 15. El polinucleótido puede comprender (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y/o (b) un polinucleótido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.

Los polinucleótidos pueden comprender la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionada en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped (p. ej., una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es la proteína madura más residuos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosecuencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosecuencia es escindida queda una proteína madura activa.

Los polinucleótidos pueden comprender la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionada en el mismo marco de lectura con una secuencia marcadora que permita, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexa-histidina suministrada 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 marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína hemaglutinina de influenza cuando se usa un huésped de mamífero (p. ej., células COS-7).

La presente descripción se refiere además a variantes de los polinucleótidos anteriormente descritos que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos y derivados.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, en las regiones no codificantes, o en ambas. Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresiones silentes, pero que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Las variantes de nucleótidos pueden ser producidas por sustituciones silentes debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polinucleótidos pueden ser producidas por diversas razones, p. ej., para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (codones de cambio en el ARNm humano para los preferidos por un huésped bacteriano tal como E. coli).

También se describen los vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento.

V. Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

Los agentes de unión al FOLR1 (siendo inmunoconjugados) son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento terapéutico, tales como para uso en el tratamiento del cáncer. En ciertos aspectos, los agentes son útiles para su uso en la inhibición del crecimiento del tumor, la inducción de la diferenciación, la reducción del volumen tumoral y/o la reducción de la tumorogenicidad de un tumor. Los inmunoconjugados pueden ser para uso en métodos *in vitro*, ex vivo o *in vivo*. En ciertos aspectos, el agente de unión a FOLR1, incluyendo un inmunoconjugado, es un antagonista del FOLR1 humano al que se une.

Los anticuerpos e inmunoconjugados anti-FOLR1 pueden ser útiles para detectar la presencia de FOLR1 en una muestra biológica. El término "detección" tal y como se utiliza en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una muestra biológica puede comprender una célula o tejido. Tales tejidos pueden incluir tejidos normales y/o cancerosos que expresan FOLR1 a niveles más altos con relación a otros tejidos. La sobreexpresión de FOLR1 puede detectar la presencia de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer renal o cáncer pancreático.

Se describe un método de detección de la presencia de FOLR1 en una muestra biológica. El método puede comprender poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-FOLR1 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-FOLR1 y FOLR1.

Se describe un método para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión aumentada de FOLR1. El método puede comprender poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-FOLR1; determinar el nivel de expresión (ya sea cuantitativa o cualitativamente) de FOLR1 por la célula de ensayo detectando la unión del anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1; y comparar el nivel de expresión de FOLR1 por la célula de ensayo con el nivel de expresión de FOLR1 por una célula control (p. ej., una célula normal del mismo origen tisular que la célula de ensayo o una célula que expresa FOLR1 a niveles comparables con tal célula normal), en donde un mayor nivel de expresión de FOLR1 por la célula de ensayo en comparación con la célula control indica la presencia de un trastorno asociado con una expresión aumentada de FOLR1. La célula de ensayo puede obtenerse de un individuo sospechoso de tener un trastorno asociado con una expresión aumentada de FOLR1. El trastorno puede ser un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.

Un método de diagnóstico o detección, tal como los descritos anteriormente, puede comprender detectar la unión de un anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1 expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida a partir de una célula que expresa FOLR1 en su superficie. El método puede comprender poner en contacto una célula con un anticuerpo anti-FOLR1 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-FOLR1 y FOLR1 en la superficie celular. Un ensayo de ejemplo para detectar la unión de un anticuerpo anti-FOLR1 a FOLR1 expresado en la

superficie de una célula es un ensayo "FACS".

Pueden usarse otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-FOLR1 a FOLR1. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión al antígeno que son bien conocidos en la técnica, tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A e inmunohistoquímica (IHC).

En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-FOLR1 pueden marcarse. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, p. ej., a través de una reacción enzimática o interacción molecular.

Los anticuerpos anti-FOLR1 pueden inmovilizarse sobre una matriz insoluble. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-FOLR1 de cualquier FOLR1 que quede libre en disolución. Esto se lleva a cabo convencionalmente ya sea insolubilizando el anticuerpo anti-FOLR1 antes del procedimiento de ensayo, como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., Pat. de EE. UU. no. 3.720.760) o por acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o insolubilizando el anticuerpo anti-FOLR1 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-FOLR1 y FOLR1, p. ej., mediante inmunoprecipitación.

Cualquiera de los anteriores de diagnóstico o detección puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo anti-FOLR1.

La enfermedad tratada con el agente o antagonista de unión a FOLR1 (p. ej., un anticuerpo huMov19 o inmunoconjugado) puede ser un cáncer. El cáncer se caracteriza por tumores que expresan el receptor 1 de folato al que se une el agente de unión a FOLR1 (p. ej., anticuerpo).

Se proporcionan inmunoconjugados para su uso en métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a FOLR1 a un sujeto (p. ej., un sujeto que necesita tratamiento). En ciertos aspectos, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervical, cáncer de vejiga, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello. En ciertos aspectos, el cáncer es cáncer de ovario. En ciertos aspectos, el cáncer es cáncer de pulmón. En ciertos aspectos, el sujeto es un ser humano.

Se proporcionan además inmunoconjugados para uso en métodos para inhibir el crecimiento de tumores. El método para inhibir el crecimiento del tumor puede comprender poner en contacto la célula con el inmunoconjugado *in vitro*. Por ejemplo, una línea celular inmortalizada o una línea celular de cáncer que expresa FOLR1 se cultiva en medio al cual se añade el inmunoconjugado para inhibir el crecimiento del tumor. Las células tumorales se pueden aislar de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre y se cultivan en un medio al que se añade el inmunoconjugado para inhibir el crecimiento del tumor.

El método para inhibir el crecimiento del tumor puede comprender poner en contacto el tumor o las células tumorales con el inmunoconjugado *in vivo*. El contacto de un tumor o célula tumoral con el inmunoconjugado se puede realizar en un modelo animal. Por ejemplo, se puede administrar el inmunoconjugado a xenoinjertos que expresan uno o más FOLR1 que se han desarrollado en ratones inmunocomprometidos (p. ej., ratones NOD/SCID) para inhibir el crecimiento del tumor. Las células madre del cáncer se pueden aislar de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre y se inyectan en ratones inmunocomprometidos a los que se administra a continuación a un agente de unión a FOLR1 para inhibir el crecimiento de las células tumorales. El inmunoconjugado se puede administrar al mismo tiempo o poco después de la introducción de las células tumorogénicas en el animal para impedir el crecimiento del tumor. El inmunoconjugado se puede administrar como un agente terapéutico después de que las células tumorogénicas se hayan desarrollado hasta un tamaño especificado.

El método para inhibir el crecimiento del tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunoconjugado. El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede tener un tumor o puede haber tenido un tumor que se ha eliminado.

El tumor puede expresar el receptor de folato al que se unen el agente de unión a FOLR1 o el anticuerpo. El tumor puede sobreexpresar el FOLR1 humano.

En ciertos aspectos, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste en tumor cerebral, tumor colorrectal, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervical, tumor de vejiga, glioblastoma y tumor de cabeza y cuello. En ciertos aspectos, el tumor es un tumor de ovario.

Además, se proporciona un inmunoconjugado para uso en un método para reducir la tumorogenicidad de un tumor en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunoconjugado al sujeto. El

tumor puede comprender células madre del cáncer. La frecuencia de las células madre del cáncer en el tumor puede reducirse mediante la administración del agente.

Así, en ciertos aspectos, se proporcionan inmunoconjugados para uso en métodos de tratamiento del cáncer usando el anticuerpo huMov19. En ciertos aspectos, el inmunoconjugado de huMov19 es huMov19-SPDB-DM4; huMov19-sulfo-SPP-DM1; huMov19-SPP-DM1; o de huMov19-PEG4-Mal-DM4.

Se proporcionan además inmunoconjugados para uso en métodos de diferenciación de células tumorogénicas en células no tumorogénicas que comprenden poner en contacto las células tumorogénicas con un agente de unión a FOLR1 (por ejemplo, administrando el agente de unión a FOLR1 a un sujeto que tiene un tumor que comprende las células tumorogénicas o que ha tenido un tumor de este tipo eliminado. En ciertos aspectos, las células tumorogénicas son células tumorales ováricas.

Se proporcionan además inmunoconjugados para uso en métodos para reducir la activación de miofibroblastos en el estroma de un tumor sólido, que comprenden poner en contacto el estroma con una cantidad eficaz del inmunoconjugado.

Se proporcionan además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los agentes de unión a FOLR1. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento del tumor y en el tratamiento del cáncer en pacientes humanos.

En ciertos aspectos, las formulaciones se preparan para su almacenamiento y uso combinando un inmunoconjugado con un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., vehículo, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, Mack Publishing, 2000). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones no tóxicos tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (p. ej., cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (p. ej., menor de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; hidratos de carbono tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tal como sodio; complejos metálicos (p. ej. complejos de proteína-Zn); y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en cualquier número de maneras para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como en las membranas mucosas que incluyen la administración vaginal y rectal) tales como parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos; pulmonar (p. ej., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico y transdérmico); oral; o parenteral que incluyen inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal (p. ej., intratecal o intraventricular).

Un inmunoconjugado puede combinarse en una formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tenga propiedades anticancerosas. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación tiene preferiblemente actividades complementarias al ADC de la combinación de manera que no se afecten negativamente entre sí. También se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión a FOLR-1 y el segundo agente anticanceroso.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un inmunoconjugado depende del tipo de enfermedad a tratar, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de la capacidad de respuesta de la enfermedad, de si el anticuerpo o agente se administra con fines terapéuticos o preventivos, terapia previa, historial clínico del paciente, etc., todo ello a discreción del médico tratante. El inmunoconjugado se puede administrar una vez o a lo largo de una serie de tratamientos que duran desde varios días hasta varios meses, o hasta que se consigue una curación o se consigue una disminución del estado de enfermedad (p. ej., reducción en el tamaño del tumor). Los esquemas de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de las mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo o agente individual. El médico que lo administra puede determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. La dosificación puede ser de 0,01 μg a 100 mg por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. El inmunoconjugado puede administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. La dosificación del inmunoconjugado puede ser de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación basándose en los tiempos de residencia medidos y en las concentraciones del fármaco en los fluidos corporales o tejidos.

La terapia de combinación puede proporcionar “sinergia” y demostrar ser “sinérgica”, es decir, el efecto conseguido cuando los ingredientes activos usados conjuntamente es mayor que la suma de los efectos que se produce del uso de los compuestos por separado. Se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos son: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación combinada de dosificaciones unitarias; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administra en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, p. ej., por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, se administra una dosificación eficaz de cada ingrediente activo secuencialmente, es decir, en serie, mientras que, en la terapia de combinación, las dosificaciones efectivas de dos o más ingredientes activos se administran conjuntamente.

VI. Kits que comprenden agentes de unión a FOLR1

Se describen kits que comprenden los anticuerpos, inmunoconjugados u otros agentes y que pueden usarse para realizar los métodos descritos en el presente documento. Un kit puede comprender al menos un anticuerpo purificado contra el receptor 1 de folato humano en uno o más recipientes. Los kits pueden contener todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluidos todos los controles, instrucciones para realizar ensayos y cualquier software necesario para el análisis y presentación de resultados. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los anticuerpos, inmunoconjugados u otros agentes se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

También se describen kits que comprenden un agente de unión a FOLR1 (p. ej., un anticuerpo que se une a FOLR1), así como un segundo agente anticanceroso. El segundo agente anticanceroso puede ser un agente quimioterapéutico (p. ej., gemcitabina o irinotecán).

Los aspectos de la presente descripción se pueden definir adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que describen en detalle la preparación de ciertos anticuerpos y métodos para usar los anticuerpos.

Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y aspectos descritos en el presente documento son sólo con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Quimerización del anticuerpo Mov19 monoclonal murino

Las secuencias de aminoácidos de la región variable para Mov19 se obtuvieron a partir de la base de datos NCBI (no. de acceso CAA68253 para la cadena ligera (SEQ ID NO: 24) y CAA68252 para la cadena pesada (SEQ ID NO: 23)) y luego se optimizaron por codones y se sintetizaron por Blue Heron Biotechnology. La región variable de cadena ligera se clonó en los sitios EcoRI y BsiWI del plásmido pAbKZeo y la región variable de la cadena pesada se clonó en los sitios HindIII y ApaI del plásmido pAbG1Neo.

Ejemplo 2

Humanización de los anticuerpos Mov19 y FR1-21 monoclonales murinos

El anticuerpo Mov19 se humanizó siguiendo métodos de modificación en superficie del marco previamente descritos (Roguska M. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* febrero de 1994, 91: 969-973 y Roguska et al., Protein Eng.9(10): 895-904 (1996)). En resumen, se calculó la accesibilidad promedio del disolvente para cada residuo del marco de la región variable usando estructuras de anticuerpos resueltas estrechamente relacionadas a partir de la base de datos PDB, y las posiciones con una accesibilidad promedio superior al 30 % se marcaron como residuos de superficie (Pedersen J. T. et al., J. Mol. Biol. 1994; 235: 959-973). La secuencia de reemplazo de la superficie humana se seleccionó alineando las posiciones superficiales de las secuencias de anticuerpos murinos con las posiciones correspondientes de las secuencias de la línea germinal del anticuerpo humano en la base de datos Kabat (Johnson, G. y Wu, T. T. (2001) *Nucleic Acids Research*, 29: 205-206). La superficie de la región variable de la cadena ligera humana más homóloga (clon DPK19, IMGT locus IGKV2D-30*01 para Mov19 e IMGT locus IGKV1/OR2-0*01 para FR1-21) y la superficie de la región variable de la cadena pesada humana más homóloga (clon 8M27, IMGT locus IGHV1-69*08 para Mov19 e IMGT locus IGHV5-51*02 para FR1-21) se seleccionó para reemplazar las posiciones de la superficie del marco Mov19 murino, dejando las 6 CDR (Tabla 1) inalteradas. Las posiciones y residuos de las superficies de Mov19 y FR1-21 murinos y humanos se dan en las Figuras 1A-D.

CDR de Mov19	**CDR de FR1-21**
Cadena Ligera	**Cadena Ligera**
CDR1: KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7)	CDR1: KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 27)

CDR de Mov19	**CDR de FR1-21**
CDR2: RASNLEA (SEQ ID NO: 8)	CDR2: GATSLET (SEQ ID NO: 28)
CDR3: QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9)	CDR3: QQYWSTPFT (SEQ ID NO: 29)
Cadena Pesada	**Cadena Pesada**
CDR1: GYFMN (SEQ ID NO: 1)	CDR1: SSYGMS (SEQ ID NO: 30)
CDR2 (AbM): RIHPYDGDTF (SEQ ID NO: 131)	CDR2 (AbM): TISSGGSYTY (SEQ ID NO: 31)
CDR3: YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3)	CDR3: DGEGGLYAMDY (SEQ ID NO: 32)
CDR2 de HC de Mov19 definido por Kabat	**CDR2 de HC de FR1-21 definido por Kabat**
Murino CDR2 de HC: RIHPYDGDTFYNQNFKD (SEQ ID NO: 128)	**Murino** CDR2 de HC: TISSGGSYTYYPDGVKG (SEQ ID NO: 33)
Humano CDR2 de HC: RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 129)	**Humano** CDR2 de HC: TISSGGSYTYYSPGFQG (SEQ ID NO: 34)
Tabla 1A: Se proporcionan las CDR de las cadenas ligera y pesada de Mov19 y FR1-21 definidas para la modificación en superficie. También se da la definición de Kabat para la CDR2 de cadena pesada para los anticuerpos murino y humano.	

Ninguno de los cambios en los residuos planteó preocupaciones por el impacto sobre las interacciones de las CDR de Mov19 o FR1-21 con sus epítopos diana sobre el receptor 1 de folato, por lo que no se consideraron retromutaciones de la superficie para las secuencias humanizadas de cualquiera de los anticuerpos. Sin embargo, la secuencia Mov19 modificado en superficie introdujo un sitio de glicosilación de consenso enlazado a N en la cadena ligera N74 (versión 1.00 de cadena ligera), de modo que se preparó una segunda versión de cadena ligera humanizada para eliminar este sitio. Una revisión de la base de datos de secuencias de la cadena ligera humana de Kabat reveló que la treonina es el residuo más común encontrado en la posición 74 de la cadena ligera de modo que la versión 1.60 de la cadena ligera de Mov19 humanizada se construyó con una treonina en la posición 74. La posición 74 no es un residuo superficial, por eso esta sustitución de residuo no tiene ningún impacto en la humanización por modificación en superficie. Los alineamientos de las secuencias de regiones variables de Mov19 y de FR1-21 murinos y humanizados se dan en la Figura 2.

Las secuencias de regiones variables para Mov19 y FR1-21 humanizados fueron optimizadas por codones y sintetizadas por Blue Heron Biotechnology. Las secuencias están flanqueadas por sitios de enzimas de restricción para facilitar la clonación en marco con las respectivas secuencias constantes en plásmidos de expresión de mamíferos de cadena sencilla. La región variable de la cadena ligera se clonó en los sitios EcoRI y BsiWI del plásmido pAbKZeo. Los ADN plasmídicos resultantes que codifican la cadena ligera de huMov19 se depositaron en la ATCC como no. de depósito ATCC PTA-10773 y PTA-10774 y el ADN plasmídico resultante que codifica la cadena ligera de huFR1-21 se depositó como no. de depósito ATCC PTA-10776. La región variable de la cadena pesada se clonó en los sitios HindIII y Apa1 del plásmido pAbG1Neo. El ADN plasmídico resultante que codifica la cadena pesada de huMov19 se depositó en la ATCC como no. de depósito ATCC PTA-10772 y el ADN plasmídico resultante que codifica la cadena pesada de huFR1-21 se depositó como no. de depósito ATCC PTA-10775. Estos plásmidos, se transfectaron después como se describe en el ejemplo 3 para producir huMov19. El plásmido que codifica la cadena ligera de huMov19 (es decir, que se depositó como no. de depósito ATCC PTA-10773 o PTA-10774) se puede emparejar con el plásmido que codifica la cadena pesada de huMov19 para crear un anticuerpo huMov19 según los métodos proporcionados en el presente documento y como son bien conocidos por el experto en la técnica.

Ejemplo 3

Expresión de anticuerpos recombinantes

Las construcciones de anticuerpos quiméricos y humanizados se produjeron transitoriamente en cualquiera de las células HEK-293T adherentes usando un procedimiento de fosfato cálcico estándar (BD Biosciences, Kit de Transfección de Mamíferos CalPhos, No. de Cat. 631312) o en células HEK-293T adaptadas a suspensión usando un procedimiento PEI modificado [Durocher Y, Perret S, Kamen A High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Nucleic Acids Res. 15 enero 2002; 30(2):E9] en matraces giratorios. Las transfecciones transitorias de PEI se realizaron como se describió anteriormente (Durocher, Y. et al., Nucleic Acids Res. 30 (2): E9 (2002)), excepto que las células HEK-293T se cultivaron en Freestyle 293 (Invitrogen) y el volumen de cultivo se dejó sin diluir después de la adición de los complejos PEI-ADN. Tanto las transfecciones transitorias adherentes como en suspensión se incubaron durante una semana y después el sobrenadante aclarado se purificó mediante una columna de Proteína A seguida de una cromatografía de intercambio iónico en columna CM como se describe a continuación. Como se muestra en la Figura 3, la expresión de huMov19 fue al menos 10 veces mayor que la expresión de Mov19 quimérico en las células transfectadas.

Ejemplo 4

Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular aclarados usando métodos estándar, tales como, por ejemplo, cromatografía de Proteína A o G (HiTrap Proteína A o G HP, 1 ml, Amersham Biosciences). En resumen, el sobrenadante se preparó para cromatografía mediante la adición de 1/10 volumen de tampón Tris/HCl 1 M, pH 8,0. El sobrenadante ajustado al pH se filtró a través de una membrana de filtro de 0,22 µm y se cargó en una columna equilibrada con 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, usando un caudal de 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,25 ml y se neutralizaron mediante la adición de 1/10 de volumen de Tris/HCl 1M, pH 8,0. La fracción o fracciones máximas se dializaron durante la noche dos veces contra 1x PBS y se esterilizaron filtrando a través de una membrana de filtro de 0,2 µm. El anticuerpo purificado se cuantificó por absorbancia a A_{280}.

Las fracciones purificadas por proteína A se purificaron adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico (IEX) con cromatografía de carboximetilo (CM). En resumen, a las muestras de la purificación por proteína A se les cambió el tampón por tampón de partida (fosfato de potasio 10 mM, cloruro de sodio 10 mM, pH 7,5) y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. La muestra preparada se cargó a continuación sobre una resina de flujo rápido CM (GE lifesciences) que se equilibró con el tampón de partida a una velocidad de flujo de 120 cm/h. El tamaño de la columna se eligió para tener capacidad suficiente para unir todo el anticuerpo en la muestra. La columna se lavó entonces con tampón de unión hasta que se obtuvo una línea base estable sin absorbancia a 280 nm. El anticuerpo se eluyó iniciando un gradiente de cloruro de sodio 10 mM a 500 mM en 20 volúmenes de columna (CV). Se recogieron las fracciones con la lectura UV por encima de 50 mAu del pico principal. Se evaluó la pureza (el porcentaje de monómero y agregados solubles de alto peso molecular) con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) sobre un gel TSK G3000SWXL, 7,8 x 300 mm con una columna de protección SWXL, 6,0 x 40 mm (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) utilizando un sistema de Agilent HPLC 1100 (Agilent, Santa Clara, CA). Las fracciones con la pureza deseada (>95 %) se agruparon, se les cambió el tampón a PBS (pH 7,4) usando un sistema TFF, y se esterilizaron por filtración a través de una membrana de filtro de 0,2 µm. El anticuerpo purificado se ensayó adicionalmente para su pureza por SEC y se determinó la concentración de IgG mediante medición de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1,47. Se diluyó si fue necesario. Como alternativa, se puede usar hidroxiapatita cerámica (CHT) para refinar tanto los anticuerpos murinos como humanizados con una selectividad mejorada. Se aplicó resina CHT de tipo II con un tamaño de partícula de 40 µm (Bio-Rad Laboratories) al refinado de anticuerpos con un protocolo similar al de la cromatografía IEX. El tampón de partida para CHT fue fosfato sódico 20 mM, pH 7,0 y el anticuerpo se eluyó con un gradiente de fosfato sódico 20-160 mM sobre 20 CV.

Ejemplo 5

Desarrollo de anticuerpos anti-FOLR1 murinos

Hubo dos series diferentes de inmunización/cribado. La primera serie ha conducido a la generación del clon FR1-21, la segunda serie ha dado como resultado la generación de clones FR1-48, FR1-49, FR1-57 y FR1-65. En la primera serie, los ratones se inmunizaron subcutáneamente con aproximadamente $5x10^6$ células KB que expresaban FOLR1 (American Tissue Culture Collection, ATCC CCL-17). En la segunda serie se usaron células 300-19 que expresaban FOLR1 humano en su superficie para inmunizar los ratones. Para obtener estas células, la secuencia de aminoácidos de FOLR1 humano se obtuvo a partir del sitio web del NCBI (acceso NP_057937), luego se optimizó por codones y se sintetizó por Blue Heron Biotechnologies, se flanqueó por sitios de restricción EcoRI y Xba1 para facilitar la clonación en el vector de expresión pSRa de mamífero. Las células 300-19, una línea de células pre-B derivada de un ratón Balb/c (Reth et al., *Nature*, 317:353-355 (1985)) se transfectaron con el plásmido de expresión pSRa-FolR1 para expresar de forma estable niveles altos de FOLR1 humano en la superficie celular. Para ambas series se aplicaron protocolos de inmunización estándar conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tales como los usados en ImmunoGen, Inc. Los ratones inmunizados fueron reforzados con antígeno tres días antes de ser sacrificados para la generación de hibridomas. Los bazos de los ratones se recogieron según protocolos

animales estándar, tales como, por ejemplo, trituración de tejidos entre dos portaobjetos de microscopio esterilizados, esmerilados para obtener una suspensión de células individuales en medio RPMI-1640. Las células del bazo se centrifugaron, se sedimentaron, se lavaron y se fusionaron con un mieloma murino, tal como, por ejemplo, células P3X63Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol., 123: 1548-1550 (1979)) usando polietilenglicol-1500 (Roche 783 641). Las células fusionadas se resuspendieron en medio de selección RPMI-1640 que contenía hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma H-0262) y se seleccionaron para el crecimiento en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Corning-Costar 3596, 0,2 ml de suspensión celular por pocillo) a 37 ºC con CO_2 al 5 %. Después de 5 días de incubación, se retiraron 0,1 ml de sobrenadante de cultivo de cada pocillo y se reemplazaron con 0,1 ml de medio RPMI-1640 que contenía suplemento de hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). La incubación a 37 ºC con CO_2 al 5 % se continuó hasta que los clones de hibridoma estaban listos para el cribado de anticuerpos. También pueden usarse otras técnicas de inmunización y producción de hibridomas, incluidas las descritas en Langone et al. (Eds., "Immunochemical Techniques, Part 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)).

Tabla 1B: Se proporcionan las CDR de las cadenas ligera y pesada de FR1-48, 49, 57 y 65. La definición de Kabat para la CDR2 de cadena pesada se da también para ambos anticuerpos murino y humano.

CDR de FR1-48	**CDR de FR1-49**	**CDR de FR1-57**	**CDR de FR1-65**
Cadena Ligera	**Cadena Ligera**	**Cadena Ligera**	**Cadena Ligera**
CDR1 - RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 57)	CDR1 - RASENIYTNLA (SEQ ID NO: 63)	CDR1- RASQNINNNLH (SEQ ID NO: 69)	CDR1 - KASQNVGPNVA (SEQ ID NO: 75)
CDR2 - AATNLAD(SEQ ID NO: 58)	CDR2 - TASNLAD (SEQ ID NO: 64)	CDR2 - YVSQSVS (SEQ ID NO: 70)	CDR2 - SASYRYS (SEQ ID NO: 76)
CDR3 - QHFWASPYT (SEQ ID NO: 59)	CDR3 - QHFWVSPYT (SEQ ID NO: 65)	CDR3 - QQSNSWPHYT (SEQ ID NO: 71)	CDR3 - QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 77)
Cadena Pesada	**Cadena Pesada**	**Cadena Pesada**	**Cadena Pesada**
CDR1 - TNYWMQ (SEQ ID NO: 60)	CDR1 - TNYWMY (SEQ ID NO: 66)	CDR1 - SSFGMH (SEQ ID NO: 72)	CDR1 - TSYTMH (SEQ ID NO: 78)
CDR2 - AIYPGNGDSR (SEQ ID NO: 61)	CDR2 - AIYPGNSDTT (SEQ ID NO: 67)	CDR2 - YISSGSSTIS (SEQ ID NO: 73)	CDR2 - YINPISGYTN (SEQ ID NO: 79)
CDR3 - RDGNYAAY (SEQ ID NO: 62)	CDR3 - RHDYGAMDY (SEQ ID NO: 68)	CDR3 - EAYGSSMEY (SEQ ID NO: 74)	CDR3 - GGAYGRKPMDY (SEQ ID NO: 80)
CDR2 de HC de Kabat	**CDR2 de HC de Kabat**	**CDR2 de HC de Kabat**	**CDR2 de HC de Kabat**
Murino AIYPGNGDSRYTQKFKG (SEQ ID NO: 81)	Murino AIYPGNSDTTYNLKFKG (SEQ ID NO: 83)	Murino YISSGSSTISYADTVKG (SEQ ID NO: 85)	Murino YINPISGYTNYNQKFKD (SEQ ID NO: 87)
Humano AIYPGNGDSRYTQKFQG (SEQ ID NO: 82)	Humano AIYPGNSDTTYNQKFQG (SEQ ID NO: 84)	Humano YISSGSSTISYADSVKG (SEQ ID NO: 86)	Humano YINPISGYTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 88)

Ejemplo 6

Cribado y selección de hibridomas

Se usaron células FOLR1-300-19 transfectadas con células FOLR1 y KB humanas en la primera y segunda series de cribados de manera correspondiente. Los sobrenadantes del cultivo del hibridoma se cribaron por citometría de flujo para determinar la secreción de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen a las células positivas para FOLR1, tales como células 300-19 que expresan FOLR1 o células KB, pero no a las células negativas para FOLR1,

tales como las células 300-19 no transfectadas. Se incubaron 0,1 ml de los sobrenadantes de hibridoma durante 3 h, con células positivas para FOLR1 o con las células 300-19 no transfectadas (1 x10^5 células por muestra) en 0,1 ml de tampón FACS (medio RPMI-1640 suplementado con suero de cabra normal al 2 %). A continuación, las células se centrifugaron, se sedimentaron, se lavaron y se incubaron durante 1 hora con 0,1 ml de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con PE (como el que puede obtenerse a partir de, por ejemplo, Jackson Laboratory, 6 μg/ml en tampón FACS). Las células se centrifugaron, se sedimentaron de nuevo, se lavaron con tampón FACS y se resuspendieron en 0,2 ml de PBS que contenía formaldehído al 1 %. La fluorescencia asociada a las células se midió usando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador de pocillos múltiples HTS o un citómetro de flujo de matriz FACS y se analizó usando CellQuest Pro (todos ellos de BD Biosciences, San Diego, EE. UU.). Los clones de hibridoma positivos se subclonaron mediante dilución limitante. Para un análisis posterior, se eligió un subclon de cada hibridoma, que mostró la misma reactividad frente a FOLR1 que las células parentales por citometría de flujo. Se cultivaron subclones estables y se identificó el isotipo de cada anticuerpo anti-FOLR1 secretado usando reactivos de isotipado comerciales (Roche 1493027). Los anticuerpos murinos fueron purificados por proteína A a partir de medios de hibridoma aclarados como se ha descrito anteriormente. Estos anticuerpos se designaron anticuerpos FR-1.

Ejemplo 7

Purificación de anticuerpos monoclonales murinos

Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de subclones de hibridoma usando métodos estándar, tales como, por ejemplo, cromatografía de Proteína A o G (HiTrap Proteína A o G HP, 1 ml, Amersham Biosciences). En resumen, se preparó el sobrenadante para cromatografía mediante la adición de 1/10 volumen de tampón Tris/HCl 1 M, pH 8,0. El sobrenadante ajustado al pH se filtró a través de una membrana de filtro de 0,22 μm y se cargó en una columna equilibrada con 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, usando un caudal de 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,25 ml y se neutralizaron mediante la adición de 1/10 de volumen de Tris/HCl 1M, pH 8,0. La fracción o fracciones máximas se dializaron durante la noche dos veces contra 1x PBS y se esterilizaron filtrando a través de una membrana de filtro de 0,2 μm. El anticuerpo purificado se cuantificó por absorbancia a A_{280}.

Ejemplo 8

Caracterización de la unión por citometría de flujo

La especificidad de unión se ensayó mediante citometría de flujo usando anticuerpos purificados. Los histogramas FACS que demuestran la unión de anti-FOLR1 a células 300-19 que expresan FOLR1 y la ausencia de unión a las células 300-19 parentales se muestran en la Figura 4. Cada anticuerpo se incubó durante 3 horas, con células 300-19 que expresan FOLR1 o las células 300-19 no transfectadas (1 x 10^5 células por muestra) en 0,1 ml de tampón FACS (medio RPMI-1640 suplementado con suero de cabra normal al 2 %). A continuación, las células se sedimentaron, se lavaron y se incubaron durante 1 hora con 0,1 ml de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con FITC (como el que se puede obtener de, por ejemplo, Jackson Laboratory, 6 μg/ml en tampón FACS). Las células se sedimentaron de nuevo, se lavaron con tampón FACS y se resuspendieron en 200 μl de PBS que contenía formaldehído al 1 %. Las muestras se adquirieron usando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador de múltiples pocillos HTS o un citómetro de flujo de matriz FACS y se analizaron usando CellQuest Pro (todos ellos de BD Biosciences, San Diego, EE. UU.). Los histogramas FACS de anticuerpos anti-FOLR1 mostraron un desplazamiento de la fluorescencia, mientras que las células 300-19 parentales no lo hicieron. Tampoco se detectó ningún desplazamiento de la fluorescencia significativo cuando cualquiera de las líneas celulares se incubaba solo con anticuerpo IgG anti-humano de cabra conjugado con FITC.

Ejemplo 9

Clonación y secuenciación de las regiones VL y VH de muFR1-21

El ARN celular total se preparó a partir de 5 x 10^6 células de hibridoma usando un kit RNeasy (QIAgen) según el protocolo del fabricante. El ADNc se sintetizó posteriormente 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 la PCR degenerada en el ADNc derivado de 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 por PCR utilizando los siguientes cebadores degenerados: *Eco*MH1 CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID NO: 50) *Eco*MH2 CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID NO: 51) y BamIgG1 GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (SEQ ID NO: 52). Las secuencias de VL se amplificaron por PCR usando los siguientes cebadores degenerados: SacIMK GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID NO: 53) y HindKL TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO: 54) (las bases mixtas se definen como sigue: 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 hicieron pasar después sobre un gel de agarosa de baja temperatura de fusión

al 1 %, se cortaron las bandas de 300 a 400 pb, se purificaron usando minicolumnas de ADN de Zymo y se enviaron a Agencourt Biosciences para secuenciación. Los respectivos cebadores de PCR 5' y 3' se usaron como cebadores de secuenciación para generar los ADNc de región variable de ambas direcciones. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL se obtuvieron traduciendo los resultados de la secuenciación del ADN con el software VectorNTI.

Para identificar los artefactos de secuenciación de cebadores en el extremo 5' en las secuencias preliminares de ADNc de región variable, el sitio IgBlast del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) se utilizó para buscar las secuencias de líneas germinales murinas de las que se derivaron las secuencias de anticuerpos. Las secuencias de regiones variables limpias se combinaron entonces con las secuencias de referencia del NCBI para las regiones constantes de anticuerpo específico para ensamblar las secuencias de anticuerpos de murino de longitud completa esperadas. El peso molecular de las cadenas ligeras y pesadas de Fr1-21 murinas esperadas se calculó entonces y se comparó con la masa medida por análisis de cromatografía líquida/espectrofotometría de masas (LC/MS). La cadena pesada de FR1-21 murino coincidió con la masa medida, pero la cadena ligera requirió un esfuerzo de secuenciación de seguimiento para determinar la secuencia en el extremo 5'. Se diseñó el cebador de la PCR CD37-1LClead1 (ttttgaattcgccaccatgaagtttccttctcaacttct) para hibridar con la secuencia líder ligada a la línea germinal del anticuerpo murino de manera que esta nueva reacción de la PCR produzca una secuencia de ADNc de región variable completa, inalterada por los cebadores. Las reacciones de PCR, purificaciones de banda y secuenciación se realizaron como se ha descrito anteriormente y la nueva secuencia completa codificó una cadena ligera que se ajustaba a la masa de la cadena ligera de Fr1-21 medida por LC/MS.

Ejemplo 10

Expresión de anticuerpos de referencia

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo Morphotech anti-FOLR1, MorAb-003 (Farletuzumab), se obtuvo de la lista de Nombres comunes internacionales para sustancias farmacéuticas (INN) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y fue optimizada por codones y sintetizada por Blue Heron Biotechnology. La secuencia de la región variable de la cadena ligera está flanqueada por los sitios de las enzimas de restricción EcoRI y BsiWI y la secuencia de la región variable de la cadena pesada flanqueada por los sitios de las enzimas de restricción HindIII y Apa1 para la clonación en marco con las respectivas secuencias constantes en plásmidos de expresión de mamíferos de cadena sencilla. La clonación, expresión y purificación se llevó a cabo como se describe para el Mov19 y Fr1-21 humanizados anteriores.

Ejemplo 11

Actividad de ADCC de huMov19

Se utilizó un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) para medir la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de líneas de células tumorales utilizando células asesinas naturales (NK) humanas recién aisladas como células efectoras (p. ej., Shields, J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604 (2001)). Las células NK se aislaron primero de sangre humana de un donante normal (Research Blood Components, Inc., Brighton, MA) usando un protocolo modificado para el kit II de aislamiento NK (Miltenyi Biotech, 130-091-152). La sangre se diluyó 2 veces con 1x PBS. Sobre 25 ml de Ficoll Paque en un tubo cónico de 50 ml se colocaron cuidadosamente en capas 25 ml de sangre diluida y se centrifugaron a 400 g durante 45 minutos a RT. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogieron de la interfaz, se transfirieron a un nuevo tubo cónico de 50 ml y se lavaron una vez con 1x PBS. Las PBMC se resuspendieron en 2 ml de tampón de aislamiento de NK (1 x PBS, BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM) y luego se añadieron 500 µl de mezcla de Biotina-Anticuerpo a la suspensión celular. La mezcla de Biotina-Anticuerpo contiene anticuerpos biotinilados que se unen a los linfocitos, excepto para las células NK, lo que da como resultado una selección negativa de las células NK. La mezcla se incubó a 4 ºC durante 10 minutos, y luego se añadieron 1,5 ml de tampón de aislamiento de NK y 1 ml de microbolas anti-biotina. La mezcla de anticuerpos y células se incubó durante otros 15 minutos a 4 ºC. A continuación, las células se lavaron una vez con 50 ml de tampón de aislamiento de NK y se resuspendieron en 3 ml de tampón de aislamiento de NK. A continuación, se montó una columna MACS LS en el separador autoMACS (Miltenyi Biotech) y se lavó previamente con 3 ml de tampón de aislamiento de NK. La suspensión celular se aplicó automáticamente sobre la columna, se lavó y la fracción efluente con células NK no marcadas se recogió en un nuevo tubo cónico de 50 ml. Las células NK resultantes se sembraron en 30 ml de medio RPMI completo (RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 5 %, penicilina estreptomicina al 1 %, HEPES 1 mM, piruvato de sodio 1 mM, disolución de aminoácidos no esenciales 100X MEM al 1 %) durante la noche. El ensayo posterior y todas las diluciones se llevaron a cabo en medio RHBP (medio RPMI 1640 suplementado con HEPES 20 mM, pH 7,4, BSA al 0,1 % y estreptomicina penicilina al 1 %). Se dividieron en alícuotas varias concentraciones de anticuerpos en medio RHBP por duplicado a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células diana se resuspendieron a 10^6 células/ml en medio RHBP y se añadieron a 100 µl/pocillo a cada pocillo que contenía diluciones de anticuerpo. La placa que contenía células diana y diluciones de anticuerpo se incubó durante 30 minutos a 37 ºC. Entonces se añadieron células NK a los pocillos que contenían las células diana a 50 µl/pocillo. La relación típica fue de aproximadamente 1 célula diana por 3-4 células NK. Se establecieron al menos los siguientes controles para cada experimento: células NK solas, células diana solas (liberación espontánea de LDH), células diana con células NK (liberación de LDH independiente de

anticuerpos), células diana con TritonX-100 al 10 % (liberación máxima de LDH). Las mezclas se incubaron a 37 ºC durante 4 horas para permitir la lisis celular. Las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 1.200 rpm y se transfirieron cuidadosamente 100 µl del sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadió mezcla de reacción de LDH (100 µl/pocillo) del kit de Detección de Citotoxicidad (Roche 1 644 793) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 30 minutos. La densidad óptica de las muestras se midió a 490 nm (DO_{490}). El porcentaje de lisis específica de cada muestra se determinó usando la siguiente fórmula: porcentaje de lisis específica= (valor de la muestra-liberación espontánea)/(liberación máxima-liberación espontánea) * 100.

La incubación con huMov19 condujo a una buena actividad de ADCC frente a células IGROV-1 en presencia de células efectoras NK humanas. La actividad ADCC en las células IGROV-1 se comparó para huMov19, huFR-1-21, Mor003, y chTK1 (control de isotipo) (Figura 6). El tratamiento con 0,9 ng/ml de huMov19 dio como resultado aproximadamente un 30 % de lisis de células IGROV-1, similar a la actividad que se observó con los otros anticuerpos anti-FOLR1. La actividad de ADCC por huMov19 tenía una CE_{50} de 0,20 ng/ml, huFr-1-21 tenía una CE_{50} de 0,11 ng/ml, Mor003 de 0,16 ng/ml y chTK1 no mostró ninguna actividad frente a las células IGROV-1.

Ejemplo 12

Preparación de inmunoconjugados anti-FOLR1

Preparación de huMOV19v1.6-sulfo-SPDB-DM4

El conector 2-sulfo-SPDB ejemplar se disolvió en DMA. El anticuerpo huMOV19v1.6 se incubó a 8 mg/ml con un exceso molar de 12 veces del conector 2-sulfo-SPDB durante aproximadamente 2 horas a 25 ºC a pH 7,5. La mezcla de reacción se purificó usando una columna G25F SEPHADEX™ equilibrada con tampón de fosfato de potasio 50 mM que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5. El maitansinoide DM4 se disolvió en dimetilacetamida (DMA, la concentración final es 5 %) y se añadió un exceso molar de 1,7 veces en comparación con el conector gota a gota al anticuerpo modificado con sulfo-SPDB. La mezcla de reacción se ajustó a pH 7,5 con tampón HEPES 1 mM. Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, el anticuerpo conjugado se purificó por cromatografía sobre G25F SEPHADEX™ equilibrada con histidina 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 1 %, pH 5,5. El número de moléculas de DM4 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó utilizando los coeficientes de extinción informados anteriormente para anticuerpo y maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de las especies de maitansinoides libres totales se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM4 por anticuerpo huMov19v1.6 con <1 % presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.6-SPP-DM1

El conector 4-(2-piridilditio)-pentanoato de N-succinimidilo (SPP) ejemplar se disolvió en etanol. El anticuerpo huMOV19v1.6 se incubó a 8 mg/ml con un exceso molar de 6,5 a 6 veces del conector SPP durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente en tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, y etanol al 5 %. El anticuerpo modificado con SPP se diluyó 2 veces en PBS, pH 6,5 y se modificó con un exceso molar de 1,5 veces del maitansinoide DM1 mediante la adición de una disolución concentrada (15-30 mM) de DM1 en dimetilacetamida (DMA). La concentración de DMA se ajustó al 5 % y después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, el anticuerpo conjugado se purificó por cromatografía sobre G25F SEPHADEX™ equilibrada con histidina 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 1 %, pH 5,5. El número de moléculas de DM1 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y DM1 (Liu et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 93, 8618-8623 (1996)). El porcentaje de maitansinoide libre presente después de la reacción de conjugación se determinó inyectando 20-50 µg de conjugado sobre una columna HiSepTM equilibrada en acetonitrilo al 25 % en tampón de acetato de amonio 100 mM, pH 7,0, y eluyendo en acetonitrilo. El área máxima de la especie de maitansinoides libre total (eluida en el gradiente e identificada por comparación del tiempo de elución con patrones conocidos) se midió usando un detector de absorbancia ajustado a una longitud de onda de 252 nm y comparado con el área máxima relacionada con maitansinoide ligado (eluído en el máximo de conjugado en las fracciones no retenidas por la columna) para calcular el porcentaje de especies de maitansinoides libres totales. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM1 por huMOV19v1,6 con <1 % presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.6 SPDB-DM4

El conector 4-(2-piridiltio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) ejemplar se disolvió en etanol. El anticuerpo huMOV19v1.6 se incubó a 8 mg/ml con un exceso molar de 5,5-5 veces del conector SPDB durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente en tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y etanol al 3 %. El anticuerpo modificado con SPDB se diluyó 2 veces en PBS, pH 6,5 y se modificó con un exceso molar de 1,5 veces del maitansinoide DM4 mediante la adición de una disolución concentrada (15-30 mM) de DM4 en dimetilacetamida (DMA). Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, el anticuerpo conjugado se purificó por cromatografía sobre G25F SEPHADEX™ equilibrada con histidina 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 1 %, pH 5,5. El número de moléculas de DM4 unidas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y

maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de las especies de maitansinoides libres totales se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM4 por anticuerpo huMOV19v1.6 con <1 % presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.0-3-sulfo-mal-DM4

El conector NHS-3-sulfo-mal y DM4 se disolvieron por separado en DMA. El conector y el tiol DM4 se mezclaron juntos en una disolución de DMA que contenía tampón de succinato 200 mM al 40 %, EDTA 2 mM, pH 5,0 para dar una relación molar de DM4 a conector de 1,6:1 y una concentración final de DM4 igual a 10 mM. La mezcla se hizo reaccionar durante 2 horas a 25 ºC. Sin purificación, la mezcla de reacción se añadió de manera que se añadió un equivalente de exceso molar de 9,6 de conector frente a anticuerpo a una disolución de anticuerpo huMOV19v1.0 en tampón de fosfato (pH 7,5) bajo condiciones de conjugación finales de 4 mg/ml de anticuerpo, tampón de fosfato al 90 %/DMA al 10 %, pH 7,5 (v/v). Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de conjugación se purificó por cromatografía sobre G25 SEPHADEX equilibrada en PBS pH 7,5. El huMOV19v1.0-3-sulfo-mal-DM4 se dializó a continuación en un tampón que contenía fosfato 9,55 mM, NaCl 139,6 mM, pH 6,5. El número de moléculas de DM4 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de las especies de maitansinoides libres totales se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM4 por anticuerpo huMOV19v1.0 con <1 % presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.0-SMCC-DM1

El conector NHS-sulfo-SMCC y DM1 se disolvieron por separado en DMA. El conector y el tiol DM1 se mezclaron juntos en una disolución de DMA que contenía tampón de succinato 200 mM al 40 %, EDTA 2 mM, pH 5,0 para dar una relación molar de DM1 a conector de 1,2:1 y una concentración final de DM1 igual a 3,75 mM. La mezcla se hizo reaccionar durante 75 minutos a 20 ºC. Sin purificación, se añadió la mezcla de reacción de manera que se añadió un equivalente de exceso molar de 6,4 de conector frente a anticuerpo a una disolución de anticuerpo huMOV19v1.0 en tampón de fosfato (pH 7,5) bajo condiciones de conjugación finales de 4 mg/ml de anticuerpo, fosfato de potasio 50 mM al 88 %, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5/DMA al 12 %, pH 7,5 (v/v). Después de 2 horas de incubación a 20 ºC, la mezcla de conjugación se purificó por cromatografía sobre G25 SEPHADEX equilibrada en PBS pH 7,5. El huMOV19v1.0-SMCC-DM1 se dializó luego en un tampón que contenía Glicina 250 mM, Histidina 10 mM pH 5,5. El número de moléculas de DM1 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de las especies de maitansinoides libres totales se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM1 por anticuerpo huMOV19v1.0 con <2,8 % presente como maitansinoide no conjugado.

Preparación de huMOV19v1.0-PEG4-mal-DM1

El reactivo de la etapa 1, NHS-PEG4-mal-DM1 se disolvió en DMA. El anticuerpo huMov19v1.0 se incubó a 5 mg/ml con un exceso molar de 5,7 veces de NHS-PEG4-mal-DM1 durante la noche a 25 ºC en KPi 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5 y DMA al 10 % en volumen. La mezcla de reacción se purificó mediante columna G25 SEPHADEX equilibrada en PBS pH 7,5. El huMOV19v1.0-PEG4-mal-DM1 se dializó en tampón que contenía Glicina 250 mM, Histidina 10 mM pH 5,5. El número de moléculas de DM1 ligadas por molécula de anticuerpo se determinó usando los coeficientes de extinción previamente informados para anticuerpo y maitansinoide (Widdison, WC, et al., J. Med Chem, 49: 4392-4408 (2006)). El porcentaje de las especies de maitansinoides libres totales se determinó como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron conjugados con 3,5-4 moléculas de DM1 por anticuerpo huMOV19v1.0 con <1,1 % presente como maitansinoide no conjugado.

Ejemplo 13

Afinidad de unión de anticuerpos y conjugados

Las afinidades de unión de los anticuerpos anti-FOLR1 y de sus conjugados SPDB-DM4, PEG4Mal-DM4, SMCC-DM1, o anti-FOLR1-sulfo-SPDB-DM4 se ensayaron mediante Citometría de Flujo. Las células SKOV3 que expresan FOLR1 se incubaron con concentraciones variables de anticuerpos anti-FOLR1 o sus conjugados y se procesaron como se describió anteriormente para análisis por citometría de flujo. El análisis de los datos se realizó utilizando CellQuest Pro (BD Biosciences, San Diego, EE. UU.) y para cada muestra se exportó la intensidad media de fluorescencia para FL1 (MFI) y se representó gráficamente frente a la concentración de anticuerpos en un gráfico semi-logarítmico. Se generó una curva de respuesta a la dosis mediante regresión no lineal y se calculó el valor para la constante de disociación en equilibrio aparente (K_d) de las muestras de ensayo para la unión a células SKOV3 utilizando GraphPad Prism v4 (software GraphPad, San Diego, CA) y se presentan en la Figura 5. Los resultados demuestran que la conjugación bien con DM1 o DM4 a través de cualquiera de los conectores utilizados, no alteraba notablemente la afinidad de ninguno de los anticuerpos (p. ej., huMov19).

Ejemplo 14

Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La capacidad de los conjugados muFR1-9, muFR1-13, muFR1-22, muFR1-23, huFR1-23, muFR1-21 y huFR1-21 ejemplares para inhibir el crecimiento celular se midió usando ensayos de citotoxicidad *in vitro* mediante el método descrito en Kovtun YV *et al*. (*Cancer Res*. 66: 3214-3221 (2006)). Se añadió un conjugado de PEG4-mal-DM4 en diversas concentraciones a células KB que expresan FOLR1 en una placa de 96 pocillos a 1.000 células por pocillo en 100 µl en medio RPMI completo (RPMI-1640, suero bovino fetal al 10 %, glutamina 2 mM, gentamicina al 1 %, todos los reactivos de Invitrogen). Los anticuerpos y conjugados se diluyeron en medio RPMI completo usando series de dilución de 3 veces y se añadieron 100 µl por pocillo. La concentración final oscilaba típicamente entre 3 x 10^{-8} M y 4,6 x 10^{-12} M. Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control que contenían células y el medio pero que carecían de los conjugados, y pocillos que contenían solo medio. Las placas se incubaron de cuatro a seis días a 37 ºC en una atmósfera humidificada que contenía CO_2 al 5 %. Se añadió entonces un reactivo WST-8, 10 % v/v (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD, EE. UU.) a los pocillos y las placas se incubaron a 37 ºC durante 2-6 h. WST-8 se reduce por las deshidrogenasas de las células vivas a un producto de formazán de color naranja (máximo) que es soluble en medio de cultivo de tejidos. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas. Las placas se analizaron midiendo la absorbancia a 450 nm (A_{450}) y a 650 nm (A_{650}) en un lector de placas de múltiples pocillos. En primer lugar, el fondo de la opalescencia de las células (A_{650}) se restó de A_{650}. La A^*_{450} resultante se utilizó entonces para determinar la fracción de células supervivientes. La absorbancia A^*_{450} era la de los pocillos con solamente medio y WST-8. La fracción superviviente se calculó como sigue: Porcentaje de viabilidad= 100 x (A^*_{450} de la muestra tratada-A^*_{450} de fondo)/(A^*_{450} de la muestra no tratada-A^*_{450} de fondo). Los valores de la fracción superviviente se representaron frente a la concentración de anticuerpo o conjugado en un gráfico semi-logarítmico para cada tratamiento. A partir de estos datos, se determinaron entonces los valores de CI_{50} utilizando GraphPad Prism v4 (software GraphPad, San Diego, CA) y se presentan en la Figura 5. Los resultados mostrados en la Figura 5 demuestran que todos los conjugados son activos de forma similar en su potencia citotóxica frente a células KB que expresan FOLR1. Para verificar adicionalmente la especificidad de los conjugados anti-FOLR1-maitansinoide frente a FOLR1, se evaluaron sus actividades en presencia de un exceso de anticuerpos no conjugados frente a células KB. La adición de un exceso de anticuerpo no conjugado competitivo a los conjugados suprimió su citotoxicidad, como se observa en la Figura 7. Estos datos indican que los conjugados matan a las células KB de una manera dependiente de antígeno. Los datos adicionales demostraron que el huMov19-SPDB-DM4 inducía la detención del ciclo celular en la fase G2/M en células KB en ensayos *in vitro*.

Ejemplo 15

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

Se ensayaron el conjugado huMov19-SPDB-DM4 escindible dirigido a FOLR1 en comparación con huC242-SPDB-DM4 no dirigido y el conjugado no escindible huMov19-PEG4-Mal-DM4 en comparación con el huC242-PEG4Mal-DM4 no dirigido utilizando un modelo establecido de xenoinjerto de células KB implantadas subcutáneamente en ratones SCID. Los ratones se asignaron al azar por peso corporal a grupos de tratamiento y se trataron una vez (conjugados de SPDB) en el día 3 después de la inoculación de células, o tres veces semanalmente en los días 3, 10 y 17 después de la inoculación de las células con 5 y 10 mg/kg de conjugado, respectivamente. El volumen tumoral medio de los diferentes grupos de tratamiento se representa en la Figura 8. Los tratamientos con huMov19-SPDB-DM4 o huMov19-PEG4Mal-DM4 dieron como resultado una disminución del volumen tumoral medio en comparación con el control de PBS, mientras que los tratamientos con cualquiera de los respectivos conjugados no dirigidos no produjeron ningún efecto significativo.

Ejemplo 16

Eficacia *in vivo* de los conjugados anti-FOLR1-PEG4Mal-DM4 en un modelo de xenoinjerto de KB

Se ensayaron los conjugados de PEG4Mal-DM4 de los anticuerpos anti-FOLR1 ejemplares huMov19, muFR-1-9, muFR-1-13, muFR-1-22, muFR-1-23 y huFR-1-21 usando un modelo de xenoinjerto establecido de células KB implantadas subcutáneamente en ratones SCID. Los ratones se asignaron al azar por peso corporal a grupos de tratamiento y se trataron una vez en el día 3 después de la inoculación de células con 10 mg/kg de uno de los conjugados enumerados anteriormente o sólo con PBS. Se mostró anteriormente que huMov19-PEG4Mal-DM4 era similar a los conjugados con PEG4Mal-DM4 de muFR-1-9, muFR-1-13, muFR-1-22, muFR-1-23 y huFR-1-21 en su potencia citotóxica *in vitro*. HuMov19-PEG4Mal-DM4 y huFR-1-21-PEG4Mal-DM4 eran significativamente más potentes *in vivo* que cualquiera de los otros conjugados, dando como resultado una disminución más pronunciada en el volumen tumoral medio (Figuras 9 y 10). También se demostró que la potencia era dependiente de la dosis (Figura 11) y la elección del conector también desempeñó su papel (Figuras 12 y 13).

Ejemplo 17

Eficacia *in vivo* de los conjugados anti-FOLR1-sulfo-SPDB-DM4 en un modelo de xenoinjerto

Se ensayaron los conjugados huMov19-sulfo-SPDB-DM4 anti-FOLR1 en tres xenoinjertos de adenocarcinoma seroso ovárico: OVCAR-3, IGROV-1 y OV-90. Cada uno de estos tumores de xenoinjerto mostró niveles de

expresión de FOLR1 comparables a los tumores de pacientes cuando se medían usando un método de tinción inmunohistoquímico calibrado (IHC) en secciones incluidas en parafina fijadas con formalina. Los ratones que presentaban tumores de xenoinjerto subcutáneo establecidos (aproximadamente 100 mm^3) se trataron con una sola inyección intravenosa de conjugado huMov19-sulfo-SPDB-DM4 a 1,2, 2,5 y 5,0 mg/kg (basado en la concentración de anticuerpos; las Figuras 14-16 muestran la concentración del conjugado de maitansinoide en µg/kg). El conjugado fue activo en los tres modelos evaluados. En los xenoinjertos de OVCAR-3, la dosis mínimamente eficaz (MED) fue de 1,2 mg/kg (Figura 14). Los niveles de dosis más altos fueron altamente activos, dando como resultado regresiones completas (RC) en 4/6 y 2/6 ratones en los grupos de tratamiento de 2,5 y 5,0 mg/kg, respectivamente. El tratamiento con el conjugado dio como resultado una fuerte actividad antitumoral tanto en el modelo de xenoinjerto IGROV-1 como en el OV-90, con una MED de 2,5 mg/kg, una sola inyección (Figuras 15 y 16). Estos datos demuestran la fuerte actividad antitumoral de los conjugados huMov19-sulfo-SPDB-DM4 contra tumores de xenoinjerto de ovario con niveles de expresión de FOLR1 comparables a los tumores de pacientes.

Ejemplo 18

Efecto de los conectores sobre la eficacia de los inmunoconjugados

El anticuerpo anti-FOLR1 huMov19 se unió a DM1 o DM4 a través de los conectores escindibles que contienen disulfuro SPP, SPDB o sulfo-SPDB, o a través del conector SMCC no escindible. Se examinaron las actividades citotóxicas *in vitro* de estos conjugados en las líneas de células KB, IGROV-1 y JEG-3. El análisis por FACS indicó que las células KB (cervicales) tenían >2.000.000 sitios de unión a anticuerpo por célula. Las células IGROV-1 (ovárica) tenían 260.000 sitios de unión a anticuerpo por célula, y las células JEG-3 (coriocarcinoma) tenían 40.000 sitios de unión a anticuerpo por célula. Los resultados de la citotoxicidad *in vitro* se resumen en la Tabla 2 a continuación. Los conjugados escindibles mostraron actividades *in vitro* marcadamente mayores en comparación con las del conjugado con SMCC.

Tabla 2: Efecto de los conectores de los inmunoconjugados sobre la citotoxicidad *in vitro*.

	CI_{50}, nM (n=3), basado en Ab			
Células	SPP-DM1	SPDB-DM4	Sulfo-SPDM-DM4	SMCC-DM1
KB	0,1	0,1	0,1	0,1
Igrov 1	0,1	0,1	0,3	1,0
Jeg3	0,2	0,2	3,0	20

También se ensayaron las actividades *in vivo* de los conjugados en modelos de tumores positivos para FOLR-1, de KB y OVCAR-3. Los resultados mostrados en la Figura 17 demuestran que los conjugados SPDB-DM4 y sulfo-SPDB-DM4 escindibles son más evidentes que los conjugados SMCC-DM1 no escindibles *in vivo*. Además, entre los conjugados escindibles, el conjugado de SPP-DM1 era menos activo que los conjugados de SPDB-DM4 o sulfo-SPDB-DM4 en ambos modelos de xenoinjerto (Figura 18). Los dos últimos conjugados eran activos de forma similar contra los tumores KB, mientras que el conjugado de sulfo-SPDB-DM4 era más activo contra el modelo OVCAR-3. Los datos obtenidos usando el modelo OVCAR-3 se resumen en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Efecto de los conectores de los inmunoconjugados sobre el tamaño del tumor en el modelo de xenoinjerto OVCAR-3.

Conjugado	Tumor sobre el control (%)	Respuesta Parcial	Respuesta Completa	Respuesta
SPP-DM1	54	0/6	0/6	Inactivo
SPDB-DM4	9	6/6	1/6	Muy activo
Sulfo-DPDB-DM4	0	6/6	4/6	Muy activo

Estos datos demuestran que los inmunoconjugados que contienen un conector escindible muestran una mayor eficacia tanto *in vitro* como *in vivo*, y los inmunoconjugados anti-FOLR1 que contienen sulfo-SPDB son muy activos en modelos tumorales.

Ejemplo 19

Eficacia *in vitro* e *in vivo* del conjugado anticuerpo huFR1 SMCC-DM1

Se conjugaron huFR1-48, huFR1-49, huFR1-57 y huFR1-65 anti-FOLR1 con un conector SMCC y DM1 y se analizaron como se ha descrito anteriormente los efectos sobre células KB, e *in vivo* utilizando los modelos de xenoinjerto anteriormente descritos. Aunque cada uno de los anticuerpos mostró una eficacia similar en el modelo de células KB, los inmunoconjugados de huFR1-48, huFR1-49, huFR1-57 y huFR1-65 mostraron una eficacia *in vivo* variable, pero significativa, a una dosis de 200 µg/kg en un sistema de modelo de xenoinjerto (Tabla 4 y Figura 19).

Tabla 4: Eficacia *in vitro* e *in vivo* del conjugado anticuerpo huFR1 SMCC-DM1

No. de Clon	Afinidad aparente (nM)	Actividad de huAb-smcc-DM1 sobre KB *in vitro* (nM)	Actividad de huAb-smcc-DM1 *in vivo*
huFR1-48	0,13	0,05	+
huFR1-49	0,08	0,10	+
huFR1-57	0,14	0,10	+
huFR1-65	0,15	0,10	+
huMov19	0,06	0,10	++

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Immunogen, Inc.

<120> Anticuerpos e inmunoconjugados contra el receptor 1 de folato y usos de los mismos

<130> S68328PCEPT1

<150> US 61/413.172

<151> 12-11-2010

<150> US 61/346.595

<151> 20-05-2010

<150> US 61/307.797

<151> 24-02-2010

<160> 130

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<200>

<223> huMov19 vHC CDR1

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vHC CDR2

<400> 2

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vHC CDR3

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vHC

<400> 4

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> 5

<211> 440

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vHC

<400> 5

aagcttgcca ccatgggttg gtcatgcatc atcctcttct tggttgcaac tgctaccgga 60

gtgcacagtc aggtacagct cgtgcagtcc ggcgccgagg tggtgaagcc tggtgccagc 120

gtgaagatct cctgtaaagc cagtggatac acattcaccg gttattttat gaattgggtg 180

aaacagagcc caggccaatc cctcgaatgg atagggcgaa tccacccata tgacggggac 240

```
acctttaca accagaaatt ccaggggaaa gccactctga cagtggacaa gagttccaac      300

actgcacaca tggagcttct ctccctgacc agcgaagact tcgctgttta ttactgtacc      360

cgttatgatg gttcccgtgc aatggactac tggggccaag ggaccactgt caccgtaagt      420

tccgccagca ccaagggccc                                                  440
```

<210> 6

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 HC

<400> 6

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

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

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

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

```
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vLC CDR1

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vLC CDR2

<400> 8

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vLC CDR3

<400> 9

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vLCv1.00

<400> 10

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

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 vLCv1.60

<400> 11

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 Thr 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

<210> 12

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 LCv1.00

<400> 12

```
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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 13

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 LCv1.60

<400> 13

```
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 Thr 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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 14

<211> 408

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico de huMov19 LCV1.00

<400> 14

gaattcgcca ccatgggctg gagctgcatt atccttttc tggtagccac agctacaggc 60

gtgcatagcg atatcgtgct gacacaatcc cccctctctc tggccgtgtc actcggacag 120

cccgctatca tcagctgcaa agccagccag tctgtcagct tcgctggaac aagtcttatg 180

cattggtatc atcagaagcc tggccagcaa cccaggctgc tgatctatcg agcctcaaac 240

ttggaagcag gagtgccaga ccggttttct gggtccggga gtaaaaccga ttttacactt 300

aatatctcac ctgtcgaggc cgaggacgcc gccacctact actgtcagca gagccgagag 360

taccccttaca cttttggcgg tgggactaaa ctggaaataa aacgtacg 408

<210> 15

<211> 408

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huMov19 LCv1.60

<400> 15

gaattcgcca ccatgggctg gtcttgtatc atcctgtttc tggtggccac cgcaaccggt 60

gttcactccg acattgtgct gacacagtcc cccctttcac tggctgtatc cctcggccag 120

cccgctatca tcagctgcaa ggctagccag agcgtgagtt ttgccggcac ttcacttatg 180

cattggtacc atcagaaacc aggccagcaa cctaggctgc tgatttatcg ggctagcaac 240

ctggaggccg gcgtgcccga ccgctttagc gggagcggct ccaagactga cttcactctg 300

accatctccc ccgtagaagc agaagatgct gcaacctact actgtcagca gtctcgcgag 360

tatccttata cattcggagg cggaactaaa ctggagatta aacgtacg 408

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muMov19 vHC CDR2

<400> 16

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muMov19 vHC_CAA68252

<400> 17

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

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

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

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

Lys Asp 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
        115
```

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muMov19 vLC_CAA68253

<400> 18

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

Gln Arg 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

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

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

Pro Val Glu Glu 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
            100                 105
```

<210> 19

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> chMov19 HC

<400> 19

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

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

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

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

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

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

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

```
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> chMov19 LC

<400> 20

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

Gln Arg 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

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

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

Pro Val Glu Glu 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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 21

<211> 441

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico de chMov19 HC

<400> 21

```
Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
1               5                   10                  15

Gly Thr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr
            20                  25                  30

Cys Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Cys Ala
        35                  40                  45

Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Thr Cys Cys
    50                  55                  60

Ala Thr Thr Cys Ala Cys Ala Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ala Cys Thr
65                  70                  75                  80

Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys
                85                  90                  95

Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Thr Thr Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly
            100                 105                 110

Gly Ala Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala Thr
        115                 120                 125

Cys Thr Cys Ala Thr Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala
    130                 135                 140

Gly Gly Ala Thr Ala Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Cys Thr Gly
145                 150                 155                 160

Gly Cys Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly
                165                 170                 175

Gly Gly Thr Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys Ala Cys
            180                 185                 190

Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Thr
        195                 200                 205

Gly Gly Ala Thr Cys Gly Gly Ala Cys Gly Thr Ala Thr Thr Cys Ala
    210                 215                 220
```

```
Cys Cys Cys Cys Thr Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Ala Thr
225                 230                 235                 240

Ala Cys Thr Thr Thr Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala
                245                 250                 255

Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys
            260                 265                 270

Thr Ala Cys Ala Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Thr Gly Ala Cys
        275                 280                 285

Ala Ala Ala Thr Cys Ala Thr Cys Thr Ala Ala Cys Ala Cys Cys Gly
    290                 295                 300

Cys Thr Cys Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Cys Thr
305                 310                 315                 320

Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Ala
                325                 330                 335

Gly Ala Cys Thr Thr Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Thr Ala Thr Thr
            340                 345                 350

Ala Cys Thr Gly Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Cys Gly Ala
        355                 360                 365

Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly
    370                 375                 380

Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly
385                 390                 395                 400

Gly Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala Gly Thr
                405                 410                 415

Cys Thr Cys Ala Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr
            420                 425                 430

Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala
        435                 440
```

<210> 22

<211> 408

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico de chMov19 LC

<400> 22

gaattcgcca ccatgggttg gtcttgtatt atcctctttc tcgtcgcaac cgcaacaggc 60

gtccattcag atatcgaact cacacaatca ccagcttccc tcgcagtctc tctcggtcaa 120

cgcgcaatca tctcttgtaa agcctcccaa tcagtctcat tcgccggcac gtccctcatg 180

cattggtacc atcaaaaacc cggtcagcaa cccaaactcc ttatctatag agcaagcaac 240

ctcgaagcag gcgttcccac cagatttagc ggatcaggaa gtaaaaccga tttcacactc 300

aacattcatc cagtcgaaga agaagatgca gctacttatt attgccaaca gtctagagaa 360

tatccataca cattcggagg gggtaccaaa cttgaaatta aacgtacg 408

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muMov19 vHC_CAA68252

<400> 23

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

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

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

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

Lys Asp 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
        115
```

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muMov19 vLC_CAA68253

<400> 24

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

Gln Arg 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

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

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

Pro Val Glu Glu 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
            100                 105
```

<210> 25

<211> 257

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> receptor 1 de folato humano

<400> 25

```
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
```

<210> 26

<211> 771

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico del receptor 1 de folato humano

<400> 26

```
atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctccttctag tgtgggtggc tgtagtaggg       60

gaggctcaga caaggattgc atgggccagg actgagcttc tcaatgtctg catgaacgcc      120

aagcaccaca aggaaaagcc aggccccgag gacaagttgc atgagcagtg tcgaccctgg      180

aggaagaatg cctgctgttc taccaacacc agccaggaag cccataagga tgtttcctac      240

ctatatagat tcaactggaa ccactgtgga gagatggcac ctgcctgcaa acggcatttc      300

atccaggaca cctgcctcta cgagtgctcc cccaacttgg ggccctggat ccagcaggtg      360
```

gatcagagct ggcgcaaaga gcgggtactg aacgtgcccc tgtgcaaaga ggactgtgag 420

caatggtggg aagattgtcg cacctcctac acctgcaaga gcaactggca caagggctgg 480

aactggactt cagggtttaa caagtgcgca gtgggagctg cctgccaacc tttccatttc 540

tacttcccca cacccactgt tctgtgcaat gaaatctgga ctcactccta caaggtcagc 600

aactacagcc gagggagtgg ccgctgcatc cagatgtggt tcgacccagc ccagggcaac 660

cccaatgagg aggtggcgag gttctatgct gcagccatga gtggggctgg gccctgggca 720

gcctggcctt tcctgcttag cctggcccta atgctgctgt ggctgctcag c 771

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-21 vLC CDR1

<400> 27

Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-21 vLC CDR2

<400> 28

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-21 vLC CDR3

<400> 29

Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-21 vHC CDR1

<400> 30

Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-21 vHC CDR2

<400> 31

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr
1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-21 vHC CDR3

<400> 32

Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H2 de FR1-21 murino de Kabat

<400> 33

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

Gly

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H2 de FR1-21 humano de Kabat

<400> 34

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


Gly
```

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-21 vLC

<400> 35

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-21 vHC

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 37

<211> 323

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de ADN de muFR1-21 vLC

<400> 37

```
gacatccaga tgacacaatc ttcatcctac ttgtctgtat ctctaggagg cagagtcacc      60
attacttgca aggcaagtga ccacataaat aattggttag cctggtatca gcagaaacca     120
ggaaatgctc ctaggctctt aatatctggt gcaaccagtt tggaaactgg ggttccttca     180
agattcagtg gcagtggatc tggaaaggat tacactctca gcatttccag tcttcagact     240
gaagatgttg ctacttatta ctgtcaacag tattggagta ctccattcac gttcggctcg     300
gggacaaagt tggaaataaa acg                                             323
```

<210> 38

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-21HcvarPat

<400> 38

gaagtgaagc tggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggttggagtg tgtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta cacctactat 180

ccagacggtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagggacggc 300

gagggggggcc tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-21 LC

<400> 39

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
            20                  25                  30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr 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

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> 456

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-21 HC

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met 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 Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
    130                 135                 140

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

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

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

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

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

```
Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys
        435                 440                 445

Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 41

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21 vLC

<400> 41

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21 vHC

<400> 42

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Pro Gly Phe
    50                  55                  60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

                85                  90                  95

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 43

<211> 446

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21VH_co

<400> 43

aagcttgcca ccatgggatg gtcatgcatc attctttttc tcgtcgccac tgccacaggt 60

gtgcattccg aggtgcaact tgtagaatct ggcggggatg ttgtgaagcc tggaggtagt 120

ctcaagttgt cctgtgctgc atctgggttt accttctctt cctacggaat gagctgggtg 180

agacagactc ctggcaaggg gctggagtgc gttgccacca ttagtagtgg aggttcttac 240

acctactatt cacctggttt tcagggacgc tttacaatct cccgcgataa gtctaagaac 300

acccttacc tccagatgag tagccttaag gctgaggaca cagccatgta ttattgcgct 360

cgcgatgggg agggagggct ttacgctatg gactactggg gccagggtac cagcgtgacc 420

gtttcctctg ctagtaccaa gggccc 446

<210> 44

<211> 396

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR21VL_co

<400> 44

gaattcgcca ccatgggatg gtcatgtatc attctgttct tggtagcaac agcaactggc 60

gtccattctg acatccagat gacccaatcc tccagcagct tgtcagtatc cgttgggggc 120

cgcgttacta ttacctgtaa ggcctccgac catataaata actggcttgc atggtatcaa 180

cagaagcctg ggaaggcacc taaactgctt atctctgggg ccacaagcct ggagaccggc 240

gtgccttcca ggttctctgg aagtggatct ggcaaggact ataccttgag cattagtagc 300

cttcaacctg aggacgtcgc cacctactat tgtcagcagt attggtctac acccttacc 360

tttggacagg gcactaaatt ggagataaaa cgtacg 396

<210> 45

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21 LC

<400> 45

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 46

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21 HC

<400> 46

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Pro Gly Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly
```

<210> 47

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21LC

<400> 47

gacatccaga tgacccaatc ctccagcagc ttgtcagtat ccgttggggg ccgcgttact 60

attacctgta aggcctccga ccatataaat aactggcttg catggtatca acagaagcct 120

gggaaggcac ctaaactgct tatctctggg gccacaagcc tggagaccgg cgtgccttcc 180

aggttctctg gaagtggatc tggcaaggac tataccttga gcattagtag ccttcaacct 240

gaggacgtcg ccacctacta ttgtcagcag tattggtcta cacccтttac ctttggacag 300

ggcactaaat tggagataaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 48

<211> 1347

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-21HC

<400> 48

gaggtgcaac ttgtagaatc tggcggggat gttgtgaagc ctggaggtag tctcaagttg 60

tcctgtgctg catctgggtt taccttctct tcctacggaa tgagctgggt gagacagact 120

cctggcaagg ggctggagtg cgttgccacc attagtagtg gaggttctta cacctactat 180

tcacctggtt ttcagggacg ctttacaatc tcccgcgata agtctaagaa cacccтttac 240

ctccagatga gtagccttaa ggctgaggac acagccatgt attattgcgc tcgcgatggg 300

gagggagggc tttacgctat ggactactgg ggccagggta ccagcgtgac cgtttcctct 360

gctagtacca agggcccatc agttttcccc ttggctccaa gttctaaatc cacaagcggt 420

ggaacagctg cactgggatg cctcgttaaa gattatttcc ctgagcctgt gacagtgagc 480

tggaatagcg gagcattgac ttcaggtgtg cacacttttc ccgctgtgtt gcagtcctcc 540

ggtctgtact cactgtccag tgtcgtaacc gtcccttcta gcagcttggg aacccagacc 600

tacatctgta acgtcaacca taaaccatcc aacacaaagg tggataagaa ggttgaacca 660

aagagctgtg ataagacaca tacatgccct ccttgtcctg caccagagct cctcggaggt 720

ccatctgtgt tcctgtttcc ccccaaaccc aaggacactc ttatgatctc tcgtactcca 780

gaggtcacct gtgttgttgt cgacgtgagc catgaagatc ccgaggttaa attcaactgg 840

tacgtggatg gagtcgaggt tcacaatgcc aagaccaagc ccagggagga gcaatataat 900

tctacatatc gggtagtgag cgttctgacc gtgctccacc aagattggct caatggaaaa 960

gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggct cttcccgctc ccattgagaa aactatctcc 1020

aaagccaagg ggcagccacg ggaaccccag gtgtatacat tgcccccatc tagagacgag 1080

ctgaccaaga accaggtgag tctcacttgt ctggtcaagg ggttttaccc ttctgacatt 1140

gctgtagagt gggagtctaa cggacagcca gaaaacaact acaagacaac tcccccagtg 1200

ctggacagcg acgggagctt cttcctctac tccaagttga ctgtagacaa gtctagatgg 1260

cagcaaggaa acgttttctc ctgctcagta atgcatgagg ctctgcacaa tcactatacc 1320

cagaaatcac tgtcccttag cccaggg 1347

<210> 49

<211> 792

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de ADN de huFolR1 EcoRI a XbaI

<400> 49

gaattcgcca ccatggcaca gcgcatgacc actcagctcc tgcttctgtt ggtttgggtg 60

gcagtcgtgg gagaggccca gaccaggatt gcttgggcac gcacagagct gcttaatgtt 120

tgcatgaacg caaagcacca taaagagaaa cccggtcccg aggataagtt gcacgaacag 180

tgccgccctt ggagaaagaa tgcatgctgt agcacgaaca cctctcagga ggcgcataaa 240

gacgtaagct atttgtatag atttaactgg aaccattgcg gtgaaatggc acctgcctgt 300

aaacggcact ttatccagga tacttgcttg tacgagtgta gcccgaatct cgggccctgg 360

attcagcaag ttgatcagag ttggcgcaaa gagagggtgc tgaacgttcc gctttgcaag 420

gaggactgcg agcaatggtg ggaagactgt agaaccagct acacctgtaa gtctaactgg 480

cacaaaggat ggaactggac atccgggttt aacaaatgcg ctgtcggcgc tgcctgccag 540

ccatttcatt tctactttcc aactcccact gtcctgtgta acgagatttg gacgcattca 600

tataaagtca gcaactacag ccggggctcc ggccgctgca ttcagatgtg gttcgaccct 660

gcacagggca accctaacga ggaggtcgca cgcttctacg ctgcagcaat gtctggagcc 720

ggtccttggg ctgcttggcc atttctcctt agcctcgccc tcatgcttct ctggctgttg 780

tcataatcta ga 792

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador EcoMH1

<400> 50

```
Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys Ser Ala Arg Gly
1               5                   10                  15

Thr Asn Met Ala Gly Cys Thr Gly Ser Ala Gly Ser Ala Gly Thr Cys
            20                  25                  30
```

<210> 51

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador EcoMH2

<400> 51

```
Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys Ser Ala Arg Gly
1               5                   10                  15

Thr Asn Met Ala Gly Cys Thr Gly Ser Ala Gly Ser Ala Gly Thr Cys
            20                  25                  30

Trp Gly Gly
        35
```

<210> 52

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador BamIgG1

<400> 52

```
Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Thr Ala Gly Ala Cys Ala
1               5                   10                  15

Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Thr Gly Thr Cys Gly Thr Thr Thr
            20                  25                  30

Thr Gly Gly Cys
        35
```

<210> 53

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SacIMK

<400> 53

Gly Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Gly Thr Gly
1 5 10 15

Met Thr Ser Ala Cys Met Cys Ala Arg Trp Cys Thr Met Cys Ala
20 25 30

<210> 54

<211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HindKL

<400> 54

Thr Ala Thr Ala Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Thr Thr
1 5 10 15

Gly Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly
20 25 30

Gly Ala Thr Ala Cys Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Gly Cys
35 40 45

<210> 55

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cd37-1LC líder

<400> 55

ttttgaattc gccaccatga agtttccttc tcaacttct 39

<210> 56

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> compuesto Mov19 CDR2 vHC humano y quimérico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (14)..(14)

<223> Xaa1= Q, H, K, o R

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (15)..(15)

<223> Xaa2= R, Q, H, o N

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (16)..(16)

<223> Xaa3= E, T, S, G, A, o V

<220>

<221> característica_misc

<222> (18)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica_misc

<222> (21).. (21)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 56

```
Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Ala Ala
1               5                   10                  15

Phe Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala
            20
```

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-48vL CDR1

<400> 57

```
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-48vL CDR2

<400> 58

```
Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1               5
```

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-48vL CDR3

<400> 59

Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-48vH CDR1

<400> 60

Thr Asn Tyr Trp Met Gln
1 5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-48vH CDR2

<400> 61

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg
1 5 10

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-48vH CDR3

<400> 62

Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr
1 5

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-49vL CDR1

<400> 63

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-49vL CDR2

<400> 64

Thr Ala Ser Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-49vL CDR3

<400> 65

Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-49vH CDR1

<400> 66

Thr Asn Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-49vH CDR2

<400> 67

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr
1 5 10

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-49vH CDR3

<400> 68

Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vL CDR1

<400> 69

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

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vL CDR2

<400> 70

Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser
1 5

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vL CDR3

<400> 71

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His Tyr Thr
1 5 10

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vH CDR1

<400> 72

```
Ser Ser Phe Gly Met His
1               5
```

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vH CDR2

<400> 73

```
Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser
1               5                   10
```

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-57vH CDR3

<400> 74

```
Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr
1               5
```

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-65vL CDR1

<400> 75

```
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn Val Ala
1               5                   10
```

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-65vL CDR2

<400> 76

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-65vL CDR3

<400> 77

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-65vH CDR1

<400> 78

Thr Ser Tyr Thr Met His
1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-65vH CDR2

<400> 79

Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn
1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1-65vH CDR3

<400> 80

Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 81

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de muFR1-48 definido por Kabat

<400> 81

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

Gly

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de huFR1-48 definido por Kabat

<400> 82

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

Gly

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de huFR1-49 definido por Kabat

<400> 83

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

Gly

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de muFR1-57 definido por Kabat

<400> 84

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

Gly
```

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de huFR1-57 definido por Kabat

<400> 85

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

Gly
```

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de muFR1-65 definido por Kabat

<400> 86

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

  Asp
```

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de huFR1-65 definido por Kabat

<400> 87

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

Gly
```

<210> 88

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-48vL

<400> 88

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 89

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-48vH

<400> 89

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ala
        115
```

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-49vL

<400> 90

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 91

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-49vH

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 92

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-57vL

<400> 92

```
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 Asn Ile Asn Asn Asn
            20                  25                  30

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

Lys Tyr Val Ser Gln Ser Val 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 His
                85                  90                  95

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

<210> 93

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-57vH

<400> 93

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

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

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

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

 Ser Val Thr Val Ser Ser
         115
```

<210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-65vL

<400> 94

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

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

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

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

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

Ala Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln 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> 95

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-65vH

<400> 95

```
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 Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
```

```
    50                  55                  60

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 96

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48vL

<400> 96

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 97

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48vH

<400> 97

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ala
        115
```

<210> 98

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49vL

<400> 98

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr

                85                  90                  95

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

<210> 99

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49vH

<400> 99

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 100

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57vL

<400> 100

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

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

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

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

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

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

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

<210> 101

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57vH

<400> 101

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

Ser Arg Arg 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 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65vL

<400> 102

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Thr Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

<210> 103

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65vH

<400> 103

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
```

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-48LC

<400> 104

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser 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

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> 105

<211> 441

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-48HC

<400> 105

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala 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
    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> 106

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-49LC

<400> 106

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser 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

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> 107

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-49HC

<400> 107

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr
            180                 185                 190
```

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
                245                 250                 255

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

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

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

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
                325                 330                 335

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

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
        355                 360                 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
    370                 375                 380

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

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
                405                 410                 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
            420                 425                 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 108

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-57LC

<400> 108

```
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 Asn Ile Asn Asn Asn
            20                  25                  30

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

Lys Tyr Val Ser Gln Ser Val 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 His
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
    210                 215
```

<210> 109

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-57HC

<400> 109

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
    210                 215                 220
```

```
Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
                245                 250                 255

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

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

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

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
                325                 330                 335

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

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
        355                 360                 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
    370                 375                 380

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

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
                405                 410                 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
            420                 425                 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 110

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-65LC

<400> 110

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

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

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

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

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

Ala Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln 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

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> 111

<211> 444

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> muFR1-65HC

<400> 111

```
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 Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met 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

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

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> 112

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48LC

<400> 112

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

```
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 113

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48HC

<400> 113

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

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

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

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

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49LC

<400> 114

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 115

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49HC

<400> 115

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 116

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57LC

<400> 116

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 117

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57HC

<400> 117

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

Ser Arg Arg 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 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Leu
```

```
65                  70                  75                  80

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

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 118

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65LC

<400> 118

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Thr Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
```

```
            100                 105                 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 119

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65HC

<400> 119

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

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

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

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

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

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

```
Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
```

```
        355                 360                 365

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

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

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

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

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

Gly
```

<210> 120

<211> 396

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48_VL

<400> 120

```
gaattcgcca ccatgggatg gagttgtatc atcctgtttc ttgtggctac agccacaggg       60
gtacactccg atattcaaat gacacagtcc ccttcatccc tgtccgtcag tgtggggaa       120
agggttacca tcacctgccg tgcatcagag aacatctatt ccaacctcgc ctggtaccaa      180
cagaaacctg gcaagtcccc taagctgttg gtctacgccg ctacaaacct cgccgatggg      240
gtgccttccc gtttcagtgg gtcagagtca ggcaccgact attctctgaa gatcaactcc      300
ctccagcctg aggatttcgg ctcctattac tgtcagcact tctgggctag tccatatact      360
ttcggccagg gaaccaaact tgaaattaaa cgtacg                                396
```

<210> 121

<211> 437

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-48_VH

<400> 121

aagcttgcca ccatggggtg gagctgcatc atccttttc tggtggccac tgccaccggc 60

gtgcactctc aggtccaact tgtgcagagc ggagccgagg tggccaaacc cggagctagt 120

gttaagctct catgtaaagc atctggctac acctttacta actactggat gcagtggatc 180

aagcaacggc caggccaggg cctggagtgg attggtgcta tttatcccgg aaacggggat 240

agcaggtaca ctcagaaatt tcagggaaag gctaccctta ccgccgataa gagttcttcc 300

acagcatata tgcaagtctc ctctctgacc tcagaggata gtgctgtcta ttactgcgct 360

cgccgggatg gcaactatgc agcctattgg ggtcaaggca cccttgtgac tgtatccgca 420

gcaagcacca agggccc 437

<210> 122

<211> 396

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49_VL

<400> 122

gaattcgcca ccatgggttg gtcatgcatt atcctgtttc tggtcgcaac agcaacaggt 60

gtgcacagtg acattcagat gacccaaagc ccctccagtc tgagcgtttc cgtgggggaa 120

cgtgtcacta tcacatgcag agcttccgag aatatttaca ctaacctcgc atggtaccag 180

cagaaacccg ggaagtctcc aaaacttctc gtatatacag ccagcaactt ggcagatggg 240

gtgcccagcc ggtttagcgg atctggttca ggcaccgact attctttgaa aattaattcc 300

ctgcagcctg aggattttgg tacctactat tgccagcatt tttgggtatc accatacact 360

tttggacagg gaacaaagct ggagatcaag cgtacg 396

<210> 123

<211> 440

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-49_VH

<400> 123

aagcttgcca ccatgggctg gtcttgtatt attcttttc ttgtggccac agccacagga 60

gtccattcac aggtacagct ccaacagtct ggcgcagttg tcgccaagcc cggcgcctct 120

gtgaagatga gttgcaaggc ctctggctac accttcacta attattggat gtactggatc 180

aaacaacgcc ccggccaggg tctggaactc attggagcca tctacccagg caactccgac 240

acaacataca atcagaagtt tcagggcaaa gcaaccctga ccgctgtaac ctcagctaat 300

accgtgtaca tggaggtaag tagcttgact agtgaagatt ccgcagtata ctattgcacc 360

aagcgccatg attacggcgc catggattac tggggccaag gtaccagtgt gaccgtgtct 420

tccgcttcca ccaagggccc 440

<210> 124

<211> 399

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57_VL

<400> 124

gaattcgcca ccatgggctg gtcatgcatt attttgttcc tggtcgccac cgcaaccggc 60

gttcattccg aaattgttct tactcagagc cctgcaacct tgagtgtgac acccggcgat 120

cgggtctcac tgagttgcag agcttcccag aatatcaaca ataatctgca ctggtatcag 180

cagaagcctg gccagtctcc tcgcttgctg attaagtatg tctcacagag cgtgtcaggt 240

atccctgacc gtttctccgg gtcaggttca ggcaccgact tcacactgtc catttctagc 300

gtggagcctg aggatttcgg aatgtacttt tgccagcaga gcaatagctg gcctcactac 360

acctttggcc aagggaccaa gctggagatc aagcgtacg 399

<210> 125

<211> 440

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-57_VH

<400> 125

aagcttgcca ccatgggctg gagctgtatc atcttgttcc ttgtggccac agctactggc 60

gtgcactccg aggtgcagct ggtcgaatcc ggcggaggcc tggtgcagcc tggggggagt 120

agacggctgt cctgcgctgc ctctgggttt actttctcaa gtttcggtat gcactgggtg 180

cgtcaggccc ccgggaaggg cctggaatgg gttgcttata tatcatctgg cagctccacc 240

atttcttatg ctgattccgt taagggacgc ttcaccattt ccagagacaa cagtaagaaa 300

acccttctgc tgcagatgac ctctctccgc gccgaagaca ccgcaatgta ttattgtgct 360

agagaggcct acggcagtag tatggaatac tgggggcagg ggaccctggt gaccgtgtct 420

tccgcatcta ctaagggccc 440

<210> 126

<211> 396

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65_VL

<400> 126

gaattcgcca ccatgggctg gtcttgcatt attctgttcc tggttgcaac agccactggc 60

gtccattccg aaatcgtgat gacccaatct cccgccacca tgtctacctc tcccggggac 120

cgggtgtctg tgacctgcaa ggcctctcag aatgttggcc caaacgtggc atggtatcaa 180

cagaaaccag ggcagtcacc cagagccctg atttactccg cttcttacag atattcagga 240

gttcccgccc ggttcacagg tagtgggtcc ggcactgact ttaccttgac catttccaac 300

atgcaatccg aggacctggc cgaatacttc tgtcagcagt acaattcata tccctataca 360

ttcggccagg ggaccaagct ggaaataaag cgtacg 396

<210> 127

<211> 446

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huFR1-65_VH

<400> 127

aagcttgcca ccatgggctg gtcatgcata atcctgttcc tggtcgcaac cgctacaggt 60

gtacactccc aggtgcagtt ggtgcagagc ggggccgaag ttgctaagcc cggtgcaagt 120

gtaaaaatgt cctgcaaagc tagcgggtac acattcacat cctatactat gcattgggta 180

aaacagcgcc caggacaggg gctcgcctgg ataggctata ttaacccaat atcaggatac 240

acaaactaca atcagaaatt tcagggaaag gcaaccctga ccgccgacaa gtcctcttct 300

accgcatata tgcagctcaa ctccctgacc agtgaagata gcgcagtgta ttactgtgcc 360

tccggcggtg cttatggccg gaaacccatg gattactggg gacaaggcac ctccgtcaca 420

gtgagtagcg cctcaaccaa gggccc 446

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de Mov19 murino definido por Kabat

<400> 128

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de Mov19 humano definido por Kabat

<400> 129

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC CDR2 de muFR1-49 definido por Kabat

<400> 130

```
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
1               5                   10                  15

Gly
```

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado que tiene la fórmula (A) - (L) - (C), en donde:

(A) es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor 1 de folato humano;

(L) es un conector; y

(C) es un maitansinoide o un análogo de maitansinoide,

en donde el conector (L) liga (A) a (C),

en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada (HC) que comprende:

una CDR1 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTGYFMN; una CDR2 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de RIHPYDGDTF; y una CDR3 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y

en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera (LC) que comprende:

una CDR1 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 7); una CDR2 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de RASNLEA (SEQ ID NO: 8); y una CDR3 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de QQSREYPYT (SEQ ID NO: 9).

2. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, caracterizado además porque (L) es un conector seleccionado del grupo que consiste en: un conector no escindible, un conector hidrófilo y un conector basado en ácido dicarboxílico.

3. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, caracterizado además porque (L) es un conector escindible.

4. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, en donde el conector se selecciona del grupo que consiste en: 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB), 4-(2-piridiltio)-butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB), éster de *N*-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol]-(NHS-PEG4-maleimida), 4-(2-piridiltio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP), 4-(2-piridilditio)-2-sulfopentanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPP), 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de *N*-succinimidilo (SMCC), 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de *N*-sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) y 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de *N*-succinimidilo (SIAB).

5. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el maitansinoide es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina o N(2')-desacetil -N (2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina.

6. El inmunoconjugado de la reivindicación 5, en donde (L) es 4-(2-piridilditio)-butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB) o 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB) y en donde (C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina o N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina.

7. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el dominio variable de HC del anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4,

en particular en donde la HC del anticuerpo comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10772.

8. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el dominio variable de LC del anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11,

en particular en donde la LC del anticuerpo comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10773 o PTA-10774.

9. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, en donde la HC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10772, en donde:

i) la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10774;

(L) es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB); y

(C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4);

ii) la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10773;

(L) es éster de *N*-succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol]-(NHS-PEG4-maleimida); y

(C) es N(2')-desacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1),

iii) la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10774;

(L) es 4-(2-piridilditio) butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB); y

(C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4), o

iv) la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10774;

(L) es 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP); y

(C) es N(2')-desacetil-N (2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1),

en donde el conector (L) liga (A) a (C),

en particular en donde

la LC del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC como PTA-10774;

(L) es 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB); y

(C) es N(2')-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4);

en donde (L) liga (A) a (C).

10. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además 2-6 (C), en particular

i) que comprende además una segunda (C),

ii) que comprende además una segunda y una tercera (C), o

iii) que comprende además una segunda, una tercera y una cuarta (C),

comprendiendo además preferiblemente 3-4 (C).

11. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un Fab, un Fab', un F(ab')2, un scFv, un Fv unido por disulfuro, un intracuerpo, un IgG-CH2, un minicuerpo, un F(ab')3, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, DVD-Ig, mAb2, un (scFv)2 o un scFv-Fc.

12. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a un receptor 1 de folato humano con una Kd de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 nM, preferiblemente se une a un receptor 1 de folato humano con una Kd de aproximadamente 1,0 nM o mejor, en particular en donde la afinidad de unión se mide por citometría de flujo, Biacore o radioinmunoensayo.

13. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en donde los inmunoconjugados tienen un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 (C) por (A), en particular en donde los inmunoconjugados tienen un promedio de aproximadamente 3,5 ± 0,5 (C) por (A).

14. Un reactivo de diagnóstico que comprende el inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el reactivo de diagnóstico comprende además un marcador, preferiblemente en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste en un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de imagenología y un ion metálico.

15. Un inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

16. El inmunoconjugado para uso según la reivindicación 15, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer

pancreático, cáncer renal, cáncer de peritoneo y cáncer de pulmón, en particular en donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer de peritoneo o un cáncer de pulmón, más en particular en donde el cáncer es cáncer de ovario.

Figura 1A

Cadena Ligera				
Kabat #	muMov19	DPK19	huMov19v1.00	huMov19v1.60
1	D	D	D	D
3	E	***V***	***V***	***V***
5	T	T	T	T
9	A	***L***	***L***	***L***
15	L	L	L	L
17	Q	Q	Q	Q
18	R	***P***	***P***	***P***
40	P	P	P	P
41	G	G	G	G
42	Q	Q	Q	Q
45	K	***R***	***R***	***R***
57	G	G	G	G
60	T	***D***	***D***	***D***
67	S	S	S	S
70	D	D	D	D
74*	N	K	N	***T****
76	H	***S***	***S***	***S***
80	E	***A***	***A***	***A***
81	E	E	E	E
100	G	G	G	G
103	K	K	K	K
105	E	E	E	E
107	K	K	K	K
108	R	R	R	R

Figura 1B

Cadena Pesada			
Kabat #	muMov19	8m27	huMov19
1	Q	Q	Q
3	Q	Q	Q
5	Q	***V***	***V***
9	A	A	A
11	L	***V***	***V***
13	K	K	K
14	P	P	P
19	K	K	K
23	K	K	K
28	S	***T***	***T***
41	H	***P***	***P***
42	G	G	G
43	K	***Q***	***Q***
61	Q	Q	Q
62	N	***K***	***K***
64	K	***Q***	***Q***
65	D	***G***	***G***
73	K	K	K
74	S	S	S
82B	S	S	S
84	S	S	S
85	E	E	E
105	Q	Q	Q
112	S	S	S
113	S	S	S

Figuras 1C y 1D

C

FR1-21 V_L		
Posición Kabat	Resto murino	Resto humano
1	D	D
3	V	V
9	S	S
10	**Y**	***S***
15	**L**	***V***
18	R	R
40	P	P
41	G	G
42	**N**	***K***
45	**R**	***K***
57	G	G
60	S	S
67	S	S
80	Q	Q
81	**T**	***P***
100	**S**	***Q***
103	K	K
105	E	E
107	K	K
108	R	R

D

FR1-21 V_H		
Posición Kabat	Resto murino	Resto humano
1	E	E
3	**K**	***Q***
11	**L**	***V***
13	K	K
14	P	P
17	S	S
19	K	K
41	P	P
42	**D**	***G***
43	K	K
44	**R**	***G***
60	**P**	***S***
61	**D**	***P***
63	**V**	***F***
64	**K**	***Q***
65	G	G
73	**N**	***K***
74	**A**	***S***
75	K	K
83	K	K
84	**S**	***A***
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

Figura 2

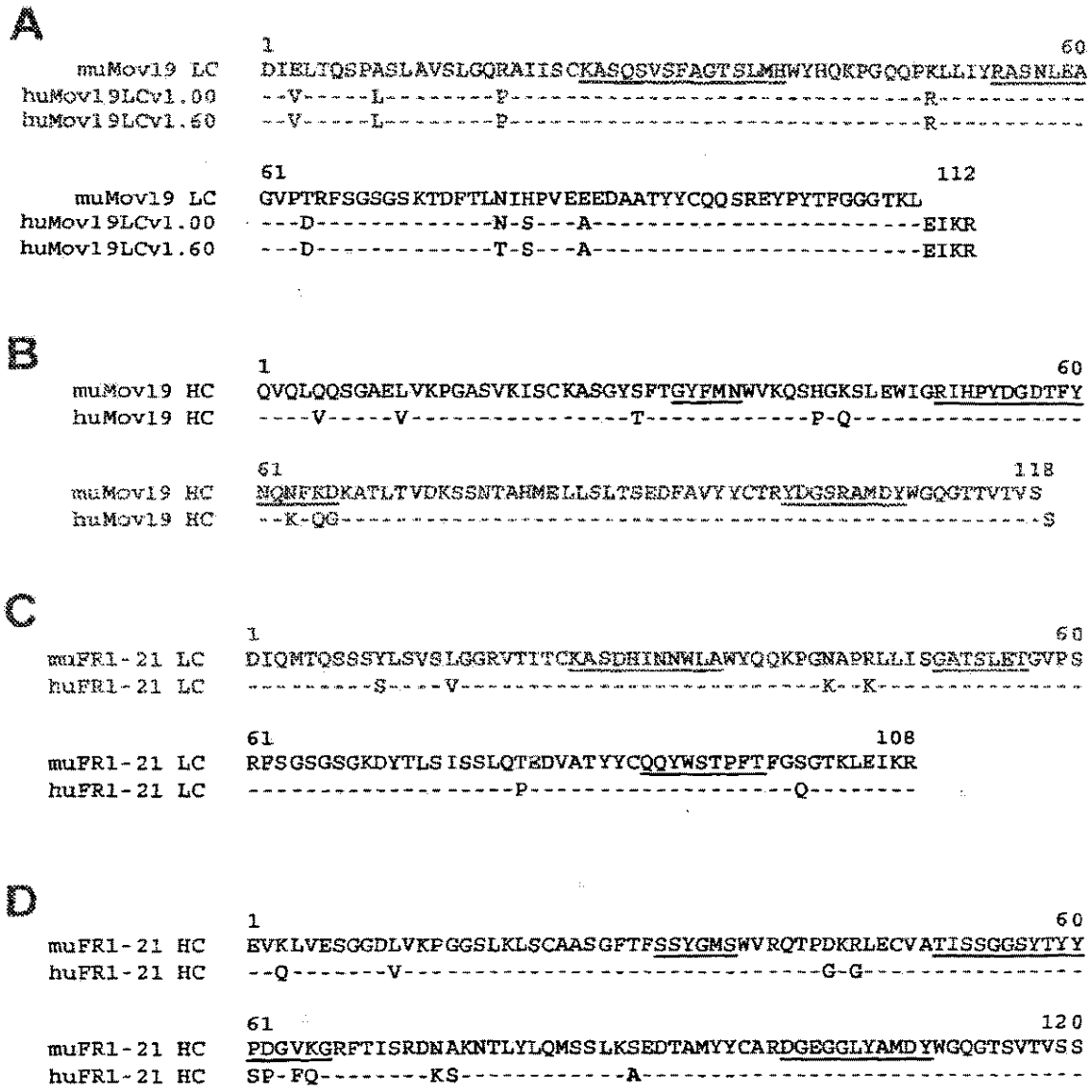

A
1 60
muMov19 LC DIELTQSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPKLLIYRASNLEA
huMov19LCv1.00 --V-----L--------P----------R----------
huMov19LCv1.60 --V-----L--------P----------R----------
61 112
muMov19 LC GVPTRFSGSGSKTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKL
huMov19LCv1.00 ---D----------N-S---A----------EIKR
huMov19LCv1.60 ---D----------T-S---A----------EIKR
B
1 60
muMov19 HC QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWVKQSHGKSLEWIGRIHPYDGDTFY
huMov19 HC ----V-----V----------T----------P-Q----------
61 118
muMov19 HC NQNFKDKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVS
huMov19 HC --K-QG----------S
C
1 60
muFR1-21 LC DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPS
huFR1-21 LC ----------S----V----------K--K----------
61 108
muFR1-21 LC RFSGSGSGKDYTLSISSLQTEDVATYYCQQYWSTPFTFGSGTKLEIKR
huFR1-21 LC ----------P----------Q--------
D
1 60
muFR1-21 HC EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLECVATISSGGSYTYY
huFR1-21 HC --Q-------V----------G-G----------
61 120
muFR1-21 HC PDGVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARDGEGGLYAMDYWGQGTSVTVSS
huFR1-21 HC SP-FQ--------KS----------A----------

Figura 3

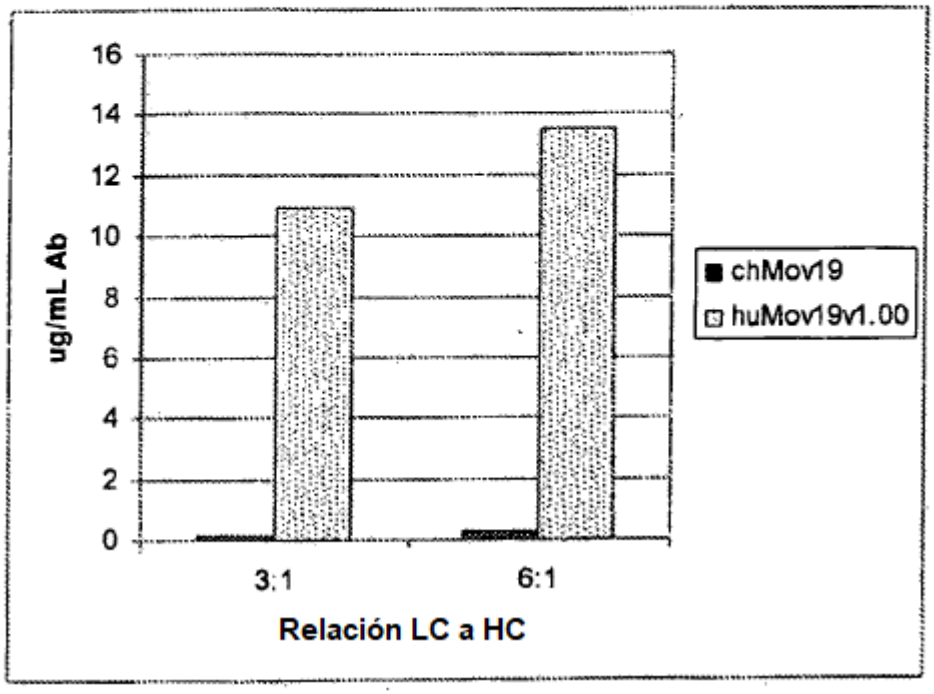
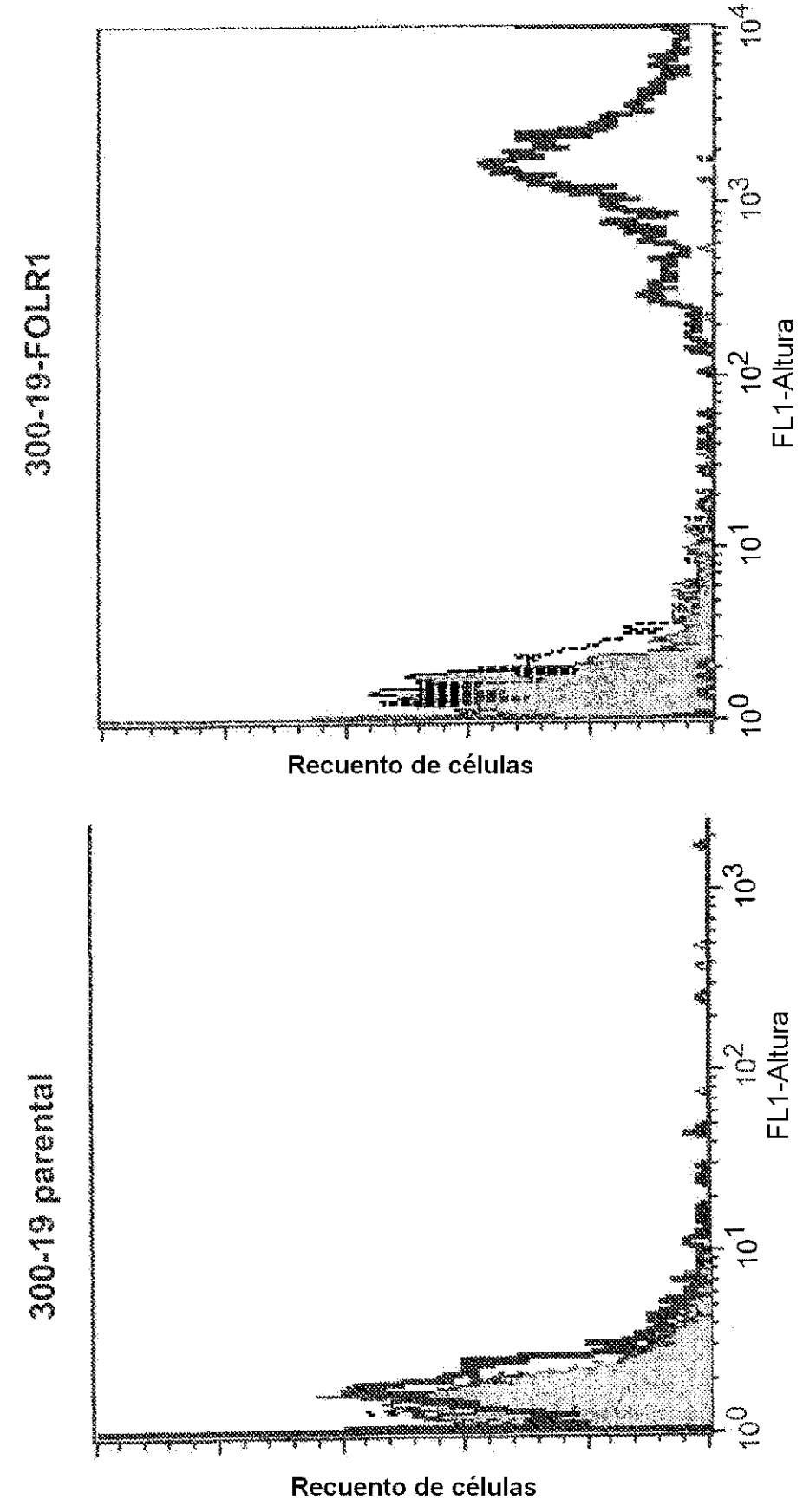

16
14
12
10
8
6
4
2
0
ug/mL Ab
3:1
6:1
Relación LC a HC
chMov19
huMov19v1.00

Figura 4



Células 300-19 parentales
Gris continuo = auto-fluorescencia de las células
Negro discontinuo = células + FITC secundario anti-humano
Negro continuo = células + huMov-19 + FITC secundario anti-humano

Figura 5

Clon	Isotipo	Afinidad sobre células SKOV3, Kd, nM	Actividad citotóxica de conjugados PEG4-mal-DM4 sobre células KB, IC50, nM (exposición continua)
huMov19	IgG1	0,07	0,15
muFR1-9	IgG1	0,03	0,22
muFR1-13	IgG2b	0,66	0,15
muFR1-22	IgG2a	0,69	0,14
muFR1-23	IgG2a	0,55	0,13
huFR1-23	IgG1	0,60	
muFR1-21	IgG2b	0,07	0,10
huFR1-21	IgG1	0,07	0,10

Figura 6

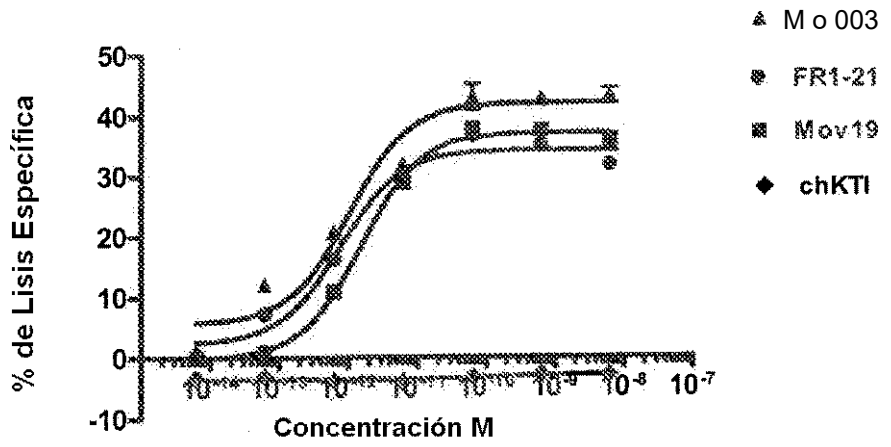

% de Lisis Específica
50
40
30
20
10
0
-10
Concentración M
M o 003
FR1-21
Mov19
chKTI

Figura 7

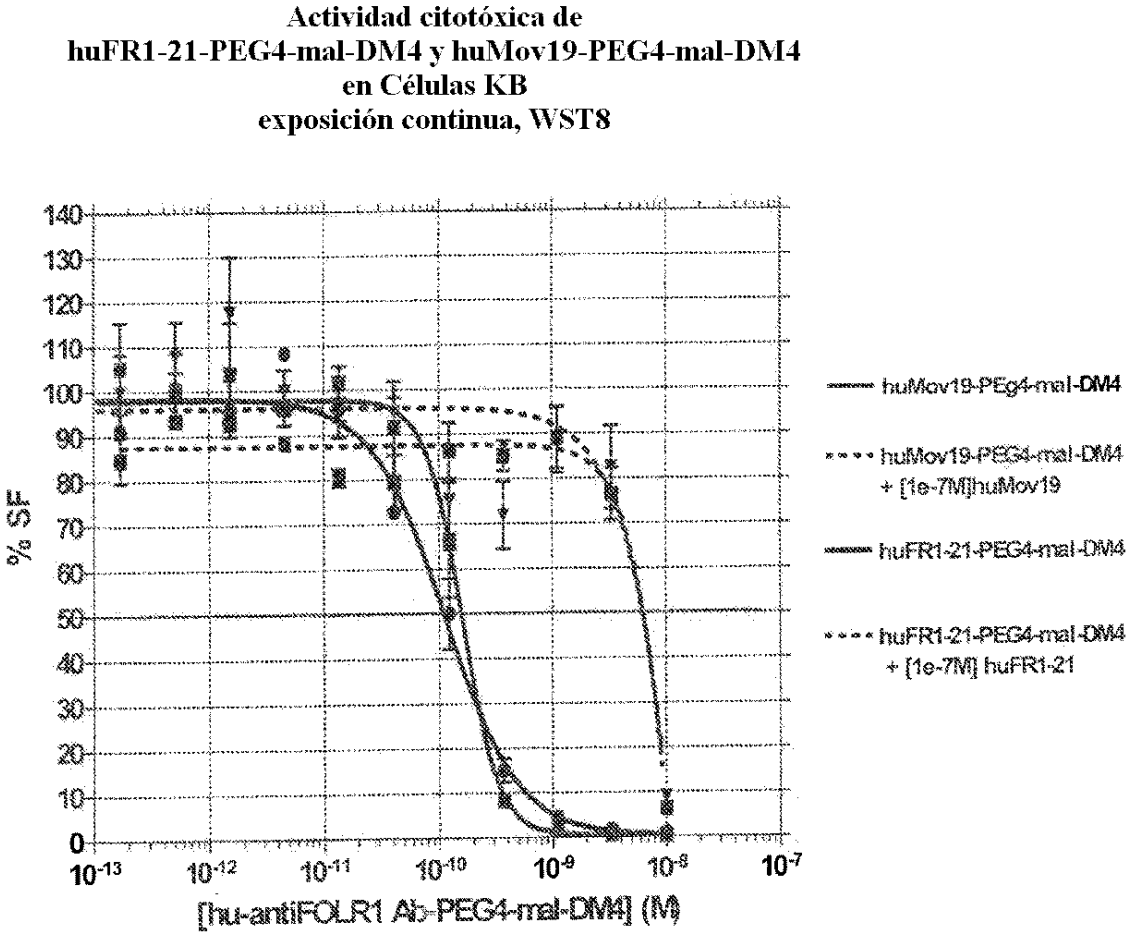

Actividad citotóxica de
huFR1-21-PEG4-mal-DM4 y huMov19-PEG4-mal-DM4
en Células KB
exposición continua, WST8
% SF
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
[hu-antiFOLR1 Ab-PEG4-mal-DM4] (M)
huMov19-PEg4-mal-DM4
huMov19-PEG4-mal-DM4
+ [1e-7M]huMov19
huFR1-21-PEG4-mal-DM4
huFR1-21-PEG4-mal-DM4
+ [1e-7M] huFR1-21

Figura 8

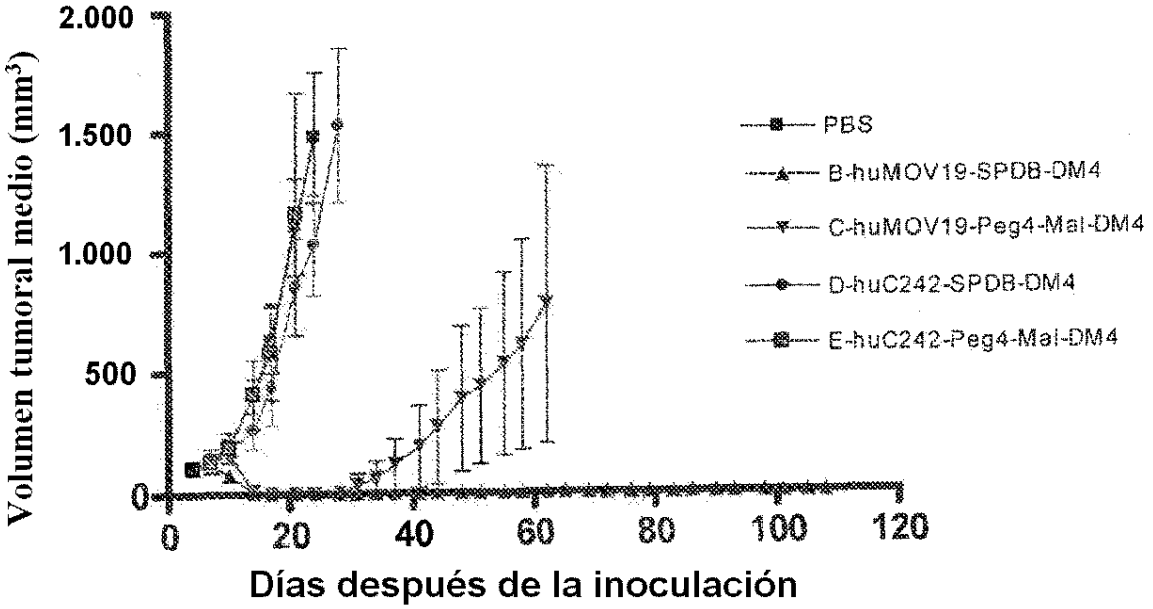

Volumen tumoral medio (mm³)
2.000
1.500
1.000
500
0
0
20
40
60
80
100
120
Días después de la inoculación
PBS
B-huMOV19-SPDB-DM4
C-huMOV19-Peg4-Mal-DM4
D-huC242-SPDB-DM4
E-huC242-Peg4-Mal-DM4

Figura 9

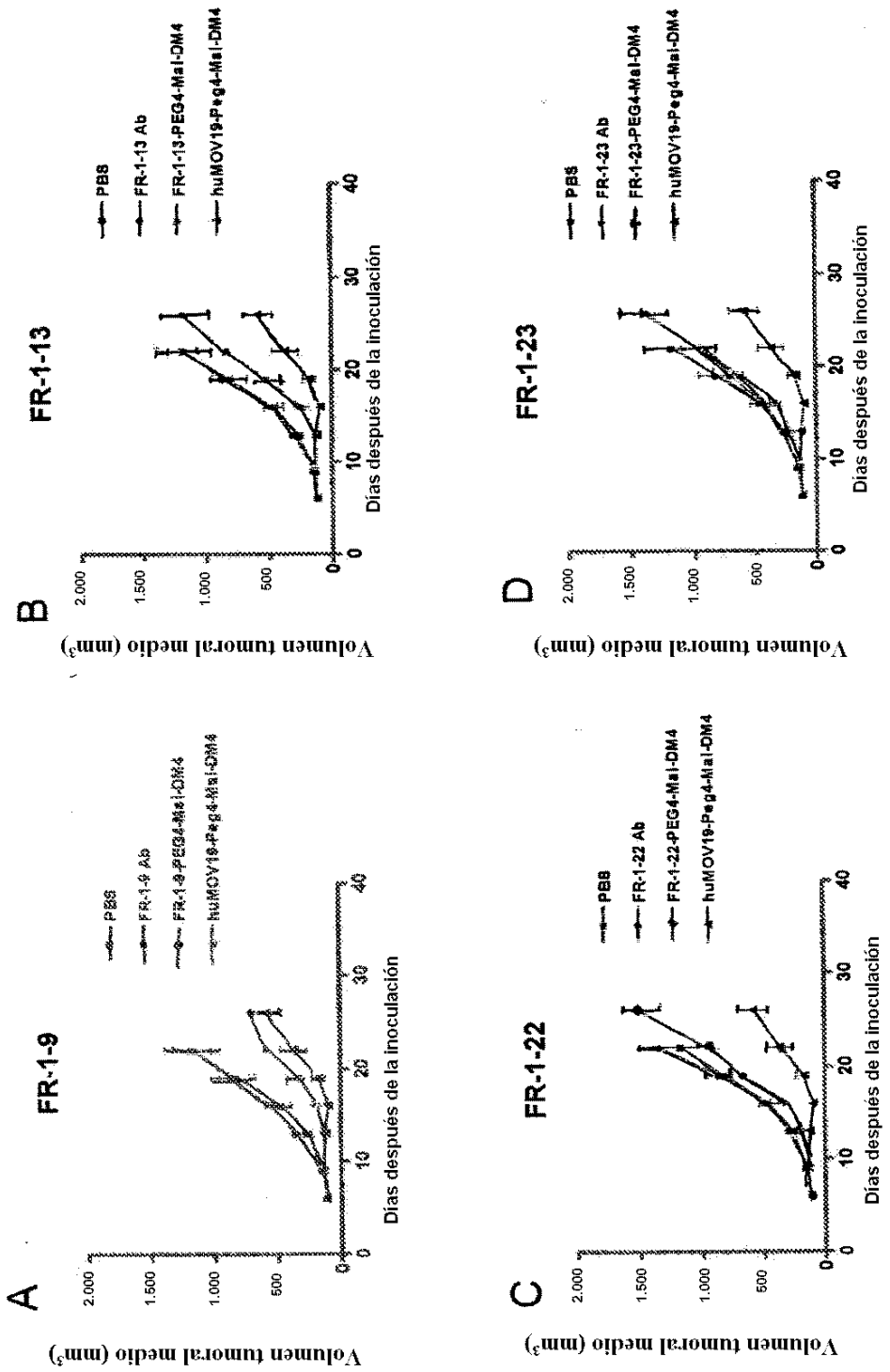
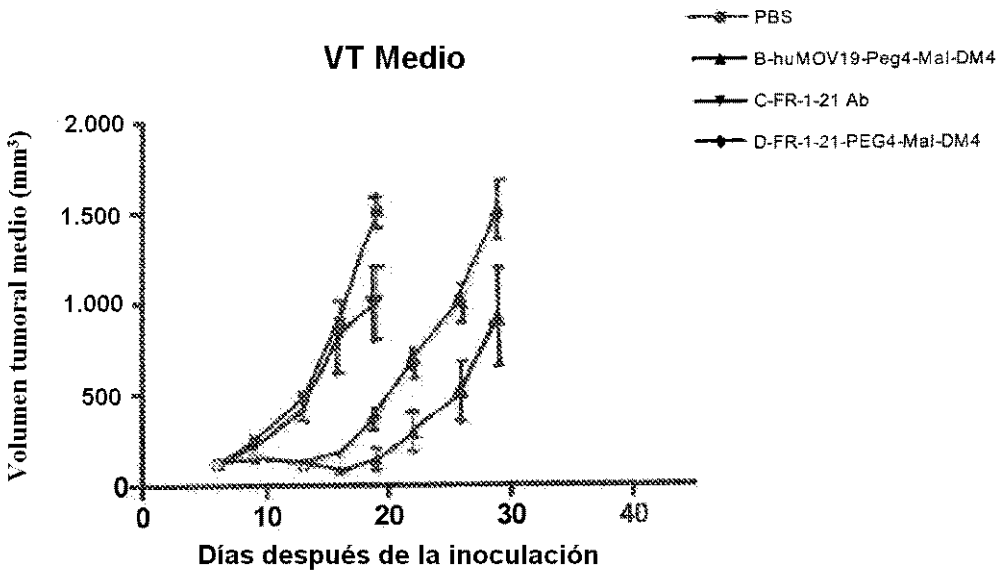

A
FR-1-9
PBS
FR-1-9 Ab
FR-1-9-PEG4-Mal-DM4
huMOV19-Peg4-Mal-DM4
Volumen tumoral medio (mm³)
Días después de la inoculación
B
FR-1-13
PBS
FR-1-13 Ab
FR-1-13-PEG4-Mal-DM4
huMOV19-Peg4-Mal-DM4
Volumen tumoral medio (mm³)
Días después de la inoculación
C
FR-1-22
PBS
FR-1-22 Ab
FR-1-22-PEG4-Mal-DM4
huMOV19-Peg4-Mal-DM4
Volumen tumoral medio (mm³)
Días después de la inoculación
D
FR-1-23
PBS
FR-1-23 Ab
FR-1-23-PEG4-Mal-DM4
huMOV19-Peg4-Mal-DM4
Volumen tumoral medio (mm³)
Días después de la inoculación

Figura 10



Una sola inyección de 10 mg/kg el día 6 después de la inoculación, modelo KB

Figura 11

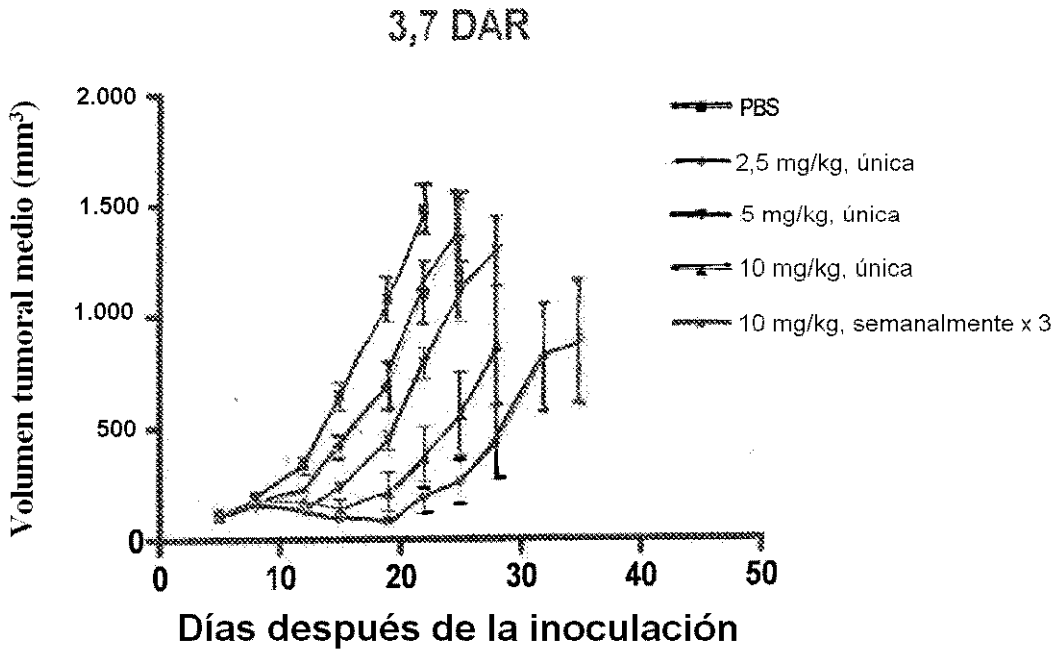
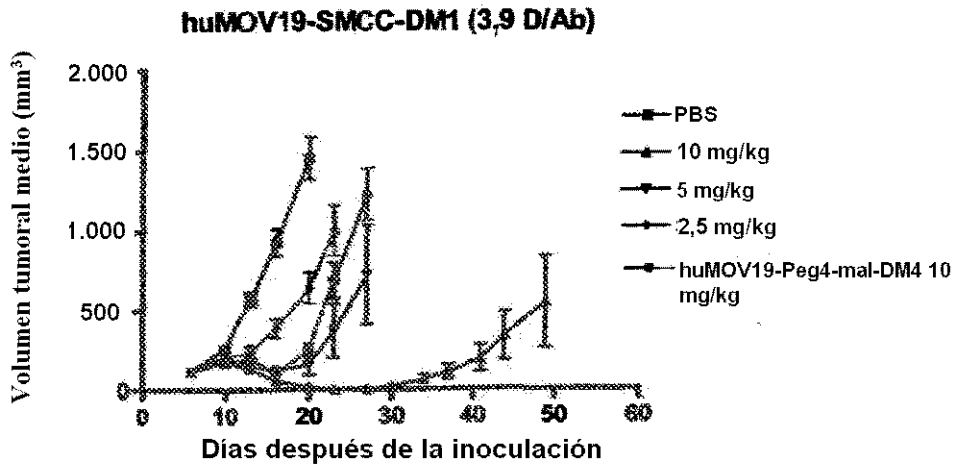
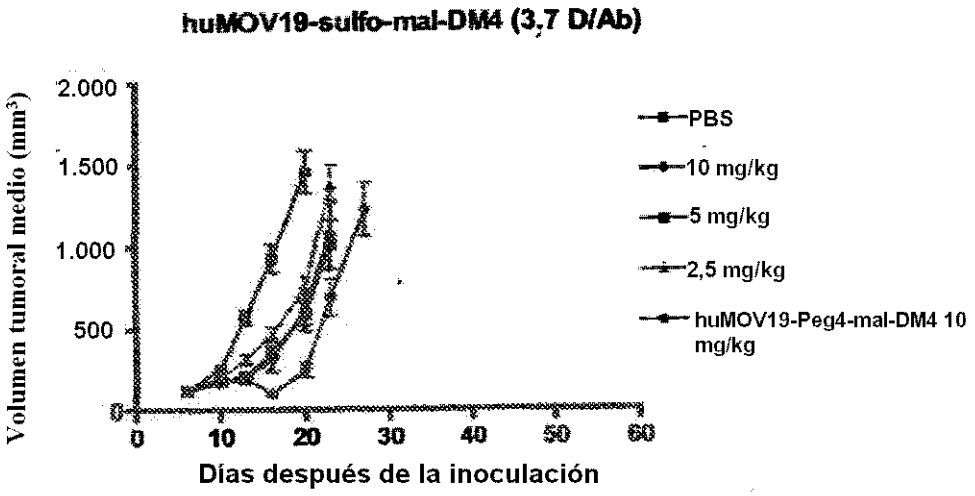

3,7 DAR
Volumen tumoral medio (mm³)
2.000
1.500
1.000
500
0
0
10
20
30
40
50
Días después de la inoculación
PBS
2,5 mg/kg, única
5 mg/kg, única
10 mg/kg, única
10 mg/kg, semanalmente x 3

Figura 12

A



B



C

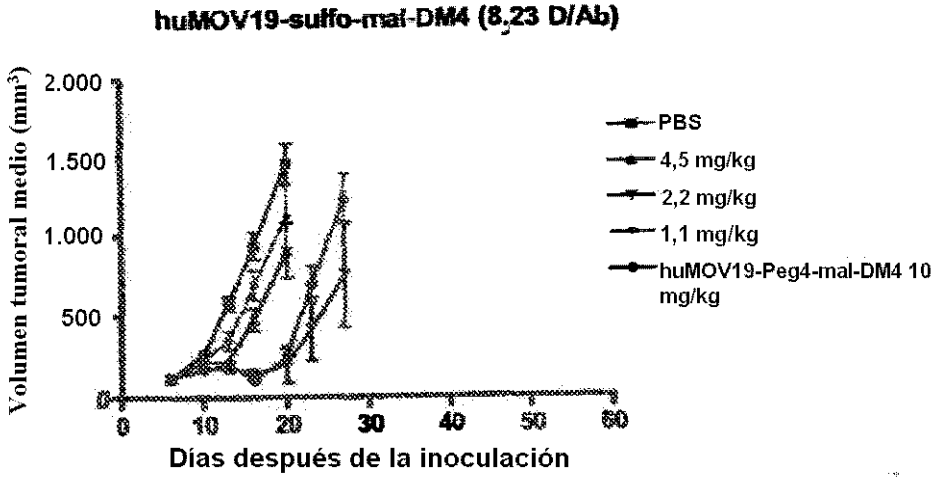
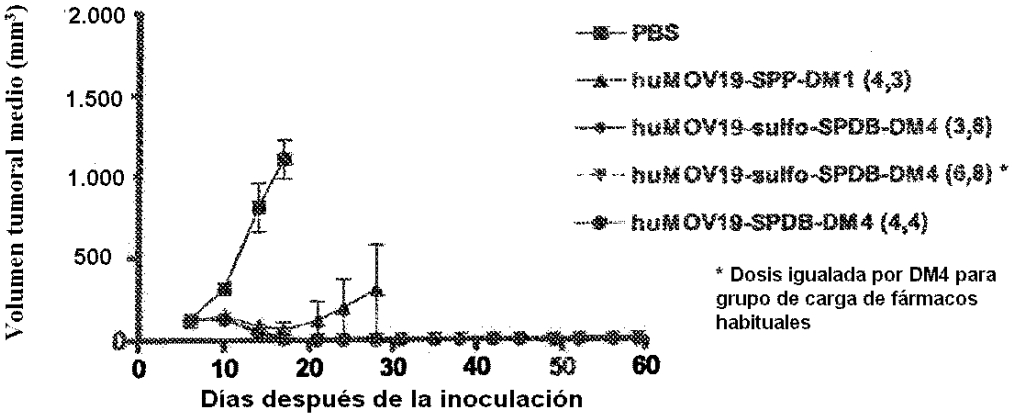


Figura 13

A. Una sola inyección de 5 mg/kg



B. Una sola inyección de 2,5 mg/kg

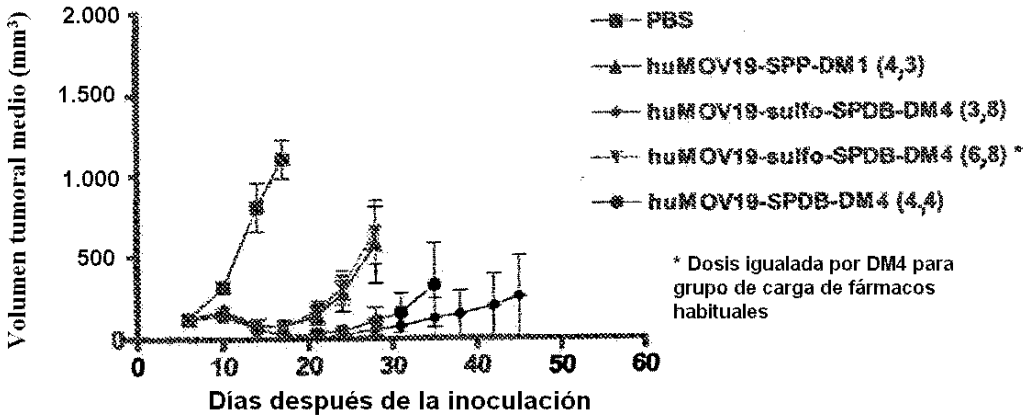
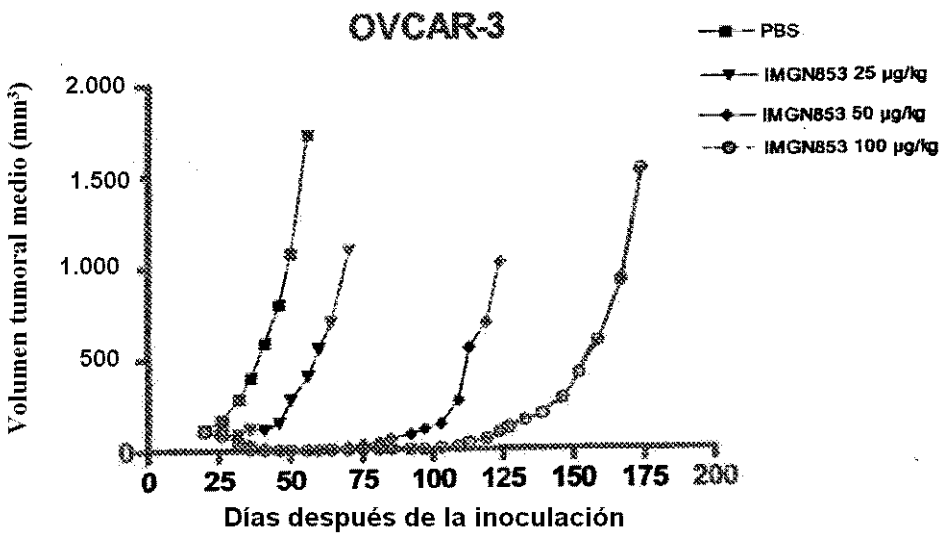
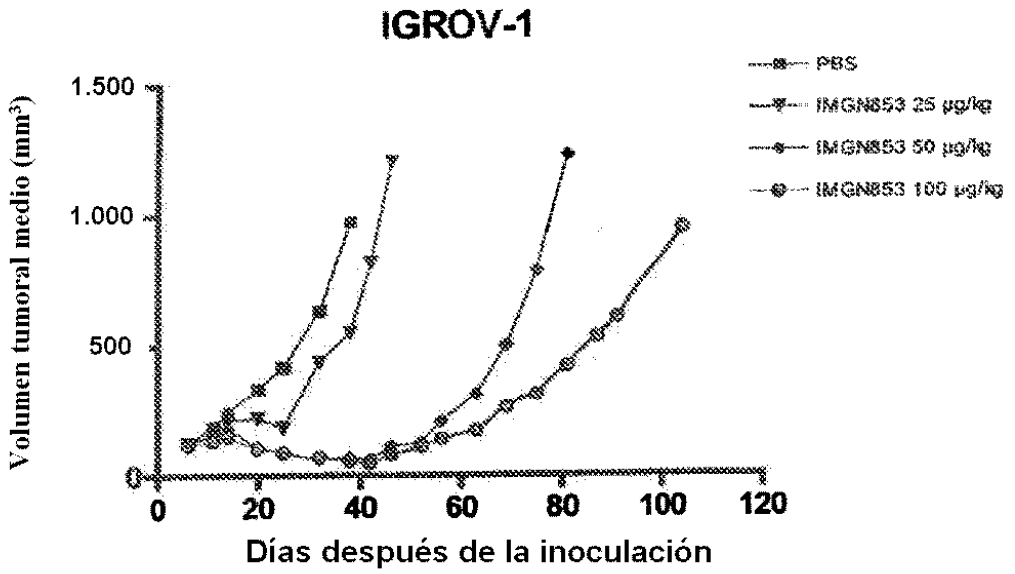


Figura 14



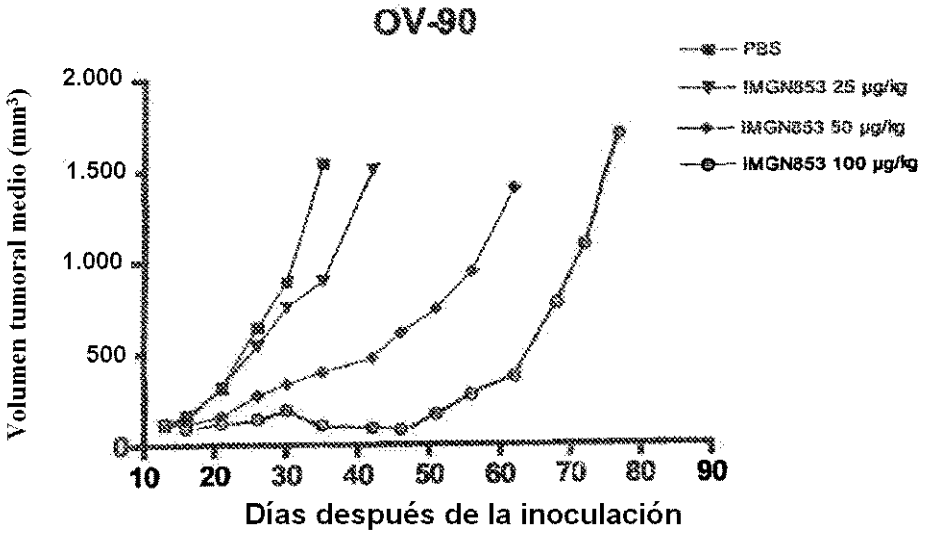
MODELO	Dosis por inyección	T/C (%)	(T-C) en días	log de destrucción de células	Regresiones		Sobrevivientes sin tumor día 208	Comentarios
					Parcial	Completa		
OVCAR-3	25 µg/kg	18	21,0	0,7	2/6	1/6	0/6	activo
	50 µg/kg	0	74,5	2,4	6/6	4/6	0/5	muy activo
	100 µg/kg	0	120,0	3,9	6/6	6/6	0/6	muy activo

Figura 15



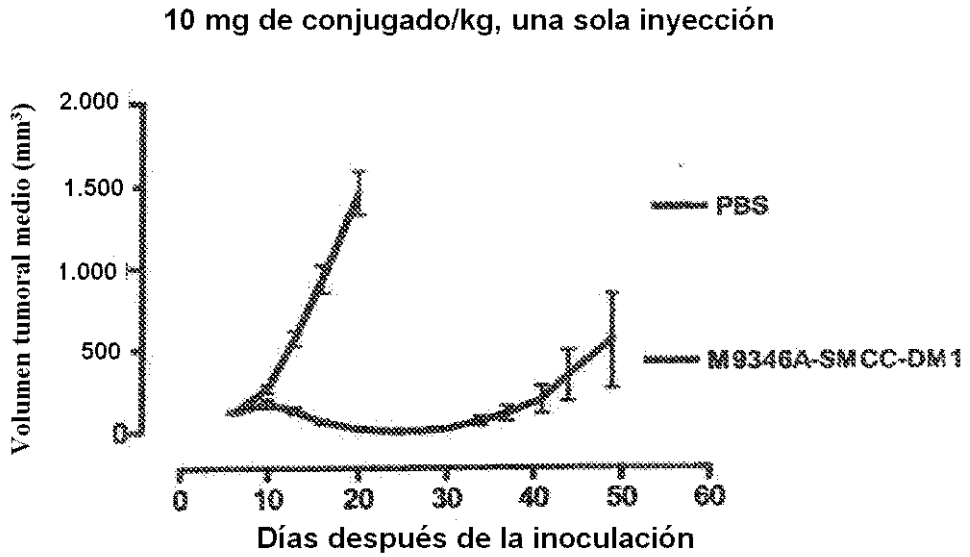
MODELO	Dosis por inyección	T/C (%)	(T-C) en dias	log de destrucción de células	Regresiones Parcial	Regresiones Completa	Sobrevivientes sin tumor dia 120	Comentarios
IGROV-1	25 µg/kg	55	6,0	0,2	0/6	0/6	0/6	inactivo
	50 µg/kg	7	41,0	1,1	5/6	0/6	0/6	muy activo
	100 µg/kg	5	67,0	1,8	6/6	0/6	0/6	muy activo

Figura 16



MODELO	Dosis por inyección	T/C (%)	(T-C) en días	log de destrucción de células	Regresiones Parcial	Regresiones Completa	Sobrevivientes sin tumor día 92	Comentarios
OV-90	25 µg/kg	77	5,0	0,2	0/6	0/6	0/6	inactivo
	50 µg/kg	36	26,0	1,2	0/6	0/6	0/6	activo
	100 µg/kg	18	40,0	1,9	2/6	0/6	0/6	activo

Figura 17


10 mg de conjugado/kg, una sola inyección
Volumen tumoral medio (mm³)
2.000
1.500
1.000
500
0
PBS
M9346A-SMCC-DM1
0
10
20
30
40
50
60
Días después de la inoculación

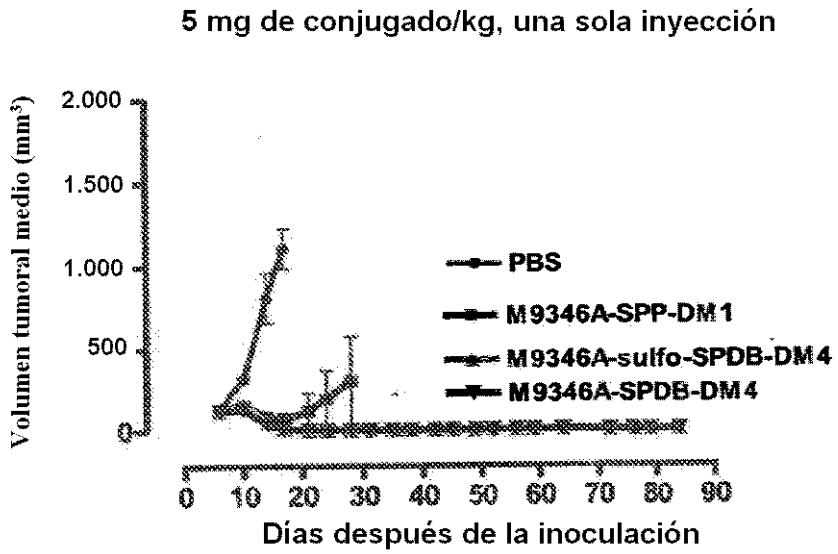
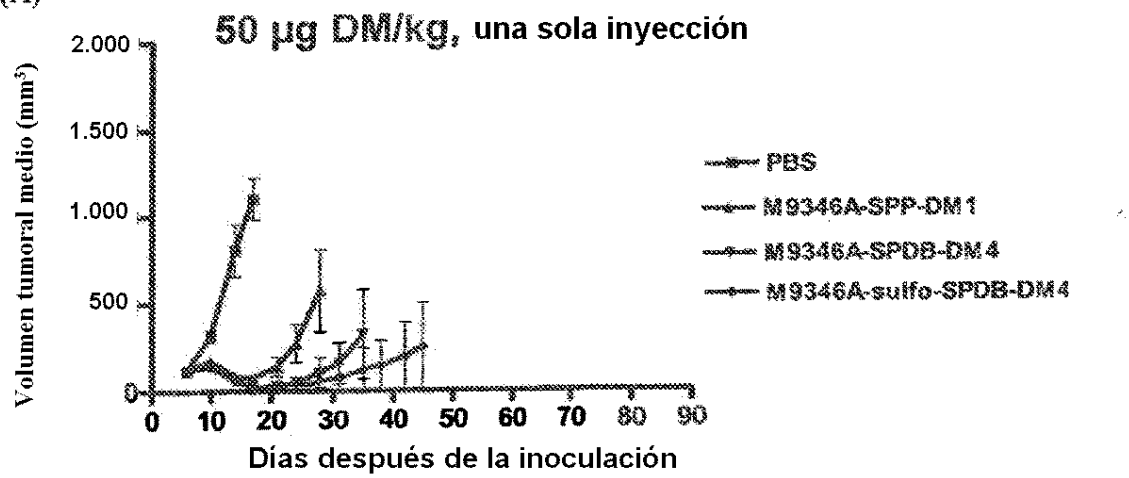

5 mg de conjugado/kg, una sola inyección
Volumen tumoral medio (mm³)
2.000
1.500
1.000
500
0
PBS
M9346A-SPP-DM1
M9346A-sulfo-SPDB-DM4
M9346A-SPDB-DM4
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Días después de la inoculación

Figura 18

(A)


50 µg DM/kg, una sola inyección
Volumen tumoral medio (mm³)
2.000
1.500
1.000
500
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
Días después de la inoculación
PBS
M9346A-SPP-DM1
M9346A-SPDB-DM4
M9346A-sulfo-SPDB-DM4

(B)

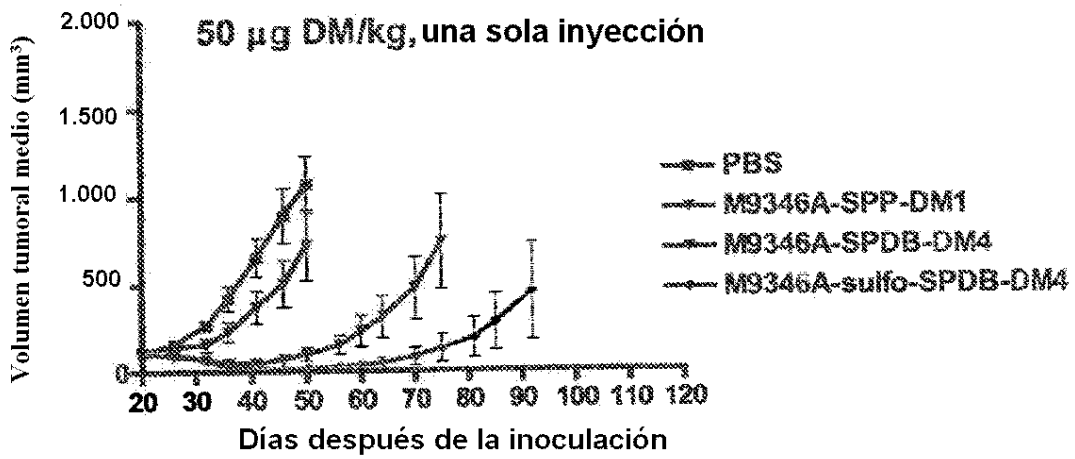
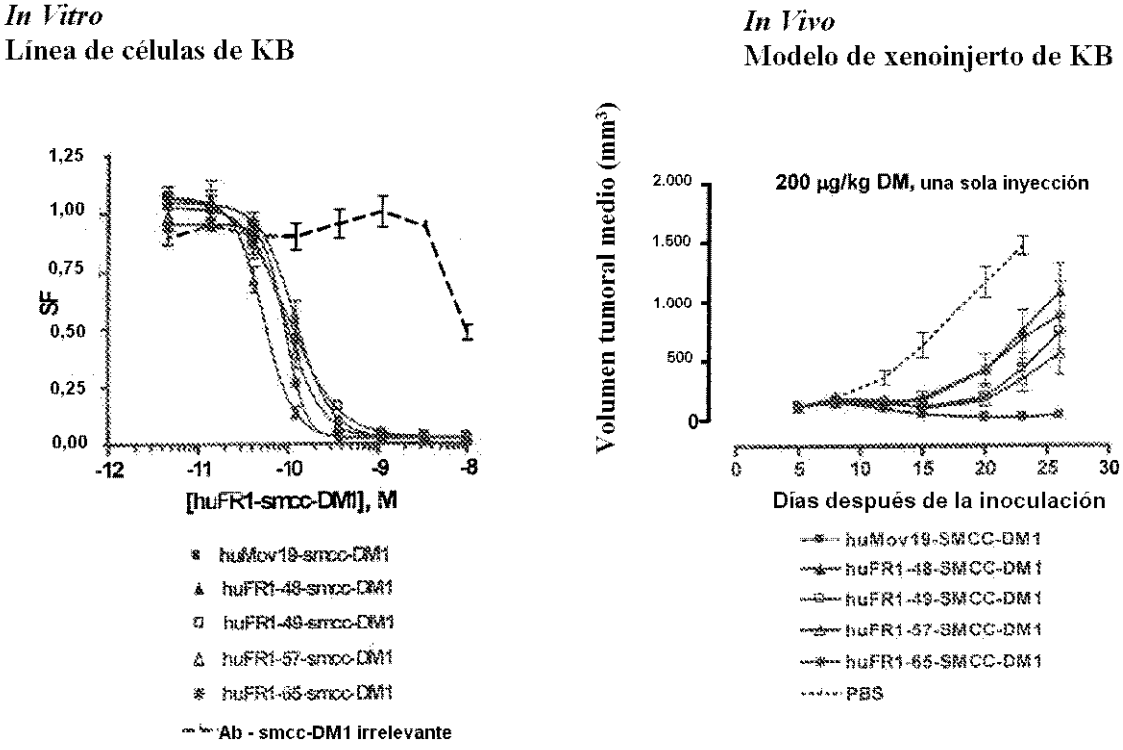

50 µg DM/kg, una sola inyección
Volumen tumoral medio (mm³)
2.000
1.500
1.000
500
0
20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Días después de la inoculación
PBS
M9346A-SPP-DM1
M9346A-SPDB-DM4
M9346A-sulfo-SPDB-DM4

Figura 19


In Vitro
Línea de células de KB
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
SF
-12
-11
-10
-9
-8
[huFR1-smcc-DM1], M
huMov19-smcc-DM1
huFR1-48-smcc-DM1
huFR1-49-smcc-DM1
huFR1-57-smcc-DM1
huFR1-65-smcc-DM1
Ab - smcc-DM1 irrelevante
In Vivo
Modelo de xenoinjerto de KB
Volumen tumoral medio (mm3)
200 µg/kg DM, una sola inyección
2.000
1.500
1.000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
Días después de la inoculación
huMov19-SMCC-DM1
huFR1-48-SMCC-DM1
huFR1-49-SMCC-DM1
huFR1-57-SMCC-DM1
huFR1-65-SMCC-DM1
PBS