

MOLÉCULAS DE UNIÓN CONTRA FRA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a moléculas de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmento de unión a antígeno del mismo) para el tratamiento del cáncer, y a conjugados de anticuerpo-fármaco relacionados.

ANTECEDENTES

El cáncer sigue siendo una de las principales enfermedades en todo el mundo a pesar de los años de estudio sobre los mecanismos de la patogénesis del cáncer y el desarrollo de numerosos fármacos anticancerígenos potenciales. En particular, el cáncer de pulmón y el cáncer de ovario son el tercer y quinto cáncer más común en las mujeres, respectivamente. La quimioterapia y la radioterapia son los tratamientos más comunes contra el cáncer. No obstante, estas terapias están vinculadas a diversos efectos secundarios negativos, que incluyen fatiga, náuseas y pérdida de cabello. Estos problemas se complican por el hecho de que los tratamientos de quimioterapia se administran con frecuencia durante largos períodos de tiempo. Durante las últimas décadas, se han desarrollado y comercializado varias terapias con anticuerpos para el cáncer, lo que ha llevado a una reducción en la necesidad de formas convencionales de quimioterapia para varios tipos de cáncer. Aunque la disponibilidad de metodología para producir anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) ha mejorado mucho durante este periodo de tiempo, existen relativamente pocos anticuerpos anti-neoplásicos clínicamente disponibles e incluso algunos pocos que pueden usarse para seleccionar como diana una variedad de tipos de cáncer. Además, existe una necesidad de aumentar la potencia de anticuerpos terapéuticos, que se limita generalmente por la prevalencia de la expresión del antígeno diana y los efectos posteriores sobre la célula cancerosa tras la unión al anticuerpo. La conjugación de anticuerpos monoclonales con moléculas citotóxicas para generar conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) es un enfoque novedoso para administrar una terapia dirigida contra los tumores malignos. Este enfoque se ha implementado con éxito para objetivos específicos (HER2, CD30 y CD79b) que conducen a ADC comercializados tales como fam-trastuzumab deruxtecan-nxki (cáncer de mama y gástrico), brentuximab vedotin (linfoma de Hodgkin) y polatuzumab vedotin-piiq (linfoma de Nonhodgkin), respectivamente.

Los receptores de folato (FR) son proteínas unidas a la membrana presentes en la superficie celular y, por lo tanto, pueden explotarse para desarrollar nuevos ADC. La familia FR incluye FR α , FR β , FR γ y FR δ . FR se une a las moléculas de folato y las transporta a las células, de modo que las moléculas de folato se envían al ciclo del folato para apoyar el metabolismo de los nucleótidos. En particular, el folato es importante para la síntesis, metilación y reparación del ADN (Cheung, *et al.*, *Oncotarget*. 2016;7(32):52553-52574).

FR α es una proteína de membrana anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que tiene una alta afinidad por la forma activa de folato, 5-metiltetrahidrofolato (5-MTF). FR α se expresa por el gen *FOLR1*. Estudios previos han demostrado que FR α desempeña un papel crucial en la embriogénesis (Kelemen, *Int J Cancer*. 2006;119(2):243-250). El transporte de folato en adultos, sin embargo, se conduce principalmente por la expresión ubicua de transportadores de folato reducidos y transportadores de folato acoplados a protones (Zhao, *et al.*, *Annu Rev Nutr*. 2011;31:177-201). La distribución de la expresión de FR α en adultos generalmente se limita a las superficies apicales de los epitelios polarizados, como el plexo coroideo, el riñón, el pulmón y la placenta.

La sobreexpresión de FR α , que también se conoce como receptor de folato 1 (FOLR1) o proteína de unión a folato (FBP), se observa con frecuencia en células tumorales como las de ovario, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)) y carcinomas de mama (Shi, *et al.*, *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:4989-4996). En particular, un estudio anterior encontró que el nivel de FR α soluble en la sangre de pacientes con cáncer de ovario es elevado, lo que respalda la posible aplicación de FR α como biomarcador de cáncer de ovario temprano (Basal, *et al.*, *PLoS One*. 2009;4(7):e6292). Los modelos preclínicos de ovario también han revelado que la sobreexpresión de FR α está asociada con la progresión del tumor, y la unión de folato a FR α podría mediar en la activación del protooncogén STAT3 (Hansen, *et al.*, *Cell Signal*. 2015;27(7):1356-1368).

Los anticuerpos contra FR α en la técnica adolecen de deficiencias, tales como internalización deficiente, semivida corta y citotoxicidad insuficiente. Además, los ADC dirigidos a FR α en la técnica emplean inhibidores de microtúbulos, que se han asociado con toxicidades específicas en ensayos clínicos, tal como inflamación de la córnea (mirvetuximab soravtansina, que consiste en un anticuerpo anti-FR α M9346A conjugado a través de un ligador sulfo-SPBD con la ojiva maitansinoide DM4) (Moore *et al.* (2017) *Cancer* 123:3080-7), la enfermedad pulmonar intersticial (MORAb-202, que consiste en el anticuerpo humanizado farletuzumab derivado de LK26 conjugado con la ojiva de eribulina) (Sato, *et al* (2020) *ESMO Abstract* <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.01.026>), y neuropatía y neutropenia (STRO-002, que consiste en un anticuerpo anti-FR α SP8166 conjugado con la ojiva de hemisterlina) (Naumann, *et al* (2021) *J Clin Oncol* 39 (Suppl 15/abstr 5550) https://doi10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.5550). Estudios recientes también han encontrado que las células cancerosas pueden adquirir resistencia a los inhibidores de microtúbulos (Ganguly, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec; 1816(2): 164-171).

Además, los ADC dirigidos a FR α recientes han empleado anticuerpos con una estructura compleja. Por ejemplo, el ADC IMGN151 se desarrolló a partir del ADC mirvetuximab soravtansina. El anticuerpo de IMGN151 es una molécula asimétrica, biparatópica y biespecífica

que contiene mutaciones botón en ojal para reforzar la heterodimerización. La mitad del fundamento consiste en una cadena pesada y ligera de IgG1 cuyos dominios variables se comparten con mirvetuximab. La otra mitad consiste en una proteína de fusión scFv-Fc que se une a un segundo epítipo distinto en FR α . La modificación de una IgG puede tener consecuencias negativas en cuanto a propiedades fisicoquímicas (y por tanto capacidad de desarrollo o fabricación) e inmunogenicidad. Se sabe que los formatos biespecíficos tienen una mayor propensión a títulos de expresión más bajos y una mayor agregación, lo que puede conducir a procesos de producción más complejos y un aumento en el costo de los productos. El anticuerpo de STRO-002, por otro lado, incluye aminoácidos no naturales p-azidometil fenilalanina (pAMF) en dos sitios definidos en cada cadena pesada para la conjugación específica de sitios de fármacos. Aunque es específica, la introducción de aminoácidos no naturales puede requerir esfuerzos sustanciales de ingeniería de líneas celulares o libres de células y da como resultado títulos de producción de mAb potencialmente más bajos.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un ADC dirigido a FR α que pueda administrar una alta concentración de carga útil citotóxica a las células diana y mediar en la destrucción de células tumorales altamente eficaz con menos toxicidades para el paciente.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona, entre otros, anticuerpos frente a FR α , incluyendo moléculas de ácido nucleico, vectores, células huésped, composiciones farmacéuticas y kits que las comprenden, y usos de las mismas que incluyen métodos de tratamiento.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FR α o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN), una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT);

(b) una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 (SYAMS), una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 8 (SISSGRSYIYYADSVKG); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 (EMQQLALDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 10 (RASQGISNFLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11 (AASSLQS); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 (QQYNSYPFT);

(c) una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 13 (SNSAAWN), una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 (RTYYRSNWKYNDYTLVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15 (GVGRFDS); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 16

(RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 (KASSLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18 (QEYKTYSIFT);

(d) una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 19 (SYNMN), una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 20 (SISSGSSYIYYADSMKG); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 (GMTTLTFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22 (RASQGISTFLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 23 (AASSLQS); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 24 (QQYISYPLT);

(e) una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 25 (SYSMN), una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 26 (SISSRSSYVYYADSVKG); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 27 (GMTTLTFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 28 (RASQGISSFLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 29 (AASSLQS); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 30 (QQYNSYPLT); o

(f) una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 (SDSATWN), una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 (RTYYRSKWYSDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 33 (GGAPFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 34 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 35 (KASSLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 36 (QQYNSYSMYT).

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(a) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38;

(b) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;

(c) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42;

(d) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44;

(e) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; o

5 (f) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48.

10 En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- (a) L en el extremo N-terminal (por ejemplo, posición 1) del VH;
- (b) E en el extremo N-terminal (por ejemplo, posición 1) del VH; o
- (c) Q en el extremo N-terminal (por ejemplo, posición 1) del VH.

15 En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- (a) un VH de la SEQ ID NO: 37 y un VL de la SEQ ID NO: 38;
- (b) un VH de la SEQ ID NO: 39 y un VL de la SEQ ID NO: 40;
- (c) un VH de la SEQ ID NO: 41 y un VL de la SEQ ID NO: 42;
- (d) un VH de la SEQ ID NO: 43 y un VL de la SEQ ID NO: 44;
- 20 (e) un VH de la SEQ ID NO: 45 y un VL de la SEQ ID NO: 46; o
- (f) un VH de la SEQ ID NO: 47 y un VL de la SEQ ID NO: 48.

25 En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α comprende una cadena pesada constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 109 o 111 y una cadena ligera constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 110.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada constante de la SEQ ID NO: 109 o 111 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera constante de la SEQ ID NO: 110.

30 En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;
- 35

(b) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52;

5 (c) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54;

10 (d) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56;

15 (e) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; o

20 (f) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α comprende:

25 (a) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 50;

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 51 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 52;

(c) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 53 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 54;

30 (d) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 55 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 56;

(e) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 57 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 58; o

(f) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 59 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 60.

35 En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento Fab', o un fragmento F(ab')₂.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo es humanizado, quimérico o completamente humano, preferentemente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo es completamente humano.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo es monoclonal, policlonal, recombinante, o multiespecífico.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo es del tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferentemente del tipo IgG1.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con uno o más agentes heterólogos.

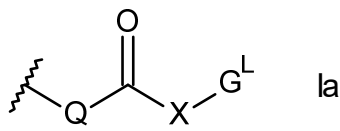
En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el uno o más agentes heterólogos se seleccionan del grupo que consiste en una citotoxina, un agente antimicrobiano, un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, una proteína, una enzima, un lípido, un modificador de la respuesta biológica, un agente farmacéutico, una linfocina, un anticuerpo heterólogo, un fragmento de un anticuerpo heterólogo, un marcador detectable, un polietilenglicol (PEG), un radioisótopo o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el agente heterólogo es una citotoxina.

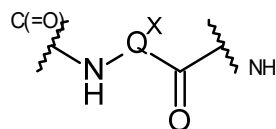
En otro aspecto, se proporciona un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) que comprende el anticuerpo anti-FR α o su fragmento de unión a antígeno de la invención, en el que el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con una citotoxina.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, la citotoxina se une al anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de un ligador R^L seleccionado de:

(Ia):

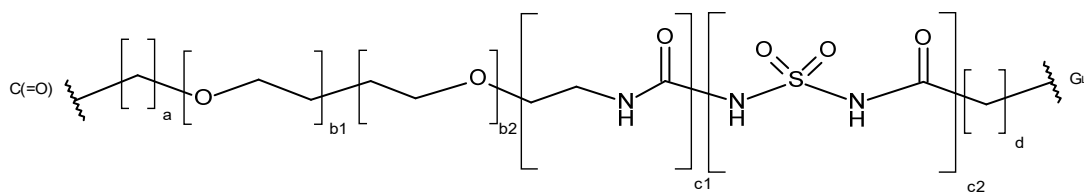


donde Q es:



, donde Q^X es tal que Q es un residuo de aminoácido, un residuo dipeptídico, un residuo tripeptídico o un residuo tetrapeptídico;

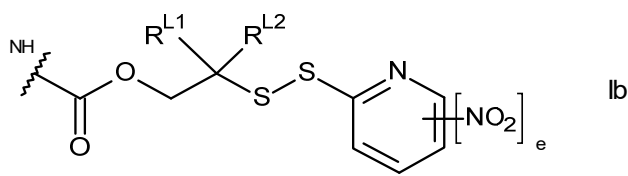
X es:



donde a = de 0 a 5, b_1 = de 0 a 16, b_2 = de 0 a 16, c_1 = 0 o 1, c_2 = 0 o 1, d = de 0 a 5, donde al menos b_1 o b_2 = 0 (es decir, solo uno de entre b_1 y b_2 puede no ser 0) y al menos c_1 o c_2 = 0 (es decir, solo uno de entre c_1 y c_2 puede no ser 0);

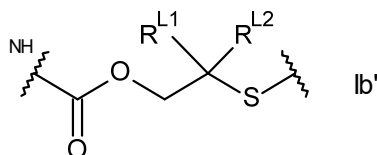
G^L es un ligador para conectar al anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo;

(Ib):



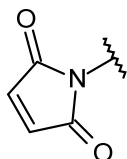
donde R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente de H y metilo, o junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1; o

(Ib'):

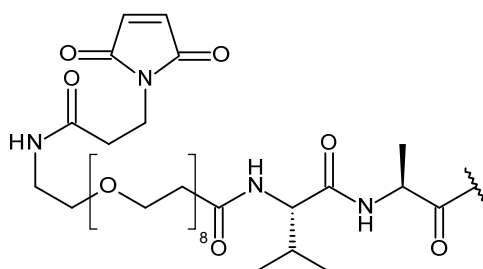


donde R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente de H y metilo, o junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo ciclopropileno o ciclobutileno.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, G^L es



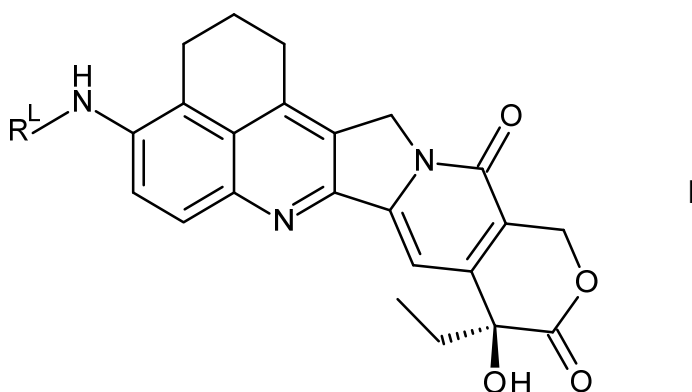
En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, R^L es



En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, la citotoxina se selecciona de un inhibidor de la topoisomerasa I, un derivado de tubulisina, una pirrolobenzodiazepina o una combinación de los mismos. En realizaciones preferidas, la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I.

En otro aspecto, se proporciona un ADC que comprende un anticuerpo anti-FR α o un fragmento de unión a antígeno del mismo unido a una citotoxina, donde la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I.

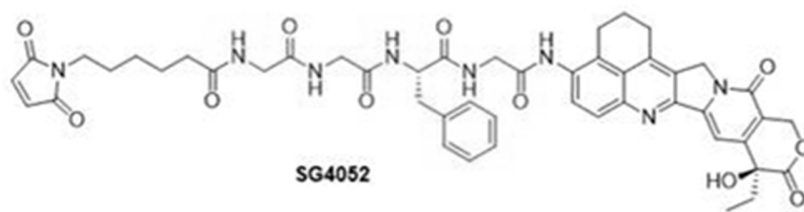
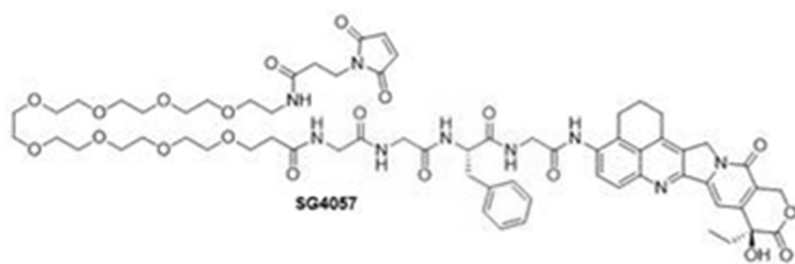
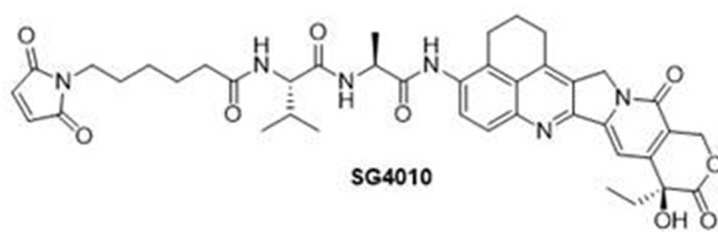
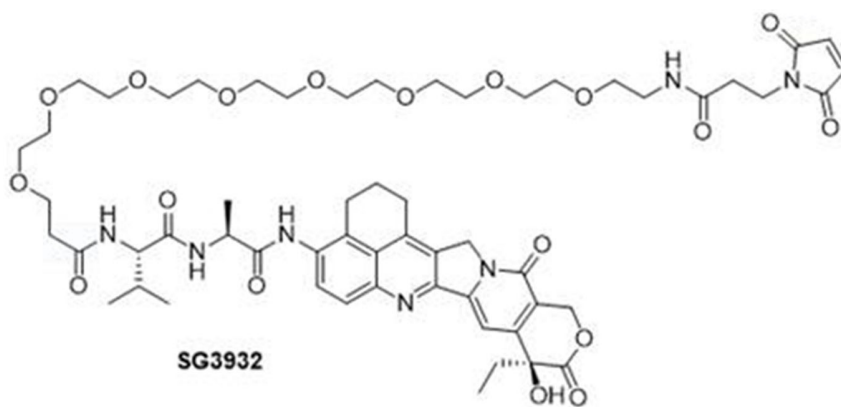
En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el inhibidor de la topoisomerasa I se representa por la fórmula (I):



y sales y solvatos del mismo;
donde R^L se definió anteriormente.

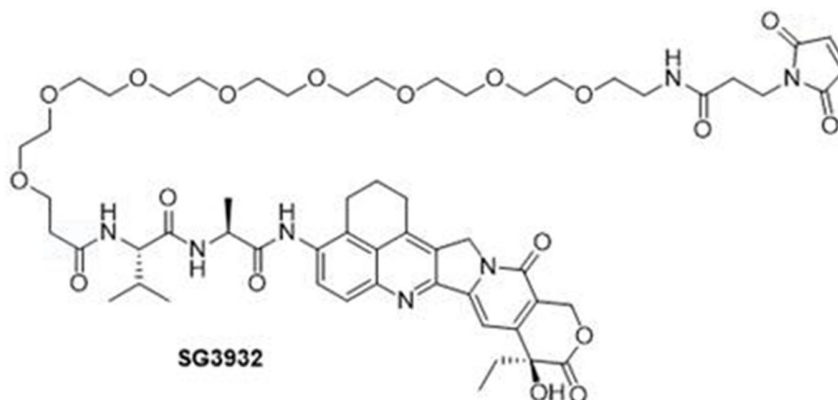
En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el inhibidor de la topoisomerasa I es:

25



preferentemente donde el inhibidor de la topoisomerasa I es:

5



10

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, la razón de fármaco con respecto a anticuerpo (DAR) está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente donde el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10.

15

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, la DAR es aproximadamente 8 o aproximadamente 4; preferentemente donde la DAR es aproximadamente 8.

En otro aspecto, se proporciona un ADC que comprende un anticuerpo anti-FR α o un fragmento de unión a antígeno del mismo unido a una citotoxina, donde:

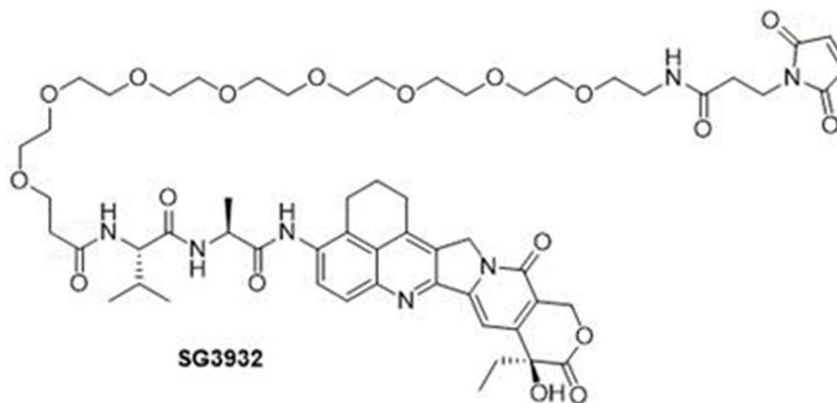
20

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN), una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH de la SEQ ID NO: 37 y un VL de la SEQ ID NO: 38;

25

(ii) la citotoxina es el inhibidor de la topoisomerasa I SG3932

30



35

; y

(iii) la DAR es aproximadamente 8.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

En otro aspecto, se proporciona un vector que comprende:

(a) el polinucleótido de la invención asociado operativamente con un promotor; o

5 (b) un polinucleótido que codifica la región VH tal como se define en la invención, y un polinucleótido que codifica la región VL tal como se define en la invención, donde dichos polinucleótidos están asociados operativamente con uno o más promotor(es).

En algunas realizaciones, el vector comprende además un polinucleótido que codifica la región de cadena pesada constante tal como se define en la invención y un polinucleótido que
10 codifica la región de cadena ligera constante tal como se define en la invención.

En otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende el polinucleótido de la invención o el vector de la invención.

En otro aspecto, se proporciona un método para la preparación del anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, comprendiendo el método las
15 etapas de:

(a) transfectar una célula huésped con un vector de la invención;

(b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno; y

(c) recuperar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, a partir de dicho cultivo.

20 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, o el ADC de la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FR α o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, un ADC de la invención o una composición farmacéutica
25 de la invención para su uso en un método para reducir una población de células positivas para FR α en un sujeto, comprendiendo el método administrar el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo, el ADC o la composición farmacéutica al sujeto. Típicamente, las células positivas para FR α son células cancerosas positivas para FR α .

En un aspecto relacionado, se proporciona un método para reducir una población de
30 células positivas para FR α en un sujeto, comprendiendo el método administrar el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, el ADC de la invención, o la composición farmacéutica de la invención al sujeto. Típicamente, las células positivas para FR α son células cancerosas positivas para FR α .

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FR α o un fragmento de unión a
35 antígeno del mismo de la invención, un ADC de la invención o una composición farmacéutica de la invención para usar en el tratamiento de un cáncer asociado con la expresión de FR α .

En un aspecto relacionado, se proporciona un método para tratar un cáncer asociado con la expresión de FR α , comprendiendo el método administrar el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, el ADC de la invención o la composición farmacéutica del invención a un sujeto.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el cáncer comprende células cancerosas que tienen una expresión heterogénea de FR α y/o una baja expresión de FR α ; opcionalmente en el que la célula cancerosa tiene una expresión de FR α similar a la línea celular Igrov-1.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, dicho cáncer se selecciona de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, carcinoma de células renales (RCC), cáncer colorrectal, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de mama (por ejemplo, TNBC), cáncer de cuello uterino y mesotelioma pleural maligno, preferentemente dicho cáncer se selecciona de cáncer de ovario y cáncer de pulmón.

En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), opcionalmente donde el NSCLC se selecciona de NSCLC escamoso, adenocarcinoma NSCLC o una combinación de los mismos.

Los aspectos y las realizaciones de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas. Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención también se describen en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Las **Figuras 1A-F** muestra la unión de (**Figura 1A**) AB1370026; (**Figura 1B**) AB1370035; (**Figura 1C**) AB1370049; (**Figura 1D**) AB1370083; (**Figura 1E**) AB1370096; y (**Figura 1F**) AB1370117 a FR α humano, FR α de cyno, FR α de ratón, FR β humano o FR γ humano mediante ensayo HTRF.

La **Figura 2** muestra el análisis multiparamétrico del perfilador de alto contenido de la internalización de anticuerpos en células KB con la intensidad en el eje vertical representada frente a la concentración de la muestra en el eje horizontal. Se preseleccionaron los anticuerpos con una captación por encima de un límite determinado por las muestras de control positivo (círculos) y se muestran como rombos grises, y los que están por debajo del límite como rombos blancos. Los puntos de datos para los 6 ejemplos de anticuerpos, ejecutados por duplicado en el ensayo, se indican mediante rombos negros y se etiquetan con el nombre de la muestra. Al menos una muestra por anticuerpo a modo de ejemplo estaba por encima del límite.

Las **Figuras 3A-C** muestra los 6 ejemplos de IgG en ensayos de competición de epítomos HTRF con (Figura 3A) Comparador 1 IgG; (Figura 3B) Comparador 2 IgG; y (Figura 3C) Comparador 3 IgG.

La **Figura 4** muestra los resultados del ensayo de autointeracción AC-SINS. Se sometió a ensayo la propensión de los anticuerpos a autoasociarse en tampón HSA (columnas negras). El anticuerpo de control negativo exhibió bajos niveles de autointeracción, mientras que el anticuerpo de control positivo exhibió altos niveles de autointeracción en HSA, como se esperaba. El umbral para marcar un anticuerpo en riesgo (> 5 nm) se indica mediante la línea horizontal punteada.

Las **Figuras 5A-B** muestra la internalización de anticuerpos anti-FR α en (Figura 5A) células Jeg-3 (con expresión media de FR α) y (Figura 5B) células KB (con alta expresión de FR α) a lo largo del tiempo medido por el aumento de la fluorescencia en el instrumento CX7.

Las **Figuras 6A-D** muestra los cromatogramas de AB1370049-SG3932 DAR8 obtenidos de (Figura 6A) UHPLC-RP a 214 nm (en forma reducida); (Figura 6B) UHPLC-RP a 330 nm (en forma reducida); (Figura 6C) UHPLC-SEC a 280 nm; y (Figura 6D) UHPLC-HIC a 214 nm.

Las **Figuras 7A-D** muestra los cromatogramas de AB1370049-SG3932 DAR4 obtenidos de (Figura 7A) UHPLC-RP a 214 nm (en forma reducida); (Figura 7B) UHPLC-RP a 330 nm (en forma reducida); (Figura 7C) UHPLC-SEC a 280 nm; y (Figura 7D) UHPLC-HIC a 214 nm.

Las **Figuras 8A-B** muestra el progreso de las transformaciones químicas en una serie de ADC DAR8 cuando se exponen a diversos sueros. Los procesos químicos observados son (Figura 8A) desconjugación; y (Figura 8B) hidrólisis de maleimida.

Las **Figuras 9A-C** muestra el ensayo de citotoxicidad de 6 días con ADC de DAR8 líder en (Figura 9A) células KB (con alta expresión de FR α); (Figura 9B) Célula Jeg-3 (con expresión de FR α media-alta); y (Figura 9C) célula Igrov-1 (con expresión de FR α media).

La **Figura 10** muestra la actividad de muerte de transeúntes de AB1370049-SG3932 DAR8. Se trataron células KB positivas para FR α y negativas para FR α solas o en una razón de 1:1 con AB1370049-SG3932 DAR8 ADC 1 nM durante 6 días. La actividad citotóxica se midió después de 6 días con citometría de flujo.

Las **Figuras 11A-B** muestra el estudio de xenoinjerto KB con ADC DAR8 principal. El día 6 se administró una dosis intravenosa única de (Figura 11A) 1.25 mg/kg o (**Figura 11B**) 5 mg/kg. La administración de dosis se indica por el asterisco negro.

Las **Figuras 12A-B** muestra el estudio de xenoinjerto OVCAR-3 con ADC DAR8 principal. El día 33 se administró una dosis intravenosa única de (Figura 12A) 1.25 mg/kg o (Figura 12B) 5 mg/kg. La administración de dosis se indica por el asterisco negro.

La **Figura 13** muestra el estudio de xenoinjerto IGROV-1 con AB1370049-SG3932 DAR8. El día 33 se administró una dosis intravenosa única de 5 mg/kg.

La **Figura 14** muestra el estudio de xenoinjerto de KB con ADC DAR4 principal. El día 7 se administró una dosis intravenosa única de 5 mg/kg.

Las **Figuras 15A-B** muestra (Figura 15A) OVCAR-3 y (Figura 15B) Estudio de xenoinjerto de CaCo-2 con administración de dosis única de AB1370049-SG3932 DAR8 o FR α -DM4 ADC a 1.25, 2.5 y 5 mg/kg. La administración de dosis se indica por el asterisco negro.

Las **Figuras 16A-B** muestra la mediana del porcentaje de crecimiento tumoral resultante de una sola administración de (Figura 16A) 5 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8 en 51 modelos PDX; y (Figura 16B) 2.5 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8 en 39 Modelos PDX.

Las **Figuras 17A-C** muestra el estudio del modelo PDX con administración de dosis única de AB1370049-SG3932 DAR8 a 2.5 mg/kg o 5 mg/kg para (Figura 17A) modelo PDX ovárico CTG-0711; (Figura 17B) NSCLC PDX modelo CTG-2367; y (Figura 17C) PDX endometrial modelo CTG-2268.

Las **Figuras 18A-F** muestra las señales de viabilidad celular medidas en (Figura 18A) células progenitoras en linaje megacariocítico; (Figura 18B) células progenitoras en linaje mieloide; (Figura 18C) células progenitoras en linaje eritroide; (Figura 18D) células expandidas y diferenciadas en linaje megacariocítico; (Figura 18E) células expandidas y diferenciadas en linaje mieloide; y (Figura 18F) células expandidas y diferenciadas en linaje eritroide. El eje X representa las concentraciones de fármaco y el eje Y representa el porcentaje de viabilidad (los valores son promedios por triplicado $\pm$ SD). AB1370049-SG3932 DAR8 no muestra una toxicidad exacerbada en comparación con un control de ADC no dirigido, en células madre progenitoras hematopoyéticas primarias CD34+ derivadas de médula ósea inducidas para diferenciarse en linajes eritroide, mieloide o megacariocítico.

La **Figura 19** muestra los perfiles de concentración-tiempo de mAb no conjugado medio ($\pm$ SD) frente a AB1370049-SG3932 DAR8 en monos cynomolgus. Los perfiles de FC a 15 y 25 mg/kg de muestras de plasma se recolectaron y procesaron utilizando el ensayo de inmunocaptura LC-MS/MS y FC no compartimental. El mAb total es una medida de los requisitos intactos (en el caso de que el ADC incluya ADC o mAb desconjugado). El ADC total es una medida de ADC intacto solamente.

La **Figura 20** muestra el porcentaje medio de crecimiento tumoral en el modelo PDX OVO857 con la administración de una dosis individual de AB1370049-SG3932 DAR8 a 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg o FR α -DM4 ADC a 2.5 y 5 mg/kg.

La **Figura 21** muestra el porcentaje medio de crecimiento tumoral en el modelo PDX CTG3226 con la administración de una dosis individual de AB1370049-SG3932 DAR8 a 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg o FR α -DM4 ADC a 2,5 y 5 mg/kg.

La **Figura 22** muestra el porcentaje medio de crecimiento tumoral en el modelo PDX CTG-0956 con la administración de una dosis individual de AB1370049-SG3932 DAR8 a 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg.

La **Figura 23** muestra el porcentaje medio de crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto OVCAR3 para 4 ratones (designados 2_2718, 4_7C2A, 18_2146 y 27_2438 respectivamente) dosificados primero por vía intravenosa con 8 rondas de Q2W 5 mg/kg FR α -DM4 ADC hasta la recaída de tumor, seguido por una nueva provocación con AB1370049-SG3932 DAR8 por vía intravenosa a 5 mg/kg Q2W, recibiendo 2 rondas de tratamiento con AB1370049-SG3932 DAR8. Las líneas verticales discontinuas indican la dosis administrada a los ratones.

La **Figura 24** muestra el porcentaje medio de crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto OVCAR3 en el que se aislaron tumores resistentes a FR α -DM4 de ratones y se reimplantaron en nuevos ratones huéspedes. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 280-360 mm³, se administró a los ratones dos dosis (Q2W) de 5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 o FR α -DM4. Las líneas verticales discontinuas indican la dosis administrada a los ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES GENERALES

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido normalmente por una persona normalmente versada en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Singleton, *et al.*, "DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY", 20.^a ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, "THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY", Harper Perennial, NY (1991) proporcionan al experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos usados en esta descripción.

A menos que se indique de otro modo, cualquier secuencia de ácido nucleico se escribe de izquierda a derecha, en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha, en orientación de amino a carboxi, respectivamente.

Debe señalarse que, tal como se utiliza en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto claramente dictamine de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un agente" incluye una pluralidad de tales agentes y la referencia a "el agente" incluye la referencia a uno o más agentes y equivalentes del mismo conocidos por aquellos expertos en la materia y así sucesivamente.

"Aproximadamente" puede significar generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Los grados de error

ilustrativos están dentro del 20 por ciento (%), normalmente dentro del 10 % y más normalmente dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado. Preferentemente, el término "aproximadamente" se entenderá en el presente documento como más o menos ($\pm$) el 5 %, preferentemente ± 4 %, ± 3 %, ± 2 %, ± 1 %, ± 0.5 %, ± 0.1 %, del valor numérico del número con el que se está usando. Las realizaciones descritas en el presente documento como "que comprenden" uno o más rasgos distintivos también pueden considerarse como divulgación de las realizaciones correspondientes "que consisten en" dichos rasgos distintivos.

Los aminoácidos se denominan en el presente documento usando el nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una sola letra. El término "proteína", tal como se usa en el presente documento, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o del término "proteína". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en el presente documento. En la presente divulgación y reivindicaciones pueden usarse los códigos de una letra y de tres letras convencionales para restos de aminoácidos. El código de 3 letras para aminoácidos se define de acuerdo con la IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Debe entenderse que un polipéptido puede codificarse por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

Las concentraciones, las cantidades, los volúmenes, los porcentajes y otros valores numéricos se pueden presentar en el presente documento en un formato de intervalo. También se ha de entender que dicho formato de intervalo se utiliza simplemente por conveniencia y brevedad, y debe interpretarse de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos mencionados explícitamente como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subintervalos englobados dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo se citara explícitamente.

ANTICUERPOS ANTI-FRA

Los inventores han desarrollado una matriz a modo de ejemplo de anticuerpos anti-FR α con una alta afinidad y unión específica a FR α en células cancerosas (por ejemplo, no se une específicamente a otros miembros de la familia FR como FR β y FR γ). Los inventores realizaron una evaluación exhaustiva de la capacidad de desarrollo de los anticuerpos, comprobando la propensión a la autoasociación reversible, la internalización, la unión no específica y la hidrofobicidad y la estabilidad de los mAbs frente a los factores de estrés térmico y fotográfico. Además, los inventores emplearon un estudio de farmacocinética en ratones *in vivo* para un panel enfocado de mAb para eliminar cualquiera que exhibiera una semivida *in vivo* deficiente y una mayor eliminación. Con el fin de reducir la probabilidad de desarrollar una respuesta de

anticuerpos antidrogas (ADA) en humanos, se realizó una evaluación de inmunogenicidad *in silico* para descartar cualquier anticuerpo con un mayor riesgo previsto de respuesta ADA. A través de la estrategia de selección anterior, los inventores identificaron un panel de 6 anticuerpos con propiedades beneficiosas similares.

5

SECUENCIAS DE ANTICUERPOS

10

La presente invención abarca los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno definidos en el presente documento que tienen las secuencias CDR enumeradas o secuencias de cadena ligera variable y pesada variable (anticuerpos de referencia), así como variantes funcionales de los mismos. Una variación funcional se une al mismo antígeno diana que el anticuerpo de referencia, y preferiblemente muestra la misma reactividad cruzada de antígeno que el anticuerpo de referencia. Las variantes funcionales pueden tener una afinidad diferente para el antígeno diana cuando se compara con el anticuerpo de referencia, pero se prefiere sustancialmente la misma afinidad.

15

20

En algunas realizaciones, las variantes funcionales de un anticuerpo de referencia muestran variación de secuencia en una o más CDR en comparación con las correspondientes secuencias de CDR de referencia. Por tanto, una variante de anticuerpo funcional puede comprender una variante funcional de una CDR. Si el término "variante funcional" se usa en el contexto de una secuencia de CDR, esto significa que la CDR tiene como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 diferencia de aminoácidos cuando se compara con una correspondiente secuencia de CDR de referencia, y cuando se combina con las 5 CDR restantes (o variantes de las mismas) permite que el anticuerpo variante se una al mismo antígeno diana que el anticuerpo de referencia, y preferiblemente que muestre la misma reactividad cruzada de antígeno que el anticuerpo de referencia. Una variante funcional puede denominarse como "anticuerpo variante".

25

Las **Tablas 1-5** muestran las secuencias CDR, las secuencias VH y VL, las secuencias de cadena pesada y cadena ligera, las secuencias FR y las secuencias de dominio constante, respectivamente, de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 y AB1370117. En caso de discrepancia, prevalecen las secuencias de las Tablas.

30

En un aspecto, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las 6 CDR de cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 de la **Tabla 2**, donde las CDR se determinan por Kabat, Chothia o IMGT.

35

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno, comprende:

una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN);

una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS);

una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY);

una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA);

una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y

5 una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT);

donde una cualquiera o más de dichas CDR comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con dichas secuencias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno comprende:

10 una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN);

una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS);

una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY);

una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA);

una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y

15 una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL que

20 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, o al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un VH de la SEQ ID NO: 37 y un VL de la SEQ ID NO: 38.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al

30 menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 50.

35 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno, comprende:

una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 (SYAMS);
 una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 8 (SISSGRSYIYYADSVKG);
 una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 (EMQQLALDY);
 una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 10 (RASQGISNFLA);
 una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11 (AASSLQS); y
 una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 (QQYNSYPFT);

donde una cualquiera o más de dichas CDR comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con dichas secuencias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno comprende:

una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 (SYAMS);
 una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 8 (SISSGRSYIYYADSVKG);
 una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 (EMQQLALDY);
 una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 10 (RASQGISNFLA);
 una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11 (AASSLQS); y
 una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 (QQYNSYPFT).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un VH de la SEQ ID NO: 39 y un VL de la SEQ ID NO: 40.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 51 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 52.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno, comprende:

una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 13 (SNSAAWN);
 una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 (RTYYRSNWyNDYTLsvKS);
 una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15 (GVGRFDS);
 una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 (RASQSISSWLA);
 una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 (KASSLES); y
 una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18 (QEYKTYSIFT);

donde una cualquiera o más de dichas CDR comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con dichas secuencias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno comprende:

una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 13 (SNSAAWN);
 una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 (RTYYRSNWyNDYTLsvKS);
 una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15 (GVGRFDS);
 una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 (RASQSISSWLA);
 una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 (KASSLES); y
 una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18 (QEYKTYSIFT).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un VH de la SEQ ID NO: 41 y un VL de la SEQ ID NO: 42.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-

FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 53 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 54.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno, comprende:

- una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 19 (SYNMN);
- una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 20 (SISSGSSYIYYADSMKG);
- una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 (GMTTLTFDY);
- una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22 (RASQGISTFLA);
- una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 23 (AASSLQS); y
- una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 24 (QQYISYPLT);

donde una cualquiera o más de dichas CDR comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con dichas secuencias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno comprende:

- una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 19 (SYNMN);
- una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 20 (SISSGSSYIYYADSMKG);
- una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 (GMTTLTFDY);
- una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22 (RASQGISTFLA);
- una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 23 (AASSLQS); y
- una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 24 (QQYISYPLT).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un VH de la SEQ ID NO: 43 y un VL de la SEQ ID NO: 44.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 55 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 56.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno, comprende:

- una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 25 (SYSMN);
- una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 26 (SISSRSSYVYYADSVKG);
- una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 27 (GMTTLTFDY);
- una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 28 (RASQGISSFLA);
- una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 29 (AASSLQS); y
- una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 30 (QQYNSYPLT);

donde una cualquiera o más de dichas CDR comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con dichas secuencias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno comprende:

- una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 25 (SYSMN);
- una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 26 (SISSRSSYVYYADSVKG);
- una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 27 (GMTTLTFDY);
- una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 28 (RASQGISSFLA);
- una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 29 (AASSLQS); y
- una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 30 (QQYNSYPLT).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un VH de la SEQ ID NO: 45 y un VL de la SEQ ID NO: 46.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al

menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 57 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 58.

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno, comprende:

una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 (SDSATWN);

una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 (RTYYRSKWYSDYAVSVKS);

10 una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 33 (GGAPFDY);

una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 34 (RASQSISSWLA);

una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 35 (KASSLES); y

una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 36 (QQYNSYSMYT);

15 donde una cualquiera o más de dichas CDR comprende 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con dichas secuencias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno comprende:

una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 (SDSATWN);

una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 (RTYYRSKWYSDYAVSVKS);

20 una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 33 (GGAPFDY);

una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 34 (RASQSISSWLA);

una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 35 (KASSLES); y

una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 36 (QQYNSYSMYT).

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 y un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o

30 idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un VH de la SEQ ID NO: 47 y un VL de la SEQ ID NO: 48.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que comprende

una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 59 y una

5

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende VH de cadena pesada FR1, VH FR2, VH FR3, y/o VH FR4 que es al menos el 80%, 85%, 90% o 95% idéntica, o idéntica a VH de cadena pesada de referencia FR1, VH FR2, VH FR3, y/o VH

10

FR4, respectivamente de uno cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 descritos en la **Tabla 4**, donde el anticuerpo o fragmento puede unirse a FR α solo (por ejemplo, en forma de un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla).

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos descritos en el presente

15

documento, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende VL de cadena ligera FR1, VL FR2, VL FR3, y/o VL FR4 que son al menos el 80%, 85%, 90% o 95% idéntica, o idéntica a cadena ligera de referencia VL FR1, VL FR2, VL FR3, y/o VL FR4, respectivamente de uno cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 descritos en la **Tabla 4**, donde el anticuerpo o fragmento

20

puede unirse a FR α solo (por ejemplo, en forma de un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla).

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende (a) VL de cadena ligera FR1, VL FR2, VL FR3, y VL FR4 que son al menos el 80%, 85%, 90% o

25

95% idéntica, o idéntica a cadena ligera de referencia VL FR1, VL FR2, VL FR3, y VL FR4, respectivamente, de uno cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 tal como se describe en la **Tabla 4**; y (b) VH de cadena pesada FR1, VH FR2, VH FR3, y VH FR4 que son al menos el 80%, 85%, 90% o 95% idéntica, o idéntica a cadena pesada de referencia VH FR1, VH FR2, VH FR3, y VH FR4,

30

respectivamente, de uno cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 tal como se describe en la **Tabla 4**.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-FR α comprende una cadena pesada constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al

35

menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 109 y una cadena ligera constante que comprende

una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 110. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada constante de la SEQ ID NO: 109 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera constante de la SEQ ID NO: 110.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos del fragmento de unión a antígeno descritos en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno anti-FR α comprende una cadena pesada constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111 y una cadena ligera constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 110. En algunas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno anti-FR α comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada constante de la SEQ ID NO: 111 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera constante de la SEQ ID NO: 110.

TABLA 1: SECUENCIAS DE CDR DEL ANTICUERPO FRA

Constructo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
AB1370049	SDS ATW N (SEQ ID NO: 1)	RTYYRSKWYNDYAV SVKS (SEQ ID NO: 2)	GVGSFDY (SEQ ID NO: 3)	RASQSISSW LA (SEQ ID NO: 4)	KASGLE S (SEQ ID NO: 5)	QQYNSYSQ LT (SEQ ID NO: 6)
AB1370026	SYA MS (SEQ ID NO: 7)	SISSGRSYIYYADSVK G (SEQ ID NO: 8)	EMQQLAL DY (SEQ ID NO: 9)	RASQGISNF LA (SEQ ID NO: 10)	AASSLQ S (SEQ ID NO: 11)	QQYNSYPF T (SEQ ID NO: 12)
AB1370035	SNS AAW N	RTYYRSNWYNDYTL SVKS (SEQ ID NO: 14)	GVGRFDS (SEQ ID NO: 15)	RASQSISSW LA S	KASSLE S	QEYKTYSIF T

Constructo	VH- CDR 1	VH-CDR2	VH-CDR3	VL-CDR1	VL- CDR2	VL-CDR3
	(SEQ ID NO: 13)			(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 18)
AB1370083	SYN MN (SEQ ID NO: 19)	SISSGSSYIYYADSMK G (SEQ ID NO: 20)	GMTTLTF DY (SEQ ID NO: 21)	RASQGISTF LA (SEQ ID NO: 22)	AASSLQ S (SEQ ID NO: 23)	QQYISYPLT (SEQ ID NO: 24)
AB1370095	SYS MN (SEQ ID NO: 25)	SISSRSSYVYYADSV KG (SEQ ID NO: 26)	GMTTLTF DY (SEQ ID NO: 27)	RASQGISSF LA (SEQ ID NO: 28)	AASSLQ S (SEQ ID NO: 29)	QQYNSYPL T (SEQ ID NO: 30)
AB1370117	SDS ATW N (SEQ ID NO: 31)	RTYYRSKWYSYAV SVKS (SEQ ID NO: 32)	GGAPFDY (SEQ ID NO: 33)	RASQSISSW LA (SEQ ID NO: 34)	KASSLE S (SEQ ID NO: 35)	QQYNSYS MYT (SEQ ID NO: 36)

TABLA 2: SECUENCIAS VH Y VL DEL ANTICUERPO FRA

Constructo	VH	VL
AB1370049	LVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISG DSVSSDSATWNWIRQSPSRGLEWL GRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINP DTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCA RGVGSFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS GLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNSYSQTLFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 38)
AB1370026	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRAS QGISNFLAWFQQAPGKAPKSLIYAAS

Constructo	VH	VL
	SISSGRSYIYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLKMNSLRDEDTAVYYCAREM QQALDYGWGGTLTVSS (SEQ ID NO: 39)	SLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYNSYPFTFGQGTK LEIK (SEQ ID NO: 40)
AB1370035	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEW LGRTYYRSNWYNDYTLVKSRTVN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC VRGVGRFDSWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 41)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQ SISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSLQ PDDFASYCQEYKYSIFTFGPGTKV DIK (SEQ ID NO: 42)
AB1370083	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVS SISSGSSYIYYADSMKGRFTISRDN KNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGM TTLTFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 43)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRAS QGISTFLAWFQQKPGKAPKSLIYAAS SLQSGVPSKFSGSGSETDFTLTISL QPEDFATYYCQQYISYPLTFGGGTV EIK (SEQ ID NO: 44)
AB1370095	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSRSSYVYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGM TTLTFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 45)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRAS QGISSFLAWFQQKPGKAPKSLIYAAS SLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 46)
AB1370117	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSVSSDSATWNWIRQSPSRGLEW LGRTYYRSKWYSDYAVSVKSRTINP DTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYFCA RGGAPFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 47)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITINCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNSYSMYTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 48)

TABLA 3: SECUENCIAS DE CADENA PESADA Y CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO**FRA**

Constructo	VH-CH	VL-CL
AB1370049	LVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSVSSDSATWNWIRQSPSRGLEW LGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRTIN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQ SISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASG LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ DDFATYYCQQYNSYSQTLFGGGTKV

Constructo	VH-CH	VL-CL
	ARGVGSFDYWGGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 49)	EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO: 50)
AB1370026	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSSISSGRSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLKMNSLRDEDTAVYYCAR EMQQLALDYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRAS QGISNFLAWFQQAPGKAPKSLIYAAS SLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQYNSYPFTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 52)

Constructo	VH-CH	VL-CL
	(SEQ ID NO: 51)	
AB1370035	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLE WLGRYYRSNWYNDYTLVKSRTV NPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYY CVRGVGRFDSWGQGTLLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 53)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQ SSSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSLQPD DFASYCQEYKTYISFTFGPGTKVDIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 54)
AB1370083	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEW VSSISSGSSYIYADSMKGRFTISRD NAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAR GMTTLTFDYWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRAS QGISTFLAWFQQKPGKAPKSLIYAASS LQSGVPSKFSGSGSETDFTLTISLQP EDFATYYCQQYISYPLTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 56)

Constructo	VH-CH	VL-CL
5	EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 55)	
10	AB1370095	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRAS QGISSFLAWFQQKPGKAPKSLIYAASS LQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 58)
15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSRSSYVYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGM TLTFDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 57)	
20		
25		
30	AB1370117	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITINCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQQYNSYSMTYFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
35	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSVSSDSATWNWIRQSPSRGLEW LGRTYYRSKWYSDYAVSVKSRITIN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYFC ARGGAPFDYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSC	

Constructo	VH-CH	VL-CL
	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 60)

TABLA 4: REGIONES FR DEL ANTICUERPO FRA

Constructo	VH-FR1	VH-FR2	VH-FR3	VH-FR4	VL-FR1	VL-FR2	VL-FR3	VL-FR4
AB1370049	LVQLQQS GPGLVKP SQTLSLT CAISGDS VS (SEQ ID NO: 61)	WIRQS PSRGL EWLG (SEQ ID NO: 62)	RITINPDTS KNQFSLQL NSVTPEDT (SEQ ID NO: 63)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 64)	DIQMTQ SPSTLSA SVGDRV TITC (SEQ ID NO: 65)	WYQQKP GKAPKL LIY (SEQ ID NO: 66)	GVPSRFS GSGSGTE FTLTSSL QPDDEFAT YYC (SEQ ID NO: 67)	FGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 68)
AB1370026	EVQLVES GGGLVKP GGSLRLS CAASGFT FS (SEQ ID NO: 69)	WVRQA PGKGL EWVS (SEQ ID NO: 70)	RFTISRDN AKNSLYLK MNSLRDED (SEQ ID NO: 71)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 72)	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC (SEQ ID NO: 73)	WFQQAP GKAPKS LIY (SEQ ID NO: 74)	GVPSKFS GSGSGTD FTLTSSL QPEDFAT YYC (SEQ ID NO: 75)	FGQGK LEIK (SEQ ID NO: 76)
AB1370035	QVQLQQS GPGLVKP SQTLSLT CAISGDS VS (SEQ ID NO: 77)	WIRQS PSRGL EWLG (SEQ ID NO: 78)	RITVNPDT SKNQFSLQ LNSVTPED (SEQ ID NO: 79)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 80)	DIQMTQ SPSTLSA SVGDRV ITC (SEQ ID NO: 81)	WYQQKP GKAPKL LIY (SEQ ID NO: 82)	GVPSRFS GSGSGTE FTLTITSL QPDDEFAS YYC (SEQ ID NO: 83)	FGPGTK VDIK (SEQ ID NO: 84)

Constru cto	VH-FR1	VH-FR2	VH-FR3	VH-FR4	VL-FR1	VL-FR2	VL-FR3	VL-FR4
AB1370 083	EVQLVES GGGLVKP GGSLRLS CAASGFT FS (SEQ ID NO: 85)	WVRQA PGKGL EWVS (SEQ ID NO: 86)	RFTISRDN AKNSLFLQ MNSLRAED TAVYYCAR (SEQ ID NO: 87)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 88)	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC (SEQ ID NO: 89)	WFQQKP GKAPKS LIY (SEQ ID NO: 90)	GVPSKFS GSGSETD FTLTSSL QPEDFAT YYC (SEQ ID NO: 91)	FGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 92)
AB1370 095	EVQLVES GGGLVKP GGSLRLS CAASGFT FS (SEQ ID NO: 93)	WVRQA PGKGL EWVS (SEQ ID NO: 94)	RFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRAED TAVYYCAR (SEQ ID NO: 95)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC (SEQ ID NO: 97)	WFQQKP GKAPKS LIY (SEQ ID NO: 98)	GVPSKFS GSGSGTD FTLTSSL QPEDFAT YYC (SEQ ID NO: 99)	FGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 100)
AB1370 117	QVQLQQS GPGLVKP SQTLSLT CAISGDS VS (SEQ ID NO: 101)	WIRQS PSRGL EWLG (SEQ ID NO: 102)	RITINPDTS KNQFSLQL NSVTPEDT AVYFCAR (SEQ ID NO: 103)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 104)	DIQMTQ SPSTLSA SVGDRV TINC (SEQ ID NO: 105)	WYQQKP GKAPNL LIY (SEQ ID NO: 106)	GVPSRFS GSGSGTE FTLTSSL QPDDFAT YYC (SEQ ID NO: 107)	FGQGTK LEIK (SEQ ID NO: 108)

TABLA 5: SECUENCIAS DE DOMINIO CONSTANTE DEL ANTICUERPO FRA

Región constante	Secuencia
CH (CH1-hinge- CH2-CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 109)

CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 110)
CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV (SEQ ID NO: 111)

Las variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de la invención se contemplan como abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la(s) secuencia(s) de aminoácidos mantengan al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, y más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con el anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se define en cualquier parte en el presente documento.

Los anticuerpos de la invención pueden incluir variantes en las que los residuos de aminoácidos de una especie se sustituyen por el residuo correspondiente en otra especie, ya sea en las posiciones conservadas o no conservadas. En algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos en las posiciones no conservadas se sustituyen por residuos conservativos o no conservativos. En particular, se contemplan sustituciones conservativas de aminoácidos.

Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, incluidas las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina o histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina o cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina o triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano o histidina). Por tanto, si un aminoácido en un polipéptido se reemplaza por otro aminoácido de la misma familia de cadenas laterales, se considera que la sustitución de aminoácidos es conservativa. La inclusión de variantes modificadas de forma conservadora en los anticuerpos de la invención no excluye otras formas de variante, por ejemplo, variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos.

Las sustituciones de aminoácido no conservativas incluyen aquellas en las que (i) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (p. ej., Arg, His o Lys) se sustituye por, o mediante, un residuo electronegativo (p. ej., Glu o Asp), (ii) un residuo hidrófilo (p. ej., Ser o Thr) se sustituye por, o mediante, un residuo hidrófobo (p. ej., Ala, Leu, Ile, Phe o Val), (iii) una

cisteína o prolina se sustituye por, o mediante, cualquier otro residuo, o (iv) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa hidrófoba o aromática (p. ej., Val, His, Ile o Trp) se sustituye por, o mediante, una que tiene una cadena lateral más pequeña (p. ej., Ala, Ser) o sin cadena lateral (p. ej., Gly).

Además de los 20 aminoácidos convencionales, los aminoácidos no convencionales (tal como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina) pueden sustituirse por residuos de aminoácidos de los anticuerpos de la presente invención. Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético y aminoácidos no naturales pueden sustituirse por restos de aminoácidos. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender también residuos de aminoácidos que no se producen de manera natural.

Los aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metano-prolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxi-prolina, N-metilglicina, alo-treonina, metil-treonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomo-cisteína, nitro-glutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenil-alanina, 4-azafenil-alanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen varios métodos en la técnica para incorporar restos de aminoácidos que no se producen de manera natural en proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro*, en donde se supriman mutaciones interruptoras usando ARNt supresores químicamente aminoacilados. Los métodos para sintetizar aminoácidos y ARNt de aminoacilación se conocen en la técnica. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones interruptoras se lleva a cabo en un sistema libre de células que comprende un extracto de S30 de *E. coli* y enzimas disponibles en el mercado y otros reactivos. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman *et al.*, *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung *et al.*, *Science* 259:806-9, 1993; y Chung *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:10145-9, 1993). En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en *Xenopus oocytes* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:19991-8, 1996). Dentro de un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que va a sustituirse (p. ej., fenilalanina) y en presencia del (de los) aminoácido(s) que no se produce(n) de manera natural deseado(s) (p. ej., 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido que no se produce de manera natural se incorpora en el polipéptido en lugar de su contraparte natural. Véase, Koide *et al.*, *Biochem.* 33:7470-6, 1994. Los restos de aminoácidos que se producen de manera natural pueden convertirse en especies que no se producen de manera natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química puede

combinarse con mutagénesis dirigida al sitio para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2:395-403, 1993).

Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos que no se producen de manera natural y aminoácidos no naturales pueden sustituirse por residuos de aminoácidos de anticuerpos de la presente invención.

Los aminoácidos esenciales en los anticuerpos de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por escaneo de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989). Los sitios de interacción biológica pueden determinarse también mediante análisis físico de estructura, tal como se determina mediante tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de supuestos aminoácidos de sitio de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, *Science* 255:306-12, 1992; Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Las identidades de aminoácidos esenciales pueden deducirse también a partir de análisis de homologías con componentes relacionados (por ejemplo, los componentes de translocación o proteasa) de los anticuerpos de la presente invención.

Las sustituciones de varios aminoácidos pueden realizarse y probarse utilizando métodos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los divulgados por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:2152-6, 1989). En resumen, estos autores divulgan métodos para la aleatorización simultánea de dos o más posiciones en un polipéptido, selección de polipéptido funcional y después secuenciación de los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen la presentación en fagos (p. ej., Lowman *et al.*, *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5,223,409; Huse, publicación de la WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, *Gene* 46:145, 1986; Ner *et al.*, *DNA* 7:127, 1988).

El "porcentaje de identidad de secuencia" entre dos o más secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias. Por tanto, el % de identidad puede calcularse como el número de nucleótidos/aminoácidos idénticos dividido entre el número total de nucleótidos/aminoácidos, multiplicado por 100. Los cálculos de % de identidad de secuencia pueden tener en cuenta también el número de huecos y la longitud de cada hueco que se necesita introducir para optimizar el alineamiento de dos o más secuencias. Las comparaciones de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos o más secuencias pueden llevarse a cabo

usando algoritmos matemáticos específicos, tal como BLAST, que será familiar para un experto en la materia.

Se puede utilizar cualquiera de una variedad de métodos de alineamiento de secuencias para determinar el porcentaje de identidad, incluyendo, sin limitación, métodos globales, métodos locales y métodos híbridos, tal como, p. ej., métodos de aproximación de segmentos. Los protocolos para determinar el porcentaje de identidad son procedimientos rutinarios dentro del alcance de un experto en la materia. Los métodos globales alinean secuencias desde el comienzo hasta el final de la molécula y determinan el mejor alineamiento sumando puntuaciones de pares de restos individuales e imponiendo penalización de huecos. Los métodos no limitativos incluyen, por ejemplo, CLUSTAL W, véase, p. ej., Julie D. Thompson *et al.*, CLUSTAL W: "Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice", 22(22) *Nucleic Acids Research* 4673-4680 (1994); y refinamiento repetitivo, véase, p. ej., Osamu Gotoh, "Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments", 264(4) *J. Mol. Biol.* 823-838 (1996). Los métodos locales alinean secuencias mediante identificación de uno o más restos conservados compartidos por todas las secuencias de entrada. Los métodos no limitativos incluyen, p.ej., caja de apareamiento, véase, p. ej., Eric Depiereux y Ernest Feytmans, "Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences", 8(5) *CABIOS* 501 -509 (1992); muestreo de Gibbs, véase, p. ej., C. E. Lawrence *et al.*, "Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment", 262(5131) *Science* 208-214 (1993); alineamiento-M, véase, p. ej., Ivo Van Walle *et al.*, "Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences", 20(9) *Bioinformatics*:1428-1435 (2004).

El porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, *Bull. Math. Bio.* 48: 603-16, 1986 y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:10915-19, 1992. En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de huecos de 10, una penalización de extensión de huecos de 1, y la matriz de puntualización "blosum 62" de Henikoff y Henikoff (*ibid.*) tal como se muestra a continuación (se indican aminoácidos mediante los códigos de una letra convencionales).

En algunas realizaciones, los dominios variables de las cadenas tanto pesada como ligera de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, están alterados por al menos el reemplazo parcial de una o más CDR y/o por el reemplazo parcial de la región marco conservada, y cambio de secuencia. Aunque las CDR se pueden obtener a partir de la misma clase o incluso subclase del anticuerpo a partir del cual se obtienen las regiones marco

conservadas, se contempla que las CDR se obtengan de un anticuerpo de una clase distinta y, en determinadas realizaciones, de un anticuerpo de una especie distinta. No es necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. En su lugar, tan solo es necesario transferir los restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de Estados Unidos N.º 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, cada uno de los cuales se incorpora a la presente por referencia, estará totalmente dentro de las competencias del experto en la materia llevar a cabo experimentación rutinaria para obtener un anticuerpo funcional con una inmunogenicidad reducida.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede incluir, además de un VH y un VL, una región constante de cadena pesada o fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada humana, por ejemplo, una región constante de IgG humana, por ejemplo, una región constante de IgG1 humana.

En algunas realizaciones (preferentemente cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga con un agente, tal como un agente citotóxico), se inserta un residuo en la región constante de la cadena pesada para la conjugación específica del sitio. Por ejemplo, se puede insertar un resto de cisteína entre los aminoácidos S239 y V240 en la región CH2 de IgG1, que se puede denominar "una inserción 239" o "239i".

En algunas realizaciones, los anticuerpos dados a conocer en el presente documento pueden modificarse para comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o el dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunas realizaciones, se contempla una región constante modificada, en donde uno o más dominios están total o parcialmente deletados. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado comprenderá variantes o construcciones con dominios deletados, en donde se ha eliminado el dominio CH2 completo (construcciones Δ CH2). En algunas realizaciones, el dominio de la región constante omitido puede reemplazarse por un espaciador corto de aminoácidos (p. ej., 10 restos) que proporcione parte de la flexibilidad molecular que normalmente confiere la región constante ausente. La delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado en circulación. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante, acordes con la presente invención, moderen la unión al complemento y, así, reduzcan la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden utilizar otras modificaciones de la región constante para eliminar uniones disulfuro o fracciones de oligosacárido que

permitan una mejor ubicación debido a una especificidad antigénica o flexibilidad del anticuerpo aumentadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede modificarse por ingeniería para fusionar el dominio CH3 de forma directa con la región bisagra de los anticuerpos modificados respectivos o fragmentos de los mismos. En otras construcciones, puede insertarse un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, pueden expresarse construcciones compatibles en las
10 cuales el dominio CH2 se ha delecionado y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Puede añadirse tal espaciador, por ejemplo, para garantizar que los elementos reguladores del dominio constante sigan estando libres y accesibles, o que la región bisagra siga siendo flexible. Los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, demostrar ser inmunogénicos y
15 provocar una respuesta inmunitaria no deseada frente a la construcción. En algunas realizaciones, cualquier espaciador añadido a la construcción puede ser relativamente no inmunogénico, o incluso omitirse por completo, de modo que se mantengan las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la delección de los dominios de la región constante enteros, un anticuerpo o
20 fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en el presente documento puede modificarse mediante la delección parcial o sustitución de unos pocos aminoácidos, o incluso de uno solo, en una región constante. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en zonas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión del Fc y aumentar de este modo la localización tumoral. De manera similar, se puede delecionar
25 total o parcialmente uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, la unión a C1Q del complemento). Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, la semivida en suero) mientras se dejan otras funciones convenientes asociadas con el dominio de la región constante correspondiente intactas. Además, las regiones constantes del anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del
30 mismo pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos, que potencie el perfil de la construcción resultante. En este sentido, es posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo
35 modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, puede existir una adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar características

convenientes, tales como la disminución o el aumento de la función efectora, o proporcionar más unión a citotoxina o hidratos de carbono. En algunas realizaciones, puede ser conveniente insertar o repetir secuencias específicas obtenidas a partir de dominios de la región constante seleccionados. En algunas realizaciones, una región constante de la cadena pesada o un
5 fragmento de esta, por ejemplo, una región constante de la IgG humana o un fragmento de esta, puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos respecto a un dominio constante de la IgG natural, donde la IgG modificada tiene una semivida mayor en comparación con la semivida de una IgG que tiene el dominio constante de la IgG natural. Por ejemplo, el dominio constante de la IgG puede contener una o más sustituciones de aminoácidos de los restos de aminoácido
10 de las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, en las que la numeración de las posiciones de aminoácido está de acuerdo con el índice EU como se expone en Kabat. En algunas realizaciones, el dominio constante de la IgG puede contener una o más de una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 252 con tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W) o treonina (T), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 254 con treonina (T),
15 una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 256 con serina (S), arginina (R), glutamina (Q), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) o treonina (T), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 257 con leucina (L), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 309 con prolina (P), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 311 con serina (S), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 428 con treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F) o serina (S), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 433 con arginina (R), serina (S), isoleucina (I), prolina (P) o glutamina (Q), o una sustitución del aminoácido en la posición
20 Kabat 434 con triptófano (W), metionina (M), serina (S), histidina (H), fenilalanina (F) o tirosina. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FR α o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden un mutante YTE. El término "YTE" o la expresión "mutante YTE" se refiere a una mutación en el Fc de la IgG1 que da como resultado un aumento de la unión al FcRn humano y mejora la semivida en suero del anticuerpo que tiene la mutación. Un mutante YTE comprende una combinación de tres mutaciones M252Y/S254T/T256E (numeración EU Kabat
25 *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Servicio de Salud Pública de EE. UU., Institutos Nacionales de Salud, Washington, D.C.), introducida en la cadena pesada de una IgG1. Véase la patente de Estados Unidos n.º 7,658,921, que se incorpora por referencia en el presente documento. Se ha demostrado que el mutante YTE aumenta la semivida en suero de los anticuerpos en aproximadamente cuatro veces, en comparaciones con las versiones de tipo silvestre del mismo anticuerpo (Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006); Robbie et al., (2013) Antimicrob. Agents Chemother. 57, 6147-6153). Véase también la Patente de Estados Unidos N.º 7,083,784, que se incorpora en el presente documento por referencia en
30 su totalidad.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

L en el extremo N-terminal (por ejemplo, posición 1) del VH;

E en el extremo N-terminal (por ejemplo, posición 1) del VH; o

5 Q en el extremo N-terminal (por ejemplo, posición 1) del VH.

DEFINICIONES Y FORMATOS DE ANTICUERPOS

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con, un antígeno particular.

10 Los anticuerpos de la presente invención generalmente están aislados o son recombinantes. "Aislado", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, que ha sido identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular a partir del cual se expresó. Normalmente, una cantidad aislada el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. Por lo tanto, un "anticuerpo
15 aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a FR α está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de FR α .

Generalmente, un anticuerpo comprende al menos dos "cadenas ligeras" (LC) y dos
20 "cadenas pesadas" (HC). Las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de dichos anticuerpos son polipéptidos que consisten de varios dominios. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como "VH") y una región constante de cadena pesada (abreviada en este documento como "CH"). La región constante de cadena pesada comprende los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3 (clases de anticuerpos IgA, IgD e IgG) y opcionalmente el dominio constante de cadena pesada CH4
25 (clases de anticuerpos IgE e IgM). Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera (abreviado aquí como "VL") y un dominio constante de cadena ligera (abreviado aquí como "CL"). .

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. Un
30 anticuerpo "intacto" o "de longitud completa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que tiene dos polipéptidos de cadena pesada (H) y dos polipéptidos de cadena ligera (L) interconectados por enlaces disulfuro.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en
35 combinación. Las regiones variables VH y VL pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) (también

conocidas como regiones hipervariables), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Preferentemente, cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, que se disponen desde el extremo amino terminal hacia el extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir adicionalmente toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera.

La unión entre una función y su antígeno o epítipo diana está mediada por las CDR. El término "epítipo" se refiere a una región de proteína diana (por ejemplo polipéptido) que puede unirse a (por ejemplo, que está unida mediante) un anticuerpo o fragmento de unión antígeno de la invención. Las CDR son los principales determinantes de la especificidad del antígeno. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en variabilidad de 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 estas dos estrategias para determinar las CDR.

La secuencia de una CDR puede identificarse por referencia a cualquier sistema numérico conocido en la técnica, por ejemplo, el sistema Kabat (Kabat, E. A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), el sistema Chothia (Chothia & Lesk, "Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins", *J. Mol. Biol.* 196, 901–917 (1987)), o el sistema IMGT (Lefranc et al., "IMGT Unique Numbering for Immunoglobulin and Cell Receptor Variable Domains and Ig superfamily V-like domains", *Dev. Comp. Immunol.* 27, 55–77 (2003)) (véase la **Tabla 6**).

TABLA 6: DEFINICIONES DE CDR

	Kabat	Chothia	IMGT
VH CDR1	31-35	26-32	27-38
VH CDR2	50-65	52-56	56-65
VH CDR3	95-102	95-102	105-117
VL CDR1	24-34	24-34	27-38
VL CDR2	50-56	50-56	56-65
VL CDR3	89-97	89-97	105-117

Los "dominios constantes" (o "regiones constantes") de la cadena pesada y de la cadena ligera no están directamente implicados en la unión de un anticuerpo a una diana, pero exhiben diversas funciones efectoras. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden participar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos del huésped, incluidas diversas células del

sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Hay cinco clases principales de región constante de cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE e IgM, cada una con funciones efectoras características designadas por isotipo. Las moléculas de Ig interactúan con múltiples clases de receptores celulares. Por ejemplo, las moléculas de IgG interactúan con tres clases de receptores Fcγ (FcγR) específicos para la clase de anticuerpo IgG, en concreto, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en la superficie celular desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen el atrapamiento y la destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la eliminación de complejos inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas por anticuerpos por parte de linfocitos citolíticos (que se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulinas. Se ha informado que las secuencias importantes para la unión de IgG a los receptores FcγR están ubicadas en los dominios CH2 y CH3.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-FRα o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son isotipo IgG. Los anticuerpos anti-FRα o fragmentos de unión a antígeno pueden ser cualquier subclase IgG, por ejemplo, isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-FRα o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se basan en un isotipo IgG1. El uso de una molécula de IgG1 humana de tipo natural que está cerca de una IgG natural podría reducir la capacidad de desarrollo y otros riesgos. Por ejemplo, los presentes inventores han ideado ADC que usan una estructura de mAb IgG1 humano, que se cree, sin estar ligado a ninguna teoría, será menos inmunogénico que otros ADC anti-FRα que se están desarrollando como IMG151.

Para las posiciones de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada discutidas en los anticuerpos de la invención, la numeración es de acuerdo con el índice EU descrito por primera vez en Edelman, G.M., et al., Proc. nacional Academia ciencia USA 63 (1969) 78-85). La numeración de la UE de Edelman también se establece en Kabat *et al.* (1991) (citado anteriormente). Por lo tanto, los términos "Índice de la UE como se establece en Kabat", "Índice de la UE". "Índice EU de Kabat" o "numeración EU" en el contexto de la cadena pesada se refiere al sistema de numeración de residuos basado en el anticuerpo IgG1 EU humano de Edelman et al. como se establece en Kabat *et al.* (1991). El sistema de numeración usado para la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera se establece de manera similar en Kabat *et al.* (Citado anteriormente). Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, "numerado de acuerdo con Kabat" se refiere al sistema de numeración de Kabat establecido en Kabat et al. (citado anteriormente).

Los términos "región Fc", "parte Fc" y "Fc" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a la porción de una inmunoglobulina nativa que se forma por dos cadenas Fc. Cada "cadena Fc" comprende un dominio constante CH2 y un dominio constante CH3. Cada cadena Fc también puede comprender una región bisagra. Una región Fc nativa es homodimérica. En algunas realizaciones, la región Fc puede ser heterodimérica porque puede contener modificaciones para reforzar la heterodimerización de Fc. La región Fc contiene el resto hidrato de carbono y los sitios de unión para el complemento y los receptores Fc (incluyendo el receptor FcRn), y no tiene actividad de unión a antígeno. Fc puede referirse a esta región aisladamente, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de Fc. Se han encontrado polimorfismos en varios sitios del dominio Fc, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones EU 270, 272, 312, 315, 356 y 358, lo que da como resultado variaciones menores entre las secuencias descritas en la presente solicitud y las secuencias conocidas en la técnica. Como resultado, cada región Fc de IgG de que se produce de manera natural se denomina "dominio Fc de IgG de tipo natural" o "dominio Fc de IgG TN" (es decir, cualquier alelo). Las secuencias de cadenas pesadas de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas pueden obtenerse en una variedad de bases de datos de secuencias, incluyendo la base de datos UniProt (www.uniprot.org) con los números de registro P01857 (IGHG1_HUMAN), P01859 (IGHG2_HUMAN), P01860 (IGHG3_HUMAN) , y P01861 (IGHG4_HUMAN) respectivamente.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FR α de la invención son anticuerpos monoclonales. Un "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a una población de anticuerpos homogénea implicada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de un único determinante antigénico o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes antigénicos. La expresión "anticuerpo monoclonal" puede abarcar tanto anticuerpos monoclonales completos, así como también fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes monocatenarios (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos fabricados de varias maneras que incluyen, pero sin limitación, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos. Más preferentemente, los anticuerpos anti-FR α de la invención son anticuerpos monoclonales aislados. En una realización más preferible, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano. En realizaciones alternativas, los métodos de la invención pueden emplear anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos anti-FR α de la invención y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden obtener de cualquier especie por medios recombinantes. Por ejemplo, los

anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden ser de ratón, rata, cabra, caballo, cerdo, bovino, pollo, conejo, camélido, burro, ser humano o versiones quiméricas de los mismos. Para su uso en la administración a seres humanos, los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de origen no humano pueden modificarse genética o estructuralmente para que sean

5 menos inmunogénicos tras la administración al paciente humano. Se prefieren especialmente los anticuerpos humanos o humanizados, en especial como anticuerpos recombinantes humanos o humanizados.

La expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo producido en un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido en un ser humano, fabricado utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Un anticuerpo humano puede incluir anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada y/o ligera humanas tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de la cadena pesada humana y la cadena ligera murinas. Un anticuerpo humano

10 puede incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o durante el reordenamiento génico o por mutación somática *in vivo*). Un anticuerpo humano puede producirse en una célula humana (mediante expresión recombinante), un animal no humano o una célula procariota o eucariota que puede expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reorganizados (tales como cadenas pesadas y ligeras). Un péptido ligador que no se encuentra en los anticuerpos humanos nativos puede incluirse en un anticuerpo humano de cadena sencilla. Por ejemplo, un Fv puede tener un péptido ligador, como de dos a aproximadamente ocho residuos de glicina u otros aminoácidos, que une la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena

15 ligera. Estos péptidos ligadores se consideran de origen humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando una variedad de técnicas, incluyendo las técnicas de presentación en fagos que usan bibliotecas eficaces derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Los ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas autóctonas funcionales pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas también pueden usarse para producir anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.^{os} WO 1998/24893; WO 1992/01047; WO 1996/34096; WO 1996/33735; patentes de EE. UU. n.º 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5.916.771; y 5,939,598, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia). También pueden prepararse directamente anticuerpos humanos utilizando diversas

20 técnicas conocidas en la técnica. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados a partir de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo

25

30

35

dirigido frente a un antígeno diana. Véase, p. ej., Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boemer *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); patente de EE. UU. n.º 5,750,373.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que la estructura o las CDR se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina original. Por ejemplo, se puede injertar una CDR murina en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L. y col., *Nature* 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. En algunas realizaciones, los "anticuerpos humanizados" son aquellos en los que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente a la del anticuerpo original para generar propiedades deseables.

Los anticuerpos humanizados pueden prepararse opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diferentes productos conceptuales humanizados y modificados genéticamente utilizando modelos tridimensionales de los anticuerpos parentales, modificados genéticamente y secuencias humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están habitualmente disponibles y los expertos en la materia están familiarizados ellos. Se puede disponer de programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que afectan la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno, tal como FR α . De esta manera, se pueden seleccionar y combinar restos de la FR a partir de las secuencias consenso e importada, de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o antígenos) diana.

Los anticuerpos humanizados se pueden modificar adicionalmente mediante la sustitución de restos adicionales en la región de armazón de Fv y/o dentro de los restos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán esencialmente todos de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o esencialmente 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 consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región o un dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente el de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes de EE.UU. n.ºs 5,225,539 o 5,639,641, cada una de las cuales se incorpora como referencia en el presente documento.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, generalmente preparada mediante técnicas de ADN recombinante. Se prefieren los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado de la del anticuerpo original para generar propiedades deseables. Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos que implican ADN recombinante convencional y técnicas de transfección génica se conocen bien en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; patente de los EE.UU. n.ºs 5,202,238 y 5,204,244, cada una de las cuales se incorpora como referencia en el presente documento.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa tal como se describió anteriormente. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un fragmento de unión a antígeno. El término "fragmento de unión a antígeno" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier configuración natural o construida artificialmente de un polipéptido de unión a antígeno que comprende una, dos o tres CDR de cadena ligera y/o una, dos o tres CDR de cadena pesada, donde el polipéptido puede unirse al antígeno.

En algunas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno de la invención es un fragmento Fab. El anticuerpo según la invención también puede ser un Fab', un Fv, un scFv, un Fd, un dominio V NAR, un IgNAR, un intrabody, un IgG CH2, un minibody, un monodominio, un Fcab, un scFv-Fc, F(ab')₂, un di-scFv, un activador de células T biespecífico (BiTE®), un F(ab')₃, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, un DVD-Ig, un (scFv)₂, un mAb2 o un DARPin.

Los términos "fragmento Fab" y "Fab" se usan de manera intercambiable en el presente documento y contienen una sola cadena ligera (por ejemplo, un dominio constante CL y un VL) y una sola cadena pesada (por ejemplo, un dominio constante CH1 y un VH). La cadena pesada de un fragmento Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra cadena pesada.

Un "fragmento Fab" contiene una sola cadena ligera y una sola cadena pesada, pero además de CH1 y VH, un "fragmento Fab" contiene la región de la cadena pesada entre los dominios CH1 y CH2 que se requiere para la formación de un enlace disulfuro entre cadenas. Así, dos "fragmentos Fab" pueden asociarse mediante la formación de un enlace disulfuro para formar una molécula F(ab')₂.

Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena incluye una porción de la región constante necesaria para la formación de un enlace disulfuro entre cadenas entre dos cadenas pesadas.

Un "fragmento Fv" contiene solo las regiones variables de la cadena pesada y ligera. No contiene regiones constantes.

Un "anticuerpo de dominio único" es un fragmento de anticuerpo que contiene una unidad de dominio de anticuerpo único (por ejemplo, VH o VL).

Un "Fv de cadena sencilla" ("scFv") es un fragmento de anticuerpo que contiene los dominios VH y VL de un anticuerpo, unidos para formar una cadena sencilla. Un ligador polipeptídico se usa comúnmente para conectar los dominios VH y VL del scFv.

Un "scFv en tándem", también conocido como TandAb®, es una molécula Fv de cadena sencilla formada por la unión covalente de dos scFv en una orientación en tándem con un ligador peptídico flexible.

Un "enganchador de células T biespecífico" (BiTE®) es una proteína de fusión que consta de dos fragmentos variables de cadena única (scFv) en una sola cadena peptídica. Uno de los scFv se une a las células T a través del receptor CD3 y el otro a un antígeno de célula tumoral.

Un "diacuerpo" es un pequeño fragmento de anticuerpo bivalente y biespecífico que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL) conectado por un ligador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena (Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772). Esto fuerza el emparejamiento con los dominios complementarios de otra cadena y promueve el ensamblaje de una molécula dimérica con dos sitios de unión a antígeno funcionales.

Una "DARPin" es una molécula repetida de anquirina biespecífica. Las DARPins se derivan de proteínas de anquirina naturales, que se pueden encontrar en el genoma humano y son uno de los tipos más abundantes de proteínas de unión. Un módulo de biblioteca DARPin se define por secuencias de proteínas repetidas de anquirina naturales, utilizando 229 repeticiones de anquirina para el diseño inicial y otras 2200 para el refinamiento posterior. Los módulos sirven como bloques de construcción para las bibliotecas DARPin. Los módulos de la biblioteca se parecen a las secuencias del genoma humano. Un DARPin se compone de 4 a 6 módulos. Porque cada módulo es de aprox. 3.5 kDa, el tamaño de un DARPin promedio es de 16-21 kDa. La selección de los aglutinantes se realiza mediante visualización de ribosomas, que está completamente libre de células y se describe en He M. y Taussig MJ., Biochem Soc Trans. 2007, Nov;35(Pt 5):962-5.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FR α de la invención y fragmentos de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos desnudos. El término "anticuerpo desnudo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un agente terapéutico, por ejemplo, con un agente citotóxico o radiomarcador. En realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos monoespecíficos desnudos. En realizaciones preferidas alternativas, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos están conjugados con uno o más agentes heterólogos (por ejemplo, un agente citotóxico).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede modificarse adicionalmente para que contenga fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Esos restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Las fracciones también pueden reducir o eliminar cualquiera de los efectos secundarios convenientes de las proteínas y similares. Se puede encontrar una revisión general de estas fracciones en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22^a ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

UNIÓN FRA

En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-FR α de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen específicamente a FR α . El término "unión específica a FR α " se refiere a un anticuerpo que puede unirse al objetivo definido con suficiente afinidad para que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico para dirigirse a FR α . En algunas realizaciones, un anticuerpo que se une específicamente a FR α no se une a otros antígenos o no se une a otros antígenos con suficiente afinidad para producir un efecto fisiológico. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FR α , o sus fragmentos de unión a antígeno, de la invención se unen específicamente a FR α humano (UniProt ID: P15328) y/o mono cynomolgus FR α (UniProt ID: A0A2K5U044). En realizaciones particularmente preferidas, los anticuerpos anti-FR α , o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la invención se unen específicamente a FR α humano. En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-FR α , o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la invención se unen específicamente a FR α humano y FR α de mono cynomolgus.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, el FR α tiene una secuencia de SEQ ID NO: 112 o SEQ ID NO: 113. En realizaciones preferidas, el FR α tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 112.

SEQ ID NO: 112: PROTEÍNA FRA HUMANA (POLIPÉPTIDO SECRETADO MADURO PREVISTO)

RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKNACCSTNTSQAHKDVS
YLYRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQ

WWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS
 YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMS

**SEQ ID NO: 113: PROTEÍNA FRA CYNO (POLIPÉPTIDO SECRETADO MADURO
 PREVISTO)**

RTARARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQAHKDVS
 LYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQ
 WWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS
 YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMS

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a uno o más seleccionados de un FR α de ratón (UniProt ID: P35846), FR α de rata (UniProt ID: G3V8M6), FR β humano (UniProt ID: P14207), FR γ humano (UniProt ID: P41439), o una combinación de los mismos.

El término "no se une" significa que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención no se une sustancialmente a una o más de dichas moléculas (por ejemplo, FR α de ratón, FR α de rata, FR β humano, FR γ humano o una combinación de los mismos). El término "sustancialmente no", cuando se usa en el contexto de la unión en el presente documento, puede significar que menos del 5%, 2%, 1%, 0.5% o 0.1 % de las células que expresan una o más de dichas moléculas en un cultivo celular se unen al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención (al entrar en contacto con el mismo). De manera adecuada, el término "sustancialmente no" cuando se usa en el contexto de unión en el presente documento puede significar que no se unen tales células.

AFINIDAD DE UNIÓN

Generalmente, la "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único 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, como se utiliza en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse generalmente mediante la constante de disociación (KD). Puede medirse la afinidad mediante métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en el presente documento. Los anticuerpos con una baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos con una alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo.

Adecuadamente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se une a la molécula de FR α con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo es útil como agente terapéutico o reactivo de diagnóstico para dirigirse a FR α .

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a FR α humano con una KD de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 30 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a FR α humano con una KD de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 30 nM, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 1 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 1 a aproximadamente 30 nM, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 2 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 2 a aproximadamente 30 nM, aproximadamente 2 a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nM, aproximadamente 5 a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nM o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 nM.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a FR α cyno con una KD de aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 80 nM o menos, aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 30 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a FR α cyno con una KD de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 1 a aproximadamente 80 nM, aproximadamente 1 a aproximadamente 60 nM, aproximadamente 1 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 2 a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 2 a aproximadamente 80 nM, aproximadamente 2 a aproximadamente 60 nM, aproximadamente 2 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nM, aproximadamente 5 a aproximadamente 60 nM, aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nM, aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nM, aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 20 a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 20 a aproximadamente 80 nM, aproximadamente 20 a aproximadamente 60 nM, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 30 a aproximadamente 100

nM, aproximadamente 30 a aproximadamente 80 nM, aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nM, o aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nM.

La afinidad o avidez de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este por un antígeno puede determinarse de forma experimental utilizando cualquier método adecuado bien conocido en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA), o cinética (por ejemplo, análisis KINEXA® o BIACORE™). Se pueden emplear fácilmente formatos de ensayo de unión directa así como ensayos de unión competitiva. (Véase, por ejemplo, Berzofsky et al., *Antibody-Antigen Interactions*, en *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kubly, *Immunology*, W. H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y los métodos descritos en el presente documento).

De acuerdo con la invención, la afinidad de unión de los anticuerpos anti-FR α , o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la invención puede determinarse usando un ensayo de afinidad de unión a FR α tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la afinidad de unión del anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención se determina por Biacore, por ejemplo, Biacore T200 a 25°C. Por ejemplo, la afinidad del ECD de FR α humano recombinante por el anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede medirse usando el Biacore T200 a 25°C, por ejemplo usando el siguiente protocolo. La proteína A se inmoviliza covalentemente en la superficie de un chip CM5 utilizando técnicas estándar de acoplamiento de amina a una concentración de 50 µg/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 4.0. El anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se captura en la superficie de la Proteína A en tampón HBS-EP+ pH 7.4 a 10 µl/min para permitir la unión de FR α ECD. Se diluye ECD de FR α en serie (FR α ECD humano 0.4 nM-100 nM; cyno FR α ECD 0.8 nM-200 nM; FR α ECD de ratón 30 nM-4000 nM y rata FR α ECD) en tampón HBS-EP+ pH 7.4 y se hace fluir sobre el chip a 50 µl/min, con 2 minutos de asociación y 8 minutos de disociación. Se regenera completamente la superficie del chip con pulsos de MgCl₂ 3 M para eliminar el anticuerpo capturado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, junto con cualquier FR α ECD unido. Se realizan múltiples inyecciones de tampón solo en las mismas condiciones para permitir la sustracción de referencia doble de los conjuntos de sensogramas finales, que se analizan con el software de evaluación Biacore T200.

Alternativamente, la afinidad de unión del anticuerpo anti-FR α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención puede determinarse mediante Octet, por ejemplo Octeto rojo. Por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo anti-FR α puede analizarse mediante Octet red a 25°C, por ejemplo, usando el siguiente protocolo. Se realizan los ensayos de unión en Octet RED384 (ForteBio) a 25°C en un tampón de ensayo que contiene PBS, BSA al 0.1% v/v (Sigma, A9576), Tween-20 al 0.01% v/v (Sigma, P9416) (pH 7.4) usando placas negras de 384

pocillos con fondo inclinado (ForteBio, 18-5076). Se configuran los ensayos usando proteína A o biosensores de captura antihumanos (AHC) (ForteBio, 18-5089) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recubren 10 µg/ml de IgG anti-FRα de rata (Sino Biological, 81073-RP01) en biosensores de proteína A (ForteBio, NC9490476) y se cargan 10 µg/ml de IgG humana de prueba en biosensores de captura antihumanos (AHC) (ForteBio, 18-5089) durante 180 segundos. Se mide la asociación incubando biosensores cargados con FRα humano 500 nM (interno) o FRα de rata 500 nM (Sino Biological, 81073-R08H). Se mide la disociación después de la transferencia al tampón de ensayo. Se analizan los datos usando el software de análisis de datos Octet versión 7.0.

PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona un método para producir anticuerpos anti-FRα de la invención y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende cultivar una célula huésped recombinante que expresa las cadenas pesada y ligera y aislar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno producido por la célula.

En una realización preferible, el método para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende (a) cultivar la célula huésped y (b) aislar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este expresado de la célula.

Un anticuerpo de la invención puede producirse transfectando una célula huésped con uno o más vectores que comprenden polinucleótidos que codifican los respectivos anticuerpos o fragmentos, cultivando la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

En algunas realizaciones, el método comprende las etapas de:

a) transfectar una célula huésped con uno o más vectores que comprenden polinucleótidos que codifican el conjunto de cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo de la invención;

b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y

c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

En realizaciones preferidas, el método comprende las etapas de:

a) transfectar una célula huésped con vectores que comprenden polinucleótidos que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de la invención;

b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y

c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

La presente invención abarca además un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo obtenible mediante dichos métodos para producir un anticuerpo o fragmento de unión

a antígeno del mismo que se une a un polipéptido FR α (por ejemplo, epítipo de polipéptido FR α).

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, como anticuerpos monoclonales) puede fabricarse usando métodos de ADN recombinante tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4,816,567, que se incorpora en el presente documento como referencia. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de linfocitos B maduros o célula de hibridoma, tal como mediante RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción) utilizando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y se determina su secuencia utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen por lo demás proteína inmunoglobulina, se generan anticuerpos monoclonales por las células hospedadoras. Además, pueden aislarse anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la especie deseada, a partir de fagotecas que expresan las CDR de la especie deseada, tal como se describe en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

Se conocen en la técnica estrategias de maduración de la afinidad y estrategias de combinación de cadenas, y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Véase Marks *et al.*, *BioTechnology* 10:779-783 (1992), incorporado por referencia en su totalidad.

Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. De manera tradicional estos fragmentos se obtienen mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, tal como describen, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 24:107-117 (1993) y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985). En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos anti-FR α se producen de forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse en *E. coli* u otras células hospedadoras, permitiendo así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Dichos fragmentos de anticuerpos anti-FR α también se pueden aislar de las fagotecas de anticuerpos analizadas anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo anti-FR α también pueden ser anticuerpos lineales tal como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5,641,870, que se incorpora como referencia en el presente documento. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia.

De acuerdo con la presente invención, las técnicas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para FR α . véase, p. ej., a la patente de EE. UU. n.º 4,946,778). Además, pueden adaptarse métodos para la construcción de colecciones de expresión de Fab para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por FR α , o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Véase, p. ej., Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989). Pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante técnicas conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitación: el fragmento F(ab')₂ producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; el fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂; el fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor; o fragmentos Fv.

CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO (ADC)

También se proporcionan en el presente documento los ADC que comprenden anticuerpos anti-FR α o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

AGENTE HETERÓLOGO

En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se une a un agente heterólogo. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con un agente heterólogo. De manera adecuada, "conjugado" significa unido por medio de un enlace covalente o iónico.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está conjugado a uno o más agentes heterólogos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de la topoisomerasa I (TOPOi), un derivado de tubulicina, una pirrolobenzodiazepina, un agente antimicrobiano, un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, una proteína, una enzima, un lípido, un modificador de la respuesta biológica, un agente farmacéutico, una linfocina, un anticuerpo heterólogo, un fragmento de un anticuerpo heterólogo, una etiqueta detectable, un polietilenglicol (PEG), un radioisótopo y una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el agente heterólogo puede ser un fármaco. Preferentemente, el agente heterólogo es una citotoxina. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede conjugarse a tal agente heterólogo para proporcionar un "conjugado de anticuerpo-fármaco" (ADC).

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un ADC que comprende el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención, donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con una citotoxina.

El agente heterólogo se une normalmente a, o "se carga en" el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. La carga de agente (p) es el número promedio de agente(s) por anticuerpo

o fragmento de unión a antígeno. El experto en la técnica entenderá que más de uno de dicho(s) agente(s) (por ejemplo, TOPOi) puede conjugarse con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

En algunas realizaciones, el número promedio de agentes por anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20. En algunas realizaciones el intervalo se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10. En algunas realizaciones, existe un agente por anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo). En algunas realizaciones, el número de agentes por anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) puede expresarse como una relación de agente (es decir, fármaco) con respecto a anticuerpo. Esta relación se denomina la relación de fármaco con respecto al anticuerpo (DAR)." La DAR es el número promedio de fármacos (es decir, agentes) unidos a cada anticuerpo. En algunas realizaciones de la presente invención, la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20. En algunas realizaciones, el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10. En realizaciones preferidas, la DAR es aproximadamente 4 (por ejemplo,, 3.8-4.2) o aproximadamente 8 (por ejemplo,, 7.6-8.4), más preferentemente aproximadamente 8 (por ejemplo,, 7.6-8.4).

LIGADORES

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede estar conjugado con un agente heterólogo (por ejemplo, agente citotóxico) por un ligador.

El término "ligador" o "espaciador", tal como se usa en el presente documento, significa un resto químico divalente que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a antígeno a un agente heterólogo (por ejemplo, citotoxina) para formar un conjugado (por ejemplo, ADC). En algunas realizaciones, el ligador o el espaciador es un espaciador peptídico. En algunas realizaciones, el ligador o espaciador es un espaciador no peptídico (por ejemplo, químico). Los ligadores adecuados tienen dos extremos reactivos, uno para la conjugación de anticuerpos y el otro para la conjugación de agentes heterólogos. Debido a la formación de enlaces entre el ligador y/o el agente heterólogo (por ejemplo, citotoxina), y entre el ligador y/o el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, uno o ambos terminales reactivos estarán ausentes o incompletos (tal como siendo sólo el carbonilo del ácido carboxílico). Estas reacciones de conjugación se discuten con más detalle a continuación.

En realizaciones preferidas, el ligador se une (por ejemplo, se conjuga) de manera escindible a un residuo amino, por ejemplo, un aminoácido de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, el ligador puede escindirse en circunstancias intracelulares, lo que permite que la unidad de fármaco se libere del anticuerpo en el entorno intracelular.

Alternativamente, la unidad ligadora puede no ser escindible. En tales realizaciones, el fármaco se libera, por ejemplo, mediante la degradación de anticuerpos. Sin embargo, las cargas útiles no escindibles requieren una digestión completa de mAb en el lisosoma y el producto que contiene el fármaco resultante puede ser demasiado polar, por ejemplo, para lograr el efecto de la activación inespecífica.

El anticuerpo unido a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC) es preferentemente estable e intacto antes de ser transportado o administrado a una célula, es decir, el anticuerpo debe unirse al resto del fármaco. Fuera de la célula diana, los ligadores son estables, pero dentro de la célula pueden escindirse a un ritmo elevado. Un ligador eficaz: (i) mantendrá las propiedades de unión específicas del anticuerpo; (ii) permitirá la administración intracelular del conjugado o resto de fármaco; (iii) permanecerá estable e intacto, es decir, sin escindir, hasta que el conjugado haya sido entregado o transportado a su sitio de destino; y (iv) mantendrá el efecto citostático o destructor de células del resto citotóxico. Los métodos analíticos estándar, tal como la espectroscopia de masas, la HPLC y la técnica de separación/análisis LC/MS, pueden usarse para evaluar la estabilidad del anticuerpo unido a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC).

Los ligadores pueden escindirse, por ejemplo, mediante hidrólisis enzimática, fotólisis, hidrólisis en condiciones ácidas, hidrólisis en condiciones básicas, oxidación, reducción de disulfuro, escisión nucleófila o escisión organometálica (véase, por ejemplo, Leriche et al., Bioorg. Med Chem., 20:571-582, 2012).

Los ligadores hidrolizables en condiciones ácidas incluyen, por ejemplo, hidrazonas, semicarbazonas, tiosemicarbazonas, amidas cis-aconíticas, ortoésteres, acetales, cetales o similares. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.ºs 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661). Los ligadores escindibles en condiciones reductoras incluyen, por ejemplo, un disulfuro. Se conocen en la técnica una variedad de ligadores disulfuro, incluyendo, por ejemplo, los que se pueden formar usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno) (Véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931, Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987)).

En realizaciones preferidas, el ligador es susceptible de hidrólisis enzimática. Tales ligadores son preferibles a los ligadores escindibles sensibles al pH, que pueden no ser lo suficientemente estables y escindirse prematuramente antes de alcanzar la célula diana y, por

lo tanto, puede observarse una toxicidad potencial fuera del objetivo. El ligador escindible enzimáticamente puede ser, por ejemplo, un ligador que contiene un péptido que se escinde por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero sin limitarse a, una proteasa lisosomal o endosomal. Una ventaja de emplear la liberación proteolítica intracelular del fármaco terapéutico es que el agente normalmente se atenúa cuando se conjuga, y las estabildades séricas de los conjugados suelen ser altas.. En algunas realizaciones, el ligador de peptidilo tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o de al menos tres aminoácidos. Los ligadores de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los péptidos que comprenden los aminoácidos valina, alanina, citrulina (Cit), fenilalanina, lisina, leucina y glicina son ejemplos de péptidos apropiados. Los aminoácidos naturales, los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos no naturales, como la citrulina, son todos ejemplos de residuos de aminoácidos que forman un componente ligador de aminoácidos. Los dipéptidos a modo de ejemplo incluyen valina-citrulina (VC o Val-Cit) y alanina-fenilalanina (AF o Ala-Phe). Los tripéptidos a modo de ejemplo incluyen glicina-valina-citrulina (Gly-Val-Cit) y glicina-glicina-glicina (Gly-Gly-Gly). En algunas realizaciones, el ligador incluye un dipéptido tal como Val-Cit, Ala-Val o Phe-Lys, Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Phe-Arg o Trp-Cit.

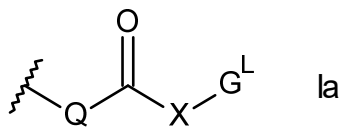
En algunas realizaciones, el ligador comprende PEG. Un ligador escindible por proteasa estable que contiene PEG puede limitar la hidrofobicidad de la carga útil y puede escindir y liberar selectivamente el fármaco libre dentro de las células cancerosas diana. Una naturaleza menos hidrófoba del ligador, tal como se describe en el presente documento, puede permitir una alta carga del fármaco en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, DAR8) sin agregación, que sería significativamente mayor que la de mirvetuximab soravtansina (DAR3-4) o derivados de la misma, tal como IMG151 (DAR3.5). Esto podría permitir que el ADC entregue una concentración significativamente mayor de carga útil de citotoxina a las células cancerosas diana mediante la unión a FR α en las células cancerosas.

En algunas realizaciones, el ligador comprende maleimida. El uso de maleimida en el ligador puede permitir la generación de ADC de DAR8 y DAR4 haciendo uso de los disulfuros intercatenarios nativos en los anticuerpos. Esto es ventajoso sobre la conjugación de aminos superficiales a partir de residuos de lisina, lo que podría resultar en una mezcla de especies de DAR y variabilidad de lote a lote. También puede haber problemas de reproducibilidad que afecten la eficacia del ADC si los sitios de conjugación interfieren con la unión al antígeno. Además, otros métodos de conjugación, por ejemplo, es posible que la química de clic de azida-alquino que implica un anticuerpo modificado por ingeniería no logre fácilmente una DAR de más de 4.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se une a un agente heterólogo, preferentemente una citotoxina, a través de un ligador R^L seleccionado de:

(Ia):

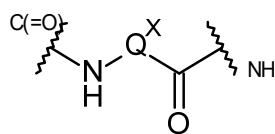
5



donde

Q es:

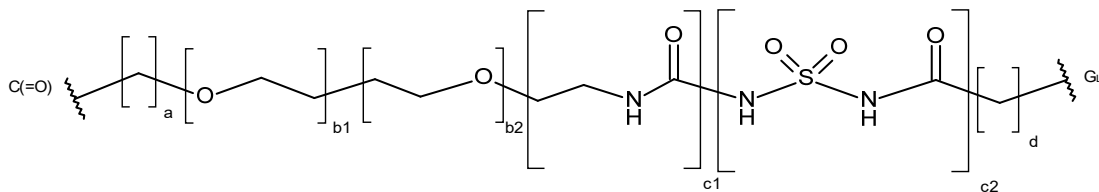
10



, donde Q^X es tal que Q es un residuo aminoacídico, un residuo dipeptídico, un residuo tripeptídico o un residuo tetrapeptídico;

X es:

15



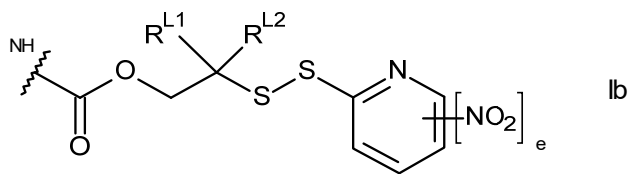
20

donde a = de 0 a 5, b1 = de 0 a 16, b2 = de 0 a 16, c1 = 0 o 1, c2 = 0 o 1, d = de 0 a 5, donde al menos b1 o b2 = 0 (es decir, solo uno de entre b1 y b2 puede no ser 0) y al menos c1 o c2 = 0 (es decir, solo uno de entre c1 y c2 puede no ser 0);

G^L es un ligador para conectar a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención;

25

(Ib):

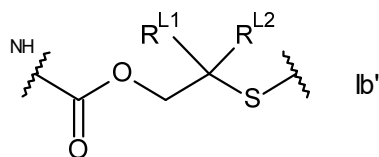


30

donde R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente entre H y metilo o, junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo de ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1; o

35

(Ib')



donde R^{L1} y R^{L2} son como se han definido anteriormente.

A modo de ejemplo, se describirán las realizaciones preferidas de G^L , X, Q^X (por ejemplo, dentro del ligador de la descrita anteriormente) y el ligador de Ib.

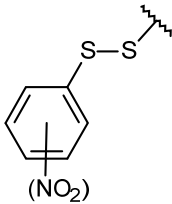
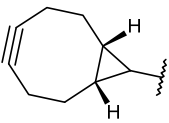
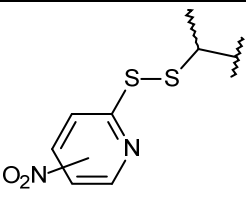
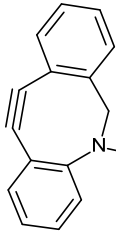
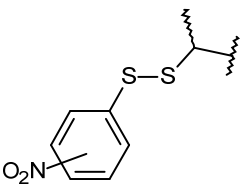
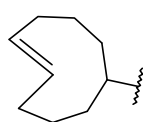
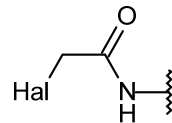
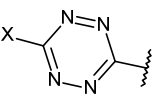
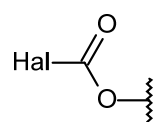
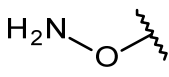
Las siguientes preferencias se pueden aplicar a todos los aspectos de la invención tal como se han descrito en el presente documento o se pueden referir a un único aspecto. Las preferencias se pueden combinar entre sí en cualquier combinación.

Diversas definiciones que pertenecen a ciertos términos en esta sección se proporcionan con las "Definiciones químicas" de encabezado proporcionadas a continuación.

G^L

G^L puede seleccionarse entre:

(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	
(G^{L2})		(G^{L8})	
(G^{L3-1})	 donde el grupo NO_2 es opcional	(G^{L9})	

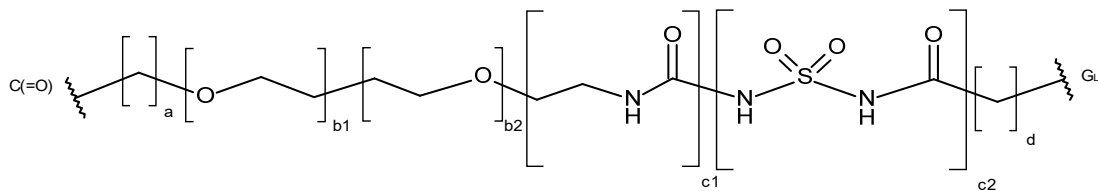
(G ^{L3-2})	 donde el grupo NO₂ es opcional	(G ^{L10})	
(G ^{L3-3})	 donde el grupo NO₂ es opcional	(G ^{L11})	
(G ^{L3-4})	 donde el grupo NO₂ es opcional	(G ^{L12})	
(G ^{L4})	 donde Hal = I, Br, Cl	(G ^{L13})	
(G ^{L5})		(G ^{L14})	

donde Ar representa un grupo arileno C5-6, por ejemplo, fenileno, y X representa alquilo C1-4.

En algunas realizaciones, G^L se selecciona entre G^{L1-1} y G^{L1-2}. En algunas de estas realizaciones, G^L es G^{L1-1}.

X

X es preferiblemente:



donde a = de 0 a 5, b1 = de 0 a 16, b2 = de 0 a 16, c = 0 o 1, d = de 0 a 5, donde al menos b1 o b2 = 0 y al menos c1 o c2 = 0.

a puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, a es de 0 a 3. En algunas de estas realizaciones, a es 0 o 1. En otras realizaciones, a es 0.

b1 puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunas realizaciones, b1 es de 0 a 12. En algunas de estas realizaciones, b1 es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 3, 4, 5 u 8.

b2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunas realizaciones, b2 es de 0 a 12. En algunas de estas realizaciones, b2 es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 3, 4, 5 u 8. Preferiblemente, solo uno de entre b1 y b2 puede no ser 0.

c1 puede ser 0 o 1. c2 puede ser 0 o 1. Preferiblemente, solo uno de entre c1 y c2 puede no ser 0.

d puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, d es de 0 a 3. En algunas de estas realizaciones, d es 1 o 2. En otras realizaciones, d es 2. En otras realizaciones, d es 5.

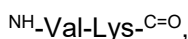
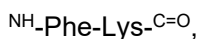
En algunas realizaciones de X, a es 0, b1 es 0, c1 es 1, c2 es 0 y d es 2, y b2 puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, b2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunas realizaciones de X, a es 1, b2 es 0, c1 es 0, c2 es 0 y d es 0, y b1 puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, b1 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunas realizaciones de X, a es 0, b1 es 0, c1 es 0, c2 es 0 y d es 1, y b2 puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, b2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunas realizaciones de X, b1 es 0, b2 es 0, c1 es 0, c2 es 0 y uno de entre a y d es 0. El otro de entre a y d es de 1 a 5. En algunas de estas realizaciones, el otro de entre a y d es 1. En otras de estas realizaciones, el otro de entre a y d es 5. En algunas realizaciones de X, a es 1, b2 es 0, c1 es 0, c2 es 1, d es 2 y b1 puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, b2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8.

Q^x

En algunas realizaciones, Q es un residuo aminoacídico. El aminoácido puede ser un aminoácido natural o un aminoácido no natural. Por ejemplo, Q puede seleccionarse de: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg y Trp, donde Cit es citrulina.

En algunas realizaciones, Q comprende un residuo dipeptídico. Los aminoácidos en el dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el dipéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el ligador es un ligador lábil por acción de la catepsina, el dipéptido es el sitio de acción para una escisión mediada por la catepsina. El dipéptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina.

En algunas realizaciones, Q se selecciona de:



NH-Ala-Lys-C=O,

NH-Val-Cit-C=O,

NH-Phe-Cit-C=O,

NH-Leu-Cit-C=O,

5 NH-Ile-Cit-C=O,

NH-Phe-Arg-C=O,

NH-Trp-Cit-C=O y

NH-Gly-Val-C=O;

donde Cit es citrulina.

10 Preferentemente, Q se selecciona entre:

NH-Phe-Lys-C=O,

NH-Val-Ala-C=O,

NH-Val-Lys-C=O,

NH-Ala-Lys-C=O y

15 NH-Val-Cit-C=O.

Más preferiblemente, Q se selecciona entre NH-Phe-Lys-C=O, NH-Val-Cit-C=O o NH-Val-Ala-C=O.

Otras combinaciones de dipéptidos adecuadas incluyen:

NH-Gly-Gly-C=O,

20 NH-Gly-Val-C=O

NH-Pro-Pro-C=O y

NH-Val-Glu-C=O.

25 Se pueden utilizar otras combinaciones de dipéptidos, incluidas las descritas en Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, que se incorpora a la presente por referencia.

30 En algunas realizaciones, Q es un residuo tripeptídico. Los aminoácidos en el tripeptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el tripeptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el ligador es un ligador lábil por acción de la catepsina, el tripeptido es el sitio de acción para una escisión mediada por la catepsina. El tripeptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina. Los ligadores tripeptídicos de interés particular son:

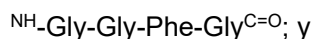
NH-Glu-Val-Ala-C=O

NH-Glu-Val-Cit-C=O

NH-αGlu-Val-Ala-C=O

35 NH-αGlu-Val-Cit-C=O

En algunas realizaciones, Q es un residuo tetrapeptídico. Los aminoácidos en el tetrapéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el tetrapéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el ligador es un ligador lábil por acción de la catepsina, el tetrapéptido es el sitio de acción para una escisión mediada por la catepsina. El tetrapéptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina. Los ligadores tetrapeptídicos de interés particular son:

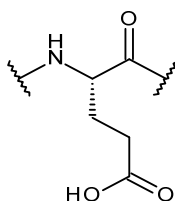


En algunas realizaciones, el tetrapéptido es:

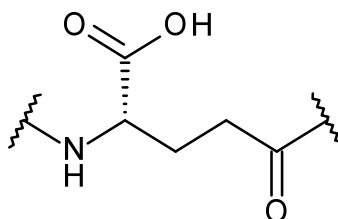


En las representaciones anteriores de residuos peptídicos, NH- representa el extremo N y -C=O representa el extremo C del residuo. El C-terminal se une al NH de la "Unidad de fármaco" (por ejemplo, A* como se explica a continuación).

Glu representa el residuo de ácido glutámico, es decir:



αGlu representa el residuo de ácido glutámico cuando se une mediante la cadena α , es decir:



En algunas realizaciones, la cadena lateral del aminoácido se protege químicamente, cuando sea adecuado. El grupo protector de la cadena lateral puede ser un grupo tal como se ha discutido anteriormente. Las secuencias de aminoácidos protegidas son escindidas por enzimas. Por ejemplo, una secuencia dipeptídica que comprenda un residuo de Lys en la cadena lateral protegido con Boc puede ser escindida por la catepsina.

Los grupos protectores para las cadenas laterales de los aminoácidos son muy conocidos en la técnica y se describen en el catálogo de Novabiochem y como se ha descrito anteriormente.

LIGADOR IB

R^{L1} y R^{L2} pueden seleccionarse independientemente entre H y metilo o, junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo de ciclopropileno o ciclobutileno.

En algunas realizaciones, tanto R^{L1} como R^{L2} son H. En algunas realizaciones, R^{L1} es H y R^{L2} es metilo. En algunas realizaciones, R^{L1} y R^{L2} son ambos metilo.

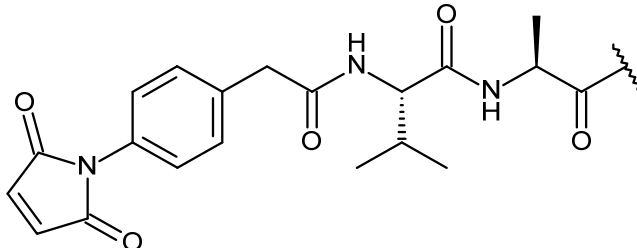
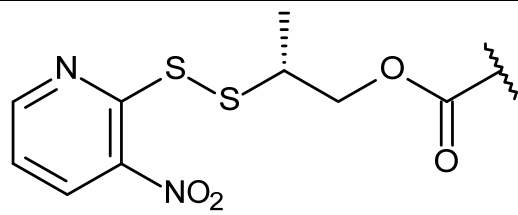
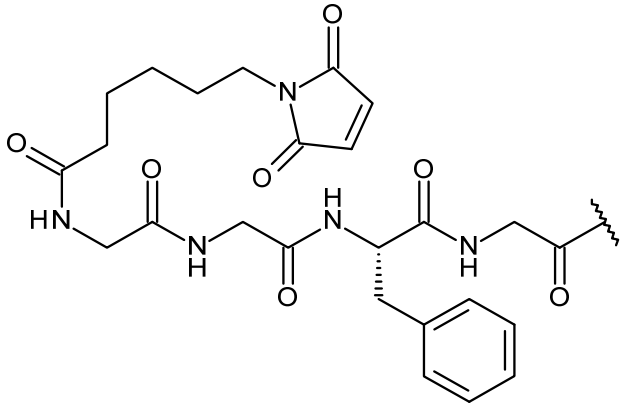
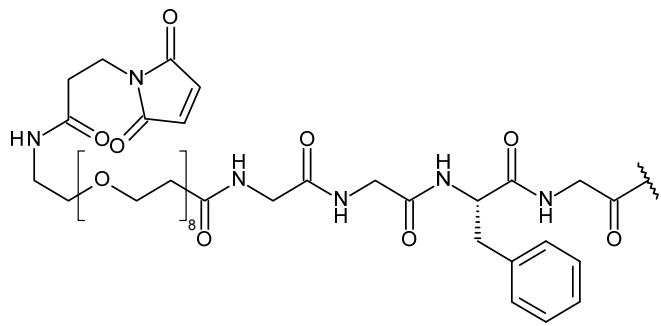
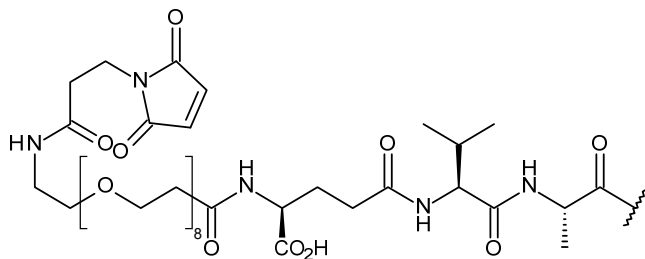
En algunas realizaciones, R^{L1} y R^{L2} , junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo ciclopropileno. En algunas realizaciones, R^{L1} y R^{L2} , junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo ciclobutileno.

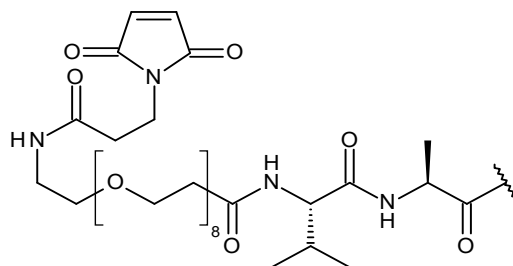
En el grupo Ib, en algunas realizaciones, e es 0. En otras realizaciones, e es 1 y el grupo nitro puede estar en cualquier posición disponible del anillo. En algunas de estas realizaciones, se encuentra en la posición orto. En otras de estas realizaciones, se encuentra en la posición para.

 R^L

En algunas realizaciones, R^L se selecciona entre:

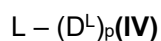
(i)	
(ii)	
(iii)	
(iv)	

(v)	
(vi)	
(vii)	
(viii)	
(ix)	



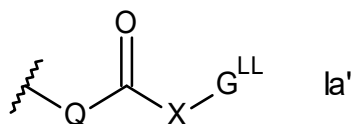
Preferentemente, R^L es

Por ejemplo, un conjugado (por ejemplo, conjugado de anticuerpo-fármaco) de la invención puede ser de la fórmula general IV:



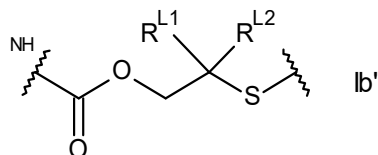
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde L es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, D^L es una "Unidad de Fármaco" (por ejemplo, citotoxina tal como TOPOi) que tiene un ligador R^{LL} conectado al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, donde el ligador se selecciona preferentemente de

(Ia'):



donde Q y X son tal como se han definido anteriormente y G^{LL} es un ligador conectado a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención; y

(Ib'):



donde R^{L1} y R^{L2} son tal como se han definido anteriormente; y

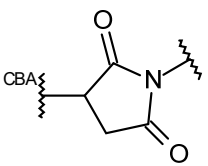
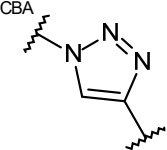
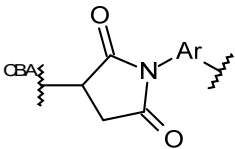
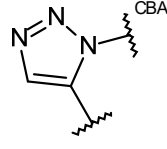
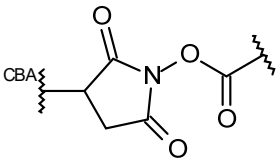
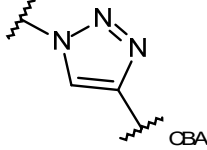
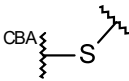
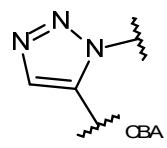
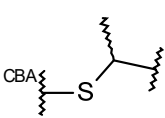
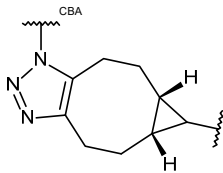
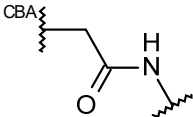
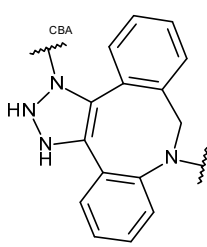
p es un número entero de 1 a 20.

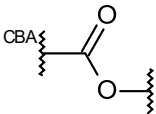
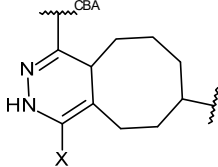
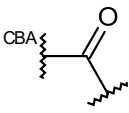
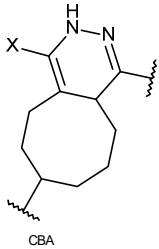
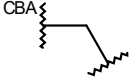
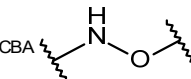
La carga de fármaco está representada por p, el número de "Unidades de fármaco" (p. ej., citotoxina como TOPOi) por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. La carga

de fármaco puede oscilar desde 1 hasta 20 unidades de fármaco (D) por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Para las composiciones, p representa la cantidad promedio de fármaco de los conjugados en la composición y p está comprendida en el intervalo de 1 a 20. En algunas realizaciones, el intervalo de p se selecciona de 1 a 10, 2 a 10, 2 a 8, 2 a 6, y 4 a 10; preferentemente donde p es 8.

G^{LL}

G^{LL} se puede seleccionar entre:

(G ^{LL1-1})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL10})	
(G ^{LL-4})		(G ^{LL11})	

(G ^{LL5})		(G ^{LL12})	
(G ^{LL6})		(G ^{LL13})	
(G ^{LL7})		(G ^{LL14})	

donde Ar representa un grupo arileno C₅₋₆, por ejemplo, fenileno y X representa alquilo

C₁₋₄.

En algunas realizaciones, G^{LL} se selecciona entre G^{LL1-1} y G^{LL1-2}. En algunas realizaciones, G^{LL} es G^{LL1-1}.

En algunas realizaciones, R^{LL} es un grupo derivado de los grupos R^L anteriores.

Un experto en la técnica reconocerá que cualquiera o más de los grupos químicos, fracciones y características dados a conocer en el presente documento pueden combinarse de múltiples formas para formar ligadores útiles para la conjugación de los anticuerpos y las citotoxinas tal como se da a conocer en el presente documento.

En algunas realizaciones donde los compuestos descritos en el presente documento se proporcionan en un enantiómero único o en forma enantioméricamente enriquecida, la forma enantioméricamente enriquecida tiene una relación enantiomérica mayor de 60:40, 70:30; 80:20 o 90:10. En otras realizaciones, la relación enantiomérica es superior a 95:5, 97:3 o 99:1.

CITOTOXINA

En realizaciones preferidas, el agente heterólogo es una citotoxina (también denominada agente citotóxico). El agente citotóxico o citotoxina puede ser cualquier molécula conocida en la técnica que inhibe o impide la función de células y/o provoca la destrucción de células (muerte celular), y/o ejerce efectos antineoplásicos/antiproliferativos. Se sabe que varias clases de agentes citotóxicos tienen una utilidad potencial en las moléculas de ADC. Los agentes citotóxicos adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la topoisomerasa I (TOPOi), amanitinas, auristatinas, daunomicinas, doxorubicinas, duocarmicinas, dolastatinas, enediinas, lexitropsinas, taxanos, puromicinas, maitansinoides, alcaloides de la vinca, tubulisin y pirrolobenzodiazepinas (PBD). Ejemplos de tales agentes citotóxicos son AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel,

docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, echinomicina, combretatestatina, chaliceamicina, maitansina, DM-1, vinblastina, metotrexato y netropsina, y derivados y análogos de los mismos. Se puede encontrar una divulgación adicional con respecto a las citotoxinas adecuadas para su uso en los ADC, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente Internacional N.º de publicación WO 2015/155345 y WO 2015/157592, incorporadas en el presente documento por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado a una o más citotoxinas seleccionadas de un inhibidor de la topoisomerasa I, derivado de tubulisina, una pirrolobenzodiazepina o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede estar conjugado con una o más citotoxinas seleccionadas del grupo que consiste en inhibidor de la topoisomerasa I SG3932 (también conocidos como AZ14170133), SG4010, SG4057 o SG4052 (las estructuras de las cuales se proporcionan a continuación), o una combinación de los mismos. Se prefiere que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo pueda conjugarse con un inhibidor de la topoisomerasa I, más preferentemente el inhibidor de la topoisomerasa I SG3932.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención no está conjugado con, o el ADC anti-FR α de la invención no comprende, un inhibidor de microtúbulos tal como un inhibidor de tubulina (por ejemplo, maitansinoides, auristatinas). La clase de moléculas inhibidoras de microtúbulos experimenta toxicidades potencialmente difíciles de tratar que limitan la dosificación.

INHIBIDOR DE LA TOPOISOMERASA I

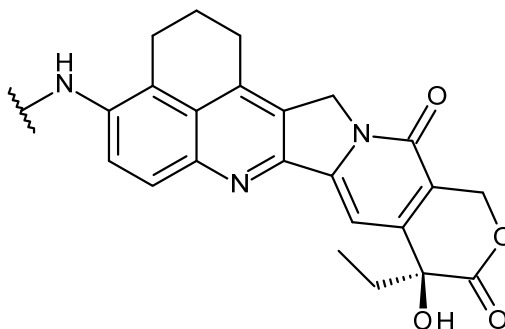
La presente invención demuestra los primeros ADC anti-FR α que utilizan una carga útil inhibidora de la topoisomerasa I (TOPOi). Además, usando modelos *in vivo* e *in vitro*, los inventores han demostrado la estabilidad y eficacia de los mAb anti-FR α cuando se conjugan con una carga útil de TOPOi y se implementan como ADC.

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un ADC que comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención) conjugado con una carga útil TOPOi. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con, o el ADC anti-FR α de la invención comprende, un inhibidor de la topoisomerasa I.

Los inhibidores de la topoisomerasa son compuestos químicos que bloquean la acción de la topoisomerasa (topoisomerasa I y II), la cual es un tipo de enzima que controla los cambios en la estructura del ADN que la ruptura y la unión del esqueleto de fosfodiéster de las hebras

de ADN durante el ciclo celular normal. Los inhibidores de la topoisomerasa I son ventajosos ya que median en la destrucción de células tumorales de forma muy eficaz con menos toxicidades para el paciente. En particular, se sabe que las cargas útiles alternativas tal como el inhibidor de microtúbulos que generalmente se han usado hasta la fecha para el desarrollo de ADC anti-FR α tienen problemas de toxicidad (Hinrichs, et al. AAPS J. 2015 Sep; 17(5): 1055-1064). Además, el uso de un ligador menos hidrófobo con una ojiva menos potente (por ejemplo, TOPOi) facilitaría la muerte por parte de los transeúntes en tumores heterogéneos. Aunque la actividad de la activación inespecífica puede lograrse aumentando la potencia y/o mejorando la permeabilidad de la ojiva a través de una mayor hidrofobicidad, esto puede dar como resultado una mayor toxicidad debido a una absorción no específica.

Un ejemplo general de un inhibidor de la topoisomerasa I adecuado se representa por el siguiente compuesto:



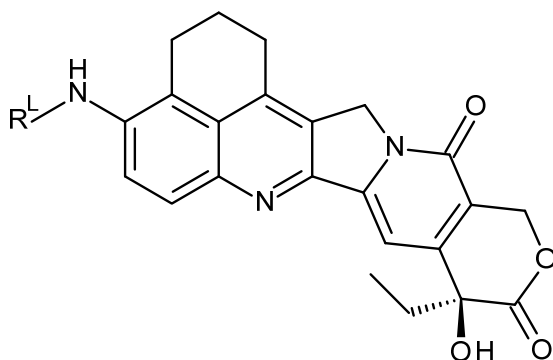
A*

Dicho compuesto se indica como A*, y puede denominarse como una "unidad de fármaco" en el presente documento.

El compuesto (por ejemplo, A*) está preferiblemente provisto de un ligador para conectar (preferiblemente conjugar) con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. En realizaciones preferidas, el ligador se une (por ejemplo, se conjuga) de manera escindible a un residuo amino, por ejemplo, un aminoácido de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

Más particularmente, un ejemplo de un inhibidor de la topoisomerasa I adecuado se representa por el siguiente compuesto, con la fórmula "I":

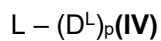
72



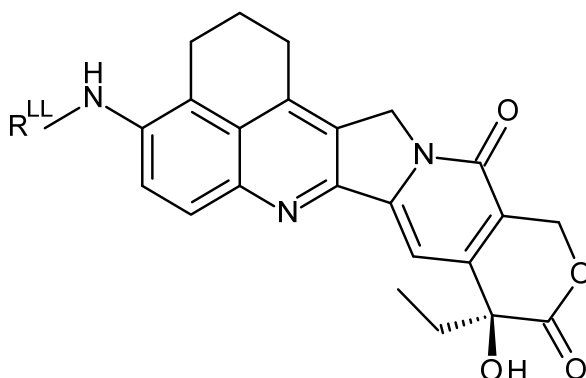
I

y sales y solvatos del mismo, donde R^L se define anteriormente.

Por consiguiente, por un conjugado (por ejemplo, conjugado de anticuerpo-fármaco) de la invención tiene la fórmula general IV:



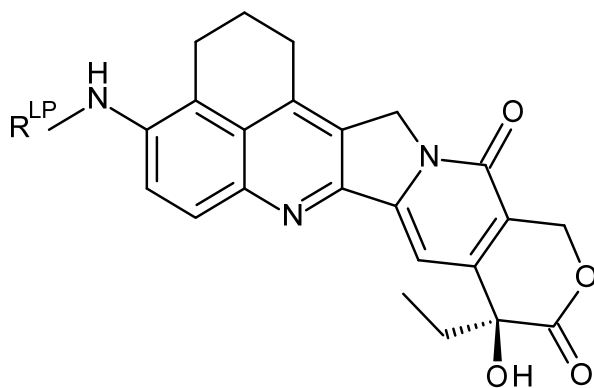
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde L y p se definen anteriormente, D^L es un inhibidor de la topoisomerasa I que tiene un ligador (por ejemplo, unidad de fármaco ligador) que es de fórmula III:



III

y sales y solvatos del mismo, donde R^{LL} se define anteriormente.

En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula I es de la fórmula I^P:

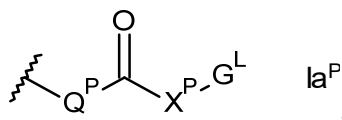
I^P

;

y sales y solvatos del mismo, donde R^{LP} es un ligador para la conexión a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, donde dicho ligador se selecciona de:

(Ia^P):

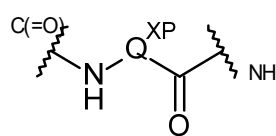
5



donde

Q^P es:

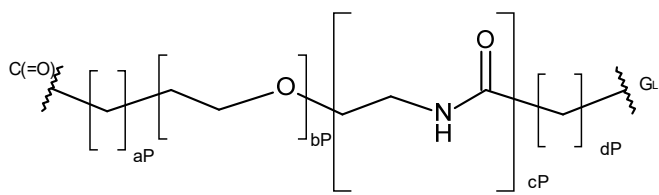
10



, donde Q^{XP} es tal que Q^P es un residuo aminoácido, un residuo dipeptídico o un residuo tripeptídico;

X^P es:

15



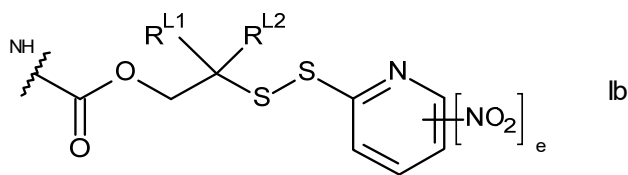
20

donde aP = de 0 a 5, bP = de 0 a 16, cP = 0 o 1, dP = de 0 a 5;

G^L se definió anteriormente;

(Ib):

25



donde R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente entre H y metilo o, junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo de ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1.

30

aP puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, aP es de 0 a 3. En algunas de estas realizaciones, aP es 0 o 1. En otras realizaciones, aP es 0.

bP puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunas realizaciones, b es de 0 a 12. En algunas de estas realizaciones, bP es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 4 u 8.

35

cP puede ser 0 o 1.

dP puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, dP es de 0 a 3. En algunas de estas realizaciones, dP es 1 o 2. En otras realizaciones, dP es 2.

En algunas realizaciones de X^P, aP es 0, cP es 1 y dP es 2, y bP puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, bP es 0, 4 u 8.

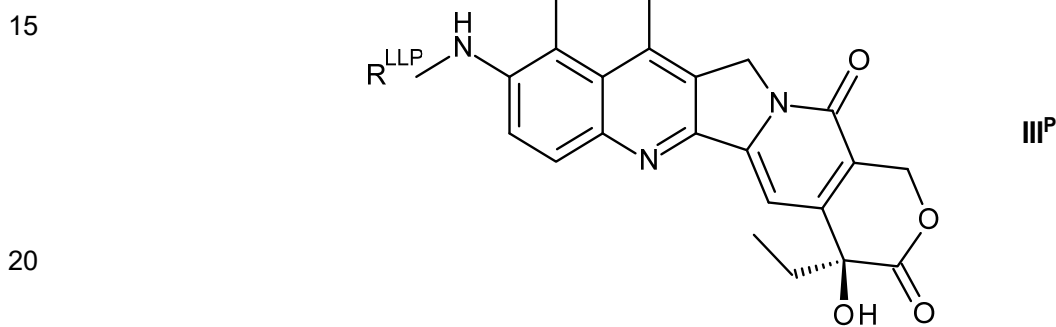
5 Las preferencias para Q^X anteriores para compuestos de Fórmula I se pueden aplicar a Q^{X^P} (por ejemplo, cuando sea adecuado).

Las preferencias para G^L, R^{L1}, R^{L2} y e anteriores para compuestos de Fórmula I se pueden aplicar a compuestos de Fórmula I^P.

En algunas realizaciones, el conjugado de fórmula IV es de fórmula IV^P:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde L es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, D^{LP} es un inhibidor de la topoisomerasa I (por ejemplo, unidad de fármaco ligador) que es de fórmula III^P:



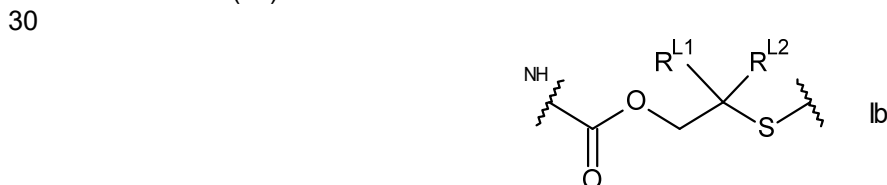
R^{LLP} es un ligador conectado al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde dicho ligador se selecciona de

(Ia^P):



donde Q^P, X^P y G^{LL} son tal como se definen anteriormente; y

(Ib'):

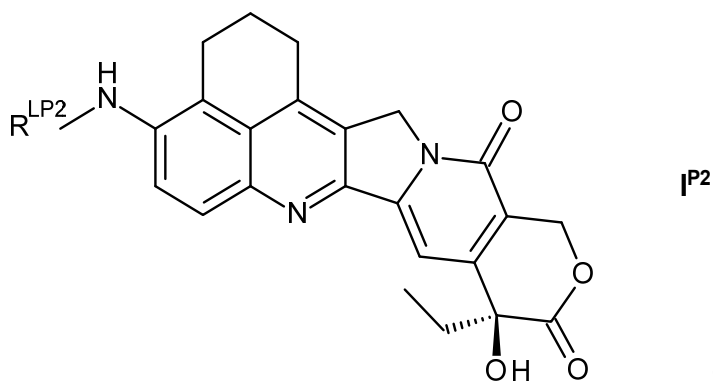


donde R^{L1} y R^{L2} son como se han definido anteriormente; y

p es un número entero de 1 a 20.

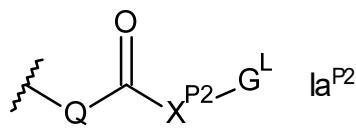
En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula I es de fórmula I^{P2}:

75



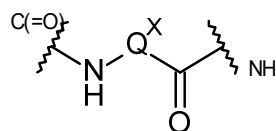
y sales y solvatos del mismo, donde R^{LP2} es un ligador para la conexión a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, donde dicho ligador se selecciona de:

(Ia^{P2}):



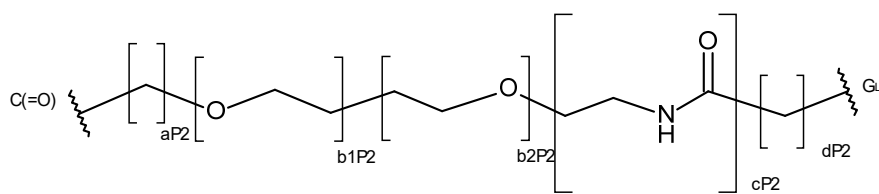
donde

Q es:



, donde Q^X es tal que Q es un residuo aminoacídico, un residuo dipeptídico, un residuo tripeptídico o un residuo tetrapeptídico;

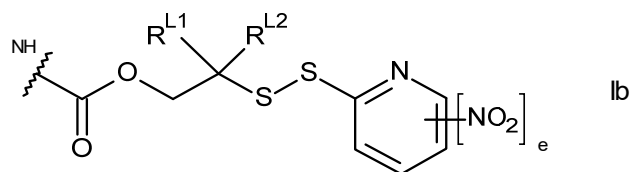
X^{P2} es:



donde $aP2 =$ de 0 a 5, $b1P2 =$ de 0 a 16, $b2P2 =$ de 0 a 16, $cP2 =$ 0 o 1, $dP2 =$ de 0 a 5, donde al menos $b1P2$ o $b2P2 =$ 0 (es decir, solo uno de entre $b1$ y $b2$ puede no ser 0);

G^L es un ligador para conectar a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención;

(Ib):



5 donde R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente entre H y metilo o, junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo de ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1.

10 aP2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, aP2 es de 0 a 3. En algunas de estas realizaciones, aP2 es 0 o 1. En otras realizaciones, aP2 es 0.

10 b1P2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunas realizaciones, b1P2 es de 0 a 12. En algunas de estas realizaciones, b1P2 es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 3, 4, 5 u 8.

15 b2P2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunas realizaciones, b2P2 es de 0 a 12. En algunas de estas realizaciones, b2P2 es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 3, 4, 5 u 8.

Preferiblemente, solo uno de entre b1P2 y b2P2 puede no ser 0.

cP2 puede ser 0 o 1.

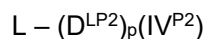
20 dP2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, dP2 es de 0 a 3. En algunas de estas realizaciones, dP2 es 1 o 2. En otras realizaciones, dP2 es 2. En otras realizaciones, dP2 es 5.

25 En algunas realizaciones de X^{P2} , aP2 es 0, b1P2 es 0, cP2 es 1 y dP2 es 2, y b2P2 puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, b2P2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunas realizaciones de X^{P2} , aP2 es 1, b2P2 es 0, cP2 es 0 y dP2 es 0, y b1P2 puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, b1P2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunas realizaciones de X^{P2} , aP2 es 0, b1P2 es 0, cP2 es 0 y dP2 es 1, y b2P2 puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, b2P2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunas realizaciones de X^{P2} , b1P2 es 0, b2P2 es 0, cP2 es 0 y uno de entre aP2 y dP2 es 0. El otro de entre aP2 y d es de 1 a 5. En algunas de estas realizaciones, el otro de entre aP2 y d es 1. En otras de estas realizaciones, el otro de entre aP2 y dP2 es 5.

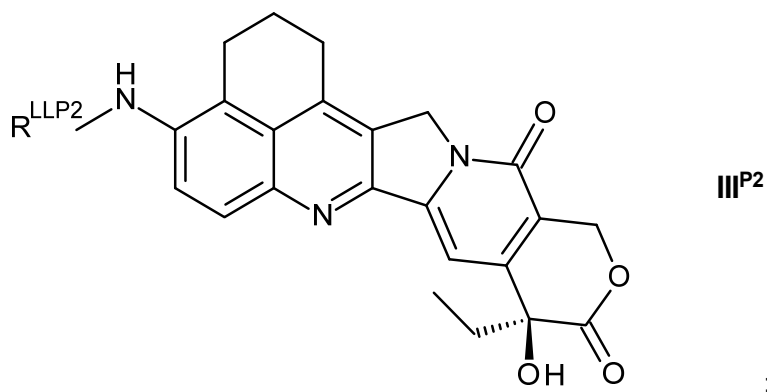
30 Las preferencias para Q^X anteriores para compuestos de Fórmula I se pueden aplicar a Q^X en la Fórmula Ia^{P2} (por ejemplo, cuando sea adecuado).

Las preferencias para G^L , R^{L1} , R^{L2} y e anteriores para compuestos de Fórmula I se pueden aplicar a compuestos de Fórmula IP².

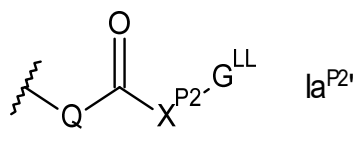
35 En algunas realizaciones, el conjugado de fórmula IV es de fórmula IV^{P2}:



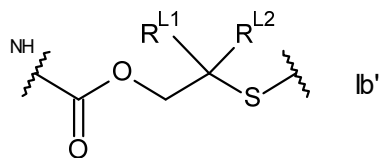
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde L es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, D^{LP2} es un inhibidor de la topoisomerasa I (por ejemplo, unidad de fármaco ligador) que es de fórmula III^{P2}:



R^{LLP2} es un ligador conectado al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde dicho ligador se selecciona de (Ia^{P2'}):

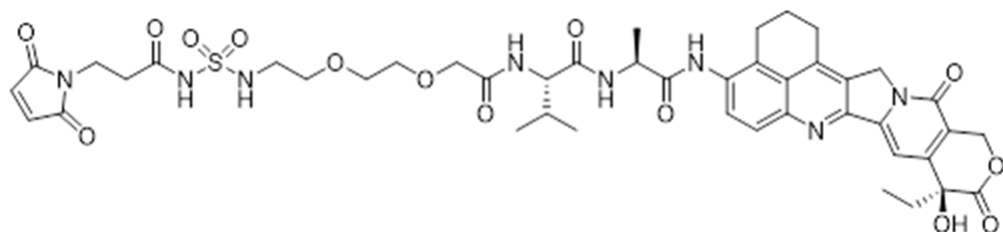
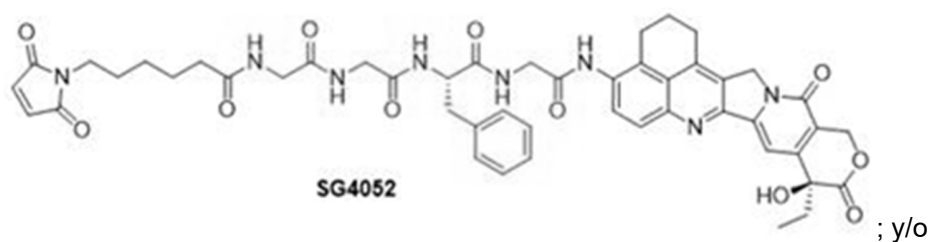
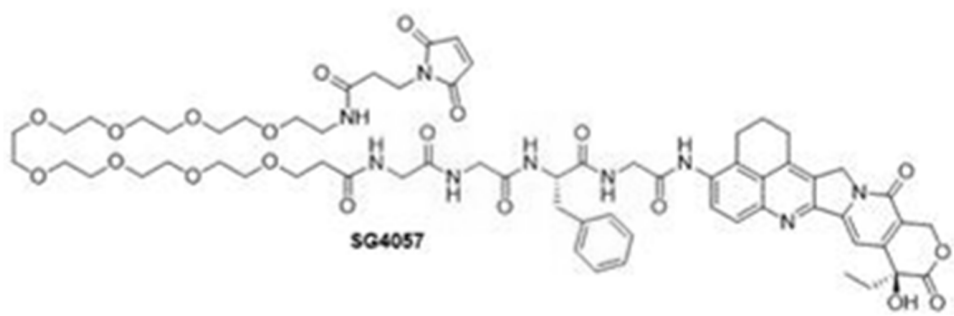
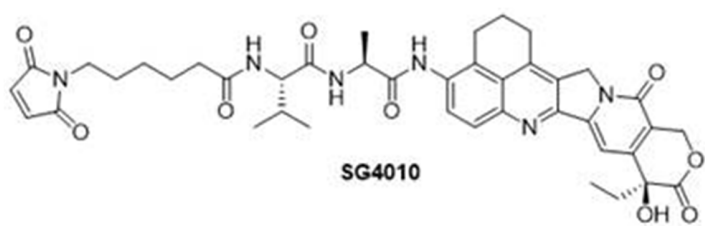
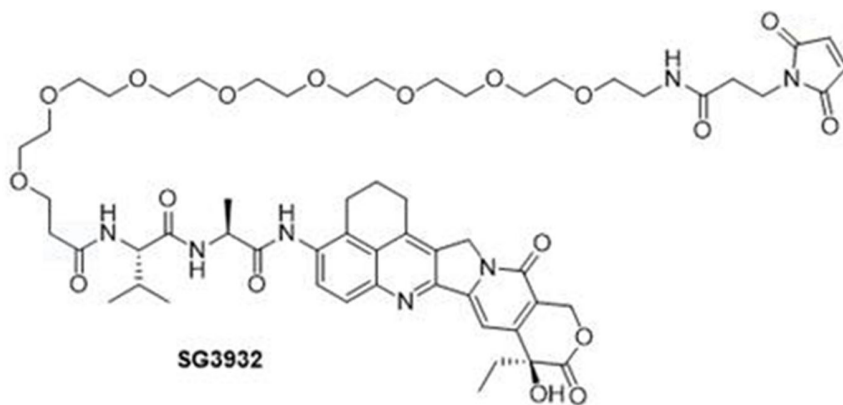


donde Q y X^{P2} son tal como se definen anteriormente y G^{LL} es un ligador conectado al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; y (Ib'):

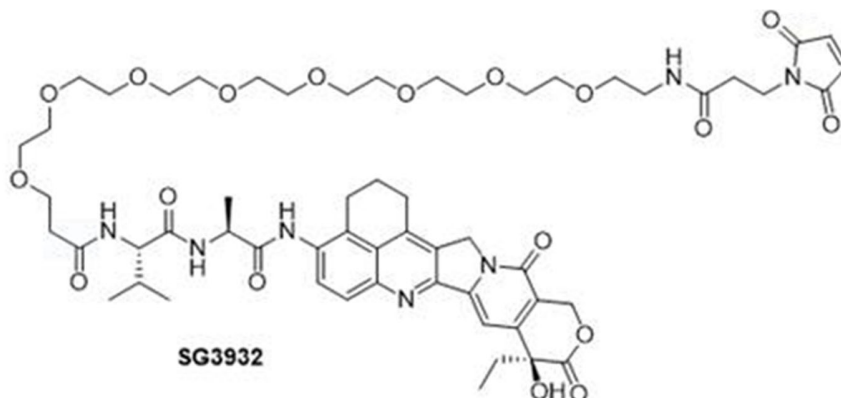


donde R^{L1} y R^{L2} son como se han definido anteriormente; y p es un número entero de 1 a 20.

Los inhibidores de la topoisomerasa I particularmente adecuados incluyen aquellos que tienen las siguientes fórmulas:



SG3932 se prefiere particularmente. Por tanto, en una realización preferida, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I que tiene la siguiente fórmula (por ejemplo, SG3932):

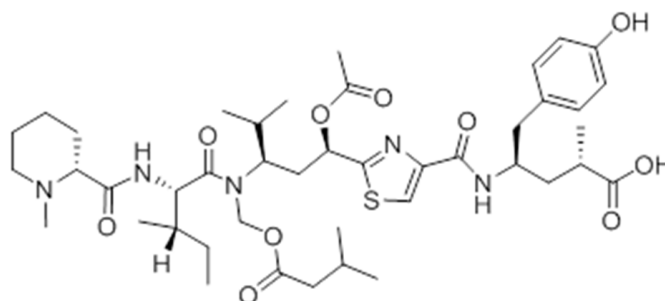


Los métodos sintéticos para producir inhibidores de topoisomerasa I se describen, por ejemplo, en el documento WO 2020/200880, que se incorpora en el presente documento como referencia.

Aunque se prefieren inhibidores de la topoisomerasa I tal como se ha descrito anteriormente, debe observarse que cualquiera agente adecuado (por ejemplo, fármaco/citotoxina) puede unirse a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de la invención. Ejemplos de otros agentes adecuados se describen a continuación.

TUBULISINA Y PIRROLOBENZODIAPEZINA

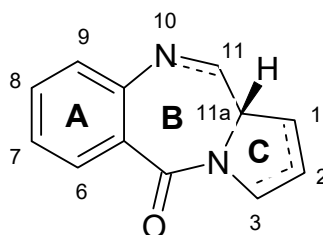
En algunas realizaciones, la citotoxina es una tubulisina o derivado de tubulisina. En algunas realizaciones, la citotoxina es tubulisina A, que tiene la siguiente estructura química:



Las tubulisinas son miembros de una clase de productos naturales aislados de especies mixobacterianas. Como agentes que interactúan con el citoesqueleto, las tubulisinas son venenos mitóticos que inhiben la polimerización de tubulina y conducen a la detención del ciclo celular y apoptosis. Como se usa en el presente documento, el término “tubulisina” se refiere tanto colectiva como individualmente a las tubulisinas de origen natural, y a análogos y derivados de tubulisinas. Se divulgan ejemplos ilustrativos de tubulisinas, por ejemplo, en los documentos WO2004005326A2, WO2012019123A1, WO2009134279A1, WO2009055562A1, WO2004005327A1, US7776841, US7754885, US20100240701, US7816377, US20110021568 y US20110263650, incorporados en el presente documento por referencia. Ha de entenderse

que tales derivados incluyen, por ejemplo, profármacos de tubulicina o tubulinas que incluyen uno o más grupos de protección o protectores, una o más fracciones de unión.

En otra realización, la citotoxina puede ser una pirrolobenzodiazepina (PBD) o un derivado de PBD. La PBD se transloca al núcleo, donde se entrecruza con el ADN, impidiendo la replicación durante la mitosis, dañando el ADN mediante la introducción de rupturas monocatenarias y, posteriormente, conduciendo a la apoptosis. Algunas PBD tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferente es PuGPu. Las PBD tienen la estructura general:



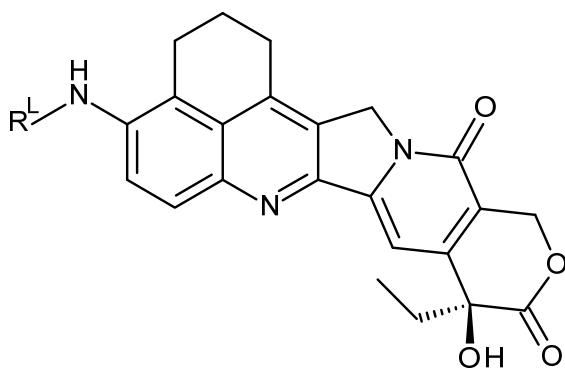
Las PBD difieren en el número, tipo y posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos aromáticos A como en los anillos pirrolo C, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) o un metil éter de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11, que es el centro electrófilo responsable de la alquilación del ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición C11a quiral que les proporciona un giro a la derecha cuando se observan desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional apropiada para la isohelicidad con el surco menor del ADN-B, lo que conduce a un ajuste ceñido en el sitio de unión. Su capacidad para formar un aducto en el surco menor les permite interferir con el procesamiento del ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales.

El primer antibiótico antitumoral de PBD, antramycin, se descubrió en 1965. Desde entonces se han notificado diversas PBD que se producen de manera natural y se han desarrollado más de 10 rutas sintéticas para dar una variedad de análogos. Los miembros de la familia incluyen abeimicina, chicamicina, DC-81, mazetramicina, neotramicinas A y B, porotramicina, protractarcina, sibanomycin (DC-102), sibiromicina y tomamicina. Las PBD y los ADC que los comprenden también se describen en los documentos WO 2015/155345 y WO 2015/157592, incorporados por referencia en su totalidad en la presente.

REALIZACIONES ESPECÍFICAS DE ADC

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-FR α o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con una citotoxina, o un ADC que comprende un anticuerpo anti-FR α o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con una citotoxina.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I, o el ADC anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. conjugado a un inhibidor de la topoisomerasa I, representado por el siguiente compuesto de fórmula "I":

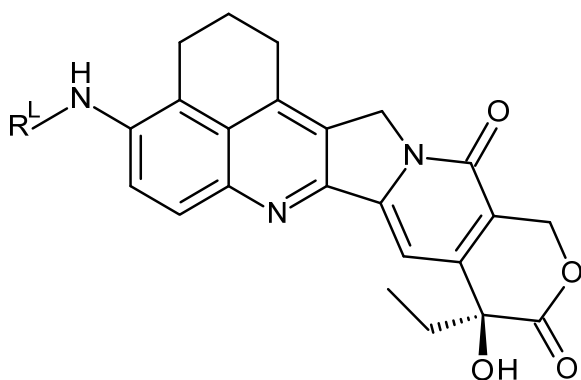


I

, donde R^L se definió anteriormente;

donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I, o el ADC anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. conjugado a un inhibidor de la topoisomerasa I, representado por el siguiente compuesto de fórmula "I":



I

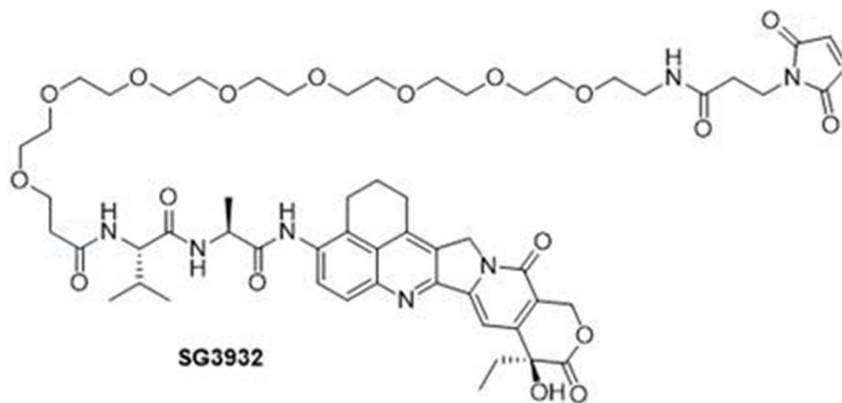
, donde R^L se definió anteriormente;

donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG3932, o el ADC anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG3932

5

10



15

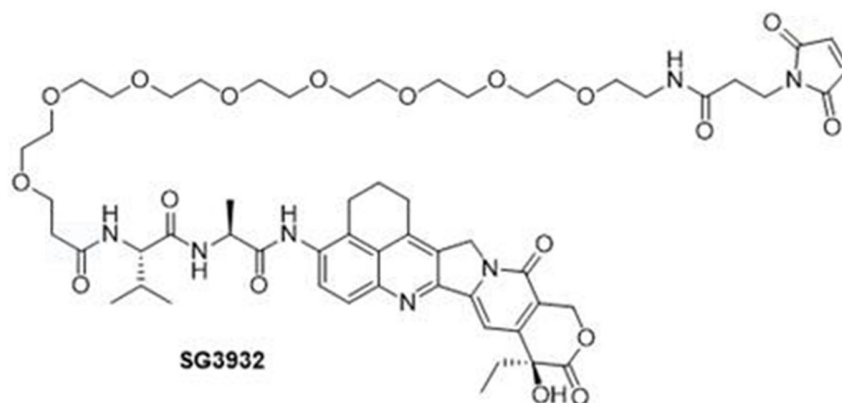
donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

20

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG3932, o el ADC anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG3932

25

30



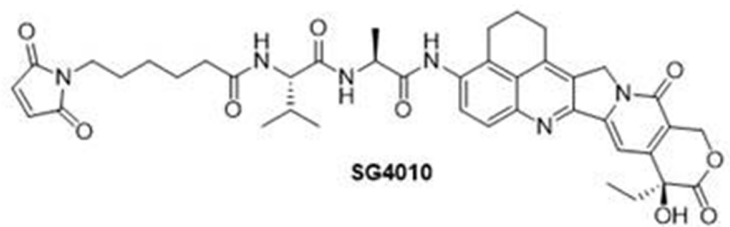
donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

35

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4010, o el ADC

anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4010

5



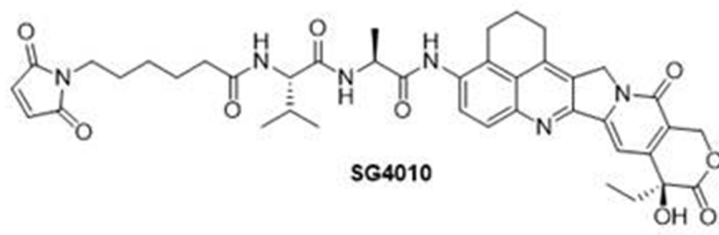
10

donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

15

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4010, o el ADC anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4010

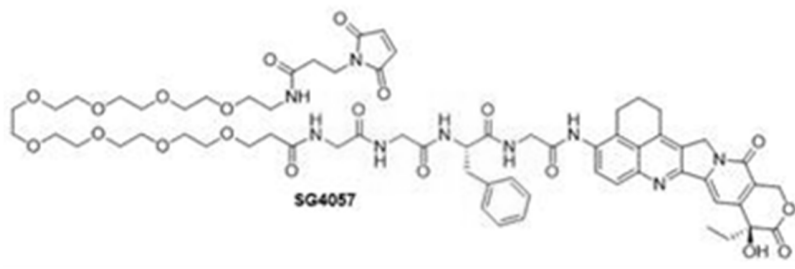
20



25

donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

30

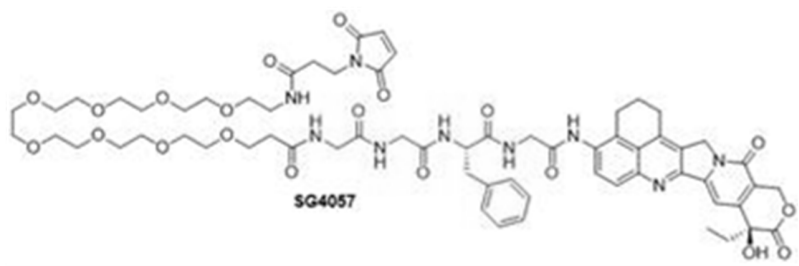


35

donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10,

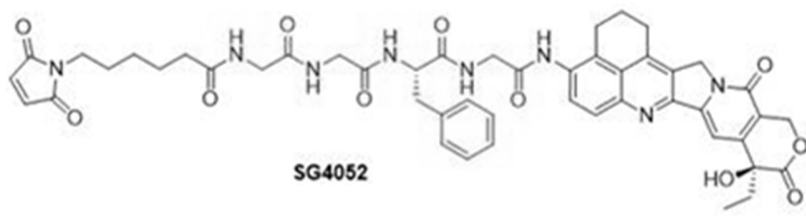
aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4057, o el ADC anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4057



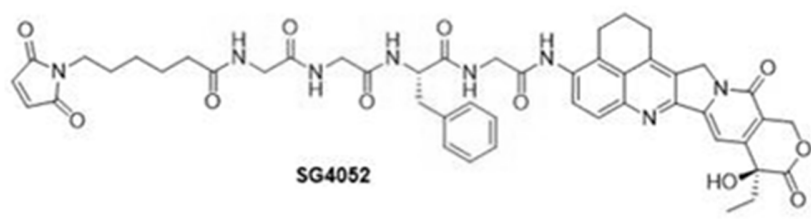
donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4052, o el ADC anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4052



donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención está conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4052, o el ADC anti-FR α de la invención comprende un anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención conjugado con un inhibidor de la topoisomerasa I SG4052

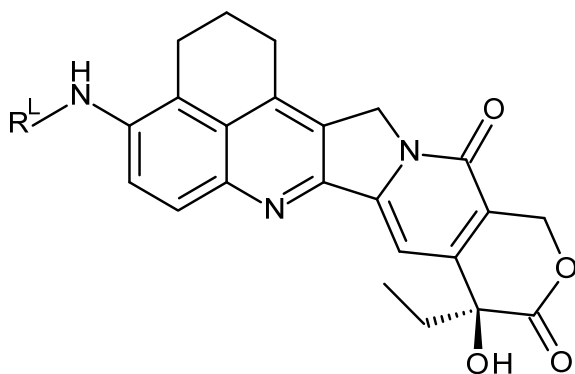


donde la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

En algunas realizaciones,

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I representado por el siguiente compuesto, con la fórmula "I":



I

, donde R^L se define

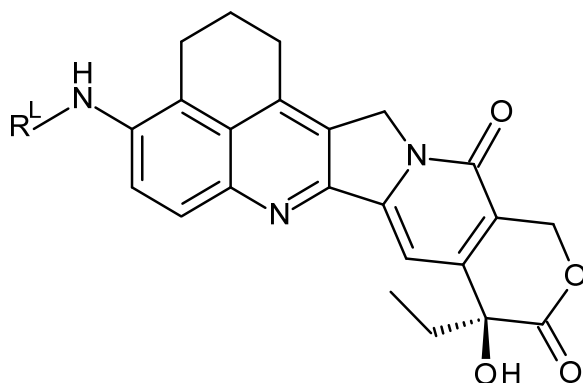
anteriormente; y

(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

En algunas realizaciones,

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I representado por el siguiente compuesto, con la fórmula "I":



I

, donde R^L se define

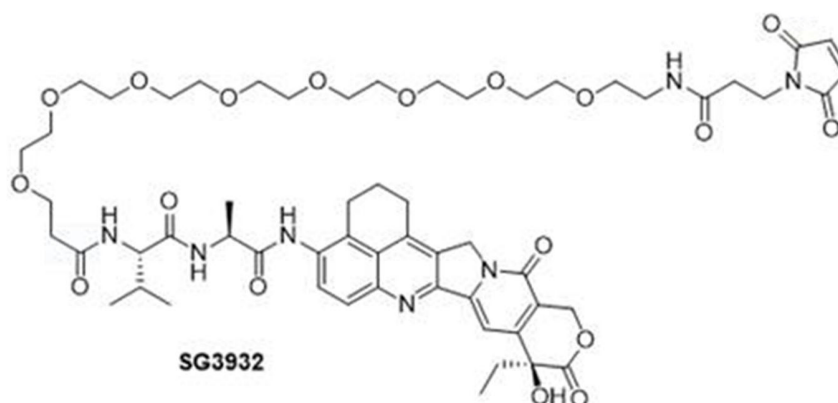
anteriormente; y

(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

En algunas realizaciones,

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I SG3932



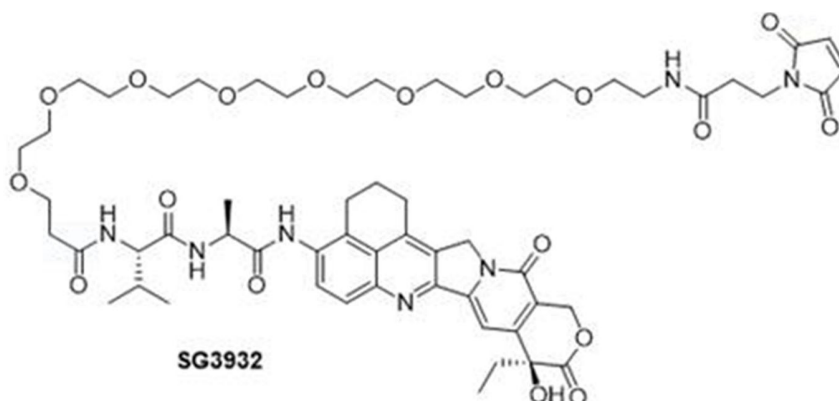
; y

(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

En algunas realizaciones,

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I SG3932



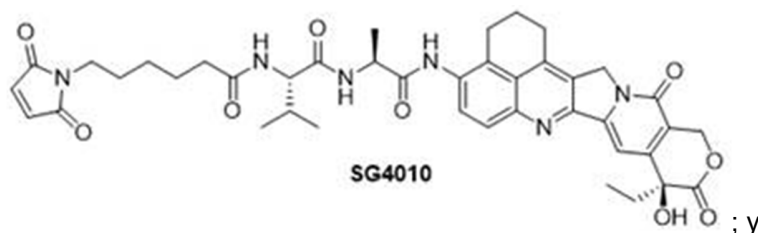
; y

(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

En algunas realizaciones,

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I SG4010



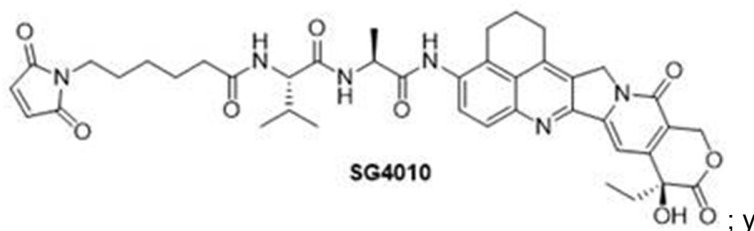
(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

En algunas realizaciones,

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I SG4010

91



5

(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

10

En algunas realizaciones,

15

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

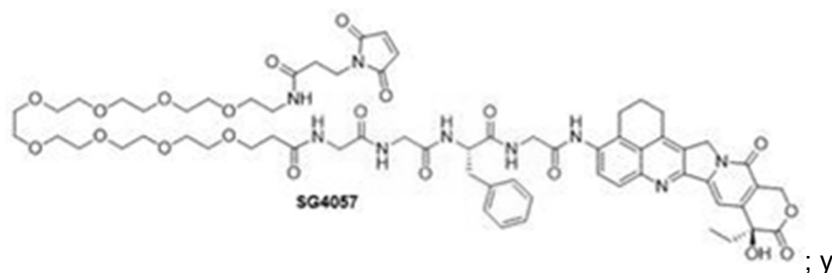
20

25

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I SG4057

30

35

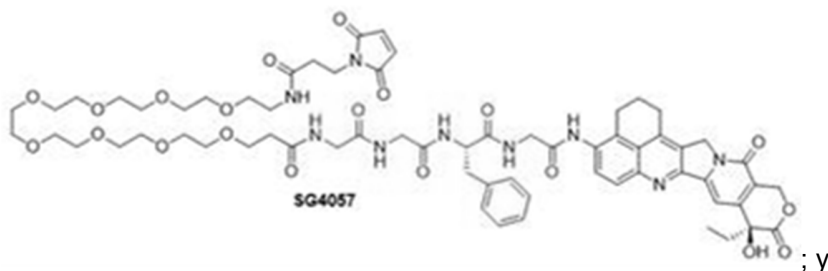


(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

En algunas realizaciones,

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I SG4057

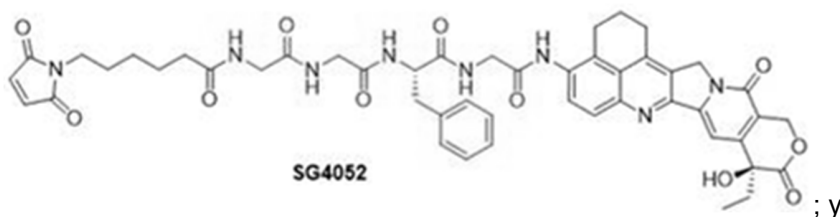


(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

En algunas realizaciones,

(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I SG4052



5

(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente 2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 8.

10

En algunas realizaciones,

15

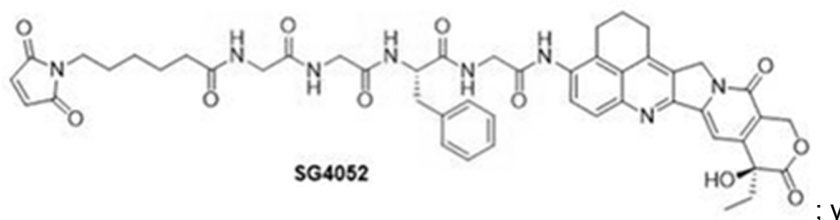
(i) el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (SDSATWN); una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS); una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 (GVGSFDY); una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (RASQSISSWLA); una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (KASGLES); y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 6 (QQYNSYSQLT), opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un VH con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y un VL con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38, opcionalmente donde el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 97% idéntica, al menos el 99% idéntica, o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50;

20

25

(ii) la citotoxina es un inhibidor de la topoisomerasa I SG4052

30



35

(iii) la DAR está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20, opcionalmente el intervalo de DAR se selecciona de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 2 a 10, aproximadamente

2 a 8, aproximadamente 2 a 6, y aproximadamente 4 a 10; preferentemente aproximadamente 4.

INTERNALIZACIÓN

La internalización puede ser una propiedad útil de un ADC. Por ejemplo, la internalización permite la administración de cargas útiles a una célula. Los inventores han demostrado que los anticuerpos y los ADC de la invención demostraron una rápida internalización y tráfico de lisosomas.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FR α o fragmento de antígeno del mismo, o el ADC anti-FR α de la invención se une a FR α en la superficie de una célula y se internaliza en la célula. En algunas realizaciones, la internalización del antígeno o fragmento de anticuerpo del mismo, o el ADC anti-FR α de la invención en una célula que expresa FR α se satura en aproximadamente 4 horas o menos, aproximadamente 5 horas o menos, aproximadamente 6 horas o menos, aproximadamente 7 horas o menos, aproximadamente 8 horas o menos, aproximadamente 9 horas o menos, aproximadamente 10 horas o menos, aproximadamente 11 horas o menos, o aproximadamente 12 horas o menos.

CITOTOXICIDAD

En algunas realizaciones, el ADC anti-FR α de la presente invención inhibe o suprime la proliferación (por ejemplo, de un tumor) en al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90% o aproximadamente 100% (preferentemente al menos el 40%) con respecto a un nivel de inhibición o supresión en ausencia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, ADC anti-FR α). Puede ensayarse la proliferación celular utilizando técnicas reconocidas en la técnica que miden la tasa de división celular y/o la fracción de células dentro de una población celular que experimenta división celular, y/o la tasa de pérdida de células de una población celular debido a diferenciación terminal o muerte celular (por ejemplo, incorporación de timidina).

En algunas realizaciones, el ADC anti-FR α de la presente invención ejerce citotoxicidad hacia una célula que expresa FR α a un valor de EC50 de aproximadamente 1000 ng/ml o menos, aproximadamente 500 ng/ml o menos, aproximadamente 400 ng/ml o menos, aproximadamente 300 ng/ml o menos, aproximadamente 290 ng/ml o menos, aproximadamente 280 ng/ml o menos, aproximadamente 270 ng/ml o menos, aproximadamente 260 ng/ml o menos, o aproximadamente 250 ng/ml o menos.

En algunas realizaciones, el ADC anti-FR α de la presente invención ejerce citotoxicidad hacia una célula que expresa FR α a un valor de IC50 de aproximadamente 100 μ g/ml o menos, aproximadamente 50 μ g/ml o menos, aproximadamente 25 μ g/ml o menos, aproximadamente 10 μ g/ml o menos, aproximadamente 5 μ g/ml o menos, aproximadamente 2.5 μ g/ml o menos,

aproximadamente 1 µg/ml o menos, aproximadamente 0.75 µg/ml o menos, aproximadamente 0.5 µg/ml o menos, aproximadamente 0.25 µg/ml o menos, aproximadamente 0.1 µg/ml o menos, aproximadamente 0.075 µg/ml o menos, aproximadamente 0.05 µg/ml o menos, aproximadamente 0.025 µg/ml o menos, aproximadamente 0.01 µg/ml o menos.

En algunas realizaciones, el ADC anti-FRα de la presente invención inhibe o suprime la proliferación de una población de células que tiene expresión heterogénea de FRα y/o una baja expresión de FRα. En algunas realizaciones, el ADC anti-FRα de la presente invención inhibe o suprime la proliferación de una población celular que tiene una expresión media de FRα (por ejemplo, Jeg-3, línea celular OVCAR-3 o células con un nivel similar o equivalente de expresión de FRα), expresión media-alta de FRα (por ejemplo, línea celular Igrov-1 o células con un nivel similar o equivalente de expresión de FRα), expresión alta de FRα (por ejemplo, línea celular KB o células con un nivel similar o equivalente de expresión de FRα).

PREPARACIÓN DE ADC O UN ANTICUERPO UNIDO A UN AGENTE HETERÓLOGO

Los anticuerpos unidos a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC) de la presente descripción pueden prepararse de diversas maneras, usando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos, tales como: (1) hacer reaccionar un sustituyente reactivo de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con un reactivo ligador bivalente, luego hacer reaccionar con un agente heterólogo (por ejemplo, citotoxina, preferentemente inhibidor de la topoisomerasa I); o (2) hacer reaccionar un sustituyente reactivo de un agente heterólogo (por ejemplo, citotoxina, preferentemente inhibidor de la topoisomerasa I) con un reactivo ligador bivalente, y luego hacer reaccionar con un sustituyente reactivo de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

Los sustituyentes reactivos que pueden estar presentes dentro de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en el presente documento, incluyen, sin limitación, grupos nucleófilos tales como (i) grupos amino N-terminales, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glicosilado. Los sustituyentes reactivos que pueden estar presentes dentro de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en el presente documento, incluyen, sin limitación, restos hidroxilo de residuos de serina, treonina y tirosina; restos amino de residuos de lisina; restos carboxilo de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico; y restos tiol de residuos de cisteína, así como restos propargilo, azido, haloarilo (por ejemplo, fluoroarilo), haloheteroarilo (por ejemplo, fluoroheteroarilo), haloalquilo y haloheteroalquilo de aminoácidos que no se producen de manera natural. En algunas realizaciones, los sustituyentes reactivos presentes dentro de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se da a conocer en el presente documento incluyen restos amina o tiol. Ciertos anticuerpos tienen

puentes de cisteína, que son disulfuros entre cadenas reducibles. Al tratar los anticuerpos con un agente reductor (tal como DL-ditiotreitol (DTT) y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP)), pueden volverse reactivos para la conjugación con reactivos ligadores. Cada puente de cisteína teóricamente dará como resultado la formación de dos nucleófilos tiol reactivos. La reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), que da como resultado la conversión de una amina en un tiol, puede usarse para introducir grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos. Se pueden usar uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína para insertar grupos tiol reactivos en un anticuerpo (o fragmento del mismo) (por ejemplo, preparar anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos). La ingeniería de anticuerpos con aminoácidos de cisteína reactivos se describe en la patente de EE.UU. n.º 7,521,541, que se incorpora como referencia en el presente documento.

En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener uno o más grupos hidrato de carbono que pueden cambiarse químicamente para contener uno o más grupos sulfhidrilo. El anticuerpo unido a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC) se forma luego por conjugación a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

En otro aspecto más, el anticuerpo puede contener uno o más grupos de hidratos de carbono que pueden oxidarse para producir un grupo aldehído (-CHO) (véase, por ejemplo, Laguzza et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55). La conjugación a través del aldehído correspondiente da como resultado la formación del anticuerpo unido a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC). Los protocolos adicionales para la modificación de proteínas para la unión o asociación de citotoxinas se describen en Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002). Los métodos para la conjugación de restos de ligador-fármaco con proteínas dirigidas a células tales como anticuerpos, inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos se encuentran, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5,208,020; Pat. de EE.UU. N.º 6,441,163; WO2005/037992; WO2005/081711; y WO2006/034488, cada una de las cuales se incorpora como referencia en el presente documento.

Las estrategias de conjugación convencionales para anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se basan en la conjugación aleatoria o estocásticamente de la carga útil al anticuerpo o fragmento, a través de lisinas o cisteínas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga estocásticamente con un agente heterólogo (por ejemplo, citotoxina, preferentemente inhibidor de la topoisomerasa I), por ejemplo, mediante reducción parcial del anticuerpo o fragmento, seguido de reacción con un agente deseado, con o sin un resto ligador adjunto. El anticuerpo o fragmento puede reducirse usando DTT u otro agente reductor para realizar una reducción similar, por ejemplo, TCEP. El agente con o sin un resto de ligador unido puede a continuación añadirse en un exceso molar al anticuerpo reducido o fragmento en presencia de DMSO. Después de la conjugación,

puede añadirse un agente desactivador tal como N-acetil-L-cisteína para extinguir el agente que no ha hecho reaccionar. A continuación, la mezcla de reacción puede purificarse (por ejemplo, mediante TFF, SEC-FPLC, CHT, centrifugación con filtro giratorio) y cambiar el tampón por PBS u otro tampón de formulación pertinente.

En algunas realizaciones, un agente (por ejemplo, citotoxina) está conjugado con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mediante conjugación específica de sitio. En algunas realizaciones, la conjugación específica del sitio de restos terapéuticos con anticuerpos usando residuos de aminoácidos reactivos en posiciones específicas produce preparaciones homogéneas de un anticuerpo unido a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC) con estequiometría uniforme.

La conjugación específica de sitio puede ser a través de un residuo de cisteína o un aminoácido no natural. En una realización preferible, el agente heterólogo (preferentemente citotoxina) está conjugado con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de al menos un residuo de cisteína. Se pueden modificar aminoácidos de cisteína en los sitios reactivos en un anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno de este) y que preferiblemente no forman enlaces de disulfuro intracatenarios ni intermoleculares (Junutula et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al. (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). En algunas realizaciones, el agente (por ejemplo, citotoxina) está conjugado con el anticuerpo o fragmento de antígeno de este a través de una sustitución de cisteína de al menos una de las posiciones 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 y 446, donde la numeración se corresponde con el índice de EU en Kabat. En algunas realizaciones, las posiciones de Kabat específicas son 239, 442, o ambas. En algunas realizaciones, las posiciones específicas son la posición de Kabat 442, una inserción de aminoácido entre las posiciones de Kabat 239 y 240, o ambas. En algunas realizaciones, el agente heterólogo (preferiblemente citotoxina) se conjuga con el anticuerpo o fragmento de antígeno del mismo a través de un enlace de tiol-maleimida. En algunos aspectos, la cadena lateral de aminoácido es una cadena lateral sulfhidrilo.

Cuando más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se hace reaccionar con un agente, el producto resultante puede ser una mezcla de anticuerpos unidos a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC) con una distribución de unidades de agente unidas a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía líquida tal como la interacción hidrófoba (HIC) pueden separar los compuestos en la mezcla por el valor de carga del agente. Pueden aislarse preparaciones de un anticuerpo unido a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC) con un único valor de carga de agente (p).

El número promedio de agentes por anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno) en los preparados de ADC procedentes de reacciones de conjugación se puede caracterizado utilizando métodos convencionales tales como UV, HPLC de fase inversa, HIC, espectrometría de masas, un ensayo ELISA y electroforesis. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en lo que se refiere a p. Mediante ELISA, se puede determinar el valor promedio de p en una preparación particular de un anticuerpo unido a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC) (Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de anticuerpos homogéneos unidos a un agente heterólogo (por ejemplo, ADC), donde p es un cierto valor del anticuerpo con otros agentes, puede lograrse mediante HPLC de fase inversa, electroforesis, TFF, SEC-FPLC, CHT, centrifugación con filtro giratorio. Tales técnicas también se pueden aplicar a otros tipos de conjugados.

DEFINICIONES QUÍMICAS

Las siguientes definiciones pertenecen, en particular, a la descripción anterior de los inhibidores de la topoisomerasa I.

Arileno C₅₋₆: La expresión "arileno C₅₋₆", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un resto divalente obtenido al eliminar dos átomos de hidrógeno de un átomo anular aromático de un compuesto aromático.

En este contexto, los prefijos (p. ej., C₅₋₆) denotan el número de átomos anulares, o intervalo de número de átomos anulares, ya sean átomos de carbono o heteroátomos.

Los átomos anulares pueden ser todos átomos de carbono, como en los "grupos carboarilo", en cuyo caso el grupo es fenileno C₆.

Como alternativa, los átomos anulares pueden incluir uno o más heteroátomos, como en los "grupos heteroarileno". Los ejemplos de grupos heteroarileno incluyen, sin carácter limitante, los derivados de:

N₁: pirrol (azol) (C₅), piridina (azina) (C₆);

O₁: furano (oxol) (C₅);

S₁: tiofeno (tiol) (C₅);

N₁O₁: oxazol (C₅), isoxazol (C₅), isoxazina (C₆);

N₂O₁: oxadiazol (furazano) (C₅);

N₃O₁: oxatriazol (C₅);

N₁S₁: tiazol (C₅), isotiazol (C₅);

N₂: imidazol (1,3-diazol) (C₅), pirazol (1,2-diazol) (C₅), piridazina (1,2-diazina) (C₆), pirimidina (1,3-diazina) (C₆) (por ejemplo, citosina, timina, uracilo), pirazina (1,4-diazina) (C₆); y

N₃: triazol (C₅), triazina (C₆).

Alquilo C₁₋₄: La expresión "alquilo C₁₋₄", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un resto monovalente obtenido al eliminar un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarbonado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, que puede ser alifático o alicíclico, y que puede estar saturado o insaturado (por ejemplo, parcialmente insaturado, totalmente insaturado). La expresión "alquilo C_{1-n}", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un resto monovalente obtenido al eliminar un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarbonado que tiene de 1 a n átomos de carbono, que puede ser alifático o alicíclico, y que puede estar saturado o insaturado (por ejemplo, parcialmente insaturado, totalmente insaturado). Así pues, el término "alquilo" incluye las subclases alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, etc. que se exponen a continuación.

Los ejemplos de grupos alquilo saturados incluyen, sin carácter limitante, metilo (C₁), etilo (C₂), propilo (C₃) y butilo (C₄).

Los ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen, sin carácter limitante, metilo (C₁), etilo (C₂), *n*-propilo (C₃) y *n*-butilo (C₄).

Los ejemplos de grupos alquilo ramificados saturados incluyen isopropilo (C₃), isobutilo (C₄), *sec*-butilo (C₄) y *terc*-butilo (C₄).

Alquenilo C₂₋₄: La expresión "alquenilo C₂₋₄", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

Los ejemplos de grupos alquenilo insaturados incluyen, sin carácter limitante, etenilo (vinilo, -CH=CH₂), 1-propenilo (-CH=CH-CH₃), 2-propenilo (alilo, -CH-CH=CH₂), isopropenilo (1-metilvinilo, -C(CH₃)=CH₂) y butenilo (C₄).

Alquinilo C₂₋₄: La expresión "alquinilo C₂₋₄", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono.

Los ejemplos de grupos alquinilo insaturados incluyen, sin carácter limitante, etinilo (-C≡CH) y 2-propinilo (propargilo, -CH₂-C≡CH).

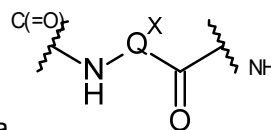
Cicloalquilo C₃₋₄: La expresión "cicloalquilo C₃₋₄", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un grupo alquilo que también es un grupo cíclico; es decir, un resto monovalente obtenido al eliminar un átomo de hidrógeno de un átomo anular alicíclico de un compuesto hidrocarbonado cíclico (carbocíclico), donde dicho resto tiene de 3 a 7 átomos de carbono, que incluyen de 3 a 7 átomos anulares.

Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, sin carácter limitante, los derivados de: compuestos hidrocarbonados monocíclicos saturados:

ciclopropano (C₃) y ciclobutano (C₄); y

compuestos hidrocarbonados monocíclicos insaturados:

ciclopropeno (C₃) y ciclobuteno (C₄).



Etiquetas de conexión: En la fórmula , las etiquetas de los superíndices $C(=O)$ y NH indican el grupo al cual están enlazados los átomos. Por ejemplo, se muestra que el grupo NH está enlazado a un carbonilo (que no forma parte del resto ilustrado) y se muestra que el carbonilo está enlazado a un grupo NH (que no forma parte del resto ilustrado).

SALES

Puede resultar conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto/agente activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. En Berge, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1-19 (1977), se describen ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables.

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, $-COOH$ puede ser $-COO^-$), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, sin carácter limitante, iones de metales alcalinos tales como Na^+ y K^+ , cationes alcalinotérreos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes tales como Al^{+3} . Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, sin carácter limitante, el ión amonio (es decir, NH_4^+) e iones de amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , $NH_2R_2^+$, NHR_3^+ , NR_4^+). Los ejemplos de algunos iones de amonio sustituidos adecuados son los derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamine, ethanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como también aminoácidos tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ión de amonio cuaternario común es $N(CH_3)_4^+$.

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, NH_2 puede ser $-NH_3^+$), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, sin carácter limitante, los derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, azufre, azufre, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, sin carácter limitante, los derivados de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalenocarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, mícico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, ácido trifluoroacético y

valérico. Los ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, sin carácter limitante, los derivados de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

SOLVATOS

Puede resultar conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se utiliza en la presente en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto activo, sal del compuesto activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, se puede hacer referencia convenientemente al solvato como un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

ISÓMEROS

Ciertos compuestos/agentes de la invención pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas, que incluyen, sin carácter limitante, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y s; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinales y anticlinales; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de barca, silla, torsionadas, de sobre y semisilla; y combinaciones de estas, a las que se hace referencia colectivamente en la presente posteriormente como "isómeros" (o "formas isoméricas").

A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular incluye todas estas formas isoméricas, incluidas sus mezclas (total o parcialmente) racémicas y de otros tipos. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isoméricas o bien son conocidos en la técnica o se pueden obtener fácilmente adaptando los métodos que se exponen en la presente, o métodos conocidos, de una manera conocida.

POLINUCLEÓTIDOS, VECTORES Y CÉLULAS HUÉSPED

En algunos aspectos, se proporcionan polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-FR α de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los polinucleótidos pueden ser cualquiera de las secuencias de nucleótidos en las **Tablas 7-8**. En caso de discrepancia, prevalecen las secuencias de las Tablas.

En otro aspecto, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica (a) VL que es al menos el 80%, 85%, 90% o 95% idéntica, o idéntica a secuencia de nucleótidos VL de referencia de uno cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 tal como se describe en la **Tabla 7**; y (b) VH que es al menos el 80%, 85%, 90% o 95% idéntica, o idéntica a secuencia de nucleótidos VH de referencia de uno cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 tal como se describe en la **Tabla 7**.

En otro aspecto, el polinucleótido del mismo comprende una secuencia que codifica (a) una cadena ligera que es al menos el 80%, 85%, 90% o 95% idéntica, o idéntica a secuencia de nucleótidos de cadena ligera de referencia de uno cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 tal como se describe en la **Tabla 8**; y (b) una cadena pesada que es al menos el 80%, 85%, 90% o 95% idéntica, o idéntica a secuencia de nucleótidos de cadena pesada de referencia de uno cualquiera de los constructos AB1370049, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117 tal como se describe en la **Tabla 8**.

TABLA 7: SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE VH Y VL DEL ANTICUERPO FRA

Constructo	VH	VL
AB1370049	CTGGTACAGCTGCAGCAGTCTGG ACCTGGACTGGTCAAGCCTTCTC AGACCCTGTCTCTGACCTGCGCC ATCTCTGGCGACTCTGTGTCCTCT GATTCTGCCACCTGGAAGTGGAT CCGGCAGTCTCCATCTAGAGGCC TGGAATGGCTGGGCAGAACCTAC TACCGGTCCAAGTGGTACAACGA CTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCC GGATCACCATCAATCCCGACACC TCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCA GCTGAACAGCGTGACCCCTGAGG ATACCGCCGTGTACTATTGTGCTA GAGGCGTGGGCTCCTTCGACTAC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 114)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CACACTGTCTGCCTCTGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCCT CTCAGTCCATCTCTAGCTGGCTGGCT TGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGG CCCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGCC TCTGGACTGGAATCCGGCGTGCCCT CTAGATTTTCTGGCTCTGGATCTGGC ACCGAGTTCACCCTGACCATTCTAG CCTGCAGCCTGACGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAACCTCCTA CAGCCAGCTGACCTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 115)
AB1370026	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCA GCTATGCCATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCATCCATTAGTAGT GGTCGTAGTTACATATACTACGCA GACTCAGTGAAGGGCCGATTAC	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAG TCAGGGCATTAGCAATTTTTTAGCCT GGTTTCAGCAGGCACCAGGGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCAT CCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA AAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC

Constructo	VH	VL
5	CATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCACTGTATCTGAAAATGAACA GCCTGAGAGACGAGGACACAGCT GTTTATTACTGTGCGAGAGAAATG CAGCAGCTGGCCCTTGACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 116)	CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACC CGTTCACTTTTGGCCAGGGGACCAA GCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 117)
10	AB1370035	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC
15	TCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGC AGACCCTCTCACTCACCTGTGCC ATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAG CAACAGTGCTGCTTGGAACTGGA TCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGC CTTGAGTGGCTGGGAAGGACATA CTACAGGTCCAATTGGTATAATGA TTATACATTATCTGTGAAAAGTCG AATAACCGTCAACCCAGACACAT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAG TTGAACTCTGTGACTCCCGAGGA CACGGCTGTGTATTATTGTGTAAG AGGGGTGGGACGCTTTGACTCCT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 118)	CACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCATCATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCT GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGC CCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGT CTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCA AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGAATTTACTCTCACCATTACCAGC CTTCAGCCTGATGATTTTGCAAGTTA TTACTGCCAAGAGTATAAACTTATTC TATATTCACTTTCGGCCCTGGGACCA AAGTGGATATCAAA (SEQ ID NO: 119)
20		
25		
30	AB1370083	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC
35	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GGGGAGGCCTGGTCAAACCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTA GCTATAACATGAACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCATCCATTAGTAGT GGTAGTAGTTACATATACTACGCA GACTCAATGAAGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGACAACGCCAAGA	CTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAG TCAGGGCATTAGCACTTTTTTAGCCT GGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCAT CCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA AAGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGAGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA

Constructo	VH	VL
5	ACTCACTGTTTCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGC TGTGTATTACTGTGCGAGAGGGA TGACTACATTAACCTTTTGACTION GGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 120)	TTACTGCCAACAGTATATTAGTTACC CGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAA GGTGGAGATCAAAA (SEQ ID NO: 121)
10	AB1370095 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTA GCTATAGCATGAATTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTA GGAGTAGTTACGTATACTACGCA GACTCAGTGAAGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACAGCT GTGTATTACTGTGCGAGAGGGAT GACTACATTAACCTTTTGACTION GGGCCAGGGAACCCTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 122)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCACTGTCTGCATCTGTCTGGAGACA GAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAG TCAGGGCATTAGCAGTTTTTTAGCCT GGTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCAT CCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA AAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACC CGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAA GGTGGAGATCAAAA (SEQ ID NO: 123)
20		
25		
30	AB1370117 CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG TCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGC AGACCCTCTCACTCACCTGTGCC ATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAG CGACAGTGCTACTTGGAAGTGGG TCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGC CTTGAGTGGCTGGGAAGGACATA CTACAGGTCCAAGTGGTATAGTG ATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTC GAATAACCATCAACCCAGACACAT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAG	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCAATTGCCGGGCCAG TCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCT GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGC CCCTAACCTCCTGATCTATAAGGCGT CGAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCA AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTC
35		

Constructo	VH	VL
5	CTGAACTCTGTGACTCCCGAGGA CACGGCTGTGTATTTCTGTGCAA GAGGGGGAGCTCCCTTTGACTAC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 124)	CATGTATACTTTTGGCCAGGGGACCA AGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 125)

**TABLA 8: SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA Y PESADA DEL
ANTICUERPO FRA**

Constructo	VH-CH	VL-CL
10	AB1370049	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT
15	CCTGGACTGGTCAAGCCTTCTCAG ACCCTGTCTCTGACCTGCGCCATC TCTGGCGACTCTGTGTCTCTGATT CTGCCACCTGGAAGTGGATCCGGC AGTCTCCATCTAGAGGCCTGGAAT GGCTGGGCAGAACCTACTACCGGT CCAAGTGGTACAACGACTACGCCG TGTCCGTGAAGTCCCGGATCACCA TCAATCCCGACACCTCCAAGAACC AGTTCTCCCTGCAGCTGAACAGCG TGACCCCTGAGGATACCGCGTGT ACTATTGTGCTAGAGGCGTGGGCT CCTTCGACTACTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCC	CCACACTGTCTGCCTCTGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGG CCTCTCAGTCCATCTCTAGCTGGCT GGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGG CAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTAC AAGGCCTCTGGACTGGAATCCGGC GTGCCCTCTAGATTTTCTGGCTCTG GATCTGGCACCGAGTTCACCCTGA CCATTTCTAGCCTGCAGCCTGACGA CTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG TACAACCTCTACAGCCAGCTGACCT TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATC TGTCTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCC TCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGC AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGC AGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACT CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA
20		
25		
30		
35		

Constructo	VH-CH	VL-CL
5 10 15 20 25 30	CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA (SEQ ID NO: 126)	GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACA GGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 127)
35	AB1370026 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT CCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGTGCGGC

Constructo	VH-CH	VL-CL
5	CCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTA TGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGG CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG GTCTCATCCATTAGTAGTGGTCGTA GTTACATATACTACGCAGACTCAGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAACGCCAAGAAGTCACTGTA TCTGAAAATGAACAGCCTGAGAGA	GAGTCAGGGCATTAGCAATTTTTTA GCCTGGTTTCAGCAGGCACCAGGG AAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATG CTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGT CCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGG ATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTTATTACTGCCAACAGTA
10	CGAGGACACAGCTGTTTATTACTGT GCGAGAGAAATGCAGCAGCTGGC CCTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTC CACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCA CCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTG GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACCGTGTCTCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGC TGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCC TGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCAA GCAGCAGCCTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTCAGTCTTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATC AGCAGGACCCCCGAGGTGACATG CGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG AGGAGCAGTACAACAGCACCTACA	TAATAGTTACCCGTTCACTTTTGGC CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAG AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT (SEQ ID NO: 129)
15		
20		
25		
30		
35		

Constructo	VH-CH	VL-CL
	GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAATACAAGTGCAAAGTCTCC AACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCCAGCCGCGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTGTC CCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTT CTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCG AGAACAACCTACAAGACCACCCCC CAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 128)	
AB1370035	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGT CCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAG ACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCT CCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACA GTGCTGCTTGGAAGTGGATCAGGC AGTCCCCATCGAGAGGCCCTTGAGT GGCTGGGAAGGACATACTACAGGT CCAATTGGTATAATGATTATACATT ATCTGTGAAAAGTCGAATAACCGTC AACCCAGACACATCCAAGAACCAG TTCTCCCTGCAGTTGAACTCTGTGA CTCCCGAGGACACGGCTGTGTATT ATTGTGTAAGAGGGGTGGGACGCT TTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTT CCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCATCATCACTTGCCGGGC CAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTG GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATA AGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTG GATCTGGGACAGAATTTACTCTCAC CATTACCAGCCTTCAGCCTGATGAT TTTGCAAGTTATTACTGCCAAGAGT ATAAACTTATTCTATATTCACTTTC GGCCCTGGGACCAAAGTGGATATC AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTG TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA

Constructo	VH-CH	VL-CL
5	CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC	GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT
	TGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCA	GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
	GCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC	ATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGT
	TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC	GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
	GAGCCCGTGACCGTGTCTTGAAC	CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
	AGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT	CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA
	GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCA	CCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGA
10	GAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGA	CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
	GCAGCGTGGTGACAGTGCCAAGCA	AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT
	GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACA	CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC
	TCTGCAACGTGAACCACAAGCCCA	CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
	GCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG	AGAGTGT
15	TTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAAC	(SEQ ID NO: 131)
	TCACACATGCCCCACCGTGCCCAGC	
	ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC	
	AGTCTTTCTGTTCCCCCCCCAAGCC	
	CAAGGACACCCTGATGATCAGCAG	
20	GACCCCCGAGGTGACATGCGTGGT	
	GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCC	
	AGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT	
	GGACGGCGTGAGGTGCACAACG	
	CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAG	
25	CAGTACAACAGCACCTACAGGGTG	
	GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAC	
	CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAA	
	TACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAG	
	GCCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAA	
30	ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG	
	CCCCGAGAACCACAGGTGTACACC	
	CTGCCCCCAGCCGCGAGGAGAT	
	GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC	
	CTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCC	
35	CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG	
	AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC	
	AACTACAAGACCACCCCCCAGTG	

Constructo	VH-CH	VL-CL
	CTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTC CTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAA (SEQ ID NO: 130)	
AB1370083	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCCTGGTCAAACCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA TAACATGAACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCATCCATTAGTAGTGAGTAG TTACATATACTACGCAGACTCAATG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAACGCCAAGAACTCACTGTTT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC GAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGATGACTACATTA TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGA ACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG AGCAGCGTGGTGACAGTGCCAAGC AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT CCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGC GAGTCAGGGCATTAGCACTTTTTTA GCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATG CTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGT CCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGG ATCTGAGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTTATTACTGCCAACAGTA TATTAGTTACCCGCTCACTTTCTGGC GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGA AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAG AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT

Constructo	VH-CH	VL-CL
5 10 15 20 25 30	GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTTCTGTTCCCCCCCCAAGC CCAAGGACACCCTGATGATCAGCA GGACCCCCGAGGTGACATGCGTG GTGGTGGATGTGTCCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGG TGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAATACAAGTGCAAAGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCCAGCCGCGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAG AACAACCTACAAGACCACCCCCCA GTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTC TTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 132)	(SEQ ID NO: 133)
35	AB1370095 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT CCTCACTGTCTGCATCTGTCTGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGC GAGTCAGGGCATTAGCAGTTTTTTA

Constructo	VH-CH	VL-CL
5	TAGCATGAATTGGGTCCGCCAGGC	GCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGG
	TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG	AAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATG
	TCTCATCCATTAGTAGTAGGAGTAG	CTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGT
	TTACGTATACTACGCAGACTCAGTG	CCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGG
	AAGGGCCGATTACCATCTCCAGA	ATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
	GACAACGCCAAGAACTCACTGTAT	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT
	CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC	TTGCAACTTATTACTGCCAACAGTA
10	GAGGACACAGCTGTGTATTACTGT	TAATAGTTACCCGCTCACTTTCCGGC
	GCGAGAGGGATGACTACATTA ACT	GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
	TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
	CTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC	TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA
	ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC	GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT
	CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC	GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
15	CAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG	CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
	GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC	AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
	CCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGA	GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACACAG
	ACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC	AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
	GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG	ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC
20	CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG	TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC
	AGCAGCGTGGTGACAGTGCCAAGC	ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
	AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTAC	CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
	ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC	CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
25	AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA	GTGT
	GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA	(SEQ ID NO: 135)
	CTCACACATGCCCACCGTGCCAG	
	CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT	
	CAGTCTTTCTGTTCCCCCCCCAAGC	
30	CCAAGGACACCCTGATGATCAGCA	
	GGACCCCCGAGGTGACATGCGTG	
	GTGGTGGATGTGTCCCACGAGGAC	
	CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTAC	
	GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA	
	CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG	
35	AGCAGTACAACAGCACCTACAGGG	
	TGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC	

Constructo	VH-CH	VL-CL
5	ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAATACAAGTGCAAAGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCAGCCGCGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA 10 CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG AACAACTACAAGACCACCCCCCA GTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTC TTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG 15 GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA 20 (SEQ ID NO: 134)	
25	AB1370117 CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGT CCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAG ACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCT CCGGGGACAGTGTCTCTAGCGACA GTGCTACTTGGAAGTGGATCAGGC AGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGT GGCTGGGAAGGACATACTACAGGT CCAAGTGGTATAGTGATTATGCAGT ATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATC 30 AACCCAGACACATCCAAGAACCAG TTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG ACTCCCGAGGACACGGCTGTGTAT TTCTGTGCAAGAGGGGGAGCTCCC TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC 35 ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTT CCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCAATTGCCGGGC CAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTG GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAACCTCCTGATCTATA AGGCGTCGAGTTTAGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTG GATCTGGGACAGAATTCACTCTCAC CATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGA TTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGT ATAATAGTTATTCCATGTATACTTTT GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATC AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTG TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT

Constructo	VH-CH	VL-CL
5	CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGA ACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG AGCAGCGTGGTGACAGTGCCAAGC AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTTCTGTTCCCCCCCCAAGC CCAAGGACACCCTGATGATCAGCA GGACCCCCGAGGTGACATGCGTG GTGGTGGATGTGTCCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGG TGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAATACAAGTGCAAAGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCAGCCGCGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG AACAACCTACAAGACCACCCCCCA GTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTC	GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGT (SEQ ID NO: 137)
10		
15		
20		
25		
30		
35		

Constructo	VH-CH	VL-CL
5	TTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 136)	

En algunas realizaciones, el polinucleótido es un polinucleótido aislado.

10 La(s) secuencia(s) (por ejemplo, secuencia(s) de polinucleótido de la presente invención incluye(n) secuencias que se han eliminado de su entorno que se produce de manera natural, aislados recombinantes o clonados (por ejemplo, ADN) y análogos sintetizado químicamente o análogos sintetizados biológicamente mediante sistemas heterólogos.

15 La(s) secuencia(s) (por ejemplo, secuencia(s) de polinucleótido) de la presente invención puede(n) prepararse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse grandes cantidades de la(s) secuencia(s) mediante replicación y/o expresión en una célula huésped adecuada. Los fragmentos de ADN naturales o sintéticos que codifican un fragmento deseado se incorporarán normalmente en constructos de ácido nucleico recombinantes, normalmente constructos de ADN, que pueden introducirse en y replicarse en
20 una célula procariota o eucariota. Normalmente los constructos de ADN serán adecuados para la replicación autónoma en un huésped unicelular, tal como levadura o bacterias, pero pueden estar destinados también para la introducción a e integración dentro del genoma de una línea de células bacterianas, de insectos, de mamíferos, de plantas u otras eucariotas cultivadas.

25 La(s) secuencia(s) (por ejemplo, secuencia(s) de polinucleótido) de la presente invención puede(n) producirse también mediante síntesis química, por ejemplo, un polinucleótido mediante el método de fosforamidita o el método de tri-éster y puede(n) realizarse en sintetizadores de oligonucleótidos automatizados comerciales. Un fragmento de doble cadena (por ejemplo, ADN) puede obtenerse del producto monocatenario de síntesis química o bien mediante sintetización de la cadena complementaria y e hibridación de la cadena de
30 manera conjunta en condiciones apropiadas o mediante adición de la cadena complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia de cebador apropiada.

35 Cuando se aplica a una secuencia (por ejemplo, secuencia de polinucleótido) de la invención, el término "aislado" preferiblemente indica que la secuencia se ha eliminado de su medio genético natural y está por tanto libre de otras secuencias codificantes extrañas o indeseadas (pero puede incluir regiones no traducidas en 5' y 3' que se producen de manera natural tal como promotores y terminadores), y está en una forma adecuada para su uso dentro

de los sistemas de producción de proteínas modificadas mediante ingeniería genética. Tales moléculas aisladas son aquellas que se separan de su entorno natural.

Las variantes de un polinucleótido descrito en el presente documento están englobadas por la invención. Las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o en ambas. En algunas realizaciones, una variante de polinucleótido comprende una alteración que produce sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero no altera las propiedades ni actividades del polipéptido codificado. En algunas realizaciones, se produce una variante de polinucleótido mediante una sustitución silenciosa debida a la degeneración del código genético. Puede producirse una variante de polinucleótido por una diversidad de motivos, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (cambiar codones en el ARNm humano a los preferentes para un hospedador bacteriano, tal como *E. coli*).

En algunos aspectos, también se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos. Los vectores pueden ser vectores de expresión. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales tales como, entre otras, secuencias reguladoras (por ejemplo, promotor, potenciador), marcadores de selección y señales de poliadenilación. Los vectores para transfectar una amplia variedad de células huésped son bien conocidos e incluyen, entre otros, plásmidos, fagémidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), así como otros , levaduras y vectores virales.

Un vector puede comprender secuencias de ácido nucleico que controlen la expresión del polinucleótido. En algunas realizaciones, el vector comprende un polinucleótido de la invención asociada operativamente con un promotor. Por ejemplo, un vector puede comprender un polinucleótido que codifica la región VH de un anticuerpo de la invención y un polinucleótido que codifica la región VL de un anticuerpo de la invención donde dichos polinucleótidos están asociados operativamente con uno o más promotor(es). Tal como se usa en el presente documento, el término "promotor" significa cualquier secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de un polinucleótido impulsando la transcripción del polinucleótido. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "asociado operativamente" y "unido operativamente" significa que el promotor está en una ubicación y/u orientación funcional correcta en relación con un polinucleótido que regula el control del inicio de la transcripción y/o la expresión de esa secuencia. En algunas realizaciones, los polinucleótidos que codifican la región VH y la región VL están asociadas operativamente con el mismo promotor. En algunas realizaciones, los polinucleótidos que codifican la región VH y la región VL están asociadas operativamente con un promotor separado. En algunas realizaciones, los promotores separados son promotores del

mismo tipo. En algunas realizaciones, los promotores separados son promotores de diferentes tipos.

En algunas realizaciones, el vector comprende uno o más de una secuencias potenciadora y represora. Tal como se usa en el presente documento, el término "potenciador" significa una secuencia de ácido nucleico que se une a una o más proteínas para aumentar la activación de la transcripción de un polinucleótido. Tal como se usa en el presente documento, el término "represor" significa una secuencia de ácido nucleico que se une a una o más proteínas para disminuir la activación de la transcripción de un polinucleótido.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende uno o más de los siguientes elementos unidos operativamente; un promotor de la transcripción; un polinucleótido que codifica la cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención; un polinucleótido que codifica la cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención; y un terminador de la transcripción.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento es una célula huésped que comprende un polinucleótido, comprendiendo dicho polinucleótido una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de la invención.

En otros aspectos, se proporcionan células huésped que expresan y pueden expresar los vectores de la invención. Estas células pueden ser células de mamífero (tales como células 293F, células CHO), células de insecto (tales como células de *Spodoptera frugiperda*), células de levadura (tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*), células vegetales o células bacterianas (tal como *E. coli*). En realizaciones preferidas, las células son células de mamíferos, preferentemente células CHO.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administre la composición. Dicha composición puede ser estéril y puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica. Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden comprender uno o más de un tampón (p. ej., tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej., polisorbato), un agente estabilizante (p. ej., albúmina humana), un conservante (p. ej., alcohol bencílico), un promotor de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" utilizada en el presente documento significa que está aprobado por la agencia reguladora del gobierno federal o de un estado, o que está enumerada en la farmacopea de EE. UU., la farmacopea europea o en otra farmacopea

reconocida de manera general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos.

Los anticuerpos anti-FR α de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o ADC de la invención, pueden administrarse al sujeto como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anti-FR α de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o ADC de la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, (por ejemplo, los anticuerpos anti-FR α de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos o ADC de la invención), un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales deben ser atóxicos y no deben interferir en la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta del portador u otro material dependerá de la vía de administración, la cual puede ser oral o mediante inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención puede comprender un vehículo estéril no tóxico farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Se describen formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 22^a ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como cualquier combinación de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio.

Un experto en la técnica entenderá que la elección adecuada del excipiente o excipientes para su uso con los anticuerpos anti-FR α de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o ADC de la invención, dependerá de las propiedades deseadas de la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención puede estar comprendida dentro de una o más formulaciones seleccionadas de una cápsula, un comprimido, una suspensión acuosa, una disolución, un aerosol nasal, un polvo liofilizado que puede reconstituirse para hacer una suspensión o disolución antes de su uso, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende más de un tipo de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender dos o más seleccionados de un anticuerpo, un fragmento de

unión al antígeno, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este conjugado con una citotoxina (por ejemplo, ADC de la invención), o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato),
5 opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son para su uso en, pero sin limitarse a, el diagnóstico, detección o control de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, el control o la mejora de un trastorno o uno o más de sus síntomas y/o en la investigación. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden
10 ser adecuadas para usos veterinarios o usos farmacéuticos en seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a un paciente por cualquier vía de administración sistémica o local apropiada. Por ejemplo, la administración puede ser oral, bucal, sublingual, oftálmica, intranasal, intratraqueal, pulmonar, tópica, transdérmica, urogenital, rectal, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal,
15 intramuscular, intracraneal, intratecal, epidural, intraventricular o intratumoral.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para la administración por cualquier medio apropiado, por ejemplo mediante parches epidérmicos o transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas o geles; por nebulizadores, vaporizadores o inhaladores; por inyección o infusión; o en forma de cápsulas, comprimidos, disoluciones o
20 suspensiones líquidas en agua o medios no acuosos, gotas, supositorios, enemas, aerosoles o polvos. La vía de administración más adecuada en un caso dado dependerá del estado físico y mental del sujeto, la naturaleza y gravedad de la enfermedad y las propiedades deseadas de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden adoptar forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un portador sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se puede incluir solución salina fisiológica, solución de dextrosa u otros sacáridos, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender
25 un portador sólido tal como una gelatina.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de aflicción, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté exenta de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica están perfectamente capacitados para preparar soluciones adecuadas utilizando, por
30 ejemplo, vehículos isotónicos tales como una inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer

o inyección láctica de Ringer. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

TERAPIA

La presente invención abarca terapias que implican la administración de anticuerpos anti-FR α o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los ADC o las composiciones farmacéuticas de la invención a un sujeto, para prevenir, tratar o mejorar los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección.

"Tratar" se refiere a medidas terapéuticas que curan, ralentizan, alivian síntomas de, y/o detienen, la progresión de un proceso patológico o trastorno diagnosticado. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tengan el trastorno. En algunas realizaciones, se "trata" satisfactoriamente a un sujeto para una enfermedad o trastorno (preferiblemente cáncer) de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento en caso de que el paciente muestre, por ejemplo, un alivio o eliminación total, parcial o transitoria de los síntomas asociados con la enfermedad o el trastorno (preferiblemente cáncer).

"Prevenir" se refiere a las medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o ralentizan el desarrollo de un proceso patológico o trastorno que tienen como objetivo. Por lo tanto, aquellos que necesitan prevención incluyen a aquellos que son propensos a tener o que son susceptibles al trastorno. En algunas realizaciones, se previene de forma satisfactoria una enfermedad o trastorno (preferiblemente cáncer) de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento, si el paciente desarrolla de manera transitoria o permanente, por ejemplo, menos síntomas o síntomas menos graves asociados con la enfermedad o trastorno, o una aparición más tardía de los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno, que un paciente que no se ha sometido a los métodos de la invención.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto mamífero. En algunas realizaciones, el "sujeto" es un humano, animales domésticos, animales de granja, animales de deportes y animales de zoo, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, etc. En algunas realizaciones, el sujeto es un mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*). En una realización preferible, el sujeto es un ser humano. En métodos de la invención, el sujeto puede no haberse diagnosticado previamente como que tiene cáncer. Como alternativa, el sujeto puede no haberse diagnosticado previamente como que tiene cáncer. El sujeto puede ser también uno que muestre factores de riesgo de enfermedad, o uno que sea asintomático para cáncer. El sujeto puede ser también uno que está padeciendo o está en riesgo de desarrollar cáncer. En algunas realizaciones, al sujeto se ha administrado previamente una terapia contra el cáncer.

Por consiguiente, en algunos aspectos, se proporcionan los anticuerpos anti-FR α de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los ADC o las composiciones farmacéuticas de la invención, para su uso en terapia, por ejemplo, para tratar una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer). También se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-FR α o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los ADC o las composiciones farmacéuticas de la invención. En un aspecto, se proporciona un método para prevenir la aparición de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-FR α o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los ADC o las composiciones farmacéuticas de la invención.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para mostrar beneficios en un paciente. Tales beneficios pueden ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la tasa y evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, es parte de la responsabilidad de los facultativos generales y otros médicos.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FR α , o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los ADC o las composiciones farmacéuticas de la invención son para uso en el tratamiento de un cáncer asociado con la expresión de FR α . En otro aspecto, se proporciona un método para tratar un cáncer asociado con la expresión de FR α , comprendiendo el método administrar a un sujeto los anticuerpos anti-FR α , o sus fragmentos de unión a antígeno, los ADC o las composiciones farmacéuticas de la invención. En otras palabras, un cáncer mencionado en el presente documento puede comprender una célula cancerosa que expresa FR α . Dicha célula cancerosa puede estar comprendida dentro de un tumor. En algunas realizaciones, el cáncer comprende células cancerosas con expresión heterogénea de FR α y/o una baja expresión de FR α .

Preferentemente, el cáncer se selecciona de cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de endometrio, cáncer de mama (por ejemplo, TNBC), cáncer de cuello uterino, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, carcinoma de células renales (RCC), cáncer colorrectal, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y mesotelioma pleural maligno. Más preferentemente, el cáncer es cáncer de ovario o cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es uno o más carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) preferiblemente seleccionado de NSCLC escamosas, NSCLC de adenocarcinoma o una combinación de los mismos.

Otros ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, proliferación celular benigna, premaligna y maligna, incluidos, entre otros, neoplasias y tumores (por ejemplo, histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma), cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, mesotelioma pleural maligno, carcinoma de mama (por ejemplo, TNBC) y cáncer de riñón. Se puede tratar cualquier tipo de célula, incluyendo, pero sin limitarse a, las de pulmón, gastrointestinales, de mama (mamaria), de ovario, de riñón (renal) y de páncreas.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FR α , o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los ADC o las composiciones farmacéuticas de la invención son para usar en un método para reducir una población de células positivas para FR α en un sujeto, comprendiendo el método administrar el anticuerpo anti-FR α o fragmento de unión a antígeno del mismo, el ADC o la composición farmacéutica al sujeto. En otro aspecto, se proporciona un método para reducir una población de células positivas para FR α en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-FR α o fragmento del mismo que se une al antígeno, el ADC o la composición farmacéutica de la invención a un sujeto. En algunas realizaciones, las células positivas para FR α tienen una expresión heterogénea de FR α y/o una baja expresión de FR α .

OTRAS APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una alta afinidad por FR α tanto in vitro como in vivo y, por lo tanto, puede usarse ventajosamente en métodos para detectar un epítipo de FR α y métodos de diagnóstico asociados.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este de la invención puede usarse en ensayos para unión inmuno-específica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencia de Western, RIA, ELISA, ELISPOT, inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este de la invención se puede emplear de forma histológica, como en inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o ensayos no inmunológicos, por ejemplo, para la detección *in situ* de FR α , o variantes conservadas o fragmentos de péptido de la misma. La detección *in situ* puede lograrse retirando un espécimen histológico de un paciente y aplicándole al mismo un anticuerpo o fragmento de

unión al antígeno de este de la invención marcado, por ejemplo, aplicado mediante recubrimiento del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este marcado en una muestra biológica. A través del uso de dicho procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de FR α , o variantes conservadas o fragmentos peptídicos, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente divulgación, los expertos habituales en la materia percibirán fácilmente que se puede modificar cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) para lograr dicha detección *in situ*.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el conjugado de anticuerpo-fármaco, pueden marcarse, por ejemplo, para ayudar a la detección de la unión celular (*in vitro* o *in vivo*). La marca puede ser una marca de biotina. En otra realización, la etiqueta puede ser un radioisótopo. En otra realización, el marcador puede ser un fluoróforo.

En un aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido FR α (por ejemplo, un epítipo de polipéptido FR α) en una muestra, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o una composición farmacéutica de la invención, para proporcionar un complejo anticuerpo-antígeno; y

(b) detectar la presencia o ausencia de dicho complejo de anticuerpo-antígeno;

donde la presencia del complejo anticuerpo-antígeno confirma la presencia de un polipéptido FR α polipéptido (por ejemplo, epítipo del polipéptido FR α) o ausencia del complejo anticuerpo-antígeno confirma la ausencia del polipéptido FR α (por ejemplo, epítipo del polipéptido FR α).

ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN Y KITS

En aspectos adicionales, en el presente documento se proporciona un artículo de fabricación que comprende uno o más anticuerpos anti-FR α de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o los ADC de la invención, o las composiciones farmacéuticas de la invención.

Aún en otros aspectos, se proporciona en el presente un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención, como uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos o ADC de la invención. Opcionalmente puede haber asociado con dicho recipiente o recipientes un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración en seres humanos. Por ejemplo, instrucciones sobre cómo emplear la composición farmacéutica proporcionada en el tratamiento del cáncer, como cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, NSCLC), cáncer de endometrio, cáncer de mama (por ejemplo, TNBC), cáncer de

cuello uterino, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer renal carcinoma de células escamosas, cáncer colorrectal, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y mesotelioma pleural maligno, también pueden incluirse o ponerse a disposición de un paciente o proveedor de servicios médicos.

5 En un aspecto, se proporciona un kit que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o el ADC, o las composiciones farmacéuticas de la invención. Se engloba adicionalmente el uso de dicho kit en los métodos de la presente invención.

10 En algunas realizaciones, el kit puede proporcionar el antígeno o el fragmento de unión al antígeno y un agente heterólogo individualmente (p. ej., una citotoxina que no está conjugada con el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, pero está en una forma adecuada para la conjugación con el mismo); opcionalmente, en el que el kit se proporciona además con instrucciones y/o reactivos para conjugar el agente heterólogo con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunas realizaciones, el kit comprende todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles,
15 instrucciones para realizar los ensayos y cualquier programa informático necesario para el análisis y la presentación de los resultados.

20 Esta descripción no se limita por los métodos y materiales a modo de ejemplo divulgados en el presente documento, y cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento se puede utilizar en la práctica o prueba de realizaciones de esta divulgación.

25 Las realizaciones anteriores deben entenderse como ejemplos ilustrativos. Se prevén otras realizaciones. Se ha de entender que cualquier rasgo distintivo descrito en relación con algunas las realizaciones se pueden utilizar solo o junto con otros rasgos distintivos descritos, y que también se puede utilizar junto con uno o más rasgos distintivos de cualquier otra de las realizaciones o aspectos, o cualquier combinación de cualquier otra de las realizaciones o aspectos. Además, también se pueden emplear equivalentes y modificaciones no descritos anteriormente sin apartarse del alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

30 En el contexto de la presente invención, otros ejemplos y variaciones de los anticuerpos y métodos descritos en el presente documento serán evidentes para un experto en la materia. Otros ejemplos y variaciones están dentro del alcance de la invención, como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

35 Todos los documentos citados en el presente documento se incorporan en su totalidad por referencia en el presente documento, incluidos todos los datos, las tablas, las figuras y el texto que se presentan en los documentos citados.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1 - GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-FRA****OBJETIVO**

Se llevó a cabo una campaña de hibridomas usando un ratón transgénico humanizado para obtener anticuerpos completamente humanos de alta afinidad que se unían al receptor de folato alfa (FR α).

MATERIALES Y MÉTODOS**PRODUCCIÓN DE FRA HUMANO PARA INMUNIZACIÓN**

Se insertó el gen FR α humano en el vector pDEST12.2 OriP. Se clonó adicionalmente la secuencia correspondiente a la región soluble del receptor de folato con un líder CD33 N-terminal y etiquetas Avi e His6 C-terminal. Se eliminó la secuencia responsable del anclaje de GPI, dando como resultado un constructo soluble.

La proteína FR α humana se expresó y purificó usando métodos estándar. Brevemente, el ADN del plásmido se preparó y se transfectó en una línea de células CHO adaptadas a la suspensión interna utilizando la administración mediada por PEI con células a una densidad de 4×10^6 células/ml en el punto de transfección. Se cultivaron las células a 34°C, CO₂ al 5%, 140 rpm, 70% de humedad durante 7 días. Se recogió el medio acondicionado y se purificó usando una columna HisTrap Excel de 5 ml (Cytiva) para captura por afinidad, seguido de pulido en una columna HiLoad Superdex 75 16/600 pg (Cytiva) equilibrada en DPBS. Se analizó la pureza de las fracciones mediante SDS-PAGE, se agruparon y se determinó su concentración a través de la absorbancia UV, y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido antes del almacenamiento a -80°C. Con el fin de biotilar la proteína de forma específica en el sitio en su etiqueta Avi, la proteína se incubó con la enzima BirA recombinante, ATP y biotina y posteriormente se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño tal como se describió anteriormente. Se expresaron los anticuerpos tal como se describe para los antígenos diana y se purificaron usando cromatografía de Proteína A.

INMUNIZACIÓN

Se tomó una estrategia de sitio múltiple de inmunización repetitiva (RIMMS), en la que se inmunizaron ratones humanizados con Del-1 y ratones de tipo natural CD1 de la siguiente manera:

- Menos 4 días: pre-sangría
- 0 días: inmunización con cebadores
- 7 días: segundo refuerzo
- 13 días: primera sangría
- 15 días: tercer refuerzo
- 20 días: segunda sangría

-22 días: cuarto refuerzo

-24 días: quinto refuerzo

-28 días: hemorragia terminal y fusiones de bazo (SP) y ganglios linfáticos (LN)

Para la inmunización, se dividieron 6 ratones Del-1 humanizados y cuatro ratones CD1 de tipo natural en dos grupos (Grupo 1: Del-1 Ratón 1-6, Grupo 2: Ratón CD1 7-10). Se inmunizaron los animales con el dominio extracelular de FR α humano recombinante tal como se discutió anteriormente. La proteína recombinante se diluyó en PBS, se emulsionaron con volúmenes iguales de adyuvante completo de Freund y se inyectaron en los ratones en dos sitios. Para las siguientes tres inyecciones, el inmunógeno se emulsionó en adyuvante incompleto de Freund y las inyecciones se realizaron como se indicó anteriormente. El refuerzo final se realizó el día 24 inyectando proteína recombinante en PBS por vía intraperitoneal.

Se obtuvieron muestras de sangre de las venas de la cola de los ratones antes de la inmunización, el día 13 después de la primera inmunización y el día 20 después de la segunda inmunización. Los títulos de IgG frente a FR α humana se determinaron mediante ELISA en suero.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL RATÓN A FRA (ELISA DE SUERO)

Los títulos de IgG en suero frente a FR α humana y un control de proteína negativo se determinaron mediante ELISA en placas de microtitulación de 96 pocillos usando técnicas estándar. Los anticuerpos se detectaron usando un anticuerpo secundario específico policlonal de cabra anti IgG de ratón marcado con HRP (Jackson Immunolabs), y el ensayo se desarrolló usando sustrato TMB (Sigma) seguido de la adición de ácido sulfúrico 0.5 M para detener la reacción. A continuación, las placas se leyeron usando un lector de placas de múltiples marcadores PerkinElmer EnVision 2103.

Se trazaron las curvas de titulación de suero para FR α humano y el control de proteína negativo y se calcularon las respectivas áreas bajo las curvas (AUC).

AISLAMIENTO DE IGG DE RATÓN MONOCLONAL (GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS)

Cuatro días después del refuerzo final, se recogieron asépticamente los ganglios linfáticos, y se aislaron las células mediante rotura mecánica y luego se contaron. Se mezclaron estas células con células de mieloma SP2/0 y se fusionaron usando un aparato de electrofusión. Se mezclaron las fusiones resultantes con un medio semisólido basado en metilcelulosa y se sembraron en placa en placas OmniTray. Las células en medio semisólido se cultivaron durante 13 días a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. Durante este período de incubación, se forman colonias clonales a partir de una única célula de hibridoma progenitora. Estas colonias secretan IgG que se atrapa en las proximidades de la colonia por el anticuerpo anti-IgG conjugado con FITC presente en el medio semisólido. Puede observarse la formación de complejos inmunitarios resultantes alrededor de la célula como un 'halo' fluorescente cuando se

visualiza mediante el instrumento recolector de colonias ClonePix FL (Molecular Devices). A continuación, se recogen estas colonias con halo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 3-5 días de cultivo, se recogieron los sobrenadantes de las colonias seleccionadas y se examinaron en cuanto a la unión a FR α humano.

5

SECUENCIACIÓN DE ADN DE IGG DE RATÓN

Se extrajo el ARN mensajero (ARNm) de células de hibridoma usando partículas de oligo (dT) magnéticas y se transcribió de manera inversa para dar ADNc. Se realizó amplificación por PCR usando cebadores de VH o VL de poli-C y regiones constantes para todas las subclases de IgG de ratón. Se secuenciaron los amplicones de PCR mediante secuenciación de Sanger.

10

PURIFICACIONES DE IGG DE RATÓN PHYNEXUS

Se propagaron células en placas de 24 pocillos y, después de 10 días, los sobrenadantes se transfirieron a bloques maestros de 96 pocillos y las IgG de ratón de todas las subclases (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares con crecimiento excesivo en resina ProPlus (Phynexus) usando Perkin Elmer Minitrack. Las IgG de ratón capturadas se eluyeron con HEPES 100 mM, NaCl 140 mM a pH 3.0 y a continuación se neutralizaron con un volumen igual de HEPES 200 mM a pH 8.0. Se cuantificaron las IgG purificadas usando una lectura de absorbancia a 280 nm en una placa de 384 pocillos UV-Star.

15

20

REFORMATEO DE IGG DE RATÓN

Los clones de IgG de hibridoma de ratón se reformatearon molecularmente para generar construcciones que expresan los dominios VH y VL de ratón y los dominios constantes de IgG de ratón relevantes para cada hibridoma básicamente como se describe por Persic *et al.*, Gene 187:9-18, 1997. El dominio VH se clonó en el vector relevante que contenía los dominios constantes de cadena pesada de ratón y los elementos reguladores para expresar la cadena pesada de IgG1 completa en células de mamífero. De manera similar, el dominio VL se clonó en un vector para la expresión de los dominios constantes de cadena ligera de ratón (λ o κ) y los elementos reguladores apropiados para expresar la cadena ligera de IgG completa en células de mamífero. Para obtener la IgG, se transfectaron transitoriamente células CHO en suspensión de mamíferos con los vectores IgG de cadena pesada y ligera. Se expresaron las IgG y se secretaron al medio. Las IgG se purificaron a partir de sobrenadantes clarificados usando columnas de cromatografía MabSelect SuRe (GE Healthcare Lifesciences Cat. n.º: 11003493 para columnas de 1 ml; 11003495 para columnas de 5 ml) y el sistema de purificación AktaXpress™ de GE Healthcare Lifesciences. El material eluido se intercambi6 en tamp6n por PBS usando columnas de desalinizaci6n PD-10 (GE Healthcare Lifesciences; Cat. n.º: 17085101). La concentraci6n de IgG se determin6 por espectrofotometr6a usando coeficientes

25

30

35

de extinción basados en las secuencias de aminoácidos de las IgG (Pace *et al.*, Protein Sci. 4:2411-2423, 1995), y se analizan la pureza de las IgG purificadas usando análisis SDS-PAGE y HP-SEC.

RESULTADOS

TÍTULOS SÉRICOS DE IGG ANTI-FRA DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN

Hay varios enfoques disponibles para el descubrimiento de mAb, incluyendo la presentación en fagos, la inmunización y el uso de un perfil de unión (lo que implicaría identificar mAb que compiten con la unión de folato a FR α). Aquí, se usó un enfoque dual para generar anticuerpos anti-FR α a través de la inmunización. La primera ruta implicó la inmunización de un ratón transgénico humano (es decir, Del-1) que contiene dominios VH y Vk humanos completos en el locus Ig. Esto aseguró que daría como resultado una gran diversidad de mAbs y, además, serían completamente humanos y estarían listos para el desarrollo sin requerir humanización. La segunda ruta implicó la inmunización de ratones no transgénicos (es decir, CD-1), en los que sería necesaria la humanización de los mAb.

En los días -4 (presangrado), 13 (sangrado 1) y 20 (sangrado 2) del protocolo de inmunización, se recogieron muestras de suero de todos los ratones y se analizó la presencia de anticuerpos específicos anti-FR α . Todos los ratones respondieron a la inmunización, generando anticuerpos específicos anti-FR α .

GENERACIÓN DE HIBRIDOMA

En total se generaron 10510 clones de hibridoma, con 2586 identificados como colonias secretoras de IgG. Se recogieron las colonias secretoras de IgG en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 3-5 días de cultivo, se recogieron los sobrenadantes de las colonias seleccionadas y se examinaron en cuanto a la unión a FR α humano. Se obtuvieron los anticuerpos principales generados (véase el Ejemplo 2) todos de ratones transgénicos Del-1.

EJEMPLO 2 – ESPECIES DE REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-

FRA

OBJETIVO

Se caracterizaron los anticuerpos generados por la fuerza de unión a la especificidad diana, ortóloga y paróloga.

MATERIALES Y MÉTODOS

PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS PARA EL ENSAYO

La **Tabla 9** indica la especie de la que procede la proteína, el vector en el que se clonó el constructo, el péptido señal y las etiquetas epitópicas fusionadas con la proteína. La **Tabla 10** muestra además la secuencia para cada inserción. En cada caso, se clonó la secuencia correspondiente a la región soluble de cada receptor de folato con un líder CD33 N-terminal y

etiquetas Avi e His6 C-terminal. Se eliminó la secuencia responsable del anclaje de GPI, dando como resultado un constructo soluble.

TABLA 9: RESUMEN DEL INSERTO CLONADO

Inserto clonado	Vector	Péptido señal	Etiquetas de epítopos
FR� humano	pDEST12.2 OriP	CD33	Avi-His6 C-terminal
FR� de cyno	pDEST12.2 OriP	CD33	Avi-His6 C-terminal
FR� de ratón	pDEST12.2 OriP	CD33	Avi-His6 C-terminal
FR� humano	pDEST12.2 OriP	CD33	Avi-His6 C-terminal
FR� humano	pDEST12.2 OriP	CD33	Avi-His6 C-terminal

Tabla 10: Secuencias del inserto

SEQ ID NO	Descripción del contenido de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 138	ECD-Avi-His de FR� humano	RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRP WRKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFNWNHCGEMA PACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIIQQVDQSWRKER VLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWN WTSGFNKCAVGAAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTSHS YKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA AAMSGGGGSGLNDIFEAQKIEWHEAAHHHHHHHHHH H
SEQ ID NO: 139	ECD-Avi-His de FR� humano	QDRTDLLNVCMDAKHHKTKPGPEDKLHDQCSPWK KNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPA CKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIIQQVNQSWRKERFL DVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCKSNWHRGWDWT SGVNBKCPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLWSHSYK VSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAA MHGGGGGSGLNDIFEAQKIEWHEAAHHHHHHHHHHH
SEQ ID NO: 140	ECD-Avi-His de FR� humano	SARARTDLLNVCMAKHHKTKQSPPEDELYGQCSP WKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKME PTCKRHFIQDSCLYECSPNLGPWIRQVNQSWRKERI LNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNW TSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLWSHSFK VSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVAKFYAAA

		MNAGAPSRGIIDSGGGGSLNDIFEAQKIEWHEAAH HHHHHHHHH
5	SEQ ID NO: 141 ECD-Avi-His de FRα de cyno	RTARARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRP WKKNACCSTNTSQAHAHKDVSYLRFNWNHCGEMA PACKRHFQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKER VLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWN WTSGFNKCPVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYS YKVSNYSRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA AAMSGLNDIFEAQKIEWHEAAHHHHHHHHHH
10	SEQ ID NO: 142 ECD-Avi-His de FRα de ratón	TRARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPW KTNSCCSTNTSQAHAHKDISYLRFNWNHCGTMTSE CKRHFQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERILD VPLCKEDCQWWEDCQSSFTCKSNWHKGWNWSS GHNECPVGASCHPFTFYFPTSAALCEEIWSHSYKLS NYSRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAEAMS GGGGGSLNDIFEAQKIEWHEAAHHHHHHHHHH

Todas las proteínas de la **Tabla 10** se expresaron y se purificaron usando los métodos descritos en el Ejemplo 1 para FRα humano.

ENSAYOS HTRF

Se realizaron los ensayos HTRF en placas no adhesivas de pocillos poco profundos de color blanco de 384 pocillos (Corning, 4513) en tampón de ensayo que contenía solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Life Technologies, 14190), albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1% v/v (Sigma, A9576) y fluoruro de potasio 0.4 M (VWR International, 26820). Se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo a 590 y 665 nm después de la excitación a 320 nm en un lector de placas Envision (PerkinElmer) después de los períodos de incubación indicados. Se usaron valores de relación de (emisión de 665 nm/emisión de 590 nm) × 10,000 para calcular el % de Delta F de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%DELTA F = \left(\frac{(\text{relación de muestra} - \text{relación de control negativo})}{\text{Relación de control negativo}} \right) \times 100$$

Se derivó la relación de control negativo de pocillos de control de unión no específica (NSB). Se analizaron las curvas usando el software GraphPad Prism usando una ecuación logística de ajuste de curvas de cuatro parámetros.

ENSAYOS DE UNIÓN A ANTÍGENO HTRF

Se incubaron los sobrenadantes que contenían IgG de ratón de células de hibridoma a una dilución de ensayo final del 25% con criptato de estreptavidina 0.5 nM (CisBio, 610SAKLB), IgG anti-ratón AF647 (Jackson ImmunoResearch, 115-605-164) y FRα humano biotinilado 1 nM,

FR α de cyno, ratón FR α , FR β humano o FR γ humano para dar un volumen de ensayo final de 10 μ l, durante 4 horas a temperatura ambiente antes de medir la fluorescencia.

ENSAYO DE UNIÓN A ANTÍGENO PARA FRA DE RATA

Se realizaron los ensayos de unión de especies en Octet RED384 (ForteBio) a 25°C en un tampón de ensayo que contiene PBS, BSA al 0.1% v/v (Sigma, A9576), Tween-20 al 0.01% v/v (Sigma, P9416) (pH 7.4) usando placas negras de 384 pocillos con fondo inclinado (ForteBio, 18-5076). Se configuraron los ensayos usando proteína A o biosensores de captura antihumanos (AHC) (ForteBio, 18-5089) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recubrieron 10 μ g/ml de IgG anti-FR α de rata (Sino Biological, 81073-RP01) en biosensores de proteína A (ForteBio, NC9490476) y se cargaron 10 μ g/ml de IgG humana de prueba en biosensores de captura antihumanos (AHC) (ForteBio, 18-5089) durante 180 segundos. Se midió la asociación incubando biosensores cargados con FR α humano 500 nM (interno) o FR α de rata 500 nM (Sino Biological, 81073-R08H). Se midió la disociación después de la transferencia al tampón de ensayo. Se analizaron los datos usando el software de análisis de datos Octet versión 7.0.

RESULTADOS

Se analizó la unión de los sobrenadantes de hibridoma 2586 a FR α humano, FR α de cyno, FR α de ratón, FR β humano o FR γ humano en un formato de ensayo HTRF. Se realizó este experimento para aislar anticuerpos que presentaban reacción cruzada con FR α de cyno, mientras se aseguraba de que no se observara unión a los parálogos: FR β y FR γ . Para determinar la similitud de secuencia del receptor de folato humano con parálogos y ortólogos, se determinaron múltiples alineaciones de secuencias usando el algoritmo Clustal Omega v1.2.2. A continuación se presentan las identidades de secuencia para FR α humano con parálogos (Tabla 11) y ortólogos (Tabla 12).

TABLA 11: PORCENTAJE DE IDENTIDADES DE SECUENCIA DE POLIPÉPTIDOS FR β Y FR γ HUMANOS MADUROS CON FRA

	FR γ _humano	FR β _humano
FR α _humano	77.8%	78.9%
FR γ _humano	N/A	87.7 %

N/A – no aplicable

TABLA 12: IDENTIDAD DE SECUENCIA PORCENTUAL DE FRA HUMANO, CYNO, DE RATÓN Y DE RATA MADUROS

FR α _humano	FR α _de ratón	FR α _de rata
---------------------	-----------------------	----------------------

FR α _cyno	97.6%	84.3 %	85.7 %
FR α _humano	N/A	83.3 %	84.8 %
FR α _de ratón	N/A	N/A	94.8 %

N/A – no aplicable

Se definió una molécula de unión como una IgG que tenía una señal de ensayo de >30% delta F. Un total de 129 IgG mostraron unión solo a FR α humano y cyno, 9 IgG mostraron unión solo a FR α humano, de cyno y de ratón, y otras 30 IgG mostró unión solo a FR α humano, de cyno o de ratón. Los datos para la IgG de 6 derivaciones se muestran en la **Tabla 13**.

TABLA 13: ENSAYO DE UNIÓN DE HTRF IGG PARA LA IGG DE 6 DERIVACIONES

Referencia IgG	de Ensayo de unión de HTRF IgG (% de Delta F)				
	FR α humano	FR α de cyno	FR α de ratón	FR β humano	FR γ humano
AB1370026	270.58	213.68	1.63	-0.38	1.31
AB1370035	225.19	141.47	-5.22	-3.26	9.2
AB1370049	187.81	94.06	-9.23	-8.11	-0.75
AB1370083	139.98	85.16	-3.65	3.81	-2.92
AB1370095	126.25	85.33	-5.66	-5.87	-1.17
AB1370117	79.81	67.23	-3.41	-1.07	-1.77

Se prepararon las 168 IgG de hibridoma que se identificaron en la selección de sobrenadante de hibridoma como IgG purificada de Phynexus. Estos se sometieron a prueba en el ensayo de unión al antígeno a 4 diluciones de la IgG. Se identificaron 115 IgG como IgG que tienen reacción cruzada entre FR α humano y cyno y no se unen a FR β y FR γ humanos. Se muestran los datos para la IgG de 6 derivaciones en las **Figuras 1A-1F**.

Además, para el ensayo de unión al antígeno FR α de rata, las IgG de 6 derivaciones también mostraron unión a FR α humana pero no unión a FR α de rata.

En general, se ha demostrado que a través de una campaña de selección y generación de anticuerpos extensa y de alto rendimiento se generó una variedad de anticuerpos IgG anti-FR α diferentes.

EJEMPLO 3 – ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO

OBJETIVO

Se caracterizaron los anticuerpos generados por su tasa de internalización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron las muestras de IgG purificadas con PhyNexus de las salidas de hibridoma en un ensayo de internalización. Se sembraron en placas las disoluciones madre congeladas de células KB durante la noche antes de la adición de muestras de IgG. Se realizó el ensayo usando un método de adquisición fijo con incubación de 2.5 horas antes de fijarlo. Se realizó el

ensayo con reactivos de detección marcados con pHrodo Green y Cell Mask Red (Thermo Fisher Scientific).

DÍA 1

Se descongelaron los viales congelados de células KB, se diluyeron en medio, se centrifugaron y se resuspendieron en medio recién preparado antes del recuento. Se sembraron en placa las células a 10,000 células/pocillo en MEM + NEAA + FCS al 10% (Thermo Fisher Scientific) y se incubaron las placas preparadas durante la noche a 37°C, CO₂ al 5% en una incubadora humidificada.

DÍA 2

Se prepararon los anticuerpos y los reactivos de detección secundarios y se preincubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se eliminó el medio de las células y se añadió el anticuerpo premezclado y el reactivo de detección. Se incubaron las placas a 37°C durante 2.5 horas. Después de la incubación, se añadió una disolución diluida 1:5000 de 30 µl/pocillo de formaldehído al 7.2% (Thermo Fisher Scientific) + Hoechst (Thermo Fisher Scientific) para producir una disolución de formaldehído al 3.7% y una dilución 1:10000 de tinción nuclear. Se incubaron las placas durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron con 1x HBSS (Thermo Fisher Scientific) antes de la adición de 30 µl/pocillo de máscara Cell Mask Red (diluida 1:5000 en Triton X-100 al 0.1% (Merck)). Se incubaron las placas a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos, se lavaron dos veces con HBSS y se tomaron imágenes en un sistema de obtención de imágenes de alto contenido Opera (véase la Tabla 14 para observar los parámetros de Opera Acquisition).

TABLA 14: PARÁMETROS PARA LA ADQUISICIÓN DE OPERA

	Láser	Fuerza	Cámara	Filtro	Contenedor	Tiempo (ms)	Lente
Exposición 1 (Hoechst)	405	3100	1	450/50	2	80	20xA
Exposición 1 (Cell Mask Red)	640	3440	3	600/40	2	80	20xA
Exposición 2 (pHrodo verde)	488	10400	2	540/75	2	2000	20xA

RESULTADOS

Se realizó un ensayo de internalización de alto rendimiento para evaluar la tasa de internalización de anticuerpos en las células KB. Se marcaron los anticuerpos purificados de Phynexus, se añadieron a las células KB y se fijaron las células después de un transcurso de tiempo de 2.5 horas. Se realizó el análisis de imágenes con Columbus y se analizaron los resultados dentro de High Content Profiler en Spotfire, lo que permitió el análisis

multiparamétrico de los datos de imagen adquiridos y el desarrollo de una "Lista de resultados" que contenía mAbs que presentaban una tasa de captación mejorada (**Figura 2**). Los 6 anticuerpos principales demostraron internalización por encima del límite determinado por las muestras de control positivo.

EJEMPLO 4 – AGRUPACIÓN DE EPÍTOPOS DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FRA

GENERADOS

OBJETIVO

El objetivo de este experimento fue agrupar epítipo de los anticuerpos anti-FR α generados, en particular los 6 anticuerpos a modo de ejemplo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se marcaron tres IgG anti-FR α de referencia para su uso en ensayos homogéneos de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF) usando un kit de etiquetado de anticuerpos DyLight 650 a microescala (Thermo Scientific, 84536) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (véase el Ejemplo 2 para conocer la configuración general del HTRF ensayo).

Se ajustaron los ensayos de competencia de epítomos HTRF usando una titulación de IgG de prueba, criptato de estreptavidina 1 nM, FR α humana biotinilada e IgG marcada con DyLight 650 para un volumen de ensayo de 10 μ l. Para los ensayos de Anticuerpo Comparador 1 y Anticuerpo Comparador 2, se usaron FR α humano biotinilado 0.5 nM y Anticuerpo Comparador 1 o Anticuerpo Comparador 2 marcado con DyLight 650 0.5 nM. Para el ensayo del Anticuerpo Comparador 3, se usó FR α humano biotinilado 1.25 nM y Anticuerpo Comparador 3 marcado con DyLight 650 1.25 nM. Se incubaron las placas de ensayo durante 3-4 horas a temperatura ambiente antes de la medición de la fluorescencia.

RESULTADOS

Se perfilaron las 115 IgG de hibridoma específicas del receptor de folato humano/de cyno en los tres ensayos de competencia de epítomos HTRF para determinar la diversidad de epítomos. Ocho IgG inhibidas en todos los ensayos, 41 en los ensayos de Anticuerpo Comparador 1 y Anticuerpo Comparador 2, 39 en los ensayos de Anticuerpo Comparador 2 y Anticuerpo Comparador 3, 12 en los ensayos de Anticuerpo Comparador 1 y Anticuerpo Comparador 3, 4 en el ensayo de Anticuerpo Comparador 1 solo, 6 en el ensayo del Anticuerpo Comparador 3 solo, y 5 IgG no inhibieron en ningún ensayo.

Se reformatearon los 6 anticuerpos a modo de ejemplo, se expresaron y se purificaron como IgG1 humana y se perfilaron en los ensayos de competición de epítomos HTRF para confirmar la potencia. En particular, todos los anticuerpos a modo de ejemplo principales podrían inhibir en el ensayo de competición del Anticuerpo Comparador 2. AB1370117 y AB1370035 inhibieron en los 3 ensayos de competencia de epítomos. AB1370026, AB1370083 y AB1370095 se inhibieron solo en los ensayos de competición de epítomos del Anticuerpo Comparador 1 y

del Anticuerpo Comparador 2. AB1370049 inhibió en solo los ensayos de competición del Anticuerpo Comparador 2 y Anticuerpo Comparador 3 (véanse la **Tabla 15** y **Figuras 3A-C**).

TABLA 15: RESUMEN DEL PERFIL DE IC50 EN LOS ENSAYOS DE COMPETENCIA DE EPÍTOPOS HTRF

Anticuerpo	Ensayo de competencia de epítomos HTRF, media geométrica IC50 (M), n>2		
	Comparador 1 IgG	Comparador 2 IgG	Comparador 3 IgG
AB1370026 hlgG1	3.20E-11	1.77E-10	sin inhibición
AB1370035 hlgG1	Inhibidor pero no sigmoidal	1.46E-09	2.85E-10
AB1370049 hlgG1	sin inhibición	3.37E-08	6.35E-09
AB1370083 hlgG1	2.96E-11	8.06E-11	sin inhibición
AB1370095 hlgG1	3.63E-10	4.15E-09	sin inhibición
AB1370117 hlgG1	Inhibidor pero no sigmoidal	9.33E-09	1.83E-09

CONCLUSIONES

Se perfilaron los 6 anticuerpos mediante ensayos de competición de epítomos. Se observó un rango de comportamiento y diversidad de epítomos, con algunas moléculas compitiendo con los tres anticuerpos de comparación y otras compitiendo solo con un subconjunto. AB1370049 no mostró competencia con el Anticuerpo Comparador 1, además de demostrar la competencia más débil con el Anticuerpo Comparador 2, mientras que competía con el Anticuerpo Comparador 3.

EJEMPLO 5 – AFINIDADES DE UNIÓN A ANTÍGENO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FRA GENERADOS

OBJETIVO

Determinar la cinética de unión y las constantes de disociación en equilibrio para un panel de anticuerpos generados, en particular los 6 anticuerpos a modo de ejemplo, contra FRα humano y cyno mediante análisis de resonancia de plasmones de superficie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se midió la afinidad del anticuerpo por las proteínas FRα humana y cyno con un sistema de resonancia de plasmón de superficie Biacore T200 (Cytiva) a 25°C. Se inmovilizó la proteína A covalentemente en la superficie de un chip CM5 usando técnicas estándar de acoplamiento de amina a una concentración de 50 µg/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 4.0. El anticuerpo se capturó en la superficie de la Proteína A en tampón HBS-EP+ , pH 7.4 a 10 µl/min para permitir la unión de FRα ECD. Se diluyó ECD de FRα en serie (FRα ECD humano 0.4 nM-100 nM; cyno FRα ECD 0.8 nM-200 nM; FRα ECD de ratón 30 nM-4000 nM y rata FRα ECD) en tampón HBS-

EP+ pH 7.4 y se hace fluir sobre el chip a 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, con 2 minutos de asociación y 8 minutos de disociación. Se regeneró completamente la superficie del chip con pulsos de MgCl_2 3 M para eliminar el anticuerpo capturado junto con cualquier FR α ECD unido. Se realizaron múltiples inyecciones de tampón solo en las mismas condiciones para permitir la sustracción de referencia doble de los conjuntos de sensogramas finales, que se analizaron con el software de evaluación Biacore T200 para obtener constantes de disociación de equilibrio.

RESULTADOS

Se midió la afinidad de los anticuerpos del panel de anticuerpos contra las proteínas cyno FR α y humanas mediante SPR. Se unieron todos los anticuerpos a proteínas humanas y de cyno. La afinidad por FR α humano estaba en el intervalo de 1-16 nM, y por cyno FR α 1-37 nM. Los parámetros de unión cinética de los 6 ejemplos de anticuerpos se resumen en la **Tabla 16** a continuación.

TABLA 16: RESUMEN DE DATOS DE AFINIDAD DE ANTICUERPOS

Anticuerpo	Proteína	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
AB1370026	FR α humano	2.79E+05	3.54E-04	1.3
	FR α de cyno	1.95E+05	3.42E-04	1.8
AB1370035	FR α humano	5.68E+05	5.27E-04	0.93
	FR α de cyno	4.75E+05	5.08E-04	1.1
AB1370049	FR α humano	2.05E+05	3.22E-03	15.7
	FR α de cyno	2.15E+05	7.94E-03	36.9
AB1370083	FR α humano	1.45E+05	1.35E-04	0.93
	FR α de cyno	1.01E+05	1.60E-04	1.56
AB1370095	FR α humano	9.57E+04	1.29E-03	13.5
	FR α de cyno	9.58E+04	1.83E-03	19.1
AB1370117	FR α humano	2.93E+05	7.62E-04	2.6
	FR α de cyno	3.64E+05	1.87E-03	5.1

CONCLUSIONES

Todos los 6 anticuerpos tenían constantes de disociación en el rango bajo de nM y en todos los casos la afinidad para unirse a cyno FR α estaba dentro de 2.5 veces de la de unirse a FR α humano. Por lo tanto, los 6 ejemplos de anticuerpos parecen adecuados desde una perspectiva de afinidad para un mayor desarrollo como agente terapéutico.

EJEMPLO 6 – PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FRA

GENERADOS

OBJETIVO

La generación de un anticuerpo terapéutico que se pueda desarrollar y esté alineado con los requisitos de fabricación requiere una evaluación exhaustiva de las propiedades

fisicoquímicas de un anticuerpo. En este experimento, se evaluó un panel de anticuerpos generados en cuanto a su título de expresión, estabilidad y tendencia hacia la autoasociación reversible.

MATERIALES Y MÉTODOS

CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDRÓFOBA (HIC) HPLC

Se realizó el análisis UHPLC-HIC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5 de 5 µm no porosa de 4.6 x 35 mm, eluyendo con un gradiente de sulfato de amonio de 1.5 M a 0 M y del 0 al 20% de acetonitrilo en fosfato de sodio 25 mM pH 7.40 en una muestra de ~ 1 mg/ml de cada mAb principal como una dilución 1:1 con sulfato de amonio 1.5 M en tampón de fosfato de sodio 25 mM pH 7.40. Cuanto más hidrófoba es la especie, más tarde se eluye y, por lo tanto, mayor tiempo de retención.

ESPECTROSCOPIA DE NANOPARTÍCULAS DE AUTOINTERACCIÓN DE CAPTURA DE AFINIDAD (AC-SINS)

Se intercambiaron los anticuerpos de captura (específicos del fragmento Fcγ de IgG antihumano de cabra, Jackson ImmunoResearch) en tampón de unión (acetato de potasio 20 mM, pH 4.3) y se prepararon nanopartículas de captura (nanopartículas de oro de 20 nm estabilizadas con citrato (a DO = 1), Innova Biosciences) mediante incubación con los anticuerpos a 0.4 mg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Se bloquearon las nanopartículas mediante incubación con PEG 2000 100 nM (Merck) a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se concentraron 10 veces. Se prepararon los anticuerpos para el análisis a una concentración final de 45 µg/ml en una disolución que contenía 12 µl de nanopartículas de captura e histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, arginina 80 mM, tampón pH 6 (HSA) hasta un volumen total de 120 µl en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se transfirieron alícuotas duplicadas de 50 µl a una placa de poliestireno de 384 pocillos (placa de poliestireno transparente de 384 pocillos Nunc, Thermo Scientific). Se midió la absorbancia de la muestra en un lector de placas y se determinó el desplazamiento hacia el rojo de la longitud de onda para cada muestra en comparación con la de los pocillos de control de tampón solamente. Un desplazamiento de >5 nm se marca como en riesgo de autoasociación.

ELISA PARA BACULOVIRUS

Se sometió a ensayo la unión no específica de anticuerpos a partículas de baculovirus mediante ELISA como describen Hotzel et al (Hotzel et al 2012 mAb 4:6, 753-760). Las preparaciones de cada anticuerpo se realizaron a 100 nM o 10 nM en PBS (Gibco 14190-086) + BSA al 0.5 % (Sigma A9576), y se utilizaron por duplicado en el ensayo de ELISA en placas Nunc Maxisorp F de 96 pocillos recubiertas durante una noche a 4 °C con 50 µl/pocillo bien de extracto de Baculovirus al 1 % en carbonato de sodio 50 mM (placa de BV) o carbonato de sodio

50 mM (placa en blanco). Tras un lavado con PBS, las placas se bloquearon con 300 µl/pocillo de PBS + BSA al 0.5 % durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. Se añadieron 50 µl/pocillo bien de PBS + BSA al 0.5 % (fondo) o diluciones de anticuerpos de prueba, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados en PBS, se añadió un anticuerpo de detección (Sigma A0170 anti-Fc humana conjugado con HRP específica) diluido 1:5000 en PBS + BSA al 0.5 % a 50 µl/pocillo. Se incubaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron las placas tres veces en PBS. A continuación, se añadió el sustrato de HRP-TMB (Reserva de SureBlue KPL 53-00-03) a 50 µl/pocillo y, tras el cambio de color, se detuvo la reacción añadiendo 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 0.5 M. La absorbancia se midió a 450nm. Se calcula una puntuación de BV promediando la absorbancia de 450 nm a una concentración de 10 nM y 100 nM para cada muestra de anticuerpo, luego se divide por la muestra de control solo secundaria. Una puntuación de BV > 5 puede indicar un riesgo de aumento del aclaramiento debido a una unión no específica.

ENSAYO DE ESTABILIDAD TÉRMICA ACELERADA

Se diluyeron las IgG a 1 mg/ml en PBS, luego se incubaron a 4°C o 45°C durante 2 semanas y luego se filtraron usando columnas de filtro giratorio (Millipore, UFC30HVN). Se realizó la cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HP-SEC) cargando 70 µl de IgG en un TSKgel G3000SWXL; Columna de 5 µm, 7.8 mm x 300 mm con un caudal de 1 ml/min y fosfato de sodio dibásico anhidro 0.1 M y sulfato de sodio 0.1 M, pH 6.8 como tampón de funcionamiento isocrático. Las moléculas de mayor tamaño se excluyen de los poros de la columna de exclusión por tamaño en mayor medida que las moléculas de menor tamaño y, por lo tanto, eluyen antes. Los máximos que se eluyen antes que el máximo de monómeros, se registran como agregados. Los máximos que se eluyen después del máximo de monómeros (excluyendo el máximo relacionado con el tampón), se registran como fragmentos. Paralelamente, se perfilaron los anticuerpos en el ensayo de competencia de epítomos HTRF para cambios en la potencia.

RESULTADOS

CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDRÓFOBA (HIC) HPLC

Los tiempos de retención de HIC más altos corresponden a una mayor hidrofobicidad, lo que puede indicar un riesgo de agregación y una mayor eliminación debido a una absorción no específica. Además, un mAb más hidrófobo podría dar como resultado un ADC más hidrófobo, lo que podría dar como resultado agregación durante la conjugación, inestabilidad como ADC y, potencialmente, una captación más no específica en los tejidos normales y, por lo tanto, toxicidad.

El panel de anticuerpos generados mostró un tiempo de retención en el intervalo de aproximadamente 2.0-2.8 min por HPLC-HIC. En particular, los 6 anticuerpos a modo de ejemplo exhibieron tiempos de retención bajos aceptables en comparación con el panel de anticuerpos sometidos a ensayo (véase la Tabla 17).

TABLA 17: RESUMEN DE DATOS DE HIC-HPLC

Muestra	Tiempo de retención por HIC-HPLC (min)
AB1370026 hIgG1	1.96
AB1370035 hIgG1	2.25
AB1370049 hIgG1	2.27
AB1370083 hIgG1	2.27
AB1370095 hIgG1	2.12
AB1370117 hIgG1	2.27

ESPECTROSCOPIA DE NANOPARTÍCULAS DE AUTOINTERACCIÓN DE CAPTURA DE AFINIDAD (AC-SINS)

También se analizó la tendencia de los anticuerpos a la autointeracción mediante espectroscopía de nanopartículas de autointeracción con captura de afinidad (AC-SINS). Este comportamiento subyace, o está asociado con, propiedades indeseables tales como autoasociación reversible, agregación, viscosidad, opalescencia y separación de fases. Al monitorear la longitud de onda del pico de absorbancia (longitud de onda del plasmón) de partículas de oro recubiertas con anticuerpo, AC-SINS mide indirectamente la propensión de una proteína a interactuar en un ambiente que imita una alta concentración de proteína. Los desplazamientos hacia el rojo de los anticuerpos a modo de ejemplo indicaron niveles insignificantes de autointeracción en el tampón HSA para todos los anticuerpos de prueba, mientras que los anticuerpos de control negativo y positivo se comportaron como se esperaba (**Figura 4**). Estos resultados indican que el riesgo de autoasociación es bajo para los 6 anticuerpos a modo de ejemplo sometidos a prueba.

ELISA PARA BACULOVIRUS

Para someter a prueba la unión no específica, que puede ser indicativa de una mayor tasa de eliminación *in vivo*, se analizó el nivel de unión a partículas de baculovirus en los anticuerpos en un formato ELISA. En todos los casos, los anticuerpos mostraron niveles insignificantes de unión no específica, todos los cuales estaban por debajo del umbral del ensayo de corte de 5. Ventajosamente, esto sugiere un bajo riesgo de mala eliminación *in vivo*.

ENSAYO DE ESTABILIDAD TÉRMICA ACELERADA

Se evaluó el panel de 6 anticuerpos a modo de ejemplo en cuanto a su estabilidad térmica sometida a ensayo por HP-SEC y, en paralelo, en el ensayo de competición de epítopos HTRF para cambios en la potencia (**Tabla 18**). En todos los casos, cualquier cambio de potencia

fue < 2 veces y la reducción de monómero fue < 3%, lo que indica que todos los anticuerpos eran térmicamente estables en las condiciones sometidas a prueba.

TABLA 18: RESUMEN DE LOS DATOS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA

Muestra	HP	SEC	%	Ensayo de competencia de epítomos MOv19 HTRF, media geométrica IC50 (M)		
	monómero			45 °C	4 °C	diferencia de pliegue
AB1370026 hlgG1	97.3	100		7.08E-10	7.11E-10	1.00
AB1370035 hlgG1	97.3	100		1.16E-09	9.45E-10	1.23
AB1370049 hlgG1	97.0	100		9.62E-09	1.63E-08	0.59
AB1370083 hlgG1	98.3	99.6		6.65E-11	5.11E-11	1.30
AB1370095 hlgG1	96.6	99.2		4.31E-09	5.07E-09	0.85
AB1370117 hlgG1	97.0	99.4		5.48E-09	3.75E-09	1.46

CONCLUSIONES

Todos los 6 mAbs principales mostraron una buena estabilidad térmica, bajo riesgo de autoasociación, unión no específica insignificante y baja hidrofobicidad y, por lo tanto, todos los mAbs principales muestran parámetros de capacidad de desarrollo aceptables.

EJEMPLO 7 – FARMACOCINÉTICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FRA GENERADOS EN RATONES SCID

OBJETIVO

Estudiar la farmacocinética de los anticuerpos anti-FRα generados en ratones SCID de tipo natural después de la administración de una dosis intravenosa única.

MATERIALES Y MÉTODOS

A los ratones SCID de tipo natural (n=3 por grupo) se les administró por vía intravenosa (bolo) los anticuerpos anti-FRα a modo de ejemplo (5 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre a los 15 min, 4 h, 1, 2, 3, 6, 10, 14 y 21 días después de la dosificación, se centrifugaron para obtener plasma y se analizaron los anticuerpos totales. Se determinaron los parámetros farmacocinéticos usando el software Phoenix 64 (Certara).

Se determinaron las concentraciones plasmáticas mediante el ensayo ELISA IgG universal.

RESULTADOS

A pesar de parecer a modo de ejemplo a través del proceso de selección basado en los Ejemplos anteriores, se observó una gama de perfiles PK dentro de este panel más amplio en ratón. A través de la detección de PK, se eliminaron los conductores con un aclaramiento de manera indeseada alto y una semivida corta.

El panel de anticuerpos analizados dio un aclaramiento en el intervalo de aproximadamente 5-25 ml/kg/días, y una semivida en el intervalo de aproximadamente 4-20

días. Entre los anticuerpos sometidos a prueba, los 6 anticuerpos anti-FR α a modo de ejemplo demostraron un aclaramiento relativamente baja y una semivida prolongada. Los parámetros farmacocinéticos para los 6 ejemplos de anticuerpos anti-FR α en ratones se muestran en la **Tabla 19**.

TABLA 19: PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA EL ANTICUERPO ANTI-FRA DE EJEMPLO (ANTICUERPO TOTAL) EN RATONES SCID DE TIPO SALVAJE

Anticuerpo principal	C _{máx} [μg/ml]	AUC _{última} [días*μg/ml]	CL [ml/kg/días]	V _{ss} [ml/kg]	t _{1/2} [días]
AB1370026	91.7	553	5.3	124	16.6
AB1370035	73.2	455	5.6	160	19.5
AB1370049	80.3	528	5.2	135	18.0
AB1370086	86.0	430	8.6	132	11.0
AB1370095	123.2	646	6.6	71	7.8
AB1370117	110.9	762	5.2	71	10.0

C_{máx} = Concentración plasmática máxima observada

AUC_{última} = área bajo la curva de concentración de plasma frente a tiempo hasta el último punto de tiempo que se puede medir

CL = aclaramiento plasmático

V_{ss} = volumen de distribución en estado estacionario

t_{1/2} = semivida de la fase de eliminación

CONCLUSIONES

Los anticuerpos anti-FR α a modo de ejemplo exhibieron una variedad de propiedades farmacocinéticas en ratones SCID de tipo natural, con AB1370035 demostrando la semivida más larga en este modelo, seguido de cerca por AB1370049, que también proporcionó el aclaramiento más bajo junto con AB1370117.

EJEMPLO 8 – FARMACOCINÉTICA DE AB1370049 EN RATONES HFCRN TG32

OBJETIVO

Estudiar la farmacocinética de AB1370049 en ratones hFcRn Tg32 tras la administración de una única dosis intravenosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

A ratones FcRn Tg32 humanos (n=3 por grupo) se les administró por vía intravenosa (bolo) AB1370049 (5 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre a los 15 min, 4 h, 1, 2, 3, 6, 10, 14 y 21 días después de la dosificación, se centrifugaron para obtener plasma y se analizaron los anticuerpos totales. Se determinaron los parámetros farmacocinéticos usando el software Phoenix 64 (Certara).

Se midieron las concentraciones de anticuerpos con un ensayo de inmunocaptura LC-MS/MS. Brevemente, se conjugó un anticuerpo antihumano policlonal con perlas magnéticas. Luego se diluyeron 25 µl de muestra de plasma en TBS y se incubaron junto con las perlas magnéticas. Después de la captura, las perlas magnéticas se lavaron varias veces antes de la digestión con tripsina en presencia de patrones internos. La digestión se extinguió con la adición de ácido. A continuación, se transfirió una alícuota del contenido líquido digerido con tripsina a la placa de inyección para el análisis de anticuerpos mediante LC-MS/MS.

Se usó el péptido tríptico característico en la región Fc del anticuerpo humano (VVSVLTVLHQDWLNGK) para calcular la concentración de anticuerpo total en la matriz seleccionada. Se separó el digerido tríptico de las muestras enriquecidas por immunoafinidad mediante cromatografía de fase inversa (RPLC), seguida de detección mediante monitorización de reacción múltiple (MRM) para el péptido característico. El estándar interno usado en este experimento es el péptido marcado isotópicamente. Se usó la relación del área del pico del analito frente a los estándares internos para calcular frente a la curva estándar creada al añadir el material de referencia ADC en la matriz deseada.

Se prepararon las curvas estándar y los QC mediante adiciones conocidas del compuesto objetivo (el material de referencia ADC) a diferentes niveles en la misma matriz que la matriz de la muestra. El rango de cuantificación cubre 100 ng/ml-12,000 ng/ml, y el control de calidad de la dilución cubre una dilución de hasta 50 veces. Se ajustó la curva estándar con una regresión lineal, con ponderación de 1/x².

RESULTADOS

Se muestran los parámetros farmacocinéticos para AB1370049 en ratones hFcRn Tg32 en la **Tabla 20**.

TABLA 20: PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA AB1370049 EN RATONES

HFCRN TG32

Anticuerpo	C_{máx} [µg/ml]	AUC_{última} [días*µg/ml]	CL [ml/kg/días]	V_{ss} [ml/kg]	t_{1/2} [días]
AB1370049	68	584	5.5	107	13.3

C_{máx} Concentración plasmática máxima observada

AUC_{última} = área bajo la curva de concentración de plasma frente a tiempo hasta el último punto de tiempo que se puede medir

CL = aclaramiento plasmático

V_{ss} = volumen de distribución en estado estacionario

t_{1/2} = semivida de la fase de eliminación

CONCLUSIONES

AB1370049 exhibió propiedades farmacocinéticas similares en ratones hFcRn Tg32 y SCID de tipo natural. El ratón hFcRn Tg32 es un modelo de ratón transgénico, en el que el FcRn del ratón se eliminó y el FcRn humano se incorporó. Como tal, representa un modelo particularmente apropiado para predecir la farmacocinética humana de AB1370049. Basándose en la farmacocinética del ratón hFcRn Tg32, el aclaramiento humano de AB1370049 probablemente será baja y la semivida será similar a la de otros anticuerpos utilizados clínicamente y, por lo tanto, se espera que permita una dosificación conveniente.

EJEMPLO 9 – INTERNALIZACIÓN/TRÁFICO LISOSOMAL DE LOS ANTICUERPOS ANTI-

FRA A MODO DE EJEMPLO EN RATONES SCID

OBJETIVO

Evaluar la internalización de mAb FR α principal en células KB y JEG-3 positivas para FR α .

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tiñeron las células KB y Jeg-3 con violeta traza celular (Thermo Scientific) y se sembraron en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Se incubaron los anticuerpos monoclonales a TA con 50 nM de Fab-pHast humano (ATS bio, Carlsbad) antes de la adición a las células sembradas. Se tomaron imágenes de células (20x) y se analizaron automáticamente para determinar el área de fluorescencia cada 30 min durante un máximo de 48 h en Plataforma de detección de alto contenido CellInsight CX7 (Thermo Scientific).

RESULTADOS

Se internalizaron todos los anticuerpos principales sometidos a prueba rápidamente en líneas celulares que expresan FR α con una saturación de aproximadamente 6-7 horas en células JEG-3 (**Figura 5A**) y 5 horas en células KB (**Figura 5B**).

CONCLUSIONES

A pesar de la menor expresión de FR α en la superficie de las células JEG-3 (coriocarcinoma) (990,000 receptores FR α /célula) en comparación con las células KB (37 millones de receptores FR α /célula), se internalizaron los anticuerpos sometidos a prueba rápidamente en ambos tipos de células, lo que demuestra su utilidad potencial en un formato de ADC.

EJEMPLO 10 – GENERACIÓN DE ADC EN FORMATO DAR8

OBJETIVO

Generar ADC DAR8 para mAb principal con carga útil SG3932 para la evaluación *in vitro* e *in vivo* de la actividad para la selección principal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se añadió una disolución 50 mM de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, Pierce) en solución salina tamponada con fosfato pH 7.4 (PBS, Gibco) (50 equivalentes molares/anticuerpo, 16.7 micromoles, 333 µl) a una disolución de 20 ml de anticuerpo (AB1370049 principal, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117; 50 mg cada uno, 333 nanomoles) en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (EDTA, Molekula) hasta una concentración final de anticuerpo de 2.5 mg/ml. Se calentó la mezcla de reducción a +37°C durante 2 horas (o hasta que se observó una reducción total mediante UHPLC) en un agitador orbital incubado con agitación suave (60 rpm). Después de enfriar a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de agente reductor mediante centrifugación con filtro giratorio en PBS + EDTA 1 mM usando un filtro giratorio Amicon Ultracell 50 kDa MWCO de 15 ml. Se añadió SG3932 como disolución de DMSO (12-24 equivalentes molares/anticuerpo, 4.8-9.0 micromoles, en 2.0-2.3 ml de DMSO) a 18-19 ml de esta disolución de anticuerpo reducido (37.0-46.9 mg, 247-313 nanomoles) a 2.0-2.5 mg/ml para una concentración final de DMSO del 10% (v/v). Se mezcló la disolución durante 1-18 horas a temperatura ambiente, luego se extinguió la conjugación mediante la adición de N-acetilcisteína (22.2-45.2 micromoles, 222-452 µl a 100 mM) durante > 30 minutos a temperatura ambiente, filtrado estéril, luego se purificó mediante filtración por rotación (PBS, seguido de histidina 20 mM + sacarosa 240 mM, pH 6.0) y se concentró usando un filtro por rotación Amicon Ultracell 30KDa MWCO de 15 ml, se filtró en condiciones estériles y se analizó.

RESULTADOS

El análisis de UHPLC-RP en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Thermo Scientific MAbPac de 50 mm x 2.1 mm eluida con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de ADC a 214 nm y 330 nm (específico de SG3932) mostró una mezcla de cadenas ligeras no conjugada (L0), cadenas ligeras unidas a una sola molécula de SG3932 (L1), cadenas pesadas no conjugadas (H0) y cadenas pesadas unidas a hasta tres moléculas de SG3932 (H1, H2, H3), donde las especies principales son L1 y H3, en consonancia con una proporción de fármaco por anticuerpo (DAR) de 7.58-7.94 moléculas de SG3932 por anticuerpo según se calcula en la fórmula a continuación utilizando la integración del pico del cromatograma de 214 nm. La carga útil extinguida por NAC libre era < LOD/LOQ. Los cromatogramas UHPLC-RP representativos para AB1370049-SG3932 DAR8 se muestran en las **Figuras 6A-6B**, que demostraron un DAR de 7.82.

$$DAR = 2 * \left(\frac{L1}{L0 + L1} + \frac{H1 + 2*(H2) + 3*(H3)}{H0 + H1 + H2 + H3} \right)$$

El análisis por UHPLC-SEC en un sistema Prominence de Shimadzu, que utilizaba una columna TSKgel SuperSW mAb HTP de Tosoh Bioscience de 4 µm 4.6 x 150 mm (con una precolumna, 4 µm, 3.0 x 20 mm) eluyendo con 0.3 mL/minuto de tampón para SEC filtrado con un filtro estéril que contenía fosfato de potasio 200 mM de pH 6.95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10% (v/v), de una muestra de ADC a 280 nm mostró una pureza monomérica del 98.5-99.5%. El cromatograma UHPLC-SEC representativo para AB1370049-SG3932 DAR8 se muestra en la **Figura 6C**.

Análisis UHPLC-HIC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5 de 5 µm no porosa de 4.6 x 35 mm eluyendo con un gradiente de sulfato de amonio de 1.5 M a 0 M y del 0 al 20% de acetonitrilo en fosfato de sodio 25 mM pH 7.40 en una muestra de ADC a 214 nm mostró un pico único complejo correspondiente a especies DAR8 en un tiempo de retención de 2.98-3.11 min. El cromatograma UHPLC-SEC representativo para AB1370049-SG3932 DAR8 se muestra en la **Figura 6D**.

El análisis UV (Nanodrop, Thermo) dio una concentración de ADC final de 0.92-3.10 mg/ml en 5.0-6.0 ml, masa obtenida de ADC de 11.0-37.0 mg (23-74% de rendimiento).

CONCLUSIONES

Todos los anticuerpos principales eran aptos para la conjugación con DAR8, mostrando una alta eficiencia de conjugación con DAR > 7.5, sin pérdida de DAR durante la purificación, sin agregación/fragmentación durante la fabricación y > 98% de pureza monomérica. Por consiguiente, los ADC de la invención pueden administrar específicamente una concentración significativamente mayor de carga útil de citotoxina a las células cancerosas diana mediante la unión a FRα en las células cancerosas. Los ADC DAR8 también son homogéneos y brindan la ventaja de la reproducibilidad y la variación limitada de lote a lote durante la fabricación. Esto permitiría la administración de una mayor cantidad de fármacos menos potentes (por ejemplo, TOPOi) a la célula cancerosa diana manteniendo la tolerabilidad.

Además, la hidrofobicidad relativamente baja de los ADC generados podría dar como resultado una menor absorción no específica por parte de los tejidos normales, lo que podría conducir a una mejor tolerabilidad en comparación con los ADC de comparación que administran fármacos más hidrófobos, tal como mirvetuximab soravtansina o IMG151.

A continuación, se evaluó adicionalmente la estabilidad térmica y sérica de los ADC principales a modo de ejemplo, la PK de ratón *in vivo*, así como la eficacia *in vitro* e *in vivo* (véanse los Ejemplos a continuación).

EJEMPLO 11 – GENERACIÓN DE ADC EN FORMATO DAR4**OBJETIVO**

Generar ADC de DAR4 para mAb principal con carga útil SG3932 para la evaluación de actividad *in vitro* e *in vivo* y en comparación con ADC de DAR8 para la selección principal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se añadió una disolución 5 mM de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, Pierce) en solución salina tamponada con fosfato pH 7.4 (PBS, Gibco) (2.7-2.9 equivalente molar/anticuerpo, 416-588 nanomoles, 83,2-117,7 µl) a una disolución de 9.2-12 ml de anticuerpo (AB1370049 principal, AB1370026, AB1370035, AB1370083, AB1370095 o AB1370117; 23-30 mg cada uno, 153-200 nanomoles) en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (EDTA, Molekula) para una concentración final de anticuerpo de 2.5 mg/ml. Se calentó la mezcla de reducción a +37°C durante 3 horas en un agitador orbital incubado con agitación suave (60 rpm). Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se añadió SG3932 como disolución de DMSO (7 equivalentes molares/anticuerpo, 2.91-4.12 micromoles, en 1.02-1.33 ml de DMSO) a esta disolución de anticuerpo reducido (23-30 mg, 153-200 nanomoles) durante una concentración final de DMSO del 10% (v/v). Se mezcló la disolución durante 17 horas a temperatura ambiente, luego se extinguió la conjugación mediante la adición de N-acetilcisteína (5.4-7.1 micromoles, 54-71 µl a 100 mM) durante > 30 minutos a temperatura ambiente, se filtró en condiciones estériles y luego se purificó en un FPLC AKTA™ Start usando una columna GE Healthcare HiLoad™ 26/600 empaquetada con Superdex 200 PG, eluyendo con 2.6 ml/min de PBS. Se agruparon las fracciones correspondientes al pico de monómero de ADC, se concentraron usando un filtro giratorio Amicon Ultracell 30KDa MWCO de 15 ml, se esterilizaron por filtración y se analizaron.

RESULTADOS

El análisis de UHPLC-RP en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Thermo Scientific MAbPac de 50 mm x 2.1 mm eluida con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de ADC a 214 nm y 330 nm (específico de SG3932) mostró una mezcla de cadenas ligeras no conjugada (L0), cadenas ligeras unidas a una sola molécula de SG3932 (L1), cadenas pesadas no conjugadas (H0) y cadenas pesadas unidas a hasta tres moléculas de SG3932 (H1, H2, H3), consistentes con un fármaco por relación de anticuerpos (DAR) de 4,13-4,27 moléculas de SG3932 por anticuerpo, calculada como en el Ejemplo 10. La carga útil extinguida por NAC libre era < LOD. Los cromatogramas UHPLC-RP representativos para AB1370049-SG3932 DAR4 se muestran en las **Figuras 7A-7B**, que demostraron un DAR de 4.24.

El análisis por UHPLC-SEC en un sistema Prominence de Shimadzu, que utilizaba una columna TSKgel SuperSW mAb HTP de Tosoh Bioscience de 4 µm 4.6 x 150 mm (con una

precolumna, 4 µm, 3.0 x 20 mm) eluyendo con 0.3 mL/minuto de tampón para SEC filtrado con un filtro estéril que contenía fosfato de potasio 200 mM de pH 6.95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10% (v/v), de una muestra de ADC a 280 nm mostró una pureza monomérica del 99.5%. El cromatograma UHPLC-SEC representativo para AB1370049-SG3932 DAR4 se muestra en la **Figura 7C**.

Análisis UHPLC-HIC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5 de 5 µm no porosa de 4.6 x 35 mm eluyendo con un gradiente de sulfato de amonio de 1.5 M a 0 M y del 0 al 20% de acetonitrilo en fosfato de sodio 25 mM pH 7.40 en una muestra de ADC a 214 nm mostró una mezcla de especies de DAR correspondiente a un DAR promedio de ~ 4. El cromatograma UHPLC-SEC representativo para AB1370049-SG3932 DAR4 se muestra en la **Figura 7D**.

El análisis UV (Stunner, Unchained Labs) dio una concentración de ADC final de 3.59-4.06 mg/ml en 5.0-6.0 ml, masa obtenida de ADC de 18.0-24.0 mg (68-79% de rendimiento).

CONCLUSIONES

Todos los anticuerpos principales fueron aptos para ajustar los equivalentes de TCEP para la conjugación estocástica de DAR4, sin pérdida de DAR durante la purificación, sin agregación/fragmentación durante la fabricación, > 99% de pureza monomérica y altos rendimientos.

A continuación, se evaluaron adicionalmente los ADC principales a modo de ejemplo para su PK de ratón *in vivo*, así como para la eficacia *in vivo* (véanse los Ejemplos a continuación).

EJEMPLO 12 – ESTABILIDAD DEL SUERO *IN VITRO*/DESCONJUGACIÓN DE LOS ADC A

MODO DE EJEMPLO

OBJETIVO

Determinar la estabilidad de AB1370049-SG3932 DAR8 y otros ADC de DAR8 principales frente a una variedad de sueros.

MATERIALES Y MÉTODOS

DEPLECIÓN DE IGG EN SUERO HUMANO

A una columna rellena con resina de proteína A MabSelect SuRe™ LX (42 ml, 1 CV) que se equilibró en PBS, se hizo pasar suero humano (100 ml) dos veces, recogiendo el suero humano cada vez. Se regeneró la columna cada vez mediante lavado con tampón de citrato (citrato de sodio 100 mM, pH 3.0, 210 ml, 5 CV).

INCUBACIÓN DE ADC EN SUERO

Se adicionaron ADC (1.00 mg/ml, diluyendo según se requería con PBS) a los sueros (ratón (ab7486, abcam), rata (C13SDZ, BioRad), humano con depleción de IgG (DHP-2001, Access Biologicals) y cyno (pedido personalizado, BioIVT), dilución 20× de ADC en suero). Se

dividieron las mezclas resultantes (1.8 ml) en alícuotas (200 µl) en placas de 96 pocillos (Sterile Nunc™). Se sellaron las placas con película AeraSeal™, se cubrieron con tapas para microplacas (Nunc™) y se incubaron en una incubadora con CO₂ al 5% a 37°C. Se extrajeron alícuotas de muestra en diversos puntos de tiempo (0, 1, 3 y 7 días) y se almacenaron las muestras a -80°C antes del análisis.

PREPARACIÓN DE LA RESINA DE CAPTURA

Se lavaron las perlas magnéticas de estreptavidina PureProteome™ (4.90 ml) (5 veces) en PBS y se añadió el conjugado de biotina CaptureSelect™ Human IgG-Fc PK (750 µl de una disolución de 1.0 mg/ml). Se diluyó la mezcla adicionalmente con PBS (60 µl, pH 7.4) antes de mezclar de principio a fin (3 h, 40 rpm). Se eliminó el CaptureSelect residual, se lavaron las perlas (5 veces) en PBS, se completó hasta el volumen original con PBS y se almacenaron a 2-8 °C antes del uso posterior.

CAPTURA DE ADC DEL SUERO

Se diluyeron las muestras de suero descongelado (200 µl cada una) con PBS (7.2 µl por muestra) y se trataron con PNGaseF (P0704L, NEB) (0.8 µl por muestra) durante 6 h. Mientras tanto, en un sistema de manipulación de perlas magnéticas KingFisher Flex, la resina de captura (50 µl por muestra) se lavó secuencialmente con tampón SN1 (1 × TBS pH 7.4, TWEEN20 al 0.05%, BSA al 0.1%, 2 × 300 µl por muestra), con el tampón de elución Pierce™ IgG (100 µl por muestra), y de nuevo con el tampón SN1 (3 × 300 µl por muestra). Se realizó la captura de ADC incubando (15 min) las muestras con las alícuotas de resina preparadas. A continuación, se lavaron las resinas (3 × 300 µl por muestra) con PBS, se eluyeron los ADC incubando las resinas en tampón de elución de IgG (25 min, 50 µl por muestra) y se filtraron las disoluciones de los ADC eluidos con una placa de filtro MultiScreenHTS HV. (0.45 µm, transparente, no estéril).

Usando una mezcla maestra de mezcla de reducción (fosfato de sodio 1.0 M pH 6.0, borato de sodio 150 mM pH 8.4, DTT 1.0 M y agua de grado LC-MS, mezclada en una proporción de 15:20:6:10), se redujeron las muestras (17 µl por muestra) durante 15 min a 37°C. La extinción mediante la adición de ácido fórmico al 2% en acetonitrilo al 50% v/v en agua (40 µl por muestra) proporcionó las muestras preparadas en su estado final antes del análisis LC-MS.

ANÁLISIS LC-MS

Se enviaron las muestras para su análisis en un sistema LC-MS que consiste en una pila de HPLC UltiMate 3000 equipada con un detector de longitud de onda variable (VWD), acoplado a un espectrómetro de masas Exactive Plus EMR Orbitrap (Thermo Scientific). Se inyectaron las muestras (78 µl) en una columna MAbPac RP (2.1 × 50 mm, 4 µm, Thermo Scientific, 088648) y se separaron en un gradiente segmentado (acetonitrilo en agua con ácido

trifluoroacético al 0.03%, 5-25 % durante 30 s, luego 25-60% durante 2 min). Se detectaron los analitos a 280 nm en el VWD y en el espectrómetro de masas (MS) en modo EMR Full MS. Parámetros del archivo de sintonización de MS: Caudal de gas envolvente: 35, Caudal de gas auxiliar: 10, Caudal de gas de barrido: 0, Voltaje de pulverización: 3.5 kV, Temperatura capilar: 300°C, Nivel de RF de lente S: 200, Temperatura del calentador de gas auxiliar: 300. Parámetros del método MS: Polaridad: positiva, CID en fuente: 20.0 eV, Microbarridos: 10, Resolución 17500, objetivo AGC: 3e6, TI máximo: automático, intervalo de barrido: 1000-4000 m/z.

ANÁLISIS DE DATOS DE EM

Se desconvolucionaron los espectros de masas usando Thermo BioPharma Finder. A los picos en los espectros desconvolucionados considerados químicamente significativos se les extrajeron sus valores de altura porcentual, de modo que se pudo determinar el DAR y el porcentaje de modificaciones químicas significativas para cada muestra. La comparación de los valores DAR de un ADC dado en un suero dado a lo largo del tiempo permitió determinar el porcentaje de desconjugación para cada muestra.

RESULTADOS

Todos los ADC mostraron bajos grados de desconjugación de la carga útil en todos los sueros (**Figura 8A**). Esto es en parte ayudado por todos los ADC que muestran niveles significativos de hidrólisis de maleimida, al menos en sueros de ratón, rata y cyno (**Figura 8B**). La hidrólisis de maleimida estabiliza químicamente las cargas útiles conjugadas, evitando que se desconjuguen del anticuerpo del ADC. Sin embargo, en suero humano empobrecido en IgG, la prevalencia de hidrólisis de maleimida fue menor. El efecto protector disminuido conferido por la hidrólisis de maleimida aquí demuestra así la estabilidad intrínseca de estos ADC frente a la desconjugación.

CONCLUSIONES

Todos los ADC mostraron una buena estabilidad general frente a todos los sueros.

EJEMPLO 13 – ESTABILIDAD *IN VIVO* / DESCONJUGACIÓN DE AB1370049-SG3932

DAR8

OBJETIVO

Evaluar la integridad del anticuerpo AB1370049-SG3932 DAR8 y la desconjugación de la ojiva en condiciones *in vivo* durante todo el marco de tiempo del estudio DRF de cyno.

MATERIALES Y MÉTODOS

A monos cynomolgus macho (N = 3) se les administraron por vía intravenosa 2 dosis únicas (cada una con 3 semanas de diferencia, es decir, los días 1 y 22) de AB1370049-SG3932 DAR8.

Se tomaron muestras de sangre por punción venosa y se centrifugaron para obtener plasma. Los ensayos de anticuerpos totales y ADC se realizaron mediante el método LBA-

LCMS. Se inmunocapturó AB1370049-SG3932 DAR8 por anticuerpo antihumano biotinilado conjugado con perlas magnéticas, que luego se someterá a múltiples etapas de lavado. Luego se realizó la digestión con tripsina y se inyectó una alícuota del sobrenadante en LCMS para el ensayo de anticuerpos totales. Otra alícuota se sometió a una escisión enzimática adicional con papaína y la disolución se usó para el ensayo de ADC. Se separó la muestra inyectada mediante cromatografía de fase inversa (RPLC), seguida de detección mediante monitorización de reacción múltiple (MRM). Se usó la relación del área del pico del analito frente a los estándares internos para calcular frente a la curva estándar creada al añadir el material de referencia ADC en la matriz deseada.

Para el ensayo de anticuerpos totales, se usaron dos péptidos tripticos característicos en el anticuerpo AB1370049-SG3932 DAR8 para calcular la concentración de anticuerpos totales en la matriz seleccionada: cadena pesada (VVSVLTVLHQDWLNGK) y cadena ligera (DSTYSLSSTLTLSK). para el ensayo de ADC, se usó la ojiva liberada de papaína para calcular la concentración. Se usaron los péptidos marcados isotópicamente o la ojiva como patrón interno.

RESULTADOS

La relación entre el ADC y el anticuerpo total fue de alrededor de 1, lo que indica que no hubo una desconjugación significativa de la ojiva *in vivo*.

CONCLUSIONES

En condiciones *in vivo*, se mantuvo el ADC AB1370049-SG3932 DAR8 estable y no se observó una degradación significativa.

EJEMPLO 14 – FARMACOCINÉTICA DE LOS ADC DAR8 A MODO DE EJEMPLO EN

RATONES SCID

OBJETIVO

Estudiar la farmacocinética de 6 ADC anti-FR α DAR8 a modo de ejemplo en ratones SCID de tipo natural después de la administración de una dosis intravenosa única.

MATERIALES Y MÉTODOS

A los ratones SCID de tipo natural (n=3 por grupo) se les administró por vía intravenosa (bolo) los ADC anti-FR α a modo de ejemplo (5 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre a los 15 min, 4 h, 1, 2, 3, 6, 10, 14 y 21 días después de la dosificación, se centrifugaron para obtener plasma y se analizaron ADC total. Se determinaron los parámetros farmacocinéticos usando el software Phoenix 64 (Certara).

Se midieron las concentraciones de los ADC totales con un ensayo de inmunocaptura LC-MS/MS. Brevemente, se conjugó un anticuerpo antihumano policlonal con perlas magnéticas. Luego se diluyeron 25 μ l de muestra de plasma en TBS y se incubaron junto con las perlas magnéticas. Después de la captura, las perlas magnéticas se lavaron varias veces

antes de digerirlas con tripsina. Se sometió una alícuota del sobrenadante digerido con tripsina a digestión enzimática durante la noche con papaína en presencia de un patrón interno. Se extinguieron las muestras digeridas con la adición de ácido antes del análisis por LC-MS/MS.

Se usó la ojiva liberada de papaína para calcular la concentración de ADC. El estándar interno usado en este experimento es la ojiva marcada isotópicamente. Se separó el digerido de papaína de las muestras enriquecidas por inmunoafinidad mediante cromatografía de fase inversa (RPLC) seguido de detección mediante monitoreo de reacción múltiple (MRM) para la ojiva liberada. Se usó la relación del área del pico del analito frente a los estándares internos para calcular frente a la curva estándar creada al añadir el material de referencia ADC en la matriz deseada.

Se prepararon las curvas estándar y los QC mediante adiciones conocidas del compuesto objetivo (el material de referencia ADC) a diferentes niveles en la misma matriz que la matriz de la muestra. Para los estudios con roedores (FcRn y Tg32), el rango de cuantificación cubre 100 ng/ml-12,000 ng/ml, y el control de calidad de la dilución cubre una dilución de hasta 50 veces. Se ajustó la curva estándar con una regresión lineal, con ponderación de $1/x^2$.

RESULTADOS

Los parámetros farmacocinéticos para los ADC anti-FR α DAR8 a modo de ejemplo en ratones SCID se muestran en la **Tabla 21**.

TABLA 21: PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA LOS ADC DAR8 EN RATONES

SCID

	C_{máx} [μ g/ml]	AUC_{última} [días* μ g/ml]	CL [ml/kg/días]	V_{ss} [ml/kg]	t_{1/2} [días]
ADC 26	96.13	576.51	5.15	125.69	18.46
ADC 35	114.24	578.45	4.17	135.57	23.21
ADC 49	127.48	696.25	4.56	97.63	15.94
ADC 95	100.77	609.16	2.95	139.85	34.13
ADC 117	117.14	654.19	5.98	87.21	11.35
ADC 83	106.97	798.87	3.63	93.63	20.05

C_{máx} Concentración plasmática máxima observada

AUC_{última} = área bajo la curva de concentración de plasma frente a tiempo hasta el último punto de tiempo que se puede medir

CL = aclaramiento plasmático

V_{ss} = volumen de distribución en estado estacionario

t_{1/2} = semivida de la fase de eliminación

CONCLUSIONES

Los ADC anti-FR α de ejemplo exhibieron una variedad de propiedades farmacocinéticas en ratones SCID de tipo natural. La farmacocinética de ratones SCID de todos los ejemplos de anticuerpos exhibió un aclaramiento plasmático bajo y una semivida plasmática larga en ratones SCID.

EJEMPLO 15 – FARMACOCINÉTICA DE LOS ADC DAR4 Y DAR8 FORMADOS A PARTIR DE AB1370049 Y SG3932 EN RATONES HFCRN TG32

OBJETIVO

Estudiar la farmacocinética de los ADC DAR4 y DAR8 formados a partir de AB1370049 y SG3932 en ratones hFcRn Tg32 después de la administración de una dosis intravenosa única.

MATERIALES Y MÉTODOS

A ratones FcRn Tg32 humanos (n=3 por grupo) se les dosificó por vía intravenosa (bolo) los ADC DAR4 o DAR8 formados a partir de AB1370049 y SG3932 (5 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre a los 15 min, 4 h, 1, 2, 3, 6, 10, 14 y 21 días después de la dosificación, se centrifugaron para obtener plasma y se analizaron ADC total. Se determinaron los parámetros farmacocinéticos usando el software Phoenix 64 (Certara).

Se midieron concentraciones de AB1370049-SG3932 DAR4 o AB1370049-SG3932 DAR8 con un ensayo de inmunocaptura LC-MS/MS. Brevemente, se conjugó un anticuerpo antihumano policlonal con perlas magnéticas. Luego se diluyeron 25 μ l de muestra de plasma en TBS y se incubaron junto con las perlas magnéticas. Después de la captura, las perlas magnéticas se lavaron varias veces antes de digerirlas con tripsina. Se sometió una alícuota del sobrenadante digerido con tripsina a digestión enzimática durante la noche con papaína en presencia de un patrón interno. Se extinguieron las muestras digeridas con la adición de ácido antes del análisis por LC-MS/MS.

Se usó la ojiva liberada de papaína para calcular la concentración de ADC DAR4 o DAR8. El estándar interno usado en este experimento es la ojiva marcada isotópicamente. Se separó el digerido de papaína de las muestras enriquecidas por inmunoafinidad mediante cromatografía de fase inversa (RPLC) seguido de detección mediante monitoreo de reacción múltiple (MRM) para la ojiva liberada. Se usó la relación del área del pico del analito frente a los estándares internos para calcular frente a la curva estándar creada al adicionar DAR4 o DAR8 el material de referencia ADC en la matriz deseada.

Se preparan las curvas estándar y los QC mediante adiciones conocidos DAR4 o DAR8 ADC (el material de referencia de ADC) a diferentes niveles en la misma matriz que la matriz de la muestra. El rango de cuantificación cubre 100 ng/ml-12,000 ng/ml, y el control de calidad de la dilución cubre una dilución de hasta 50 veces. Se ajustó la curva estándar con una regresión lineal, con ponderación de 1/x².

RESULTADOS

Los parámetros farmacocinéticos para los ADC de DAR4 y DAR8 en ratones hFcRn Tg32 se muestran en la **Tabla 22**.

**TABLA 22: PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA AB1370049-SG3932 EN
FORMATO DAR4 O DAR8 EN RATONES HFCRN TG32 (ADC MEDIO)**

ADC	C_{máx} [µg/ml]	AUC_{última} [días*µg/ml]	CL [ml/kg/días]	V_{ss} [ml/kg]	t_{1/2} [días]
DAR-4 ADC	121	504	7.2	126	12.2
DAR-8 ADC	110	405	10.4	120	8.0

C_{máx} Concentración plasmática máxima observada

AUC_{última} = área bajo la curva de concentración de plasma frente a tiempo hasta el último punto de tiempo que se puede medir

CL = aclaramiento plasmático

V_{ss} = volumen de distribución en estado estacionario

t_{1/2} = semivida de la fase de eliminación

CONCLUSIONES

AB1370049-SG3932 DAR8 exhibió un aclaramiento ligeramente mayor y una semivida más baja en hFcRn Tg32 que en ratones SCID de tipo natural. El ratón hFcRn Tg32 es un modelo de ratón transgénico, en el que el FcRn del ratón se eliminó y el FcRn humano se incorporó. Como tal, representa un modelo apropiado para predecir la farmacocinética humana de AB1370049-SG3932 DAR8. Basándose en la farmacocinética del ratón hFcRn Tg32, el aclaramiento humano de AB1370049-SG3932 DAR8 probablemente será baja y la semivida será similar a la de otros ADC usados clínicamente y debería permitir una dosificación conveniente. Estos datos son coherentes con los datos farmacocinéticos obtenidos con los mAb a modo de ejemplo de la invención. El ADC de DAR4 exhibió una semivida ligeramente más larga en ratones hFcRn Tg32, conducida por un aclaramiento plasmático ligeramente más bajo.

EJEMPLO 16 – ACTIVIDAD DE DESTRUCCIÓN DE CÉLULAS *IN VITRO* DE LOS ADC DE DAR8 A MODO DE EJEMPLO

OBJETIVO

Evaluar la actividad citotóxica de ADC anti-FRα DAR8 a modo de ejemplo con líneas de células cancerosas que expresan diferentes niveles de FRα.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron las líneas de células cancerosas con diversos niveles de expresión de FRα de la ATCC (Colección Americana de Cultivos de Tejidos). Las células KB son una línea celular de cáncer de cuello uterino con contaminante HeLa, mientras que IGROV-1 es una línea celular de cáncer de ovario y JEG-3 es una línea celular de coriocarcinoma. Se sembraron en placas

células por duplicado en placas de 96 pocillos. Después de una incubación durante 24 h, se trataron las células con un intervalo de 0-66.66 nM (0-10 µg/ml) de ADC principal o el control de ADC no dirigido NIP228 durante 6 días. El día 6, se incubaron las células durante 10 min con el reactivo CellTiter-Glo y se midió la luminiscencia usando un lector de placas de 96 pocillos. Se midió la luminiscencia de fondo en medio sin células y se restó de los valores experimentales. Se calcularon los valores de CI50 en Graph Pad Prism.

RESULTADOS

Se sometieron a prueba los ADC a modo de ejemplo en una variedad de líneas de células cancerosas con diferentes niveles de expresión de FRα: KB (alto), IGROV-1 (alto-medio) y JEG-3 (medio). Tal como se muestra en las **Figuras 9A-9C**, todos los ADC a modo de ejemplo tenían actividad citotóxica en las 3 líneas celulares positivas para FRα analizadas. Los candidatos principales de ADC fueron más potentes en la línea celular KB con alta expresión de FRα (IC50 = 0.13 a 0.23 µg/ml) y en medio JEG-3 (IC50 = 0.01-0.14 µg/ml).

CONCLUSIONES

Todos los ADC mostraron una alta potencia en estos ensayos de destrucción de células *in vitro*, lo que indica su posible eficacia en el tratamiento de cánceres que sobreexpresan FRα. En particular, AB1370049-SG3932 DAR8 tuvo la mejor actividad citotóxica en las líneas celulares que expresan 3 FRα en general.

EJEMPLO 17 – DESTRUCCIÓN DE LA ACTIVACIÓN INESPECÍFICA DE AB1370049-

SG3932 DAR8

OBJETIVO

Para evaluar la actividad de la activación inespecífica de AB1370049-SG3932 DAR8 en experimentos de cocultivo con células KB positivas y negativas para FRα.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la actividad de la activación inespecífica de AB1370049-SG3932 DAR8, se incubó una mezcla de células KB positivas para antígeno (KB TN) y células de desactivación de KB FRα negativas para antígeno con una etiqueta GFP (KB FRα k/o GFP) en presencia de AB1370049-SG3932 DAR8. Después de 6 días de cultivo, se recogieron las poblaciones celulares restantes usando tripsina y se analizaron por citometría de flujo. Se identifican las células viables con antígeno positivo y negativo, se recuentan y se comparan con muestras sin tratamiento.

RESULTADOS

AB1370049-SG3932 DAR8 mostró una actividad de destrucción de la activación inespecífica eficaz cuando se mezcló en un experimento de cocultivo 1:1 de células KB que expresan FRα y FRα negativas (**Figura 10**).

CONCLUSIONES

AB1370049-SG3932 DAR8 no solo puede inducir la apoptosis y finalmente la muerte celular en tumores que expresan FR α de manera homogénea, sino también en tumores expresados de manera heterogénea, como se muestra en experimentos de cocultivo en los que el 50% de las células expresan FR α y el 50% no. Se internaliza el ADC en las células positivas para FR α y se libera una ojiva libre que mata la célula cancerosa objetivo. La ojiva libre también puede difundirse en las células cancerosas vecinas que no expresan FR α y también puede destruirlas.

EJEMPLO 18 – ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VIVO* DE LOS ADC A MODO DE

EJEMPLO EN MODELOS DE XENOINJERTOS DERIVADOS DE CÉLULAS

OBJETIVO

Evaluar la actividad antitumoral de los ADC a modo de ejemplo, especialmente AB1370049-SG3932 DAR8, en una variedad de modelos CDX de cáncer humano, que representan una variedad de niveles de expresión objetivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el modelo de xenoinjerto KB, se inocularon subcutáneamente 6×10^6 células/ratón en ratones hembra CB17-SCID (Charles River Laboratories). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 150-200 mm³, los ratones se asignaron al azar en grupos. Se administró cada uno de los ADC DAR8 de 6 derivaciones por vía intravenosa como dosis única (día 7) a 0.3125 mg/kg, 0.625 mg/kg, 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg y ADC DAR4 a 0.625 mg/kg, 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg con los niveles de dosis correspondientes de control de isotipo NIP228.

Para el modelo de xenoinjerto Caco-2, se inocularon subcutáneamente 5×10^6 células/ratón en Matrigel al 50% en ratones desnudos atímicos hembra (Harlon Laboratories). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 150 mm³, los ratones se asignaron al azar en grupos. Se administró AB1370049-SG3932 DAR8 por vía intravenosa como dosis única (día 17) a 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, control de isotipo correspondiente NIP228 a 1.25 mg/kg, 5 mg/kg y FR α -DM4 ADC (“biosimilar a mirvetuximab soravtansina”, con una DAR de aproximadamente 3) a 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg y 5 mg/kg, con el correspondiente control de isotipo NIP228 a 1.25 mg/kg y 5 mg/kg.

Para el modelo de xenoinjerto IGROV-1, se inocularon subcutáneamente 1×10^7 células/ratón en Matrigel al 50% en ratones hembra con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (Envigo). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 285 mm³ (día 32), los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos basándose en el volumen del tumor. Los animales de control recibieron una dosis intravenosa de vehículo de 100 μ l, mientras que los animales tratados recibieron una dosis intravenosa de AB1370049-SG3932 DAR8 a 1.25 mg/kg, 2.5

mg/kg, 5 mg/kg, dosificados a 4 ml/kg, correspondiente control de isotipo NIP228 a 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg y FR α -DM4 ADC ("biosimilar a mirvetuximab soravtansina", con una DAR de aproximadamente 3) a 5 mg/kg, con el correspondiente control de isotipo NIP228 a 5 mg/kg.

Para el modelo de xenoinjerto OVCAR3, se administró AB1370049-SG3932 DAR8 como dosis única de 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg y FR α -DM4 ADC ("biosimilar a mirvetuximab soravtansina", con una DAR de aproximadamente 3) a 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg y 5 mg/kg.

Los volúmenes de los tumores se midieron dos veces a la semana con calibradores.

RESULTADOS

Se observó una regresión total del tumor con 5 mg/kg (KB y OVCAR-3) y 1.25 mg/kg (solo OVCAR-3) para todos los ADC de DAR 8 sometidos a prueba (**Figuras 11-12**). En un xenoinjerto de IGROV-1 con expresión de FR α media-alta, AB1370049-SG3932 DAR8 estuvo activo a 5 mg/kg con regresión parcial del tumor durante 70 días antes de que los tumores comenzaran a crecer de nuevo (**Figura 13**). Se seleccionó el ADC principal AB1370049-SG3932 DAR8 porque tenía una respuesta más duradera en comparación con otros candidatos principales, en particular en los modelos de xenoinjerto KB y OVCAR-3.

También se sometieron a prueba los ADC DAR4 principales en el modelo KB (**Figura 14**). Se logró la regresión total del tumor a 5 mg/kg para todos los ADC sometidos a prueba, lo que indica que los ADC DAR4 también exhiben una buena eficacia.

También se sometió a prueba AB1370049-SG3932 DAR8 contra FR α -DM4 ADC (biosimilar a mirvetuximab soravtansina, con un DAR de aproximadamente 3) en los modelos de xenoinjerto OVCAR-3 y CaCo-2 que tienen una expresión de FR α de media a media baja (**Figuras 15A-15B**). AB1370049-SG3932 DAR8 fue más eficaz a concentraciones de dosis más bajas (1.25 y 2.5 mg/kg) y tuvo una actividad antitumoral más duradera que FR α -DM4 en estos modelos.

CONCLUSIONES

Todos los ADC principales a modo de ejemplo demostraron una sólida actividad antitumoral en una variedad de diferentes modelos de xenoinjerto y en diferentes dosis. La actividad antitumoral fue similar o mejor que la molécula de comparación, FR α -DM4.

EJEMPLO 19 – ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA IN VIVO DE AB1370049-SG3932 DAR8 EN MODELOS DE XENOINJERTOS DERIVADOS DE PACIENTES EN CHAMPIONS E

INTERNOS

OBJETIVO

Evaluar la actividad antitumoral de AB1370049-SG3932 DAR8, en Modelos PDX de Champions de paso bajo y en modelos PDX internos de cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer colorrectal y cáncer de endometrio humanos que representan un intervalo de niveles de expresión objetivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MODELOS CHAMPIONS

Se seleccionaron 30 modelos PDX (19 modelos de NSCLC, 9 modelos de cáncer de ovario y 2 modelos de cáncer de endometrio) para la investigación. Se implantaron subcutáneamente fragmentos de tejido tumoral en ratones stock Foxn1nu desnudos atímicos hembra de 6-8 semanas de edad. Cuando suficientes animales de reserva alcanzaron 1000 – 1500 mm³, se recogieron los tumores y se implantaron fragmentos en los animales previos al estudio. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 150-300 mm³, los animales se distribuyeron aleatoriamente por volumen tumoral en 5 grupos. El grupo 1 no recibió tratamiento, el grupo 2 y el grupo 4 recibieron 5 mg/kg o 2.5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 respectivamente. Los grupos 3 y 5 recibieron el control de isotipo funciones NIP228-SG3932 a 5 mg/kg o 2.5 mg/kg respectivamente. Todos los animales dosificados recibieron una dosis por vía intravenosa el día 0.

Se observaron los animales diariamente y se midieron las dimensiones tumoral y el peso corporal y se registraron dos veces a la semana. Se midieron los volúmenes tumorales mediante con un calibrador de digital y los volúmenes de tumores se calcularon usando la siguiente fórmula: tumor de tumor = longitud (mm) x anchura (mm)²/0.52, donde la longitud y la anchura son los diámetros más largos y más cortos del tumor, respectivamente.

El punto final del estudio en todos los modelos se realizó cuando el volumen tumoral medio del grupo control alcanzó los 1200 mm³ o si no se alcanzó el volumen tumoral máximo, un máximo de 60 días. Si el volumen de 1200 mm³ se produjo antes del día 28, los grupos de tratamiento se midieron hasta el día 28. Después de la aleatorización de los animales en el estudio, se usaron 3 animales por modelo para recolectar muestras de tumores. Se recogieron tumores de aproximadamente 400-600 mm³, procesándose la mitad del tumor para análisis inmunohistoquímico y la otra mitad para análisis genómico.

MODELOS INTERNOS

Se realizaron estudios internos de eficacia de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) *in vivo* usando diferentes modelos de tumores, tales como cáncer de ovario, colon, endometrio y pulmón de células no pequeñas. Se implantaron estos fragmentos tumorales del modelo PDX por vía subcutánea mediante trocates en ratones NOD-SCID hembra (Envigo). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 150-200 mm³, los ratones se asignaron al azar en grupos. Se administró AB1370049-SG3932 DAR8 por vía intravenosa como dosis única de 2.5 mg/kg, 5 mg/kg con los niveles de dosis correspondientes del control de isotipo NIP228. Los volúmenes de los tumores se midieron dos veces a la semana con calibradores. Se calculó el crecimiento del tumor usando la fórmula $\frac{1}{2} \times L \times W^2$ (L = largo; W = ancho). Se midieron los pesos corporales dos veces a la semana para evaluar la tolerabilidad de los tratamientos.

DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL

Se calculó la respuesta al volumen tumoral final (FTV) del volumen tumoral inicial (ITV) en el momento que resultó en la mayor disminución del volumen tumoral inicial. Se calculó la respuesta antitumoral para cada ratón con tumor usando la fórmula:

$$5 \quad \text{Crecimiento tumoral (\%)} = [(FTV-ITV)/ITV] \times 100$$

Se calculó el crecimiento tumoral (%) para cada animal en un grupo de estudio y se calculó la respuesta del grupo como la respuesta mediana de todos los ratones tratados.

10 Para cada grupo de tratamiento se determinó si hubo respuesta o no respuesta al agente de prueba. Los criterios de respuesta se basan en RECIST 1.1, donde una respuesta se basa en una disminución del 30% en el volumen del tumor con respecto a las mediciones iniciales del tumor.

RESULTADOS

En la **Tabla 23** y la **Figura 16A** se resume la mediana del crecimiento tumoral porcentual resultante de una sola administración de 5.0 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 o NIP228-SG3932 en 51 modelos PDX. Se observó inhibición del crecimiento tumoral después de una dosis única de 5.0 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8, y el 54% de los modelos (29 de 54) mostró una reducción del volumen tumoral desde el inicio del 30% o más. Una dosis única de 5.0 mg/kg de NIP228-SG3932 dio como resultado una reducción del volumen tumoral desde el inicio del 30% o más en el 22% (11 de 49) de los modelos en los que se sometió a prueba. En los modelos PDX de cáncer de ovario sometidos a prueba, 5.0 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 dieron como resultado una reducción del volumen tumoral desde el valor inicial del 30% o más en el 78.3 % (18 de 23: IC del 95% 58% - 91%) de los modelos sometidos a prueba. 5.0 mg/kg de NIP228-SG3932 dio como resultado una reducción del volumen tumoral a partir del nivel inicial del 30% o mayor en el 43.5% (10 de 23: IC al 95% 26% - 63%) de los modelos sometidos a prueba.

TABLA 23: LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL IN VIVO A AB1370049-SG3932 DAR8 (5.0 MG/KG) EN LOS 54 MODELOS (30 MODELOS

CHAMPIONS Y 24 MODELOS INTERNOS)

Nombre del tumor	Indicación de cáncer	AB1370049-SG3932 DAR8 5.0 mg/kg		NIP228-SG3932 5.0 mg/kg	
		Mediana del % del crecimiento tumoral	Respuesta	Mediana del % del crecimiento tumoral	Respuesta
MEDI-COL-06	Colorrectal	59.0%	NR	-6.4%	NR

5	MEDI-COL-41	Colorrectal	52.3%	NR	No sometido a prueba	No sometido a prueba
	MEDI-COL-37	Colorrectal	46.3%	NR	54.6%	NR
	MEDI-COL-08	Colorrectal	43.4%	NR	No sometido a prueba	No sometido a prueba
	MEDI-COL-29	Colorrectal	5.6%	NR	No sometido a prueba	No sometido a prueba
10	MEDI-COL-28	Colorrectal	-0.3%	NR	60.9%	NR
	MEDI-COL-43	Colorrectal	-1.6%	NR	No sometido a prueba	No sometido a prueba
15	MEDI-COL-14	Colorrectal	-5.9%	NR	No sometido a prueba	No sometido a prueba
	MEDI-COL-05	Colorrectal	-67.3%	R	-59.0%	R
	MEDI-COL-01	Colorrectal	-81.7%	R	-1.9%	NR
20	CTG-1577	Endometrio	120.8%	NR	27.3%	NR
	CTG-2268	Endometrio	-49.0%	R	76.0%	NR
25	CTG-0502	NSCLC	438.3%	NR	273.7%	NR
	CTG-1014	NSCLC	33.8%	NR	29.6%	NR
	CTG-0192	NSCLC	29.6%	NR	31.3%	NR
	CTG-2532	NSCLC	19.0%	NR	-1.6%	NR
	CTG-2393	NSCLC	6.6%	NR	13.1%	NR
	CTG-2579	NSCLC	3.5%	NR	77.1%	NR
	CTG-2542	NSCLC	2.8%	NR	43.4%	NR
30	CTG-2610	NSCLC	-2.4%	NR	15.2%	NR
	CTG-1194	NSCLC	-5.3%	NR	26.3%	NR
	CTG-2535	NSCLC	-20.1%	NR	25.3%	NR
	CTG-2548	NSCLC	-30.5%	R	-1.3%	NR
35	CTG-0848	NSCLC	-49.4%	R	5.5%	NR
	CTG-0184	NSCLC	-50.5%	R	-9.6%	NR
	CTG-2530	NSCLC	-57.0%	R	-8.6%	NR

5	CTG-2534	NSCLC	-79.7%	R	-18.8%	NR
	CTG-2367	NSCLC	-85.4%	R	-13.8%	NR
	CTG-1878	NSCLC	16%	NR	-24%	NR
	CTG-2143	NSCLC	-87%	R	6%	NR
	CTG-2180	NSCLC	-36%	R	-13%	NR
10	CTG-0252	Ovário	182.5%	NR	211.9%	NR
	OV419	Ovário	100.4%	NR	14.5%	NR
	CTG-1423	Ovário	48.4%	NR	71.0%	NR
	CTG-0992	Ovário	3.1%	NR	14.1%	NR
	CTG-3331	Ovário	-7.5%	NR	-18.1%	NR
15	OV1110F	Ovário	-59.5%	R	-41.8%	R
	OV0452F	Ovário	-61.8%	R	-30.5%	R
	CTG-0486	Ovário	-63.7%	R	-32.2%	R
	CTG-1678	Ovário	-66.8%	R	40.4%	NR
	HOXF-031	Ovário	-70.6%	R	6.6%	NR
20	MEDI-OVA-05	Ovário	-72.4%	R	52.3%	NR
	OV1828F	Ovário	-76.4%	R	-68.6%	R
	CTG-3383	Ovário	-77.8%	R	-100.0%	R
	CTG-3226	Ovário	-87.3%	R	-68.0%	R
	OV2022F	Ovário	-90.4%	R	-57.4%	R
25	CTG-0956	Ovário	-92.2%	R	-12.9%	NR
	CTG-1166	Ovário	-93.6%	R	-39.7%	R
	CTG-0711	Ovário	-96.9%	R	-0.5%	NR
	MEDI-OVA-13	Ovário	-100.0%	R	-74.0%	R
	MEDI-OVA-14	Ovário	-100.0%	R	15.3%	NR
30	HOXF-050	Ovário	-100.0%	R	24.0%	NR
	HOXF-053	Ovário	-100.0%	R	-17.8%	NR
	OV0857 CIS	Ovário	-100.0%	R	-76.0%	R

En la **Tabla 24** y la **Figura 16B** se resume la mediana del crecimiento tumoral porcentual resultante de una sola administración de 2.5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 o NIP228-SG3932 en 39 modelos PDX. Se observó una inhibición específica del crecimiento tumoral después de una dosis intravenosa única de 2.5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 en el 49%

de los modelos PDX sometidos a prueba (19 de 39), mientras que el 51% de los modelos no respondieron (20 de 39). Solo dos modelos de los 37 sometidos a prueba respondieron a la misma dosis de ADC NIP228-SG3932 DAR8 no dirigido. La actividad de los ADC no dirigidos depende de la dosis, ya que menos modelos respondieron a NIP228-SG3932 DAR8 (5 %) a la concentración de dosis más baja.

TABLA 24: LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL IN VIVO A AB1370049-SG3932 DAR8 (2.5 MG/KG) EN LOS 39 MODELOS (10 MODELOS INTERNOS)

Nombre del tumor	Indicación de cáncer	AB1370049-SG3932 DAR8 2.5 mg/kg		NIP228-SG3932 2.5 mg/kg	
		Mediana del % del crecimiento tumoral	Respuesta	Mediana del % del crecimiento tumoral	Respuesta
MEDI-COL-28	Colon	31.0%	NR	82.1%	NR
MEDI-COL-43	Colon	15.3%	NR	20.2%	NR
MEDI-COL-05	Colon	-61.6%	R	28.2%	NR
MEDI-COL-01	Colon	-64.0%	R	42.0%	NR
CTG-1577	Endometrio	40.4%	NR	79.5%	NR
CTG-2268	Endometrio	-0.4%	NR	86.0%	NR
CTG-0502	NSCLC	310.9%	NR	279.0%	NR
CTG-2579	NSCLC	72.7%	NR	94.4%	NR
CTG-0192	NSCLC	54.5%	NR	55.3%	NR
CTG-1194	NSCLC	49.3%	NR	73.1%	NR
CTG-1014	NSCLC	33.1%	NR	53.4%	NR
CTG-2532	NSCLC	21.2%	NR	41.4%	NR
CTG-2393	NSCLC	16.7%	NR	-1.8%	NR
CTG-2548	NSCLC	10.6%	NR	-14.8%	NR
CTG-0184	NSCLC	2.1%	NR	26.8%	NR
CTG-2535	NSCLC	-1.3%	NR	19.0%	NR
CTG-2610	NSCLC	-23.0%	NR	8.2%	NR
CTG-2542	NSCLC	-24.4%	NR	41.8%	NR
CTG-2530	NSCLC	-28.2%	NR	19.7%	NR
CTG-0848	NSCLC	-58.4%	R	8.9%	NR
CTG-2367	NSCLC	-80.9%	R	-23.1%	NR

CTG-2534	NSCLC	-83.0%	R	11.9%	NR
CTG-0252	Ovárico	151.3%	NR	288.6%	NR
CTG-1423	Ovárico	64.7%	NR	64.6%	NR
CTG-0992	Ovárico	3.6%	NR	37.9%	NR
OV1110F	Ovárico	-29.5%	R	-8.5%	NR
CTG-3331	Ovárico	-34.2%	R	-5.8%	NR
CTG-0956	Ovárico	-40.1%	R	-5.6%	NR
OV2022F	Ovárico	-54.0%	R	No sometido a prueba	No sometido a prueba
CTG-3383	Ovárico	-57.3%	R	-68.7%	R
CTG-0486	Ovárico	-60.4%	R	45.4%	NR
CTG-1678	Ovárico	-62.6%	R	45.4%	NR
OV1828F	Ovárico	-63.0%	R	-42.2%	R
CTG-3226	Ovárico	-70.0%	R	-11.1%	NR
MEDI-OVA-14	Ovárico	-76.4%	R	No sometido a prueba	No sometido a prueba
CTG-1166	Ovárico	-77.5%	R	-25.8%	NR
CTG-0711	Ovárico	-77.8%	R	-21.1%	NR
OV0857 CIS	Ovárico	-83.6%	R	No sometido a prueba	No sometido a prueba
MEDI-OVA-13	Ovárico	-100.0%	R	83.1%	NR

AB1370049-SG3932 DAR8 ha demostrado una respuesta antitumoral en varios modelos en las 4 indicaciones de cáncer de ovario, NSCLC, CCR y cáncer de endometrio. Las Figuras 17A-17C muestran los estudios representativos de los modelos CTG-0711 (cáncer de ovario), CTG-2367 (NSCLC) y CTG-2268 (endometrio).

En cáncer de ovario la tasa de respuesta objetiva fue del 80%, en NSCLC 30%, CRC 20% y 50% en endometrio. Hubo una correlación positiva entre la expresión de FR α y la actividad de AB1370049-SG3932 DAR8.

CONCLUSIONES

AB1370049-SG3932 DAR8 es altamente eficaz en tumores que expresan FR α con niveles de expresión altos, medios y medios-bajos. En general, existe una correlación positiva entre la actividad antitumoral de AB1370049-SG3932 DAR8 y los niveles de expresión de FR α .

EJEMPLO 20 – ESTUDIOS DE SEGURIDAD *IN VITRO* CON ADC A MODO DE EJEMPLO**OBJETIVO**

Se evaluó la seguridad *in vitro* de AB1370049-SG3932 DAR8 usando células madre y progenitoras hematopoyéticas primarias (HSPC) que se diferencian en células eritroides, mieloides y megacariocíticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se descongelaron células progenitoras CD34⁺ de médula ósea humanas crioconservadas (Lonza) y se dejaron recuperar durante la noche en medio de mantenimiento (StemSpan SFEM II (Stem Cell Technologies) que contenía SCF 25 ng/ml, TPO 50 ng/ml y proteína recombinante humana Flt3-L 50 ng/ml (todos de Peprotech)), en una incubadora humidificada a 37°C con CO₂ al 5%. Al día siguiente, se resuspendieron las células en presencia de fármaco en medios Cell Expand que podían soportar la diferenciación de células eritroides (Preferred Cell Systems, SEC-BFU1-40H), diferenciación de células mieloides (Preferred Cell Systems, SEC-GM1-40H) o diferenciación de células megacariocíticas (Stem Cell Technologies, 09707), a una concentración de 5000 células/ml para células eritroides y mieloides, o de 15000 células/ml para células megacariocíticas.

Las células (100 µl) se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos de fondo transparente y paredes blancas por triplicado (Corning) con la adición de ADC a modo de ejemplo (por ejemplo, AB1370049-SG3932 DAR8) o control de isotipos NIP228 ADC (200, 66.66, 22.22, 7.4, 2.47, 0.82, 0.27, 0.091, 0.03 y 0 µg/ml) y se cultivaron durante 5 días en una incubadora humidificada a 37°C, con CO₂ al 5%.

Además, se evaluó el efecto de los ADC a modo de ejemplo sobre células expandidas y diferenciadas. Para hacerlo, las células se sembraron en placas de diferenciación de células eritroides a una concentración de 5000 células/ml durante 5 días antes de ser sembradas en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente por triplicado durante 5 días con la adición de ADC a modo de ejemplo (por ejemplo, AB1370049-SG3932 DAR8), ADC de control NIP228 no dirigido a FR α o mAb no conjugado (NIP228 y AB1370049 respectivamente) en las siguientes concentraciones 200, 66.66, 22.22, 7.4, 2.47, 0.82, 0.27, 0.091, 0.03 y 0 µg/ml, para 5 días en una incubadora humidificada a 37°C, con CO₂ al 5%. Para la diferenciación de células mieloides o la diferenciación de células megacariocíticas, las células se sembraron respectivamente a 10000 células/ml y 15000 células/ml durante 5 días, antes de centrifugarlas y sembrarlas en medios frescos respectivamente a 10000 células/ml y 30000 células/ml durante un 5 días adicionales antes de colocarse en placas en medio de diferenciación mieloide o megacariocítico a 20000 células/ml y 30000 células/ml durante 4 días en presencia de AB1370049-SG3932 DAR8 (200, 66.66, 22.22, 7.4, 2.47, 0.82, 0.27, 0.091, 0.03 y 0 µg/ml).

Se determinó la viabilidad usando CellTiter-Glo 2.0 de Promega (usando un volumen optimizado de 10 µl/pocillo), con luminiscencia detectada usando un lector de placas Envision (Perkin Elmer). Se normalizó la señal de luminiscencia relativa en el software GraphPad (Prism) al porcentaje de control con controles iguales a 100 y muerte celular máxima igual a 0.

5

RESULTADOS

10

Se usó un sistema de cultivo *in vitro* 2D para medir la toxicidad en células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ humanas primarias (HSPC). Las HSPC se proliferan y se diferencian a lo largo de linajes eritroides, megacariocíticos y mieloides (granulocitos/monocitos) en presencia de compuestos. Se determinaron los efectos inhibidores usando la cuantificación de ATP como sustituto de la viabilidad celular. Con este método, se evaluó la toxicidad inducida por AB1370049-SG3932 DAR8 y su control de ADC no dirigido a FR α relevante para evaluar cualquier toxicidad exacerbada de AB1370049-SG3932 DAR8.

15

20

AB1370049-SG3932 DAR8 presenta niveles de toxicidad similares a los de una molécula de ADC que no se dirige a FR α y lleva la misma carga útil (**Figuras 18A-18F**). Esta observación se ve en células primarias de médula ósea CD34⁺ diferenciadas en cualquier linaje, independientemente de su nivel de diferenciación. Se observaron resultados similares con otros ADC a modo de ejemplo de la invención, incluyendo los mAbs AB1370095, AB1370026 y AB1370117 cuando se conjugaron con la misma carga útil de TOPOi. Cuando se dosificó en condiciones de cultivo similares a las descritas para AB1370049-SG3932 DAR8, el mAb no conjugado (AB1370049) no indujo ninguna disminución significativa de los niveles de ATP en las HSPC. Además, el HSPC tratado con AB1370049 conjugado con la misma carga útil de TOPOi en DAR4 mostró un nivel de toxicidad comparable al del HSPC tratado con ADC DAR4 no dirigido a FR α .

25

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que no hay toxicidad mediada por el objetivo ni exacerbación de la toxicidad impulsada por los anticuerpos principales en comparación con una molécula de ADC que no se dirige a FR α .

EJEMPLO 21 – ESTUDIOS DE FARMACOCINÉTICA *IN VIVO* CON AB1370049 Y

AB1370049-SG3932 DAR8

30

OBJETIVO

35

Se llevaron a cabo análisis farmacocinéticos (PK) de plasma de AB1370049-SG3932 DAR8 en monos cynomolgus, incluyendo la exposición máxima y total, el aclaramiento y la semivida. Se recogieron muestras farmacocinéticas de monos cynomolgus en diversos niveles de dosis para el candidato principal de ADC y el anticuerpo no conjugado. Se realizó un análisis no compartimental para estimar los parámetros PK.

MATERIALES Y MÉTODOS**ADMINISTRACIÓN DE AB1370049 Y AB1370049-SG3932 DAR8 A MONOS****CYNOMOLGUS**

A monos cynomolgus macho (N = 3) se les administraron por vía intravenosa 2 dosis
5 únicas (cada una con 3 semanas de diferencia, es decir, los días 1 y 22) de AB1370049 a 15 mg/kg o AB1370049-SG3932 DAR8 a 15 y 25 mg/kg.

Se tomaron muestras de sangre por punción venosa antes de la dosis, 0.04, 0.25, 1, 3,
7, 14 y 21 días después de la dosis el día 1 y el día 22, se centrifugaron para obtener plasma y
se analizaron para anticuerpos totales, ADC totales y ojivas no conjugadas. Se determinaron
10 los parámetros farmacocinéticos usando el software Phoenix 64 (Certara).

ENSAYO DE ANTICUERPOS TOTALES Y ADC

Se midieron las concentraciones de ADC total y de anticuerpo total con un ensayo de
inmunocaptura LC-MS/MS. Brevemente, se conjugó un anticuerpo antihumano policlonal con
perlas magnéticas. Luego se diluyeron 40 µl de muestra de plasma en TBS y se incubaron junto
15 con las perlas magnéticas. Después de la captura, las perlas magnéticas se lavaron varias
veces antes de la digestión con tripsina en presencia de patrones internos. La digestión se
extinguió con la adición de ácido. A continuación, se transfirió una alícuota del contenido líquido
digerido con tripsina a la placa de inyección para el análisis de Ab total.

Para el ensayo ADC, se sometió una alícuota del sobrenadante digerido con tripsina a
20 digestión enzimática durante la noche con papaína en presencia de un patrón interno. Se
extinguieron las muestras digeridas con la adición de ácido antes del análisis por LC-MS/MS.
Se usó la ojiva liberada de papaína para calcular la concentración. El estándar interno usado en
este experimento es la ojiva marcada isotópicamente. Se separó el digerido de papaína de las
muestras enriquecidas por inmunoafinidad mediante cromatografía de fase inversa (RPLC)
25 seguido de detección mediante monitoreo de reacción múltiple (MRM) para la ojiva liberada. Se
usó la relación del área del pico del analito frente a los estándares internos para calcular frente
a la curva estándar creada al añadir el material de referencia ADC en la matriz deseada.

Para el ensayo de Ab total, se usó el péptido tríptico característico en la región Fc del
anticuerpo humano (VVSVLTVLHQDWLNGK) para calcular la concentración de anticuerpo total
30 en la matriz seleccionada. Se separó el digerido tríptico de las muestras enriquecidas por
inmunoafinidad mediante cromatografía de fase inversa (RPLC), seguida de detección mediante
monitorización de reacción múltiple (MRM) para el péptido característico. El estándar interno
usado en este experimento es el péptido marcado isotópicamente. Se usó la relación del área
del pico del analito frente a los estándares internos para calcular frente a la curva estándar
35 creada al añadir el material de referencia ADC en la matriz deseada.

Se prepararon las curvas estándar y los QC mediante adiciones conocidas del compuesto objetivo (el material de referencia ADC) a diferentes niveles en la misma matriz que la matriz de la muestra. Para el estudio NHP, el rango de cuantificación es de 100 a 15000 ng/ml, con un factor de dilución de hasta 100 veces. Se ajustó la curva estándar con una regresión lineal, con ponderación de 1/x², la exactitud y precisión del ensayo está dentro del 20% para todos los niveles, excepto en LLOQ (25%).

ENSAYO DE OJIVA NO CONJUGADA

Se realizó el ensayo de ojiva no conjugada mediante el procedimiento de precipitación. El estándar interno usado en este experimento es la ojiva marcada isotópicamente. Se precipitó la muestra con un tampón que contenía un alto porcentaje de disolvente orgánico con un patrón interno añadido. A continuación, se secó el sobrenadante bajo nitrógeno antes de reconstituirlo en el tampón adecuado para inyectarlo en LCMS. Luego, se separó la muestra mediante cromatografía de fase inversa (RPLC), seguida de detección mediante monitoreo de reacción múltiple (MRM) para la ojiva no conjugada. Se usó la relación del área del pico del analito frente a los estándares internos para calcular frente a la curva estándar creada al añadir el material de referencia ADC en la matriz deseada.

Se prepararon las curvas estándar y los QC mediante adiciones conocidas de la ojiva no conjugada a diferentes niveles en la misma matriz que la matriz de muestra. Para el estudio NHP, el rango de cuantificación del ensayo es de 0.059 a 29.5 ng/ml. La curva estándar se ajustó con una regresión lineal. La exactitud y precisión del ensayo está dentro del 15% para todos los niveles, excepto en LLOQ (20%).

RESULTADOS

Se resumen los parámetros farmacocinéticos medios basados en el análisis no compartimental (NCA) en la **Tabla 25**. El mAb no conjugado (AB1370049) exhibió una PK lineal en monos cynomolgus a 15 mg/kg con una semivida y un aclaramiento en línea con la bibliografía para IgG humana en monos. El ADC (AB1370049-SG3932 DAR8) mostró una PK lineal en macacos cynomolgus a dosis de 15 mg/kg y 25 mg/kg, con exposición proporcional a la dosis ($C_{\text{máx}}$ y AUC), CL y $t_{1/2}$ comparables observados. La exposición del anticuerpo no conjugado es mayor en comparación con el ADC de dosis igualada con un aclaramiento más lento y una semivida más larga que la del ADC, como se puede esperar para la adición de ocho ojivas citotóxicas. Sin embargo, la PK del ADC se encuentra dentro de los criterios aceptables para un ADC en monos cynomolgus.

TABLA 25: PARÁMETROS PK DE NCA MEDIOS DE MAB NO CONJUGADO Y MAB CONJUGADO EN MONOS DESPUÉS DE UNA SOLA ADMINISTRACIÓN

Dosis (mg/kg)	mAb no conjugado (AB1370049)	AB1370049-SG3932 DAR8	AB1370049-SG3932 DAR8
---------------	------------------------------	-----------------------	-----------------------

	15 mg/kg	15 mg/kg	25 mg/kg		
Analito	mAb total	ADC total	mAb total	ADC total	mAb total
C _{máx} (ug/ml)	377	396	340	773	609
AUC (ug*día/ml)	2470	1620	1390	3990	2910
t _{1/2} (día)	11.5	6.6	6.4	6.2	6.9
CL (ml/kg/día)	4.49* n=1	8.4	9.8	5.8	7.8

No se observó una acumulación significativa de ADC entre la primera y la segunda dosis y no disminuyó la exposición después de la segunda dosis, lo que indica que no se formaron anticuerpos neutralizantes significativos contra el fármaco (**Figura 19**). Los niveles de anticuerpo total y ADC total medidos para la muestra AB1370049-SG3932 DAR8 (25 mg/kg) fueron similares a los de la muestra de mAb no conjugado (15 mg/kg) desde el día 0 hasta el día 42. Los niveles de anticuerpos totales y ADC totales medidos para la muestra AB1370049-SG3932 DAR8 (15 mg/kg) fueron relativamente más bajos. En resumen, el anticuerpo total y el ADC total fueron similares dentro de los grupos, además, se observó una ojiva libre mínima a lo largo del tiempo, lo que indica una desconjugación limitada y una alta estabilidad *in vivo*.

CONCLUSIONES

El ADC DAR8 (AB1370049-SG3932 DAR8) se sometió a un estudio de determinación de intervalo de dosis en monos, donde se observó una exposición dependiente de la dosis con una semivida consistentemente larga y una depuración lenta, como se había indicado previamente en los estudios de PK en ratones.

En particular, AB1370049-SG3932 DAR8 demostró una semivida más larga y una depuración más lenta que los ADC FR α más avanzados del mercado (Olga, et al. Cancer Res August 15 2020 (80) (16 Supplement) 2890; DOI: 10.1158/1538-7445.AM2020-2890; WO2020223221A1). El perfil de toxicidad del ADC descrito en la presente invención podría dar por resultado una terapia más tolerable y a una superioridad clínica potencial.

EJEMPLO 22 - ACTIVIDAD ANTI-CÁNCER IN VIVO DE AB1370049-SG3932 DAR8 EN MODELOS DE XENOINJERTO DERIVADOS DE PACIENTES, OVO857 CIS Y CTG3226

OBJETIVO

Evaluar la actividad antitumoral de AB1370049-SG3932 DAR8 en comparación a un ADC anti FR α -DM4 en modelos de PDX de ovario con expresión de FR α media y media-baja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron estudios internos de eficacia de xenoinjerto derivado de pacientes (PDX) *in vivo* utilizando 2 modelos diferentes de PDX de ovario, OVO857_CIS ("OVO0875") y CTG3226. Los ratones NSG hembra de 6-8 semanas de edad (NOD-SCID IL2Rgamma^{null}) como ratones de siembra se implantaron por vía subcutánea con fragmentos de tejido tumoral.

Cuando suficientes animales con semillas alcanzaron 1000 – 1500 mm³, los tumores se recolectaron y los fragmentos se implantaron en los animales de estudio. Cuando el volumen tumoral alcanzó aproximadamente 150-250 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente en diferentes grupos (n=3 ratones por grupo). Un grupo no recibió tratamiento. A cuatro grupos se les administró por vía intravenosa 10, 5, 2.5 y 1.25 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8, respectivamente. A dos grupos se les administró por vía intravenosa 5 y 2.5 mg/kg de ADC FR α -DM4 ("biosimilar a mirvetuximab soravtansina", con un DAR de aproximadamente 3) respectivamente. Todos los animales dosificados recibieron el fármaco por vía intravenosa como una dosis individual a 10 ml/kg, el día 39 para OVO857_CIS y el día 46 para los modelos CTG3226 PDX.

Los volúmenes tumorales se midieron con un calibrador digital y los volúmenes de tumores se calcularon utilizando la siguiente fórmula: volumen tumoral = [longitud (mm) x ancho (mm)]² x 0.52, donde la longitud y el ancho son los diámetros más largos y más cortos del tumor, respectivamente. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para evaluar la tolerabilidad de los tratamientos.

El crecimiento de los tumores en cada grupo experimental se expresó como el volumen tumoral medio (mm³) $\pm$ EEM del número de animales utilizados.

La inhibición de crecimiento tumoral (TGI) se calculó al comparar cada grupo de tratamiento al grupo de control no tratado. El porcentaje de inhibición se calculó a partir de las medias de grupo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{TGI (\%)} = (\text{C}-\text{T})/\text{C} \times 100.$$

Donde C es el volumen tumoral medio del grupo de control no tratado y T es el volumen tumoral medio de los grupos tratados.

Tinción inmunohistoquímica de muestras tumorales para expresión de FR α

El anticuerpo monoclonal FR α anti-conejo (clon [EPR20277]) utilizado para inmunohistoquímica (IHC) se obtuvo de Abcam (núm. de catálogo ab221543) y se diluyó en diluyente de anticuerpo con agentes reductores de fondo (Agilent, núm. de catálogo S3022). La IHC se realizó en un instrumento Ventana Discovery Ultra (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA). Las secciones de tejido incrustado en parafina (FFPE) fijado con formalina se cortaron a 4 μ m, se colocaron en portaobjetos de microscopio StarFrost^{MR} y se cargaron en el autoteñidor. Los portaobjetos se recuperaron de antígeno con Ultra Cell Conditioning 1 (Roche Diagnostic, catálogo #05424569001) y se bloquearon con Inhibidor CM (Roche Diagnostics, catálogo #05266645001). Entonces, las secciones se incubaron con anticuerpo primario, HRP se bloqueó con inhibidor DISCOVERY (Roche, catálogo # 07017944001) y la muestra se incubó con anticuerpo secundario IgG HRP anti-conejo (Roche Diagnostics, catálogo # 05269717001). La tinción se visualizó por 3,3' diaminobencidina (DAB) marrón con el kit DISCOVERY

ChromoMap DAB (Roche Diagnostics, catálogo #05266645001). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina II (Roche Diagnostics, catálogo #05277965001) y reactivos de azulado (Roche Diagnostics, catálogo #05266769001). Finalmente, las secciones se deshidrataron en etanol graduado, se depuraron en xileno, y se cubrieron con cubreobjetos.

La tinción de FR α se evaluó por un patólogo, cuantificada, y se categorizó dentro del intervalo: sin tinción (0+), baja (1+), media (2+) o alta (3+).

CUANTIFICACIÓN DIGITAL DE LA EXPRESIÓN DE FRA EN MUESTRAS TUMORALES

Las imágenes digitales del ensayo FR α IHC se analizaron, cuantificaron computacionalmente y verificaron por un patólogo para confirmar la identificación adecuada del área tumoral analizable (ATA), que debe comprender al menos el 80% del tumor invasivo presente en la muestra de tejido. Se calcularon los valores de densidad óptica de membrana (OD) de las células, tal como la media general y la mediana (es decir, el cuantil 50) de valores de OD. Los valores de OD de membrana varían de 0 a 255. Para cada modelo, la expresión diana se representa como la mediana de OD de membrana de tres tumores recolectados de ratones de estudio independientes no tratados.

RESULTADOS

El tumor OVO875 se clasificó como un expresor de FR α medio con base en una puntuación de IHC de 2+ y una mediana de OD de 41.

El tumor CTG3226 se clasificó como un expresor de FR α bajo-medio con base en una puntuación de IHC de 1+ a 2+ y una mediana de OD de 28.

Los dos modelos de PDX de cáncer de ovario OVO875 (expresión de FR α media) y CTG3226 (expresión de FR α baja-media) se administraron con una dosis iv individual de AB1370049-SG3932 DAR8 (10, 5, 2.5 o 1.25 mg/kg) o FR α -DM4 (5 o 2.5 mg/kg). El volumen tumoral y los pesos corporales se monitorearon durante 68 días.

Se observó una inhibición tumoral casi completa de OVO857 después del tratamiento con AB1370049-SG3932 DAR8 a 10, 5 y 2.5 mg/kg (TGI% de 98.5, 96.4, 94.5 respectivamente), en tanto que se observó una respuesta parcial a 1.25 mg/kg (TGI% de 67). En contraste marcado, FR α -DM4 fue sustancialmente menos efectivo con un TGI de 24% a 5 mg/kg y 2% a 2.5 mg/kg (Tabla 26 y Figura 20).

TABLA 26: INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO TUMORAL (% DE TGI) EN EL MODELO PDX DE CÁNCER DE OVARIO OVO875

Tratamiento	Volumen tumoral medio (mm ³) $\pm$ EEM	TGI (%)	valor de p (ANOVA) ^a	
			Tratamiento vs vehículo	AB1370049-SG3932 DAR8 versus FR α -DM4 (H2H)

No tratado	1928.20±330.05	N/A	N/A	N/A
10 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	29.71±3.24	98.46	0.0008	N/A
5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	70.37±32.84	96.35	0.0010	<0.0001
2.5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	105.71±43.54	94.52	0.0013	<0.0001
1.25 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	635.56±248.43	67.04	0.0448	N/A
5 mg/kg de FR α -DM4	1457.15±250.01	24.43	0.9832(NS)	N/A
2.5 mg/kg de FR α -DM4	1882.00±199.43	2.40	0.9999(NS)	N/A

^avalor de p <0.05 indica una diferencia significativa en el volumen tumoral medio.

Para el modelo CTG3226, AB1370049-SG3932 DAR8 logró una respuesta casi completa a los niveles de dosis 10, 5 y 2.5 mg/kg (TGI% de 97.7, 96.8, 93.6 respectivamente), en tanto que se observó una respuesta parcial con 1.25 mg/kg (TGI% de 74%). FR α -DM4 fue activo a 5 mg/kg con una respuesta parcial de TGI% de 76.5, pero no tuvo actividad a la dosis más baja de 2.5 mg/kg (Tabla 27 y Figura 21).

TABLA 27: INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO TUMORAL (% DE TGI) EN EL MODELO PDX DE CÁNCER DE OVARIO CTG3226

Tratamiento	Volumen tumoral medio (mm ³) ± EEM	TGI (%)	valor de p (ANOVA) ^a	
			Tratamiento vs vehículo	AB1370049-SG3932 DAR8 versus FR α -DM4 (H2H)

	No tratado	966.51±152.61	NA	N/A	N/A
5	10 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	22.29±6.69	97.69	0.0039	N/A
	5 mg/kg de AB1370049- SG3932 DAR8	31.23±3.20	96.77	0.0044	<0.0001
10	2.5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	61.43±10.44	93.64	0.0061	<0.0001
	1.25 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	251.65±92.86	73.96	0.0446	N/A
15	5 mg/kg de FR α -DM4	226.86±46.03	76.53	0.0349	N/A
	2.5 mg/kg de FR α -DM4	1127.58±481.10	-16.66	0.9960(NS)	N/A

^avalor de p <0.05 indica una diferencia significativa en el volumen tumoral medio.

En un segundo conjunto de experimentos usando los mismos modelos de PDX de OVO875 y CTG3226 y siguiendo los mismos métodos como se describieron anteriormente en este ejemplo sujeto a tratar también grupos de ratones adicionales con 0.15 mg/kg, 0.3 mg/kg y 0.6 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 respectivamente, también se observaron respuestas parciales incluso a las dosis muy bajas. Por ejemplo, en el modelo OVO875, 10, 5 y 2.5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 condujeron a respuestas casi completas con TGI% de 98.5, 96.4 y 94.52, respectivamente. Se observaron respuestas parciales pero sustanciales con dosis tan bajas como 0.3 mg/kg (TGI de 41%), con 0.6 mg/kg que tiene un nivel de respuesta similar a la dosis de 0.3 mg/kg y la dosis de 1.25 mg/kg que provoca un TGI de 67%. Se observó una observación similar de magnitudes de TGI similares a través del intervalo de dosis en el modelo PDX de CTG3226.

CONCLUSIONES

Los datos de estos modelos adicionales de PDX de cáncer de ovario demostraron además que AB1370049-SG3932 DAR8 es altamente efectivo en el tratamiento de tumores que expresan FR α y logró una inhibición casi completa del crecimiento tumoral incluso con cánceres que expresan FR α a niveles de expresión medios y medios-bajos. Se demostró un TGI sustancial a través de un intervalo de dosis de AB1370049-SG3932 DAR8. Además, la eficacia de AB1370049-SG3932 DAR8 en estos modelos fue sustancialmente superior al ADC de comparador de FR α -DM4.

**EJEMPLO 23 - ACTIVIDAD ANTI-CÁNCER *IN VIVO* DE AB1370049-SG3932 DAR8 EN EL
MODELO DE XENOINJERTO DERIVADO DE PACIENTES CTG-0956**

OBJETIVO

Evaluar la actividad antitumoral de AB1370049-SG3932 DAR8 en el modelo de PDX de ovario CTG-0956 que exhibe niveles de expresión de FR α medio-altos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ratones madre atímicos sin pelaje-Foxn1nu hembra de 6-8 semanas de edad se implantaron por vía subcutánea con fragmentos de tejido tumoral. Cuando suficientes animales de existencia alcanzaron 1000 – 1500 mm³, se recolectaron los tumores y se implantaron fragmentos en los animales de preestudio. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 213-325 mm³, los animales se aleatorizaron por volumen tumoral en 8 grupos. El grupo 1 (n = 8 animales) no recibió tratamiento, el grupo 2 al grupo 8 (n = 3 animales) recibió 10 mg/kg, 5 mg/kg, 2.5 mg/kg, 1.25mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.3 mg/kg y 0.15 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 respectivamente. Todos los animales dosificados recibieron una dosis por vía intravenosa el día 0 a 4 ml/kg. Los animales se observaron diariamente y las dimensiones del tumor y el peso corporal se midieron y registraron dos veces por semana. Los volúmenes tumorales y TGI se midieron y calcularon como se describe en el ejemplo 22. El criterio de valoración del estudio se realizó el día 49 cuando el volumen tumoral medio del grupo de control alcanzó 1200 mm³.

La cuantificación digital de la expresión de FR α en células tumorales CTG-0956 se realizó como se describe en el ejemplo 22.

RESULTADOS

El tumor CTG-0956 se clasificó como un expresor de FR α medio-alto con base en una mediana de OD de 143.

Los ratones sin pelaje atímicos portadores de tumor se trataron con una dosis iv individual (intervalo de dosis 0.15 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg) de ADC. En el día 45, se calculó la inhibición del crecimiento tumoral de los diferentes grupos de nivel de dosis: Se observó una respuesta casi completa a los niveles de dosis de 10 mg/kg (TGI% 96.6) y 5 mg/kg (95.6%), se observaron respuestas parciales en todos los otros niveles de dosis que varían de 69.5% a 23.7% de TGI (**Figura 22 y Tabla 28**).

TABLA 28: INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO TUMORAL (% DE TGI) EN EL MODELO PDX DE CÁNCER DE OVARIO CTG-0956

Tratamiento	Volumen tumoral medio (mm ³) +/-EEM	TGI (%)
No tratado	1110 +/- 121	N/A
10 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	42 +/- 22	96.6
5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	53 +/- 28	95.6
2.5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	369 +/- 130	69.5
1.25 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	573 +/- 306	52.6
0.6 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	612 +/- 91	49.3
0.3 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	932 +/- 400	22.9
0.15 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8	922 +/- 108	23.7

CONCLUSIONES

Los datos de este modelo adicional de PDX de cáncer de ovario demostraron además que AB1370049-SG3932 DAR8 es altamente efectivo en el tratamiento de tumores que expresan FR α y logró una inhibición casi completa del crecimiento tumoral a dosis más altas, con TGI sustancial demostrado a través del intervalo completo de dosis de AB1370049-SG3932 DAR8.

EJEMPLO 24 – EFICACIA DE AB1370049-SG3932 DAR8 EN UN MODELO DE CDX DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN Y RESISTENCIA OBSERVADA A UN ADC DE FRA-DM4

OBJETIVOS

Evaluar la actividad antitumoral de AB1370049-SG3932 DAR8 en un modelo de línea celular OVCAR-3 resistente a FR α -DM4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar el modelo de xenoinjerto de OVCAR3, se inocularon 10×10^6 células/ratón en Matrigel al 50% por vía subcutánea en NSG hembra de 6-8 semanas de edad (NOD-SCIDIL2Rgamma^{null}). Cuando el volumen tumoral alcanzó dentro del intervalo de 200 - 600 mm³, a los ratones se les administró por vía intravenosa ADC de FR α -DM4 ("biosimilar a mirvetuximab soravtansina", con un DAR de aproximadamente 3) a 5 mg/kg, una vez cada 2 semanas (Q2W) continuamente hasta que los tumores recayeron y comenzaron a crecer de tamaño nuevamente. Entre los ratones que recayeron después de 8 rondas de dosificación Q2W, se seleccionaron 4 ratones y se volvieron a estimular con AB1370049-SG3932 DAR8 por vía intravenosa a 5 mg/kg Q2W, recibiendo 2 rondas de tratamiento con AB1370049-SG3932 DAR8.

Por separado, el tumor recaído de un ratón adicional se extirpó y se reimplantó por vía subcutánea en ratones NSG hembra de 6-8 semanas de edad (NOD-SCIDIL2Rgamma^{null}). Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 280 - 360 mm³, a los ratones se les trató por vía intravenosa Q2W con ADC de AB1370049-SG3932 DAR8 o FRα-DM4 ("biosimilar a mirvetuximab soravtansina", con un DAR de aproximadamente 3) a 5 mg/kg, recibiendo 2 rondas del respectivo tratamiento.

Los volúmenes tumorales se midieron con un calibrador digital y los volúmenes de tumores se calcularon utilizando la siguiente fórmula: volumen tumoral = [longitud (mm) x ancho (mm)² x 0.52, donde la longitud y el ancho son los diámetros más largos y más cortos del tumor, respectivamente. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para evaluar la tolerabilidad de los tratamientos.

El crecimiento de los tumores en cada grupo experimental se expresó como el volumen tumoral medio (mm³) ± EEM del número de animales utilizados.

RESULTADOS

Los ratones portadores de tumores OVCAR-3 se trataron inicialmente con FRα-DM4 Q2W. Después de la respuesta inicial al ADC, algunos ratones escaparon del tratamiento y volvieron a crecer tumores. Estos tumores se volvieron a estimular posteriormente con AB1370049-SG3932 DAR8 y se observaron inhibiciones del crecimiento tumoral en todos los ratones tratados, con respuestas casi completas en 3 de cada 4 ratones (**Figura 23**). Esto muestra que la resistencia a FRα-DM4 no se provoca por la disminución de manera regulada de FRα.

En un experimento de seguimiento, se aislaron tumores resistentes a FRα-DM4 de ratones y se reimplantaron en nuevos ratones hospedadores. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 280-360 mm³, a los ratones se les administraron dos dosis (Q2W) de 5 mg/kg de AB1370049-SG3932 DAR8 o FRα-DM4. Sólo los ratones tratados con AB1370049-SG3932 DAR8 respondieron con una respuesta casi completa al tratamiento (TGI% 92.3) en tanto que los animales tratados con FRα-DM4 aún eran resistentes al tratamiento (**Figura 24**).

CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran la capacidad de AB1370049-SG3932 DAR8 para lograr una inhibición casi completa del crecimiento tumoral en tumores, incluyendo los que se ha demostrado que han desarrollado resistencia a un ADC de comparador de FRα-DM4.