



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120166** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07K 16/24** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**G01N 33/531** (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2016 02669	(72) Винахідник(и): Аб Ольга (US), Таварес Деніел (US), Сетіаді Джуліанто (US), Ледд Шеррон (US), Керріган Крістіна Н. (US), Руй Лінгюн (US)
(22) Дата подання заявки: 29.08.2014	(73) Власник(и): ІММУНОДЖЕН, ІНК., 830 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.10.2019	(74) Представник: Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/872,407, 61/875,475, 61/940,184	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 20120009181 A1, 12.01.2012 US 20070048315 A1, 01.03.2007 US 20090156788 A1, 18.06.2009 US 20110002942 A1, 06.01.2011 US 20130039916 A1, 14.02.2013 WO 2008103473 A1, 28.08.2008 US 20120282637 A1, 08.11.2012 WO 2011042548 A1, 14.04.2011 WO 2007020965 A1, 22.02.2007 US 20080171014 A1, 17.07.2008 WO 2012135675 A2, 04.10.2012 WO 2011106528 A1, 01.09.2011 ROBERTS et al. Role of individual N-linked glycosylation sites in the function and intracellular transport of the human alpha folate receptor. Arch biochem biophys, 1998, Vol. 351, no. 2, P. 227 - 235
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 30.08.2013, 09.09.2013, 14.02.2014	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: US, US, US	
(41) Публікація відомостей про заяву: 24.06.2016, Бюл.№ 12	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.10.2019, Бюл.№ 20	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2014/053512, 29.08.2014	

(54) АНТИТІЛО, ЩО СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З FOLR1, ТА СПОСІБ ВІЯВЛЕННЯ РЕЦЕПТОРА ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ 1**(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла, яке зв'язується з рецептором фолієвої кислоти людини 1, способу одержання таких антитіл, композиції, що містить таке антитіло, способу in vitro виявлення експресії FOLR1 у зразку, застосування діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло для збільшення ефективності лікування раку у суб'єкта, та способу ідентифікації ракового захворювання.

UA 120166 C2

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

[001] Галузь застосування цього винаходу, загалом, відноситься до діагностичних методів аналізу, наборів для видів терапії на основі використання фолієвої кислоти 1 та антитіл, які зв'язуються з рецептором фолієвої кислоти 1 людини.

5 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ ВІНАХОДУ

[002] Рак є однією з основних причин смерті більш ніж одного мільйону людей, у яких діагностують рак, у розвинених країнах світу та 500000 випадків смерті за рік лише у Сполучених Штатах. Загалом, передбачається, що у більше ніж 1 з 3 людей розвинеться певна форма ракового захворювання протягом їх тривалості життя. Існує більше 200 різних типів ракових захворювань, чотири з яких – рак молочної залози, легень, колоректальний рак і рак простати, відповідають за більшу половину всіх нових випадків захворювань (Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26).

[003] Рецептор фолієвої кислоти 1 (FOLR1), також відомий як рецептор фолієвої кислоти-альфа або фолатзв'язуючий білок, являє собою N-глікозилований білок, що експресується на плазматичній мембрані клітин. FOLR1 має високу афінність до фолієвої кислоти та дещо знижену до похідних фолієвої кислоти. FOLR1 опосередковує доставку фізіологічного фолату, 5-метилтетрагідрофолату, у внутрішній простір клітини.

[004] FOLR1 надекспресується у переважній більшості ракових захворювань яєчників, а також при багатьох ракових захворюваннях матки, ендометрію, підшлункової залози, нирок, легень і молочної залози, у той час як експресія FOLR1 у нормальних тканинах обмежена апікальною мембраною епітеліальних клітин у проксимальних каналцях нирок, альвеолярних пневмоцитах легень, сечового міхура, яєчок, хоріоїдного сплетіння та щитовидної залози (Weitman SD, et al., Cancer Res 52: 3396-3401 (1992); Antony AC, Annu Rev Nutr 16: 501-521 (1996); Kalli KR, et al. Gynecol Oncol 108: 619-626 (2008)). Цей профіль експресії FOLR1 робить його підходящою мішенню для FOLR1-направленої терапії раку.

[005] Через те, що рак яєчників, як правило, до пізньої стадії проходить безсимптомно, то він часто діагностується на пізній стадії та має несприятливий прогноз при лікуванні доступними у теперішній час процедурами, як правило, хіміотерапевтичними лікарськими засобами після хірургічної циторедукції (von Gruenigen V et al., Cancer 112: 2221-2227 (2008); Ayhan A et al., Am J Obstet Gynecol 196: 81 e81-86 (2007); Harry VN et al., Obstet Gynecol Surv 64: 548-560 (2009)). Тому, існує чітка нереалізована медична потреба у більш ефективних методах діагностики ракових захворювань яєчників.

[006] Деякі запропоновані раніше методи аналізу, що використовуються для виявлення скинутого FOLR1, не є достатньо специфічними для FOLR1. Наприклад, у деяких методах аналізу не розпізнаються FOLR1 та інші представники родини рецепторів фолієвої кислоти (FOLR2, 3 та 4) або визначаються значення загального вмісту FBP (фолатзв'язуючого білка). На додаток до цього, для деяких методів аналізу потрібно, щоб отримані у людей зразки (наприклад, плазми) попередньо оброблялися з використанням стадії промивання слабкою кислотою для дисоціації фолієвої кислоти від рецептора. Деякі результати аналізів також можуть давати неточності через конкурентні ефекти між терапією антитілами та діагностичним антитілом. На додаток до цього, багато комерційно доступних наборів традиційно є ненадійними як через реактиви, так і через стабільність, що змінюється від серії до серії. Оцінки цих наборів дали дуже неоднозначні результати, а набори призначені лише для науково-дослідницьких робіт. Для багатьох наборів потрібно, щоб отримані у людей зразки, перед проведенням аналізу попередньо розбавлялися для зменшення ймовірності отримання хибнопозитивних результатів внаслідок "ефекту матриці". Таким чином, існує чітка потреба у високій чутливості і точності діагностичних методів аналізу, які можуть виявляти клінічно значимий динамічний діапазон FOLR1 як супутній метод для видів терапії на основі FOLR1.

СУТЬ ВІНАХОДУ

[007] У цьому документі представлено все, що стосується анти-FOLR1 антитіл та їх антигензв'язуючих фрагментів, а також способи для виявлення FOLR1, діагностування FOLR1-опосередованих захворювань та порушень (таких як рак), моніторингу ефективності анти-FOLR1 видів терапії, оптимізації анти-FOLR1 видів терапії та стратифікації пацієнтів.

[008] Анти-FOLR1 антитіла, запропоновані у цьому документі, можуть мати діагностичне значення. Наприклад, анти-FOLR1 антитіла, запропоновані у цьому документі, застосовуються для розрізнення пухлинних та непухлинних клітин або тканин або для ідентифікації типів, підтипів або ступенів злоякісності пухлин. В одному варіанті реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло, запропоноване у цьому документі, та/або аналіз для FOLR1-виявлення, запропонований у цьому документі, може використовуватися для розрізнення субтипів недрібноклітинного раку легень (НДРЛ), включаючи аденокарциному та плоскоклітинну

карциному, як описано у цьому документі. В іншому варіанті реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло, запропоноване у цьому документі, та/або аналіз для FOLR1-виявлення, запропонований у цьому документі, може використовуватися для виключення типу ракового захворювання (наприклад, для визначення того, що клітина або тканина не належить до будь-якого типу ракового захворювання), наприклад, саркоми.

[0009] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, запропонований у цьому документі, може специфічно зв'язуватися з епітопом FOLR1, причому епітоп містить щонайменше одну, щонайменше дві або три N-глікозилізовані амінокислоти. Глікозилювання може бути критично важливим для мембранної локалізації. Див. наприклад, Yan et al., J. Am. Soc. Nephrol. 13: 1385-1389 (2002). Переважно, антитіла та антигензв'язуючі фрагменти у цьому документі можуть виявляти експресію FOLR1 на клітинній мембрані та виявляти клінічно значимий динамічний діапазон FOLR1. Більш адекватне забарвлення, отримане з антитілами та антигензв'язуючими фрагментами, запропонованими у цьому документі, дозволяє провести розрізнення серед зразків, згрупованих всі разом як такі, що мають високі рівні експресії (з показником 3), використовуючи антитіла, що зв'язуються з різними епітопами FOLR1, без достатньої специфічності та/або без достатньої чутливості.

[0010] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, запропонований у цьому документі, може специфічно зв'язуватися з таким же епітопом FOLR1, що й антитіло, вибране з групи, яка складається з: (а) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:27 і поліпептид за SEQ ID №:28; (b) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:29 і поліпептид за SEQ ID №:30; (c) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:31 і поліпептид за SEQ ID №:32; (d) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:62 і поліпептид за SEQ ID №:63 або за SEQ ID №:64, та (e) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:65 і поліпептид за SEQ ID №:66 або SEQ ID №:67. У деяких варіантах реалізації винаходу епітоп містить N-глікозилізовану амінокислоту.

[0011] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, запропонований у цьому документі, може специфічно зв'язуватися з FOLR1, причому вказане антитіло або його фрагмент конкурентно інгібує зв'язування з FOLR1 антитіла, вибраного з групи, яка складається з: (а) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:27 і поліпептид за SEQ ID №:28; (b) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:29 і поліпептид за SEQ ID №:30; (c) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:31 і поліпептид за SEQ ID №:32; (d) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:62 і поліпептид за SEQ ID №:63 або SEQ ID №:64, та (e) антитіла, що містить поліпептид за SEQ ID №:65 і поліпептид за SEQ ID №:66 або SEQ ID №:67.

[0012] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить поліпептидні послідовності VH CDR1-3 та VL CDR1-3, вибрані з групи, яка складається з: (а) SEQ ID №:3-8, відповідно; (b) SEQ ID №:9-14, відповідно; (c) SEQ ID №:15-20, відповідно; (d) SEQ ID №:21-26, відповідно; (e) SEQ ID №: 3-5, та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно; (f) SEQ ID №: 3, 60 і 5, та SEQ ID №: 6-8, відповідно; (g) SEQ ID №: 3, 61 і 5, та SEQ ID №: 6-8, відповідно; (h) SEQ ID №: 3, 60 і 5, та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно, та (i) SEQ ID №: 3, 61 і 5, та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно.

[0013] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, запропонований у цьому документі, може специфічно зв'язуватися з FOLR1, причому антитіло або його фрагмент містить поліпептидні послідовності VH CDR1-3 та VL CDR1-3, вибрані з групи, яка складається з: (а) SEQ ID №:3-8, відповідно; (b) SEQ ID №:9-14, відповідно; (c) SEQ ID №:15-20, відповідно; (d) SEQ ID №:21-26, відповідно; (e) SEQ ID №: 3-5, та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно; (f) SEQ ID №: 3, 60 і 5, та SEQ ID №: 6-8, відповідно; (g) SEQ ID №: 3, 61 і 5, та SEQ ID №: 6-8, відповідно; (h) SEQ ID №: 3, 60 і 5, та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно, та (i) SEQ ID №: 3, 61 і 5, та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно, та (j) варіанти від (а) до (i), що включають 1, 2, 3 або 4 консервативні амінокислотні заміни.

[0014] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить поліпептидні послідовності, які є щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 99 % ідентичними поліпептидним послідовностям, вибраним з групи, яка складається з: (а) SEQ ID №:27 і SEQ ID №:28; (b) SEQ ID №:29 і SEQ ID №:30; (c) SEQ ID №:31 і SEQ ID №:32; (d) SEQ ID №:62 і SEQ ID №:63 або SEQ ID №:64; (e) SEQ ID №:65 і SEQ ID №:66 або SEQ ID №:67; (f) SEQ ID №:68 і SEQ ID №:69. У деяких варіантах реалізації поліпептидні послідовності переважно складаються з амінокислот послідовностей, вибраних з групи, яка складається з: (а) SEQ ID №:27 і SEQ ID №:28; (b) SEQ ID №:29 і SEQ ID №:30; (c) SEQ ID №:31 і SEQ ID №:32; (d) SEQ ID №:62 і SEQ ID №:63 або SEQ ID №:64; (e) SEQ ID №:65 і SEQ ID №:66 або SEQ ID №:67; (f) SEQ ID №:68 і SEQ ID №:69.

[0015] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, запропонований у цьому документі, може специфічно зв'язуватися з FOLR1, причому антитіло або його фрагмент містить гуманізовану варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить ділянки CDR1, CDR2 та CDR3, які містять амінокислоти SEQ ID №:51, SEQ ID №:52 або 53, та SEQ ID №:54, відповідно, гуманізовану варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить ділянки CDR1, CDR2 та CDR3, які містять амінокислоти SEQ ID №:48, SEQ ID №:49 та SEQ ID №:50, відповідно, та константну ділянку миші. У деяких варіантах реалізації винаходу гуманізована варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислоти SEQ ID №:45, а гуманізована варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислоти SEQ ID №:47.

[0016] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент отримані рекомбінантним способом. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент є мишачим, нелюдським, гуманізованим, химерним, зі зміненою поверхнею або людським. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язується з FOLR1 людини, але не з FOLR2 або FOLR3. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент є повнорозмірним антитілом. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент є антигензв'язуючим фрагментом. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить, переважно складається з або складається з Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, одноланцюгового Fv або scFv, зв'язаного дисульфідними зв'язками Fv, домену V-NAR, IgNar, інтраїла, IgGACH2, мініїла, F(ab')₃, тетратіла, тритіла, діатіла, одномоментного антитіла, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂ або scFv-Fc.

[0017] У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, запропонований у цьому документі, може специфічно зв'язувати FOLR1, причому поліпептид містить послідовності, вибрані з групи, яка складається з: (a) SEQ ID №:3-8, відповідно; (b) SEQ ID №:9-14, відповідно; (c) SEQ ID №:15-20, відповідно; (d) SEQ ID №:21-26, відповідно; (e) SEQ ID №: 3-5 та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно; (f) SEQ ID №: 3, 60 і 5, та SEQ ID №: 6-8, відповідно; (g) SEQ ID №: 3, 61 і 5, та SEQ ID №: 6-8, відповідно; (h) SEQ ID №: 3, 60 і 5, та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно, та (i) SEQ ID №: 3, 61 і 5, та SEQ ID №: 59, 7 і 8, відповідно, та (j) варіанти від (a) до (i), що включають 1, 2, 3 або 4 консервативні амінокислотні заміни. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид містить послідовності, які є щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 99 % ідентичними послідовностям, вибраним з групи, яка складається з: (a) SEQ ID №:27 і SEQ ID №:28; (b) SEQ ID №:29 і SEQ ID №:30; (c) SEQ ID №:31 і SEQ ID №:32; (d) SEQ ID №:62 і SEQ ID №:63 або SEQ ID №:64; (e) SEQ ID №:65 і SEQ ID №:66 або SEQ ID №:67 та (f) SEQ ID №:68 і SEQ ID №:69. У деяких варіантах реалізації поліпептид містить амінокислоти (a) SEQ ID №:27 і SEQ ID №:28; (b) SEQ ID №:29 і SEQ ID №:30; (c) SEQ ID №:31 і SEQ ID №:32; (d) SEQ ID №:62 і SEQ ID №:63 або SEQ ID №:64; (e) SEQ ID №:65 і SEQ ID №:66 або SEQ ID №:67 або SEQ ID №:68 або SEQ ID №:69.

[0018] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид зв'язується з FOLR1 з Kd від близько 0,5 до близько 10 нМ. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид зв'язується з FOLR1 з Kd близько 1,0 нМ або краще. У деяких варіантах реалізації винаходу афінність зв'язування вимірюють методом проточної цитометрії, методом Biacore, ІФА або радіоімунаналізом.

[0019] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид зв'язується з епітопом FOLR1, що містить амінокислоту, яка є N-глікозилізованою.

[0020] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид мітять міткою, що виявляється.

[0021] У деяких варіантах реалізації винаходу клітина, запропонована у цьому документі, продукує антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид. У деяких варіантах реалізації винаходу клітину виділяють.

[0022] У цьому документі також запропоновані способи створення антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента або поліпептиду. Способи можуть включати (a) культивування клітини, запропонованої у цьому документі, та (b) виділення антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента або поліпептиду з культивованої клітини.

[0023] У цьому документі також запропоновані композиції, які містять антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид та буферний розчин, вибраний з групи, яка складається з: буферного розчину для FACS, буферного розчину для ІГХ та буферного розчину для ІФА.

[0024] У цьому документі також запропоновані способи застосування антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента або поліпептиду.

[0025] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб виявлення експресії FOLR1 у зразку включає приведення у контакт зразка з антитілом, його антигензв'язуючим фрагментом, поліпептидом або композицією, запропонованих у цьому документі. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент мітять міткою, що виявляється. У деяких варіантах реалізації винаходу мітку вибирають з групи, яка складається з імунофлуоресцентної мітки, хемілюмінесцентної мітки, фосфоресцентної мітки, ферментної мітки, радіомітки, авідину/біотину, колоїдних частинок золота, забарвлених частинок та магнітних частинок. У деяких варіантах реалізації винаходу експресію FOLR1 визначають методом радіоімуноаналізу, аналізом вестерн-блот, цитометрією, імунофлуоресцентним аналізом, імуноферментним аналізом, аналізом імунопреципітації, хемілюмінесцентним аналізом або імуногістохімічним аналізом. У деяких варіантах реалізації винаходу цитометрія є проточною цитометрією. У деяких варіантах реалізації винаходу експресію FOLR1 визначають методом ІГХ.

[0026] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб збільшення ефективності терапії раку діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, включає введення діючої речовини суб'єкту, який має ракове захворювання, причому збільшену експресію FOLR1 виявляють у злویкісному зразку, отриманому від суб'єкта, використовуючи антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент, поліпептид або композицію, запропоновані у цьому документі.

[0027] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб ідентифікації ракового захворювання, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент включає: (a) приведення у контакт біологічного зразка, що містить клітини з ракової пухлини, з антитілом, його антигензв'язуючим фрагментом, поліпептидом або композицією, запропонованим у цьому документі; (b) виявлення зв'язування антитіла, фрагмента-антитіла або поліпептиду з FOLR1 у біологічному зразку з (a); (c) присвоєння показника зв'язуванню з етапу (b), причому показник присвоюють на основі порівняння з одним або більше еталонних зразків, та (d) порівняння показника з етапу (c) з показником еталонної тканини або клітини, причому показник рівня FOLR1 злویкісного зразка, який перевищує показник еталонного зразка з нормальною або низькою експресією FOLR1, або показник рівня FOLR1 злویкісного зразка, який рівний або перевищує показник еталонного зразка з високою експресією FOLR1, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню анти-FOLR1 антитілом.

[0028] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб лікування пацієнта, який має ракове захворювання, включає: (a) визначення показника експресії FOLR1 при виявленні експресії FOLR1 у злویкісному зразку, отриманому від пацієнта, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (b) введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо показник вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини.

[0029] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб лікування пацієнта, який має ракове захворювання, включає: (a) визначення показника експресії FOLR1 при виявленні експресії FOLR1 у злویкісному зразку, отриманому від пацієнта, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (b) надання вказівок медичному працівнику щодо введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо показник вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини.

[0030] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб лікування пацієнта, який має ракове захворювання, включає: (a) надання злویкісного зразка, взятого у пацієнта, який має ракове захворювання, для визначення показника експресії FOLR1 для виявлення експресії FOLR1 з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (b) введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо показник вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини.

[0031] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб лікування пацієнта, який має ракове захворювання, включає: (a) визначення експресії FOLR1 у злویкісному зразку, отриманому від пацієнта, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі; (b) визначення

показника експресії FOLR1 злоякісного зразка та (с) введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо показник вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини.

[0032] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб лікування пацієнта, який має ракове захворювання, включає: (а) введення пацієнту фіксованої дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент; (b) виявлення рівня FOLR1 у пацієнта відносно рівня FOLR1 в еталонному зразку, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (с) збільшення кількості або частоти введення наступних фіксованих доз, якщо рівень FOLR1 у пацієнта підвищений.

[0033] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб оптимізації терапевтичного режиму з діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, для суб'єкта, який має ракове захворювання, включає: (а) введення збільшеної дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, суб'єкту, який має ракове захворювання, причому збільшену експресію FOLR1 у суб'єкта виявляли з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, або (b) введення зменшеної дози діючої речовини суб'єкту, який має ракове захворювання, при цьому у суб'єкта виявляли зменшену експресію FOLR1.

[0034] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб оптимізації терапевтичного режиму з діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, для суб'єкта, який має ракове захворювання, включає: (а) виявлення рівня експресії FOLR1 у злоякісному зразку, отриманому від суб'єкта з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі; (b) визначення показника експресії FOLR1 злоякісного зразка та (с) введення збільшеної дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, суб'єкту, якщо показник є низьким, або введення зменшеної дози діючої речовини суб'єкту, якщо показник є високим.

[0035] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб зменшення FOLR1-експресуючих ракових клітин у хворого на рак пацієнта включає: (а) виявлення рівня FOLR1 у злоякісному зразку, взятому у пацієнта, у порівнянні з рівнем FOLR1 в еталонному зразку з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (b) введення пацієнту фіксованої дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, якщо рівень FOLR1 у пацієнта підвищений у порівнянні з еталонним зразком; причому введення діючої речовини зменшує у пацієнта кількість FOLR1-експресуючих ракових клітин. У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб лікування ракового захворювання у пацієнта включає: (а) виявлення рівня FOLR1 у злоякісному зразку, взятому у пацієнта, у порівнянні з рівнем FOLR1 в еталонному зразку з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (b) введення пацієнту фіксованої дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, якщо рівень FOLR1 у пацієнта підвищений у порівнянні з еталонним зразком; причому введення діючої речовини зменшує розмір FOLR1-експресуючої пухлини або зменшує рівні CA125.

[0036] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб зменшення FOLR1-експресуючих ракових клітин у хворого на рак пацієнта включає: (а) введення пацієнту, який має ракове захворювання, фіксованої дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент; (b) виявлення рівня FOLR1 у пацієнта відносно рівня FOLR1 в еталонному зразку з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (с) збільшення кількості або частоти введення наступних фіксованих доз, якщо рівень FOLR1 у пацієнта підвищений у порівнянні з еталонним зразком; причому введення діючої речовини зменшує у пацієнта кількість FOLR1-експресуючих ракових клітин. У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб лікування ракового захворювання у пацієнта включає: (а) введення пацієнту, який має ракове захворювання, фіксованої дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент; (b) виявлення рівня FOLR1 у пацієнта відносно рівня FOLR1 в еталонному зразку з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (с) збільшення кількості або частоти введення наступних фіксованих доз, якщо рівень FOLR1 у пацієнта підвищений у порівнянні з еталонним зразком; причому введення діючої речовини зменшує розмір FOLR1-експресуючої пухлини або зменшує рівні CA125.

[0037] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб моніторингу терапевтичної ефективності фіксованої дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його

антигензв'язуючий фрагмент, у пацієнта включає: (а) виявлення першого рівня FOLR1 у біологічному зразку, отриманому від пацієнта, який має ракове захворювання, з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі; (b) введення пацієнту фіксованої дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент; (c) виявлення другого рівня FOLR1 в біологічному зразку, отриманому від пацієнта, після введення діючої речовини, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (d) порівняння другого рівня FOLR1 з першим рівнем FOLR1; при цьому зменшення між першим та другим рівнем FOLR1 вказує на терапевтичну ефективність лікування.

[0038] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб ідентифікації суб'єкта, який має ракове захворювання, як такого, що ймовірно піддається режиму низькодозового лікування анти-FOLR1 антитілом, включає: (а) приведення у контакт біологічного зразка, що містить клітини з ракової пухлини, з антитілом, його антигензв'язуючим фрагментом, поліпептидом або композицією, запропонованими у цьому документі; (b) виявлення зв'язування антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або поліпептиду з біологічним зразком з (а); (c) присвоєння показника зв'язуванню з етапу (b), причому показник присвоюють на основі порівняння з одним або більше еталонних зразків, та (d) порівняння показника з етапу (c) з показником еталонної тканини або клітини, при цьому показник рівня FOLR1 злоякісного зразка, який перевищує показник еталонного зразка з нормальною або низькою експресією FOLR1, або показник рівня FOLR1 злоякісного зразка, який рівний або перевищує показник еталонного зразка з високою експресією FOLR1, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1.

[0039] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб ідентифікації ракового захворювання, як чутливого до лікування анти-FOLR1 діючою речовиною, включає: (а) виявлення рівня експресії FOLR1 у злоякісному зразку з раковою пухлиною з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, причому виявлення включає застосування способу, який розрізняє інтенсивність забарвлення або однорідність забарвлення в експресуючому FOLR1 злоякісному зразку у порівнянні з інтенсивністю забарвлення або однорідністю забарвлення в одному або більше еталонних зразків; (b) визначення показника інтенсивності забарвлення або однорідності забарвлення FOLR1 злоякісного зразка та (c) порівняння показника інтенсивності забарвлення або однорідності забарвлення FOLR1, визначеного на етапі (b), з відносним значенням, визначеним вимірюванням експресії білка FOLR1 у щонайменше одному еталонному зразку, причому щонайменше один еталонний зразок являє собою зразок тканини, клітин або осаду клітин, який не чутливий до лікування діючою речовиною, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, та при цьому показник інтенсивності забарвлення FOLR1 злоякісного зразка, визначений на етапі (b), який вище відносного значення, ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною.

[0040] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб ідентифікації ракового захворювання, як чутливого до лікування анти-FOLR1 діючою речовиною, включає: (а) виявлення рівня експресії FOLR1 у злоякісному зразку з ракової пухлини з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, причому виявлення включає застосування способу, який специфічно забарвлює мембранний FOLR1 в експресуючому FOLR1 злоякісному зразку у порівнянні з мембранним FOLR1 в одному або більше еталонних зразків; (b) визначення показника FOLR1 злоякісного зразка та (c) порівняння показника FOLR1, визначеного на етапі (b), з відносним значенням, визначеним вимірюванням FOLR1 в щонайменше одному еталонному зразку, причому щонайменше один еталонний зразок являє собою зразок тканини, клітин або осаду клітин, який не чутливий до лікування діючою речовиною, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, та при цьому показник FOLR1 злоякісного зразка, визначений на етапі (b), який вище відносного значення, ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною.

[0041] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб ідентифікації ракового захворювання, як чутливого до лікування анти-FOLR1 діючою речовиною, включає: (а) виявлення рівня експресії FOLR1 у злоякісному зразку з раковою пухлиною з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, причому виявлення включає застосування способу, який розрізняє інтенсивність забарвлення або однорідність забарвлення в експресуючому FOLR1 злоякісному зразку у порівнянні з інтенсивністю забарвлення або однорідністю забарвлення в одному або більше еталонних

зразків; (b) визначення показника інтенсивності забарвлення або однорідності забарвлення FOLR1 злжякісного зразка та (c) порівняння показника інтенсивності забарвлення або однорідності забарвлення FOLR1, визначеного на етапі (b), з відносним значенням, визначеним вимірюванням експресії білка FOLR1 у щонайменше одному еталонному зразку, причому щонайменше один еталонний зразок являє собою зразок тканини, клітин або осаду клітин, який чутливий до лікування діючою речовиною, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, та при цьому показник інтенсивності забарвлення FOLR1 злжякісного зразка, визначений на етапі (b), який більше або рівний відносному значенню, ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною.

[0042] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб ідентифікації ракового захворювання, як чутливого до лікування анти-FOLR1 діючою речовиною, включає: (a) виявлення рівня експресії FOLR1 у злжякісному зразку з ракової пухлини з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, причому виявлення включає застосування способу, який специфічно забарвлює мембранний FOLR1 в експресуючому FOLR1 злжякісному зразку у порівнянні з мембранним FOLR1 в одному або більше еталонних зразків; (b) визначення показника FOLR1 злжякісного зразка та (c) порівняння показника FOLR1, визначеного на етапі (b), з відносним значенням, визначеним вимірюванням FOLR1 в щонайменше одному еталонному зразку, причому щонайменше один еталонний зразок являє собою зразок тканини, клітин або осаду клітин, який чутливий до лікування діючою речовиною, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, та при цьому показник FOLR1 злжякісного зразка, визначений на етапі (b), який більше або рівний відносному значенню, ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною.

[0043] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб додатково включає введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, суб'єкту, від якого було отримано злжякісний зразок або біологічний зразок.

[0044] У деяких варіантах реалізації винаходу рівень FOLR1 у пацієнта виявляють у злжякісному зразку або біологічному зразку, отриманому від пацієнта. У деяких варіантах реалізації винаходу злжякісний зразок або біологічний зразок являє собою фізіологічну рідину, клітину або зразок тканини. У деяких варіантах реалізації винаходу клітина являє собою циркулюючу пухлинну клітину. У деяких варіантах реалізації винаходу фізіологічна рідина являє собою кров, асцит, сечу, плазму, сироватку або периферійну кров.

[0045] У деяких варіантах реалізації винаходу FOLR1 являє собою мембранолокалізований FOLR1 (тобто мембранний FOLR1).

[0046] У деяких варіантах реалізації винаходу FOLR1 являє собою скинутий FOLR1.

[0047] У деяких варіантах реалізації винаходу виявлення проводиться методом імуноферментного твердофазного аналізу (ІФА).

[0048] У деяких варіантах реалізації винаходу виявлення проводиться методом імуногістохімії (ІГХ). У деяких варіантах реалізації винаходу метод ІГХ являє собою калібрований метод ІГХ, який може розрізняти різні рівні експресії FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу при ІГХ аналізі отримують діапазон інтенсивності забарвлення зразків, що мають низьку експресію FOLR1 на клітинній поверхні, середню експресію FOLR1 на клітинній поверхні або високу експресію FOLR1 на клітинній поверхні. У деяких варіантах реалізації винаходу при ІГХ аналізі розрізняють інтенсивність забарвлення та однорідність забарвлення в експресуючому FOLR1 злжякісному зразку або біологічному зразку у порівнянні з еталонним зразком. У деяких варіантах реалізації винаходу ІГХ аналіз виявляє мембранний FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу ІГХ аналіз виконують вручну. У деяких варіантах реалізації винаходу ІГХ аналіз виконують, використовуючи автоматизовану систему.

[0049] У деяких варіантах реалізації винаходу показник FOLR1 визначають за результатами ІГХ аналізу.

[0050] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 1, вказує на збільшену експресію FOLR1 та ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

[0051] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень або рак ендометрію. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 3, щонайменше 3 гомо (>75 % однорідності)

експресії мембранного FOLR1 у зразку пухлини ендометрію з інтенсивністю щонайменше 2 вказує на те, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. В одному варіанті реалізації винаходу показник експресії визначають, використовуючи антитіло FOLR1-2.1.

5 [0057] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 1, вказує на збільшену експресію FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), вказує на те, що слід вводити зменшену дозу діючої речовини. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень або рак ендометрію. У деяких
10 варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 3, щонайменше 3 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 3 гетеро (25-75 % однорідності), вказує на те, що слід вводити зменшену дозу діючої речовини. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

15 [0058] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 1, вказує на збільшену експресію FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень або рак ендометрію. У деяких варіантах реалізації
20 винаходу показник, рівний щонайменше 3, щонайменше 3 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 3 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

25 [0059] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень або рак ендометрію. У деяких варіантах реалізації
30 винаходу показник, рівний щонайменше 3, щонайменше 3 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 3 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

35 [0060] У деяких варіантах реалізації винаходу Н-показник, рівний щонайменше 50, ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу Н-показник, рівний щонайменше 75, ідентифікує рак яєчників як чутливий до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких
40 варіантах реалізації винаходу Н-показник, рівний щонайменше 50, ідентифікує НДРЛ як чутливий до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу Н-показник, рівний щонайменше 50, ідентифікує рак ендометрію як чутливий до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. В одному варіанті реалізації винаходу Н-показник визначають, використовуючи антитіло FOLR1-2.1.

45 [0061] У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 у зразку пухлини яєчників з інтенсивністю щонайменше 3 ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 у зразку НДРЛ з інтенсивністю щонайменше 2 ідентифікує ракове
50 захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 у зразку пухлини ендометрію з інтенсивністю щонайменше 2 ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. В одному варіанті реалізації винаходу показник експресії визначають, використовуючи антитіло FOLR1-2.1.

55 [0062] У деяких варіантах реалізації винаходу еталонний зразок являє собою позитивний еталонний зразок або негативний еталонний зразок. У деяких варіантах реалізації винаходу еталонний зразок містить клітини, осаді клітин або тканину.

60 [0063] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид містить реактив для виявлення, вибраний з групи, яка складається з: ферменту,

флуорофору, радіоактивної мітки та люмінофору. У деяких варіантах реалізації винаходу реактив для виявлення вибраний з групи, яка складається з: біотину, дигоксигеніну, флуоресцеїну, тритію та родаміну.

[0064] У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою FOLR1-позитивний рак. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання вибране з групи, яка складається з раку яєчників, головного мозку, молочної залози, матки, ендометрію, підшлункової залози, нирок та легень. У деяких варіантах реалізації винаходу рак легень являє собою недрібноклітинний рак легень або бронхіолоальвеолярну карциному. У деяких варіантах реалізації винаходу рак яєчників являє собою епітеліальний рак яєчників. У деяких варіантах реалізації винаходу рак яєчників є стійким до лікування препаратами платини, рецидивуючим або рефрактерним.

[0065] У деяких варіантах реалізації винаходу експресію FOLR1 виявляють, використовуючи щонайменше одне додаткове анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу експресію FOLR1 вимірюють, використовуючи два анти-FOLR1 антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше одне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язане з твердою підложкою. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше одне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язане з планшетом для мікротитрування.

[0066] У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше одне додаткове антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить агент для виявлення. У деяких варіантах реалізації винаходу агент для виявлення являє собою хромогенний агент для виявлення, флуорогенний агент для виявлення, ферментний агент для виявлення або електрохемилюмінесцентний агент для виявлення. У деяких варіантах реалізації винаходу агент для виявлення являє собою пероксидазу хрину (HRP).

[0067] У деяких варіантах реалізації винаходу ІФА являє собою "сендвіч"-ІФА.

[0068] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить FOLR1-антитіло huMov19. У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина являє собою кон'югат антитіло-майтанзиноїд, що містить FOLR1-антитіло huMov19 (яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID №:45 та варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID №:47), мایتанзиноїд DM4 та сульфо-SPDB лінкер, що розщеплюється (IMGN853).

[0069] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб ідентифікації ракового захворювання як такого, що ймовірно піддається лікуванню кон'югатом антитіло-майтанзиноїд, яке містить FOLR1-антитіло huMov19, мایتанзиноїд DM4 та сульфо-SPDB лінкер (IMGN853), включає вимірювання FOLR1 з використанням антитіла, яке містить важкий ланцюг, що містить амінокислоти SEQ ID №:27, та легкий ланцюг, що містить амінокислоти SEQ ID №:28, в ІГХ аналізі, причому показник, рівний щонайменше 2 гетеро, вказує на те, що ракове захворювання ймовірно піддається лікуванню.

[0070] У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб ідентифікації ракового захворювання як такого, що ймовірно піддається лікуванню кон'югатом антитіло-майтанзиноїд, яке містить FOLR1-антитіло huMov19, мایتанзиноїд DM4 та сульфо-SPDB лінкер (IMGN853), включає вимірювання FOLR1 з використанням антитіла, яке містить важкий ланцюг, що містить амінокислоти SEQ ID №:27, та легкий ланцюг, що містить амінокислоти SEQ ID №:28, в ІГХ аналізі, причому показник, рівний щонайменше 1 гетеро, вказує на те, що ракове захворювання ймовірно піддається лікуванню.

[0071] У деяких варіантах реалізації промисловий препарат, запропонований у цьому документі, включає терапевтичну діючу речовину, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані у цьому документі, контейнер та листок-вкладиш або етикетку, яка вказує на те, що діюча речовина може застосовуватися для лікування ракового захворювання, яке характеризується збільшеною експресією FOLR1. У деяких варіантах реалізації промисловий препарат, запропонований у цьому документі, включає терапевтичну діючу речовину, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані у цьому документі, контейнер та листок-вкладиш або етикетку, яка вказує на те, що діюча речовина може застосовуватися для лікування ракового захворювання, яке характеризується експресією FOLR1 на рівні 2 або 3, вимірюваному з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі. У деяких варіантах реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло діючої речовини кон'юговане з цитотоксином. У деяких варіантах реалізації винаходу листок-вкладиш або етикетка вказує на те, що діюча речовина може застосовуватися для лікування ракового захворювання, яке характеризується експресією FOLR1 на рівні щонайменше 1. У деяких варіантах реалізації винаходу листок-вкладиш або етикетка вказує на те, що діюча речовина

може застосовуватися для лікування ракового захворювання, яке характеризується експресією FOLR1 на рівні щонайменше 2, щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності). У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень або рак ендометрію. У деяких варіантах реалізації винаходу листок-

5 вкладиш або етикетка вказує на те, що діюча речовина може застосовуватися для лікування ракового захворювання, яке характеризується експресією FOLR1 на рівні щонайменше 3, щонайменше 3 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 3 гетеро (25-75 % однорідності). У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

10 [0072] У деяких варіантах реалізації винаходу комбінований діагностичний і фармацевтичний набір, запропонований у цьому документі, включає антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, поліпептид або композицію, запропоновані у цьому документі, для використання у діагностиці, та діючу речовину, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, для застосування в терапії. У деяких варіантах реалізації антитіло

15 для виявлення здатне виявляти експресію FOLR1 методом ІГХ. У деяких варіантах реалізації антитіло для виявлення здатне виявляти експресію FOLR1 методом ІФА. У деяких варіантах реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло в діючій речовині кон'юговане з цитотоксином.

[0073] У деяких варіантах реалізації винаходу діагностичний набір, запропонований у цьому документі, включає антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент або поліпептид, запропоновані у

20 цьому документі, реагент для методу імуногістохімії (ІГХ) та один або більше стандартизованих еталонних зразків, причому стандартизовані еталонні зразки включають клітини, осаді клітин або фіксовані формаліном залиті парафіном зразки, та при цьому один або більше стандартизованих еталонних зразків отримані з не експресуючих FOLR1, експресуючих FOLR1 на низькому рівні або експресуючих FOLR1 на високому рівні клітин, осадів клітин або тканин.

25 [0074] У деяких варіантах реалізації винаходу набір для імуноаналізу для виявлення скинутого FOLR1 у зразку включає: (а) антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент, поліпептид або композицію, запропоновані у цьому документі, та (b) реактив для виявлення. У деяких варіантах реалізації винаходу набір додатково містить тверду підложку для реактиву для захвату. У деяких варіантах реалізації винаходу реактив для захвату іммобілізований на твердій

30 підложці. У деяких варіантах реалізації винаходу реактив для захвату нанесений на планшет для мікротитрування. У деяких варіантах реалізації винаходу реактив для виявлення являє собою друге FOLR1-антитіло. У деяких варіантах реалізації винаходу реактив для виявлення виявляється з використанням видоспецифічного антитіла. У деяких варіантах реалізації винаходу набір додатково містить засіб для виявлення реактиву для виявлення. У деяких

35 варіантах реалізації винаходу засіб для виявлення є колориметричним. У деяких варіантах реалізації винаходу набір додатково містить FOLR1-поліпептид в якості стандарту антигену. У деяких варіантах реалізації винаходу FOLR1-поліпептид являє собою FOLR1-Fc.

[0075] У цьому документі також запропоновані діючі речовини. У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент

40 для застосування в способі лікування ракового захворювання, причому вказана діюча речовина вводиться суб'єкту, який має ракове захворювання, при цьому збільшену експресію FOLR1 виявляють у зл�якісному зразку, отриманому від вказаного суб'єкта, з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі.

45 [0076] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, який включає: (а) визначення показника експресії FOLR1 при виявленні експресії FOLR1 у зл�якісному зразку, отриманому від пацієнта, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції,

50 запропонованих у цьому документі, та (b) введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо показник вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини.

[0077] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло

55 або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, який включає: (а) визначення показника експресії FOLR1 для виявлення експресії FOLR1 у зл�якісному зразку, отриманому від пацієнта, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (b) надання вказівок медичному працівнику

60 щодо введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо показник вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої

речовини.

[0078] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, який включає: (а) надання злоякісного зразка, отриманого від пацієнта, який має ракове захворювання, для визначення показника експресії FOLR1 при виявленні експресії FOLR1 з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (b) введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо показник вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини.

[0079] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, який включає: (а) виявлення експресії FOLR1 у злоякісному зразку, отриманому від вказаного пацієнта, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі; (b) визначення показника експресії FOLR1 вказаного злоякісного зразка та (c) введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо показник вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини.

[0080] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, який включає: (а) введення пацієнту фіксованої дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент; (b) виявлення рівня експресії FOLR1 у злоякісному зразку, отриманому від пацієнта, відносно рівня FOLR1 в еталонному зразку, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (c) збільшення кількості або частоти введення наступних фіксованих доз, якщо рівень FOLR1 у пацієнта підвищений.

[0081] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, який включає етап оптимізації терапевтичного режиму вказаної діючої речовини, який включає: (а) введення збільшеної дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, суб'єкту, який має ракове захворювання, причому збільшену експресію FOLR1 у злоякісному зразку, отриманому від вказаного суб'єкта, виявляли з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, або (b) введення зменшеної дози діючої речовини суб'єкту, який має ракове захворювання, при цьому у злоякісному зразку, отриманому від вказаного суб'єкта, виявляли зменшену експресію FOLR1.

[0082] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, який включає етап оптимізації терапевтичного режиму вказаної діючої речовини, який включає: (а) виявлення рівня експресії FOLR1 у злоякісному зразку, отриманому від вказаного суб'єкта, з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі; (b) визначення показника експресії FOLR1 вказаного злоякісного зразка та (c) введення збільшеної дози діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, суб'єкту, якщо показник є низьким, або введення зменшеної дози діючої речовини суб'єкту, якщо показник є високим.

[0083] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, за яким кількість FOLR1-експресуючих ракових клітин у хворого на рак пацієнта знижується, причому: (а) рівень FOLR1 у злоякісному зразку, отриманому від пацієнта, виявляють порівнюючи його з рівнем FOLR1 в еталонному зразку з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (b) вводять пацієнту фіксовану дозу діючої речовини, якщо рівень FOLR1 у пацієнта підвищений; при цьому введення діючої речовини зменшує у пацієнта кількість FOLR1-експресуючих ракових клітин.

[0084] У деяких варіантах реалізації винаходу діюча речовина містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для застосування в способі лікування ракового захворювання, за яким кількість FOLR1-експресуючих ракових клітин у хворого на рак пацієнта знижується, причому: (а) вводять пацієнту, який має ракове захворювання, фіксовану дозу діючої речовини; (b) рівень FOLR1 у злоякісному зразку, отриманому від пацієнта, виявляють відносно рівня FOLR1 в еталонному зразку з використанням антитіла, його антигензв'язуючого

фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (с) кількість або частоту введення наступних фіксованих доз підвищують, якщо рівень FOLR1 у пацієнта підвищений у порівнянні з еталонним зразком; причому введення діючої речовини зменшує у пацієнта кількість FOLR1-експресуючих ракових клітин.

5 [0085] У цьому документі також запропоновані анти-FOLR1 антитіла та їх антигензв'язуючі фрагменти для застосування в способах моніторингу та способах діагностування. У деяких варіантах реалізації винаходу використання анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента для застосування в способі моніторингу терапевтичної ефективності фіксованої дози діючої речовини у пацієнта включає: (а) виявлення першого рівня FOLR1 в біологічному зразку, отриманому від пацієнта, який має ракове захворювання, з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі; 10 (b) введення пацієнту фіксованої дози діючої речовини; (с) виявлення другого рівня FOLR1 в біологічному зразку, отриманому від пацієнта, після введення діючої речовини, причому виявлення виконується з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, та (d) порівняння другого рівня FOLR1 з першим рівнем FOLR1; при цьому зменшення між першим та другим рівнем FOLR1 вказує на терапевтичну ефективність лікування.

[0086] У деяких варіантах реалізації винаходу використання анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента для застосування в способі діагностування того, чи здатний суб'єкт, який має ракове захворювання, піддаватися режиму низькодозового лікування анти-FOLR1 антитілом, включає: (а) приведення у контакт біологічного зразка, що містить клітини з вказаної ракової пухлини, з антитілом, антигензв'язуючим фрагментом, поліпептидом або композицією, запропонованими у цьому документі; (b) виявлення зв'язування вказаного антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або поліпептиду з вказаним біологічним зразком з (а); 25 (с) присвоєння показника вказаному зв'язуванню з етапу (b), причому вказаний показник присвоюють на основі порівняння з одним або більше еталонних зразків, та (d) порівняння вказаного показника з етапу (с) з показником еталонної тканини або клітини, причому показник вказаного рівня FOLR1 злоякісного зразка, який перевищує показник еталонного зразка з нормальною або низькою експресією FOLR1, або показник вказаного рівня FOLR1 злоякісного зразка, який рівний або перевищує показник еталонного зразка з високою експресією FOLR1, ідентифікує вказане ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню низькою дозою діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. 30

[0087] У деяких варіантах реалізації винаходу використання анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента для застосування в способі діагностування того, чи чутливе ракове захворювання до лікування способом лікування анти-FOLR1 антитілом, включає: (а) виявлення рівня експресії FOLR1 у злоякісному зразку з вказаної ракової пухлини з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, причому вказане виявлення включає застосування способу, який розпізнає інтенсивність забарвлення або однорідність забарвлення в експресуючому FOLR1 злоякісному зразку у порівнянні з інтенсивністю забарвлення або однорідністю забарвлення в одному або більше еталонних зразків; (b) визначення показника інтенсивності забарвлення або однорідності забарвлення FOLR1 вказаного злоякісного зразка та (с) порівняння показника інтенсивності забарвлення або однорідності забарвлення FOLR1, визначеного на етапі (b), з відносним значенням, визначеним вимірюванням експресії білка FOLR1 у щонайменше одному еталонному зразку, причому щонайменше один вказаний еталонний зразок являє собою зразок тканини, клітин або осаду клітин, який не чутливий до лікування діючою речовиною, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, та при цьому показник інтенсивності забарвлення FOLR1 вказаного злоякісного зразка, визначений на етапі (b), який вище вказаного відносного значення, ідентифікує вказане ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною. 40 45 50

[0088] У деяких варіантах реалізації винаходу використання анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента для застосування в способі діагностування того, чи чутливе ракове захворювання до лікування способом лікування анти-FOLR1 антитілом, який включає: (а) виявлення рівня експресії FOLR1 у злоякісному зразку з вказаної ракової пухлини з використанням антитіла, його антигензв'язуючого фрагмента, поліпептиду або композиції, запропонованих у цьому документі, причому вказане виявлення включає застосування способу, який розпізнає інтенсивність забарвлення або однорідність забарвлення в експресуючому FOLR1 злоякісному зразку у порівнянні з інтенсивністю забарвлення або однорідністю забарвлення в одному або більше еталонних зразків; (b) визначення показника інтенсивності забарвлення або однорідності забарвлення FOLR1 вказаного злоякісного зразка та (с) 55 60

порівняння показника інтенсивності забарвлення або однорідності забарвлення FOLR1, визначеного на етапі (b), з відносним значенням, визначеним вимірюванням експресії білка FOLR1 у щонайменше одному еталонному зразку, причому щонайменше один вказаний еталонний зразок являє собою зразок тканини, клітин або осаду клітин, який чутливий до лікування діючою речовиною, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, та при цьому показник інтенсивності забарвлення FOLR1 вказаного зл�якісного зразка, визначений на етапі (b), який вище вказаного відносного значення, ідентифікує вказане ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною.

[0089] У деяких варіантах реалізації винаходу застосування діючих речовин або анти-FOLR1 антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів додатково включає введення діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його фрагмент-антиген, суб'єкту, від якого було отримано зл�якісний зразок або біологічний зразок.

[0090] У деяких варіантах реалізації винаходу зл�якісний зразок або біологічний зразок являє собою фізіологічну рідину, клітину або зразок тканини. У деяких варіантах реалізації винаходу клітина являє собою циркулюючу пухлинну клітину. У деяких варіантах реалізації винаходу фізіологічна рідина являє собою кров, асцит, сечу, плазму, сироватку або периферійну кров.

[0091] У деяких варіантах реалізації винаходу з використанням діючих речовин або анти-FOLR1 антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів виявлення проводиться методом імуноферментного твердофазного аналізу (ІФА) та/або методом імуногістохімії (ІГХ). У деяких варіантах реалізації винаходу метод ІГХ являє собою калібровану ІГХ методику, яка може розрізняти різні рівні експресії FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу при ІГХ аналізі отримують діапазон інтенсивності забарвлення зразків, що мають низьку експресію FOLR1 на клітинній поверхні, середню експресію FOLR1 на клітинній поверхні або високу експресію FOLR1 на клітинній поверхні. У деяких варіантах реалізації винаходу при ІГХ аналізі розрізняють інтенсивність забарвлення та однорідність забарвлення в експресуючому FOLR1 зл�якісному зразку або біологічному зразку у порівнянні з еталонним зразком. У деяких варіантах реалізації винаходу ІГХ аналіз виконують вручну. У деяких варіантах реалізації винаходу ІГХ аналіз виконують, використовуючи автоматизовану систему. У деяких варіантах реалізації винаходу показник FOLR1 визначають за результатами ІГХ аналізу. У деяких варіантах реалізації винаходу при ІГХ аналізі з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, описаним в цьому документі, отримується діапазон забарвлення клітин, які мають збільшену експресію FOLR1, зокрема, тих клітин, які знаходяться у межах рівня забарвлення рівного або більшого 2.

[0092] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, вказує на те, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), вказує на те, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень або рак ендометрію.

[0093] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 3, вказує на те, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 3 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 3 гетеро (25-75 % однорідності), вказує на те, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

[0094] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, вказує на те, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), вказує на те, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

[0095] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, вказує на те, що слід вводити зменшену дозу діючої речовини. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), вказує на те, що слід вводити зменшену дозу діючої речовини. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак

яєчників.

[0096] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2 гомо (>75 %

5 однорідності) або 2 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень або рак ендометрію.

[0097] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 3, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 3 гомо (>75 %

10 однорідності) або щонайменше 3 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

[0098] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2 гомо (>75 %

15 однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається низькодозовому лікуванню анти-FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

[0099] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу

25 показник, рівний щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень або рак ендометрію.

[0100] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 3, ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу

30 показник, рівний щонайменше 3 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 3 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

[0101] У деяких варіантах реалізації винаходу показник, рівний щонайменше 2, ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу

40 показник, рівний щонайменше 2 гомо (>75 % однорідності) або щонайменше 2 гетеро (25-75 % однорідності), ідентифікує ракове захворювання як чутливе до лікування діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію або рак яєчників.

[0102] У деяких варіантах реалізації винаходу еталонний зразок являє собою позитивний еталонний зразок або негативний еталонний зразок. У деяких варіантах реалізації винаходу еталонний зразок містить клітини, осаді клітин або тканину.

[0103] У деяких варіантах реалізації винаходу використання діючої речовини або анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента для застосування, запропонованого у

50 цьому документі, антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або поліпептиду, запропонованих у цьому документі, додатково містить реактив для виявлення, вибраний з групи, яка складається з: ферменту, флуорофору, радіоактивної мітки та люмінофору. У деяких варіантах реалізації винаходу реактив для виявлення вибраний з групи, яка складається з: біотину, дигоксигеніну, флуоресцеїну, тритію та родаміну.

[0104] У деяких варіантах реалізації винаходу з використання діючої речовини або анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента для застосування, запропонованого у

55 цьому документі, мається на увазі ракове захворювання, що є FOLR1-позитивним раком. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання вибране з групи, яка складається з раку яєчників, головного мозку, молочної залози, матки, ендометрію, підшлункової залози, нирок та легень. У деяких варіантах реалізації винаходу рак легень являє собою

60

недрібноклітинний рак легень або бронхіолоальвеолярну карциному. У деяких варіантах реалізації винаходу рак яєчників являє собою епітеліальний рак яєчників. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання є стійким до лікування препаратами платини, рецидивуючим або рефрактерним.

5 [0105] У деяких варіантах реалізації винаходу використання діючої речовини або анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента для застосування, запропонованого у цьому документі, мається на увазі експресія FOLR1, яка виявляється з використанням щонайменше одного додаткового анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу експресію FOLR1 вимірюють, використовуючи два анти-
10 FOLR1 антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше одне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язане з твердою підложкою. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше одне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язане з планшетом для мікротитрування. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше одне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить
15 агент для виявлення. У деяких варіантах реалізації винаходу агент для виявлення являє собою хромогенний агент для виявлення, флуорогенний агент для виявлення, ферментний агент для виявлення або електрохемилюмінесцентний агент для виявлення. У деяких варіантах реалізації винаходу агент для виявлення являє собою пероксидазу хрину (HRP). У деяких варіантах реалізації винаходу ІФА являє собою "сендвіч"-ІФА.

20 [0106] У деяких варіантах реалізації винаходу використання діючої речовини або анти-FOLR1 антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента для застосування, запропонованого у цьому документі, включає діючу речовину, що містить FOLR1-антитіло huMov19, або яка є FOLR1-антитілом huMov19. У деяких варіантах реалізації винаходу діючу речовину вводять у вигляді кон'югату антитіло-майтанзиноїд, що додатково містить мایتанзиноїд DM4 та сульфо-
25 SPDB лінкер, що розщеплюється (IMGN853).

[0107] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент, поліпептид або композиція, запропоновані у цьому документі, призначені для застосування як діагностичні.

30 [0108] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент, поліпептид або композиція, запропоновані у цьому документі, призначені для застосування в способі діагностування ракового захворювання у пацієнта, що страждає від нього. У деяких варіантах реалізації винаходу ракове захворювання асоціюють з підвищеними рівнями FOLR1.

[0109] У деяких варіантах реалізації винаходу афінність зв'язування антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або поліпептиду являє собою афінність зв'язування, отриману у
35 прикладі 3 та/або показану на фіг. 4, 5 та/або 6.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[0110] На фіг. 1 представлені зображення ІГХ-забарвлення зразків НДРЛ та аденокарциноми ендометрію яєчників з використанням антитіл 353.2-1 і 353.9-20.

40 [0111] На фіг. 2 представлені зображення ІГХ-забарвлення нормальних зразків слинної залози та підшлункової залози з використанням антитіл 353.2-1 і 353.9-20.

[0112] На фіг. 3 представлені зображення вестерн-блотів лізатів клітин з використанням антитіл 353.9-21, 353.2-1, 353.3-8 і 353.5-7.

45 [0113] На фіг. 4 показано зв'язування антитіл 353.2-1, 353.3-1, 353.5-7 і 353.9-21 з денатурованими клітинами KB (A) та неденатурованими клітинами T47D (B) з використанням сортера клітин з активацією флуоресценції (FACS).

[0114] На фіг. 5 показано зв'язування антитіл 353.2-1, 353.3-1, 353.5-7 і 353.9-21 з рекомбінантним FOLR1 людини з використанням ІФА.

50 [0115] На фіг. 6 показано зв'язування анти-FOLR2 антитіла й антитіл 353.2-1, 353.3-1, 353.5-7 і 353.9-21 з FOLR2 (A) та зв'язування анти-FOLR3 антитіла й антитіл 353.2-1, 353.3-1, 353.5-7 і 353.9-21 з FOLR3 (B) методом ІФА.

[0116] На фіг. 7 показано зв'язування анти-FOLR1 антитіл 2.1 та huMov19 з деглікозильованим та необробленим рекомбінантним FOLR1 людини методом ІФА.

[0117] На фіг. 8 показано зв'язування анти-FOLR1 антитіл 2.1, huMov19 і BN3.2 з деглікозильованими та необробленими лізатами клітин KB і Igrov-1 аналізом вестерн-блот.

55 [0118] На фіг. 9 показані амінокислоти для зміни поверхні анти-FOLR1 антитіла FRIHC2-1 та положення за Кабатом, що відповідає кожному залишку.

60 [0119] На фіг. 10 показано вирівнювання послідовностей мишачого і гуманізованого антитіла FRIHC2-1 за результатами зміни поверхні. Послідовності важкого і легкого ланцюга миші відповідають SEQ ID №:27 і SEQ ID №:28, відповідно. Послідовність гуманізованого важкого ланцюга зі зміненою поверхнею відповідає SEQ ID №: 62, а послідовності легкого ланцюга

людини зі зміненою поверхнею версії 1.0 і версії 1.1 відповідають SEQ ID №:63 і SEQ ID №:64, відповідно. Лідер "S" в послідовності легкого ланцюга (положення на каркасі -1) не розглядається при проведенні гуманізації та не використовується в послідовності гуманізованого антитіла, тому він не показаний на фігурі.

5 [0120] На фіг. 11 показані відповідні амінокислоти CDR-прищеплення анти-FOLR1 антитіла FRIHC2-1 та положення за Кабатом, що відповідає кожному залишку.

[0121] На фіг. 12 показано вирівнювання послідовностей мишачого та гуманізованого FRIHC2-1 для CDR-прищеплення. Послідовності важкого і легкого ланцюга миші відповідають SEQ ID №:27 і SEQ ID №:28, відповідно. Послідовність прищепленого гуманізованого важкого ланцюга відповідає SEQ ID №: 65, а послідовності прищепленого легкого ланцюга людини версії 1.0 і версії 1.1 відповідають SEQ ID №:66 і SEQ ID №:67, відповідно. Лідер "S" в послідовності легкого ланцюга (положення на каркасі -1) не розглядається при проведенні гуманізації та не використовується в послідовності гуманізованого антитіла, тому він не показаний на фігурі.

10 [0122] На фіг. 13 представлені зображення ІГХ-забарвлення тканин аденокарциноми легень з використанням антитіла FOLR1-2.1 (353-2.1) при різних розведеннях.

[0123] На фіг. 14 представлені зображення ІГХ-забарвлення позитивної нормальної тканини (фалопієва труба) (А) та клітин (FOLR1-трансфєкованих клітин (В)) і негативних клітин (нетрансфєкованих клітин (С)) з використанням антитіла FOLR1-2.1 (353-2.1).

20 [0124] На фіг. 15 представлені зображення ІГХ-забарвлення зразків тканини пухлини яєчника (А) та тканини аденокарциноми легень (В) з використанням антитіла FOLR1-2.1 (353-2.1).

[0125] На фіг. 16 показано забарвлення мембран пухлинних клітин у зразку пухлини ендометрію при аналізі з FOLR1-2.1. Стромальні клітини не забарвлюються.

25 [0126] На фіг. 17 показано порівняння забарвлення та визначення різниці показників між (А) аналізом з FOLR1-2.1 та (В) аналізом з BN3.2.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

[0127] У цьому описі представлені методи виявлення рецептора фолієвої кислоти 1 (FOLR1) людини, включаючи мембранний FOLR1, скинутий FOLR1 і FOLR1 на циркулюючих пухлинних клітинах, та покращення ефективності або можливості піддаватися лікуванню ракових захворювань, що характеризуються надекспресією FOLR1. Методи виявлення можуть виявляти клінічно значимий динамічний діапазон FOLR1 і, тому можуть застосовуватися для стратифікації пацієнтів, для моніторингу або визначення терапевтичної ефективності або ймовірності піддаватися лікуванню ракових захворювань, що характеризуються надекспресією FOLR1. Описані також нові FOLR1-зв'язуючі поліпептиди, такі як антитіла, які корисні для методів виявлення FOLR1 (наприклад, ІГХ аналіз для мембранозв'язаного та асоційованого з клітинами FOLR1). Запропоновані також споріднені поліпептиди і полінуклеотиди, композиції, які містять FOLR1-зв'язуючі агенти, та способи створення FOLR1-зв'язуючих агентів.

I. Визначення.

[0128] Для полегшення розуміння цього винаходу нижче визначені деякі терміни та фрази.

40 [0129] Терміни "рецептор фолієвої кислоти 1 людини", "FOLR1" або "рецептор фолієвої кислоти альфа (FR-α)", як використовується у цьому документі, відносяться до будь-якого нативного FOLR1 людини, якщо не вказано інше. Таким чином, всі ці терміни можуть відноситися або до білка або до послідовності нуклеїнової кислоти як вказано у цьому документі. Термін "FOLR1" охоплює "повнорозмірний" непроецесований FOLR1, а також будь-яку форму FOLR1, яка отримується в результаті процесингу всередині клітини. Термін також охоплює варіанти білка або нуклеїнової кислоти FOLR1, що зустрічаються в природі, наприклад, сплайс-варіанти, алельні варіанти та ізоформи. Поліпептиди і полінуклеотиди FOLR1, описані у цьому документі, можуть виділятися з різноманітних джерел, таких як типи тканин людини, або з іншого джерела або отримуватися рекомбінантними або синтетичними способами. Приклади послідовностей FOLR1 включають, але не обмежуються номерами посилань NCBI P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1 та NP_057936.1.

50 [0130] Терміни "скинутий антиген" і "скинутий FOLR1" використовуються у цьому документі взаємозаміно. Ці терміни відносяться до білка FOLR1, який є розчинним та який не асоціюється з клітинами. У деяких варіантах реалізації винаходу він включає позаклітинний домен (ECD) та лінкер глікозилфосфатидилінозиту (ГФІ). В одному варіанті реалізації винаходу скинутий FOLR1 включає лише ECD. Білок FOLR1 включає сигнальний пептид (амінокислоти 1-24), білковий ланцюг FOLR1 (амінокислоти 25-233 або 234) та пропептид, який може бути розщеплений (амінокислоти від 235 до 257). У зрілого білка FOLR1 відсутній сигнальний пептид. Скинутий FOLR1 може включати амінокислоти від 1 до 257, від 1 до 233, від 1 до 234, від 25 до 233, від 25 до 234 або їх будь-які інші фрагменти. У деяких реалізаціях винаходу сигнальний пептид

розщеплюється. В інших варіантах реалізації винаходу частина ECD та ГФІ може бути зануреною у мембрану (наприклад, розчинний ліпідний рафт). В одному варіанті реалізації винаходу скинутий FOLR1 може включати амінокислоти 1-233 або їх фрагмент.

[0131] Термін "антитіло" означає імуноглобулінову молекулу, яка впізнає та специфічно зв'язується з мішенню, такою як білок, поліпептид, пептид, вуглевод, полінуклеотид, ліпід або комбінації вищеназваних молекул за допомогою щонайменше одного сайту антигенного впізнавання у межах варіабельної ділянки молекули імуноглобуліну. Як використовується у цьому документі, термін "антитіло" охоплює інтактні поліклональні антитіла, інтактні моноклональні антитіла, фрагменти антитіл (такі як фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ та Fv), однокланові мутанти Fv (scFv), мультиспецифічні антитіла такі як біспецифічні антитіла, химерні антитіла, гуманізовані антитіла, антитіла людини, білки злиття, які містять частину антитіла, що визначає антиген, та будь-яку іншу модифіковану імуноглобулінову молекулу, яка містить сайт впізнавання антигену, за умови, що антитіла проявляють потрібну біологічну активність. Антитіло може бути будь-яким з п'яти основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM або їх підкласів (ізотипів) (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 та IgA2), на основі ідентичності їх константних доменів важкого ланцюга, названих як альфа, дельта, епсилон, гама та мію, відповідно. Різні класи імуноглобулінів мають різні і добре відомі субоднічні структури та тримірні конфігурації. Антитіла можуть бути голими або кон'югованими з іншими молекулами, такими як токсини, радіоізотопи і т.п.

[0132] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло являє собою антитіло, яке не зустрічається у природі. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло очищують від природних компонентів. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло отримують рекомбінантним способом. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло отримують з використанням гібридоми.

[0133] "Блокуюче" антитіло або "антагоністичне" антитіло являє собою антитіло, яке інгібує або знижує біологічну активність антигену, який воно зв'язує, такого як FOLR1. У конкретному варіанті реалізації винаходу блокуючі антитіла або антагоністичні антитіла практично або повністю інгібують біологічну активність антигену. Бажано, щоб біологічна активність знижувалася на 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або навіть 100 %.

[0134] Термін "анти-FOLR1 антитіло" або "антитіло, яке зв'язується з FOLR1" відноситься до антитіла, що здатне до зв'язування FOLR1 з достатньою афінністю, такою щоб антитіло було придатним в якості діагностичного та/або терапевтичного агенту при таргетингу FOLR1. Якщо не вказано інше, ступінь зв'язування анти-FOLR1 антитіла з неспорідненим не-FOLR1-білком складає менше ніж близько 10 % зв'язування антитіла з FOLR1, як виміряно, наприклад, радіоімуноаналізом (RIA). У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, яке зв'язується з FOLR1, має константу дисоціації (K_d) рівну ≤1 мкМ, ≤100 нМ, ≤10 нМ, ≤1 нМ або ≤0,1 нМ. В одному варіанті реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло не зв'язує FOLR2, FOLR3, FOLR4 або фолієву кислоту. Приклади FOLR1-антитіл відомі в цій області техніки та описані в опублікованих заявках США № 2012/0009181 і 2012/0282175 та попередніх заявках США № 61/695791 і 61/756254 та публікації PCT WO2011/106528, кожна з яких включена у цей документ як посилання. Послідовності анти-FOLR1 антитіл та їх антигензв'язуючих фрагментів представлені у табл. 1-8.

[0135] Термін "фрагмент антитіла" відноситься до частини інтактного антитіла та відноситься до антигеновизначаючих варіабельних ділянок інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіл включають, але не обмежуються фрагментами Fab, Fab', F(ab')₂ та Fv, лінійними антитілами, одноклановими антитілами та мультиспецифічними антитілами, сформованими з фрагментів антитіл. Термін "антигензв'язуючий фрагмент" антитіла включає один або більше фрагментів антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном. Показано, що антигензв'язуюча функція антитіла може виконуватися визначеними фрагментами повнорозмірного антитіла. Приклади зв'язуючих фрагментів, що охоплюються межами терміну "антигензв'язуючий фрагмент" антитіла, включають (без обмеження): (i) фрагмент Fab, моновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL та CH1 (наприклад, антитіло, розщеплене папаїном, дає три фрагменти: два антигензв'язуючих фрагменти Fab і один фрагмент Fc, який не зв'язує антиген); (ii) фрагмент F(ab')₂, бівалентний фрагмент, що містить два фрагменти Fab, зв'язані дисульфідним містком в шарнірній ділянці (наприклад, антитіло, розщеплене пепсином, дає два фрагмента: бівалентний антигензв'язуючий фрагмент F(ab')₂ і фрагмент pFc', який не зв'язує антиген) та споріднену йому моновалентну одиницю F(ab'); (iii) фрагмент Fd, що складається з доменів VH та CH1 (тобто, та частина важкого ланцюга, яка включена до Fab); (iv) фрагмент Fv, що складається з доменів VL і VH одного плеча антитіла, та спорідненого зв'язаного дисульфідними зв'язками Fv;

(v) фрагмент dAb (доменне антитіло) або sdAb (однодоменне антитіло) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), що складається з домену VH, та (vi) виділену ділянку, що визначає комплементарність (CDR).

[0136] "Моноклональне антитіло" відноситься до гомогенної популяції антитіл, які залучені до високоспецифічного впізнавання та зв'язування єдиної антигенної детермінанти або епітопа. Ця властивість є протилежною поліклональним антитілам, які, як правило, включають різні антитіла, направлені проти різних антигенних детермінант. Термін "моноклональне антитіло" охоплює як інтактні, так і повнорозмірні моноклональні антитіла, а також фрагменти антитіл (такі як фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноланцюгові мутанти (scFv), білки злиття, які містять частину антитіла та будь-яку іншу модифіковану молекулу імуноглобуліну, яка містить сайт впізнавання антигену. Крім того, "моноклональне антитіло" відноситься до таких антитіл, створених всіма можливими способами, що включають, але не обмежені застосуванням гібридоми, фагової селекції, рекомбінантної експресії та трансгенних тварин.

[0137] Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до форм нелюдських (наприклад, мишачих) антитіл, що є специфічними імуноглобуліновими ланцюгами, химерними імуноглобулінами або їх фрагментами, які містять мінімальну кількість нелюдських (наприклад, мишачих) послідовностей. Як правило, гуманізовані антитіла являють собою імуноглобуліни людини, в яких залишки з ділянці, яка визначає комплементарність (CDR), замінені залишками з CDR біологічних видів, що не є людиною (наприклад, миші, щура, кролика, хом'яка), які мають потрібну специфічність, афінність та характеристику (Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536). У деяких випадках залишки Fv-каркасної ділянки (FR) імуноглобуліну людини замінюють відповідними залишками антитіла з біологічного виду, що не є людиною, яке має потрібну специфічність, афінність та характеристику. Гуманізоване антитіло може бути додатково модифікованим заміною додаткових залишків або в каркасній ділянці Fv та/або у межах заміненних залишків нелюдського організму, для вдосконалення та оптимізації специфічності, афінності та характеристики антитіла. Загалом, гуманізоване антитіло буде включати практично всі з щонайменше одного, а як правило двох або трьох, варіабельних доменів, що містять всі або практично всі з ділянок CDR, які відповідають імуноглобуліну нелюдського організму, тоді як всі або практично всі з ділянок FR відповідають консенсусній послідовності імуноглобулінової константної ділянки або домену (Fc), як правило, такому, що відповідає імуноглобуліну людини. Приклади способів, що використовуються для створення гуманізованих антитіл, описані у патентах США 5225539 і 5639641, Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994) та Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). У деяких варіантах реалізації винаходу "гуманізоване антитіло" являє собою антитіло зі зміненою поверхнею. У деяких варіантах реалізації винаходу "гуманізоване антитіло" являє собою CDR-прищеплене антитіло.

[0138] "Варіабельна ділянка" антитіла відноситься до варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла або варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла, або одному з них або в комбінації. Варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюга кожна складається з чотирьох каркасних ділянок (FR), зв'язаних трьома ділянками (CDR), що визначають комплементарність, також відомими як гіперваріабельні ділянки. CDR в кожному ланцюзі утримуються разом у безпосередній близькості за участю FR та за допомогою CDR з іншого ланцюга, приймаючи участь в утворенні антигензв'язуючого сайту антитіл. Існує щонайменше дві методики для визначення CDR: (1) підхід, заснований на варіабельності перехресновидових послідовностей (тобто згідно Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)), та (2) підхід, заснований на кристалографічних дослідженнях комплексів антиген-антитіло (Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). На доповнення до цього, в цій галузі техніки для визначення CDR інколи застосовують комбінації цих двох підходів.

[0139] Система нумерації Кабат звичайно застосовується, коли позначають залишок у варіабельному домені (приблизно залишки 1-107 легкого ланцюга і залишки 1-113 важкого ланцюга) (наприклад, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0140] Нумерація амінокислотних положень як визначено за Кабатом, відноситься до системи нумерації, що застосовується для варіабельних доменів важкого ланцюга або варіабельних доменів легкого ланцюга при порівнянні антитіл в у публікації Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При використанні цієї системи нумерації дійсно лінійна амінокислотна послідовність може містити меншу кількість або додаткові амінокислоти, що

відповідають скороченню або вставці в FR або CDR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може включати єдину амінокислотну вставку (залишок 52a у відповідності з Кабат) після залишку 52 з H2 та вставлені залишки (наприклад, залишки 82a, 82b та 82c і т.д. у відповідності з Кабат) після залишку 82 FR важкого ланцюга. Нумерація залишків Кабат може бути визначена для цього антитіла вирівнюванням в ділянках гомології послідовності антитіла зі "стандартною" нумерованою за Кабатом послідовністю. Нумерація Чотіа замість цього стосується розташування структурних петель (Chothia та Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Кінець петлі CDR-H1 за Чотіа при нумерації з використанням правила нумерації Кабат варіює між H32 та H34 в залежності від довжини петлі (це відбувається через те, що схема нумерації Кабат розміщує інсерції в положення H35A і H35B; якщо і 35A і 35B відсутні, то петля закінчується на 32; якщо присутня лише 35A, то петля закінчується на 33; якщо присутні і 35A і 35B, то петля закінчується на 34). Гіперваріабельні ділянки за AbM представляють компроміс між CDR за Кабатом і структурними петлями за Чотіа та використовуються програмним забезпеченням для моделювання антитіл AbM компанії Oxford Molecular.

Петля	Кабат	AbM	Чотіа
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Нумерація за Кабатом)	H26-H32...34
H1	H31-H35	H26-H35 (Нумерація за Чотіа)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0141] Термін "антитіло людини" означає антитіло, продуковане організмом людини, або антитіло, що має амінокислотну послідовність, яка відповідає антитілу, продукованому організмом людини, створеним з використанням будь-якої методики, відомої в цій галузі техніки. Це визначення антитіла людини включає інтактні або повнорозмірні антитіла, його фрагменти та/або антитіла, які містять щонайменше один поліпептид важкого та/або легкого ланцюга людини, таке як, наприклад, антитіло, що містить поліпептиди легкого ланцюга миші та важкого ланцюга людини.

[0142] Термін "химерні антитіла" відноситься до антитіл, в яких амінокислотна послідовність імуноглобулінової молекули походить від двох або більше біологічних видів. Як правило, варіабельна ділянка і легкого і важкого ланцюгів відповідає варіабельній ділянці антитілу, що походять з одного виду ссавців (наприклад, миші, щура, кролика і т.д.) з потрібною специфічністю, афінністю та характеристикою, тоді як константні ділянки гомологічні послідовностям в антітілах, що походять з іншого виду (звичайно людини) для попередження прояву імунної відповіді у цього виду.

[0143] Терміни "епітоп" або "антигенна детермінанта" використовуються у цьому документі взаємозаміно та відносяться до тієї частини антигену, яка здатна впізнаватися та специфічно зв'язуватися конкретним антитілом. Коли антиген являє собою поліпептид, епітопи можуть бути утворені як послідовними амінокислотами, так і непослідовними амінокислотами розташованими поруч шляхом третинного фолдингу білка. Епітопи, утворені з послідовних амінокислот, як правило, зберігаються при денатурації білка, тоді як епітопи, утворені шляхом третинного фолдингу, як правило, втрачаються при денатурації білка. Епітоп, як правило, включає щонайменше 3, та частіше, щонайменше 5 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації.

[0144] "Афінність зв'язування" звичайно відноситься до сили повної сукупності нековалентних взаємодій між одним зв'язуючим сайтом молекули (наприклад, антитіла) та її партнером зв'язування (наприклад, антигеном). Якщо не вказано інше, як використовується у цьому документі, "афінність зв'язування" відноситься до власної афінності зв'язування, яка відображає взаємодію 1:1 між представниками пари зв'язування (наприклад, антитіла та антигену). Афінність молекули X для його партнера Y звичайно може бути представлена константою дисоціації (Kd) або напівмаксимальною ефективною концентрацією (EC50). Афінність може бути виміряна звичними методами, відомими в цій галузі техніки, включаючи

описані у цьому документі. Антитіла з низькою афінністю звичайно зв'язують антиген повільно та мають схильність легко дисоціювати, тоді як антитіла з високою афінністю звичайно зв'язують антиген швидше та мають схильність залишатися зв'язаними довше. Різноманітні методи вимірювання афінності зв'язування відомі в цій галузі техніки, будь-який з яких може застосовуватися у цілях цього винаходу. Спеціальні ілюстративні варіанти реалізації винаходу описані у цьому документі.

[0145] Фраза "або краще", коли застосовується у цьому документі відноситься до афінності зв'язування, що стосується більш сильного зв'язування між молекулою та її партнером зв'язування. Фраза "або краще", коли застосовується у цьому документі, відноситься до більш сильного зв'язування, представленого меншим числовим значенням K_d . Наприклад, антитіло, яке має афінність до антигену рівну "0,6 нМ або краще", афінність антитіла до антигену складає <0,6 нМ, тобто 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ і т.д., або будь-яке значення менше 0,6 нМ. В одному варіанті реалізації винаходу афінність антитіла, як визначено значенням K_d , буде знаходитися між від близько 10-3 до близько 10-12 М, між від близько 10-6 до близько 10-11 М, між від близько 10-6 до близько 10-10 М, між від близько 10-6 до близько 10-9 М, між від близько 10-6 до близько 10-8 М або між від близько 10-6 до близько 10-7 М.

[0146] Фраза "практично подібний" або "практично такий же", як використовується у цьому документі, означає в достатній мірі високий ступінь подібності між двома числовими величинами (звичайно одна зв'язана з антитілом інверсії, а інша зв'язана з еталонним антитілом/антитілом порівняння), так що спеціаліст у цій галузі техніки міг би спостерігати, що різниця між двома величинами є малою або немає біологічної та/або статистичної значимості в контексті біологічних властивостей, виміряних вказаними величинами (наприклад, значеннями K_d). Різниця між вказаними двома величинами рівна менше ніж близько 50 %, менше ніж близько 40 %, менше ніж близько 30 %, менше ніж близько 20 % або менше ніж близько 10 % як функція значення для еталонного антитіла/антитіла порівняння.

[0147] Термін "імунокон'югат" або "кон'югат", як використовується у цьому документі, відноситься до сполуки або її похідного, яке зв'язане зі зв'язуючим клітини агентом (тобто анти-FOLR1 антитілом або його фрагментом) та визначеним загальною формулою: A-L-C, де C = цитотоксин, L = лінкер та A = зв'язуючий клітини агент або анти-FOLR1 антитіло або фрагмент антитіла. Імунокон'югати також можуть бути визначені загальною формулою у зворотному порядку: C-L-A.

[0148] "Лінкер" являє собою будь-який хімічний фрагмент, який здатен зв'язувати сполуку, звичайно лікарську речовину, таку як майтанзиноїд, зв'язуючий клітини агент, такий як анти-FOLR1 антитіло або його фрагмент, стабільним ковалентним способом. Лінкери можуть бути чутливими або практично стійкими до кислотоіндукованого розщеплення, світлоіндукованого розщеплення, пептидазоіндукованого розщеплення, естеразоіндукованого розщеплення та розщеплення дисульфідних зв'язків в умовах, в яких сполука або антитіло залишається активним. Підходящі лінкери добре відомі в цій галузі техніки та включають, наприклад, дисульфідні групи, тіоефірні групи, кислотолабільні групи, фотоллабільні групи, пептидолабільні групи та естеразолабільні групи. Лінкери також включають заряджені лінкери та їх гідрофільні форми, як описано у цьому документі та відомо в цій галузі техніки.

[0149] Поліпептид, антитіло, полінуклеотид, вектор, клітина або композиція, яка є "виділеною" являє собою поліпептид, антитіло, полінуклеотид, вектор, клітину або композицію, яка знаходиться у формі, не виявленій у природі. Виділені поліпептиди, антитіла, полінуклеотиди, вектори, клітини або композиції включають ті, які були очищені до ступеня, в якому вони більше не знаходяться у формі, в якій вони виявлені у природі. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, полінуклеотид, вектор, клітина або композиція, яка виділена є практично чистою.

[0150] Як використовується у цьому документі, "практично чистий" відноситься до речовини, яка є щонайменше на 50 % чистою (тобто вільною від контамінантів), щонайменше на 90 % чистою, щонайменше на 95 % чистою, щонайменше на 98 % чистою або щонайменше на 99 % чистою.

[0151] Термін "підвищений" FOLR1, "збільшена експресія" FOLR1 та "надекспресія" FOLR1 відноситься до зразка, який містить підвищені рівні експресії FOLR1. FOLR1 може бути підвищеним, збільшеним або надекспресованим у порівнянні з контрольним значенням (наприклад, рівнем експресії у біологічному зразку, тканині або клітині, отриманій від суб'єкта без ракового захворювання, зразку або при раковому захворюванні, для якого не відома експресія, або наявний низький FOLR1, нормальному зразку або раковому захворюванню, для якого не відмічено наявності підвищених значень FOLR1). Наприклад, зразок зі збільшеною експресією може містити збільшення щонайменше 2-кратне, щонайменше 3-кратне або

щонайменше 5-кратне відносно контрольних значень.

[0152] Експресія FOLR1 може вимірюватися методом імуногістохімії та давати показник інтенсивності забарвлення або показник однорідності забарвлення шляхом порівняння з каліброваними контролями, що проявили визначені показники (наприклад, показник інтенсивності рівний 3 дається для випробуваного зразка, якщо інтенсивність порівняна з рівнем 3 каліброваного контролю, або інтенсивність рівна 2 дається для випробуваного зразка, якщо інтенсивність порівняна з рівнем 2 каліброваного контролю). Наприклад, показник рівний 1, 2 або 3 (3+), переважно показник рівний 2 або 3 (3+), отриманий методом імуногістохімії, вказує на збільшену експресію FOLR1. Однорідність забарвлення, яка гетерогенна або гомогенна також є характерною для експресії FOLR1. Показники інтенсивності забарвлення та однорідності забарвлення також можуть бути використані самі або у комбінації (наприклад, 2 гомо, 2 гетеро, 3 гомо, 3 гетеро і т.д.). Див. табл. 11. В іншому прикладі, збільшення експресії FOLR1 може бути визначено виявленням збільшення щонайменше 2-кратного, щонайменше 3-кратного або щонайменше 5-кратного відносно контрольних значень (наприклад, рівня експресії в тканині або клітині, отриманої від суб'єкта без ракового захворювання або з раковим захворюванням, при якому не відмічається підвищених значень FOLR1).

[0153] "Еталонний зразок" може застосовуватися для проведення кореляції та порівняння результатів, отриманих у способах винаходу, з випробуваним зразком. Еталонні зразки можуть бути клітинами (наприклад, лініями клітин, осадами клітин) або тканиною. Рівні FOLR1 в "еталонному зразку" можуть бути виражені в абсолютній або відносній кількості, діапазоні кількості, мінімальній та/або максимальній кількості, середній кількості та/або медіанній кількості FOLR1. "Еталонний зразок" також може служити в якості вихідного рівня експресії FOLR1, з яким порівнюється випробуваний зразок. "Еталонний зразок" може включати попередній зразок або зразок вихідного рівня, отриманий від того ж пацієнта, нормальний еталон з відомим рівнем експресії FOLR1 або еталон, отриманий від цільової популяції пацієнтів з відомим рівнем експресії FOLR1. Рівні FOLR1 також можуть бути виражені у вигляді величин на стандартній кривій. Стандартна крива являє собою метод кількісного визначення за розташованим на графіку даним аналізу для визначення у зразку концентрації FOLR1. В одному варіанті реалізації винаходу еталонний зразок являє собою стандарт антигену, що містить очищений FOLR1 або FOLR1-Fc. Діагностичні способи за цим винаходом можуть залучати порівняння між рівнями експресії FOLR1 у випробуваному зразку та "еталонною величиною". У деяких варіантах реалізації винаходу еталонна величина являє собою рівень експресії FOLR1 в еталонному зразку. Еталонна величина може бути попередньо визначеним значенням, а також може бути визначена за еталонними зразками (наприклад, контрольними біологічними зразками або еталонними зразками), випробуваними паралельно з випробуваними зразками. Еталонна величина може бути єдиним пороговим значенням, таким як медіанне або середнє, або діапазоном значень, таким як довірчий інтервал. Еталонні величини можуть бути встановлені для різних підгруп індивідів, таких як індивідів, схильних до ракового захворювання, індивідів, що мають ранню або пізню стадію раку, індивідів чоловічої та/або жіночої статі або індивідів, які проходять терапію ракового захворювання. Приклади нормальних еталонних зразків або величин та позитивних еталонних зразків або величин описані у цьому документі, а також описані в прикладі 1 і прикладах 8-10 заявки WO 2012/135675, включеної до цього документу як посилання.

[0154] У деяких варіантах реалізації винаходу еталонний зразок являє собою зразок здорової тканини, зокрема, відповідної тканини, яка не вражена раковим захворюванням, або відповідної тканини, яка не вражена раковим захворюванням, при якому надекспресується FOLR1, або відповідної здорової тканини, яка як відомо не експресує рівні FOLR, що виявляються. Ці типи еталонних зразків називаються негативними контрольними зразками або "нормальними" еталонними зразками. В інших варіантах реалізації винаходу еталонний зразок являє собою зразок з пухлини або здорової тканини, яка експресує FOLR1, що виявляється. Ці типи еталонних зразків називаються позитивними контрольними або позитивними еталонними зразками. Позитивні контрольні зразки також можуть використовуватися як порівняльний індикатор для типу (гетеро у порівнянні з гомо) та/або ступеню (0, 1, 2, 3) інтенсивності забарвлення, яка корелює з рівнем експресії FOLR1. Позитивні контрольні порівняльні зразки також називаються каліброваними еталонними зразками. Еталони, що експресують низький рівень або не експресують FOLR1, описані у цьому документі в прикладах, а також включають всі структури стравоходу, ацинарні клітини/острівці підшлункової залози, міжальвеолярну сполучну тканину легень та ацинарні клітини слинних залоз. Для ліній клітин типові не експресуючі клітини включають VxPC3, Panc-1 та ASPC1. Позитивні еталони FOLR1 описані у цьому документі, наприклад, в прикладах, а також включають протоки підшлункової залози,

респіраторний епітелій нормальних легень та проміжні протоки слинних залоз. У деяких варіантах реалізації винаходу позитивні еталони FOLR1 включають протоки підшлункової залози та проміжні протоки слинних залоз. Для ліній клітин типові клітини з високою експресією FOLR1 описані у цьому документі, наприклад, в прикладах, а також включають KB, HeLa, трансфected FOLR1 клітини 300.19, Igrov-1 та Wish, а типові клітини з низькою експресією FOLR1 включають Ovar-3, Caov-3, SW620, T47D та Skov-3. Інший позитивний еталон з високим FOLR1 являє собою лінію клітин, стабільно або транзійтно трансфected FOLR1. Додаткові позитивні та негативні зразки для FOLR1 описані в табл. 13. Відповідні позитивні та негативні еталонні рівні FOLR1 для конкретного ракового захворювання можуть бути визначені вимірюванням рівнів FOLR1 в одному або більше підходящих суб'єктів, і такі еталонні рівні можуть бути прив'язані до специфічних популяцій суб'єктів (наприклад, еталонний рівень може бути визначений за віковою групою так, щоб порівняння могли бути зроблені між рівнями FOLR1 у зразках, отриманих від суб'єктів визначеного віку, та еталонними рівнями для конкретного хворобливого стану, фенотипу або їх відсутності у визначеній віковій групі). Такі еталонні рівні також можуть бути прив'язані до специфічних методик, які застосовуються для вимірювання рівнів FOLR1 в біологічних зразках (наприклад, імуноаналізах і т.п.).

[0155] Як використовується у цьому документі "імуногістохімія" відноситься гістохімічних та імунологічних методів, що використовуються для аналізу, наприклад, клітин або тканин. Таким чином, терміни "імуногістохімія", "імуноцитохімія" та "імунохімія" застосовуються взаємозаміно.

[0156] Термін "первинне антитіло" у цьому документі відноситься до антитіла, яке специфічно зв'язується у зразку з цільовим білковим антигеном. Первинне антитіло звичайно являє собою перше антитіло, що застосовується в ІФА аналізі або ІГХ методиці. В одному варіанті реалізації винаходу первинне антитіло являє собою антитіло, що застосовується лише в ІГХ методиці. Термін "вторинне антитіло" у цьому документі відноситься до антитіла, яке специфічно зв'язується з первинним антитілом, тим самим утворюючи місток або зв'язок між первинним антитілом та наступним реактивом, якщо він використовується. Вторинне антитіло звичайно являє собою друге антитіло, що застосовується в імуногістохімічній методиці.

[0157] "Зразок" або "біологічний зразок" за цим винаходом є біологічного походження, в спеціальних варіантах реалізації винаходу такий зразок отриманий з еукаріотичних організмів. У деяких варіантах реалізації винаходу зразок являє собою зразок, отриманий з організму людини, але також можуть використовуватися зразки, отримані з тварин. Необмежуючі джерела для використання у цьому винаході включають, наприклад, щільну тканину, аспіраційні біоптати, асцити, рідкі екстракти, кров, плазму, сироватку, спинномозкову рідину, лімфатичну рідину, зовнішні зрізи шкіри, респіраторний, кишковий та уrogenітальний тракти, слюзи, слину, молоко, пухлини, органи, культури клітин та/або компоненти культур клітин. "Злоякісний зразок" являє собою зразок, який містить злоякісні клітини. Спосіб може застосовуватися для перевірки аспекту експресії FOLR1 або стану зразка, включаючи, але не обмежуючись, порівнянням різних типів клітин або тканин, порівнянням різних стадій розвитку та виявленням або визначенням наявності та/або типу захворювання або відхилення.

[0158] Для цілей цього документа "зріз" зразка тканини вважається однією частиною або фрагментом зразка тканини, наприклад, тонкий шар тканини або клітин, зрізаний із зразка тканини. Мається на увазі, що можуть бути взяті множинні зрізи зразків тканин та піддані аналізу у відповідності із запропонованим винаходом. У деяких випадках відібрана частина або зріз тканини містить гомогенну популяцію клітин. В інших випадках відібрана частина містить ділянку тканини, наприклад, порожнину, в якості необмежуючого приклада. Відібрана частина може бути настільки малою як одна клітина або дві клітини або може представляти, наприклад, кілька тисяч клітин. У більшості випадків, важливо отримати набір клітин і коли у винаході описано застосування для виявлення клітинних компонентів, то спосіб також може застосовуватися для виявлення неклітинних компонентів організму (наприклад, розчинних компонентів у крові, в якості необмежуючого приклада).

[0159] Як використовується у цьому документі, термін "реактив для захвату" відноситься до реактиву здатному до зв'язування та захоплення цільової молекули у зразку так, що при підходящих умовах комплекс реактив для захвату-цільова молекула може бути відділений від решти зразка. В одному варіанті реалізації винаходу реактив для захвату є іммобілізованим. В одному варіанті реалізації винаходу реактив для захвату в "сендвіч"-імуноаналізі являє собою антитіло або суміш різних антитіл проти цільового антигену.

[0160] Як використовується у цьому документі термін "антитіло, що виявляється" відноситься до антитіла, яке здатне виявлятися як прямо за допомогою мітки, посиленій засобом для виявлення, або побічно за допомогою, наприклад, іншого антитіла, яке мічене. Для прямого введення мітки антитіло, як правило, кон'югують з фрагментом, який виявляється яким-

небудь способом. В одному варіанті реалізації винаходу антитіло, що виявляється, являє собою біотинільоване антитіло.

[0161] Як використовується у цьому документі, термін "засіб для виявлення" відноситься до фрагмента або методики, що використовується для виявлення присутності антитіла, що виявляється, та включає агенти для виявлення, які посилюють іммобілізовану мітку, таку як мітка, захоплена на планшеті для мікротитування. В одному варіанті реалізації засіб для виявлення являє собою флуориметричний агент для виявлення, такий як авідин або стрептавідин.

[0162] Найчастіше при виконанні "сендвіч-ІФА" задіяні наступні стадії: (1) планшет для мікротитування покривається антитілом для захвату; (2) додається зразок і будь-який присутній антиген зв'язується з антитілом для захвату; (3) антитіло, що виявляється, додається та зв'язується з антигеном; (4) додається зв'язане з ферментом вторинне антитіло і зв'язується з антитілом, що виявляється, та (5) додається субстрат і конвертується ферментом у форму, що виявляється.

[0163] Слово "мітка", при використанні у цьому документі відноситься до сполуки або композиції, що виявляється, яка безпосередньо або опосередковано кон'югована з антитілом так, щоб створити "мічене" антитіло. Мітка може бути такою, що виявляється сама по собі, (наприклад, радіоізотопні мітки або флуоресцентні мітки) або, у випадку ферментної мітки, може каталізувати хімічну зміну сполуки субстрату або композиції, яка є такою, що виявляється.

[0164] Під терміном "корелювати" або "корелювання" позначається порівняння, тим або іншим способом, характеристики та/або результатів першого аналізу з характеристикою та/або результатами другого аналізу. Наприклад, хтось може використати результати першого аналізу для проведення другого аналізу та/або хтось може використати результати першого аналізу для визначення того, чи слід виконувати другий аналіз та/або хтось може порівняти результати першого аналізу з результатами другого аналізу. В одному варіанті реалізації винаходу збільшена експресія FOLR1 корелює зі збільшеною ймовірністю ефективності FOLR1-таргетованої протиракової терапії.

[0165] Терміни "рак" та "злоякісний" відносяться до або описують фізіологічний стан ссавців, в якому популяція клітин характеризується неконтрольованим ростом клітин. Приклади раку включають, але не обмежуються, карциномою, лімфомою, бластомою, саркомою та лейкомією. Більш конкретні приклади таких ракових захворювань включають ракові захворювання ендотеліального, мезенхімального або епітеліального походження, такі як рак легень (наприклад, плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легень, недрібноклітинний рак легень, аденокарцинома легень, мезотеліома та плоскоклітинна карцинома легень), рак черевної порожнини (наприклад, первинний перитонеальний рак), гепатоклітинний рак, рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, гліобластома, рак шийки матки, рак яєчників (серозний або ендометріоїдний), рак печінки, рак сечового міхура, гепатома, рак грудної залози, рак товстої кишки, колоректальний рак, ендометріоїдна (наприклад, аденокарцинома ендометрію) або карцинома матки, карцинома слинних залоз, рак нирок, рак печінки, рак простати, рак вульви, рак щитовидної залози, карцинома печінки, рак головного мозку (наприклад, гліобластома, пухлини хоріоїдного сплетіння) та різні типи ракових захворювань голови і шиї, а також пухлини кровоносних судин та фалопієвих труб. Ракові захворювання також охоплюють ракові захворювання, які містять клітини, що мають підвищені рівні експресії FOLR1. Такі ракові захворювання з підвищеним FOLR1 включають, але не обмежуються раком яєчників, недрібноклітинним раком легень (аденокарциномою), раком матки, ендометрію, підшлункової залози, нирок, легень та молочних залоз.

[0166] "Пухлина" або "новоутворення" відноситься до будь-якої маси тканини, яка є результатом надмірного росту або проліферації клітин, або доброякісною (нераковою) або злоякісною (раковою) масою тканини, включаючи передракові утворення.

[0167] Терміни "ракова клітина", "пухлинна клітина" та граматичні еквіваленти відносяться до загальної популяції клітин, що походять з пухлини або передракового утворення, включаючи як непухлинеутворюючі клітини, які містять масив популяції пухлинних клітин, та пухлинеутворюючі стовбурові клітини (ракові стовбурові клітини). Як використовується у цьому документі, термін "пухлинна клітина" повинен бути модифікований терміном "непухлинеутворююча", коли цілком відноситься до тих пухлинних клітин, у яких відсутня здатність до відновлення та диференціації, щоб розрізнити такі пухлинні клітини та ракові стовбурові клітини.

[0168] Термін "суб'єкт" відноситься до будь-якої тварини (наприклад, ссавця), яка включає, але не обмежена людьми, приматами крім людини, гризунами та їм подібними, які мають бути реципієнтом конкретного лікування. Як правило, термін "суб'єкт" та "пацієнт" застосовуються у

цьому документі взаємозаміно щодо суб'єкта-людини.

[0169] Термін "фармацевтична формуляція" відноситься до препарату, який представлений у такій формі, щоб забезпечити ефективний прояв біологічної активності активного інгредієнту, та який не містить додаткових компонентів, які є недопустимо токсичними для суб'єкта, якому

має вводиться формуляція. Така формуляція повинна бути стерильною.
[0170] "Ефективна кількість" антитіла або імунокон'югату, як описано у цьому документі, являє собою кількість, достатню для використання для спеціально заявленого призначення. "Ефективну кількість" може бути визначено емпірично і рутинним способом, по відношенню до заявленого призначення.

[0171] Термін "терапевтично ефективна кількість" відноситься до кількості антитіла або іншої лікарської речовини, ефективною для "лікування" захворювання або порушення у суб'єкта або ссавця. У випадку ракового захворювання терапевтично ефективна кількість лікарської речовини може зменшити кількість ракових клітин; зменшити розмір пухлини; інгібувати (тобто до деякого ступеня сповільнити і, у конкретному варіанті реалізації винаходу, зупинити) інфільтрацію ракових клітин до периферійних органів; інгібувати (тобто до деякого ступеня сповільнити і, у конкретному варіанті реалізації винаходу, зупинити) пухлинні метастази; інгібувати до деякого ступеня пухлинний ріст; полегшити до деякого ступеня один або більше симптомів, пов'язаних з раковим захворюванням, та/або привести до сприятливої відповіді, такої як збільшена виживаність без прогресування (PFS), безрецидивна виживаність (DFS) або загальна виживаність (OS), повна відповідь (CR), часткова відповідь (PR) або, у деяких випадках, стабілізація захворювання (SD), зменшення прогресування захворювання (PD), зниження часу до прогресування (TTP), зменшення CA125, у випадку раку яєчників, або до їх будь-якої комбінації. Див. визначення у цьому документі для терміна "лікування". У тому випадку, коли лікарська речовина може попереджати ріст та/або вбивати існуючі ракові клітини, вона може бути цитостатичною та/або цитотоксичною. У деяких варіантах реалізації винаходу ідентифікація збільшених рівнів FOLR1 дозволяє вводити зменшені кількості FOLR1-таргетованих лікарських засобів для досягнення такого ж терапевтичного ефекту, який спостерігається з більш високими дозами. "Профілактична ефективна кількість" відноситься до кількості, ефективній у дозуваннях та протягом періодів часу, необхідних для досягнення потрібного профілактичного результату. Як правило, але не обов'язково, оскільки профілактична доза застосовується у суб'єктів до захворювання або на ранній стадії захворювання, профілактично ефективна кількість буде меншою ніж терапевтично ефективна кількість.

[0172] Термін "сприятливо відповідати" звичайно відноситься до того, що викликає у суб'єкта сприятливий стан. Відносно лікування раку термін відноситься до досягнення суб'єктом терапевтичного ефекту. Позитивні терапевтичні ефекти при раковому захворюванні можуть бути виміряні різними способами (див. W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). Наприклад, інгібування пухлинного росту, експресія молекулярного маркера, експресія сироваткового маркера та методики молекулярної візуалізації – всі можуть застосовуватися для оцінки терапевтичної ефективності протиракового лікарського засобу. Відносно інгібування пухлинного росту у відповідності зі стандартом NCI співвідношення $T/C \leq 42\%$ являє собою мінімальний рівень протипухлинної активності. Співвідношення $T/C < 10\%$ вважається високим рівнем протипухлинної активності, де $T/C (\%) = \text{медіанний об'єм пролікованої пухлини} / \text{медіанний об'єм контролю} \times 100$. Сприятлива відповідь може оцінюватися, наприклад, за збільшеною виживаністю без прогресування (PFS), безрецидивною виживаністю (DFS) або загальною виживаністю (OS), повною відповіддю (CR), частковою відповіддю (PR) або, у деяких випадках, стабілізацією захворювання (SD), зменшенням прогресування захворювання (PD), зниженням часу до прогресування (TTP), зменшенням CA125, у випадку раку яєчників, або за їх будь-якою комбінацією.

[0173] Показники PFS, DFS та OS можуть бути виміряні за набором стандартів, установлених Національним інститутом раку та Управлінням з контролю за продуктами та ліками США для ухвалення нових ліків. Див. Johnson et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411.

[0174] "Виживаність без прогресування" (PFS) відноситься до періоду часу від реєстрації до прогресування захворювання або смерті. PFS звичайно вимірюється з використанням методу Каплана-Майєра та стандартів визначення критеріїв оцінки відповіді при солідних пухлинах (RECIST) 1.1. Звично, виживаність без прогресування відноситься до ситуації, в якій пацієнт залишається живим без посилення ракового захворювання.

[0175] "Час до прогресування пухлини" (TTP) визначають як період часу від реєстрації до прогресування захворювання. TTP звичайно вимірюють з використанням критеріїв RECIST 1.1.

[0176] "Повна відповідь" або "повна ремісія" або "CR" вказує на зникнення всіх ознак

пухлини або ракового захворювання у відповідь на лікування. Це не завжди означає, що ракове захворювання виліковне.

[0177] "Часткова відповідь" або "PR" відноситься до зменшення розміру або об'єму однієї або більше пухлин або утворень, або ступеню розповсюдження ракового захворювання в організмі у відповідь на лікування.

[0178] "Стабілізація захворювання" відноситься до захворювання без прогресування або рецидиву. При стабілізації захворювання не спостерігається ні достатнього зменшення розмірів пухлини для класифікації часткової відповіді, ні достатнього збільшення розмірів пухлини для класифікації прогресування захворювання.

[0179] "Прогресування захворювання" відноситься до виникнення ще одного нового утворення або пухлини та/або однозначного прогресування існуючих нетаргетованих утворень. Прогресування захворювання також може відноситися до пухлинного росту на більш ніж 20 відсотків від початку лікування як через збільшення маси, так і через розповсюдження пухлини.

[0180] "Безрецидивна виживаність" (DFS) відноситься до проміжку часу протягом та після лікування, в якому пацієнт залишається позбавленим захворювання.

[0181] "Загальна виживаність" (OS) відноситься до періоду часу від реєстрації пацієнта до смерті або цензурується за останньою датою, коли відомо, що пацієнт залишався живим. OS включає пролонгування тривалості життя у порівнянні з індивідами або пацієнтами, що не отримували лікування або були нелікованими. Загальна виживаність відноситься до ситуації, в якій пацієнт залишається живим протягом визначеного періоду часу, такого як один рік, п'ять років і т.д., наприклад, від часу встановлення діагнозу до лікування.

[0182] "Зменшення рівнів CA125" може оцінюватися у відповідності з настановами Міжнародної інтергрупи гінекологічного раку (GCIIG). Наприклад, рівні CA125 можуть бути виміряні перед лікуванням для встановлення вихідного рівня CA125. Рівні CA125 можуть бути виміряні один або більше разів під час або після лікування, а зниження рівнів CA125, при проходженні часу у порівнянні з вихідним рівнем, вважається зменшенням рівнів CA125.

[0183] Такі терміни як "отримання лікування" або "лікування" або "лікувати" або "полегшення" або "полегшувати" відносяться до терапевтичних заходів з лікування, зниження швидкості, зменшення симптомів та/або зупинки прогресування діагностованого патологічного стану або порушення. Таким чином, ті, хто потребує лікування включають тих, у кого вже діагностовано або є підозра на наявність порушення. У деяких варіантах реалізації винаходу суб'єкт успішно "виліковується" від ракового захворювання у відповідності зі способами цього винаходу, якщо пацієнт проявляє одне або більше з наступного: зниження кількості або повна відсутність ракових клітин; зниження розміру пухлини; інгібування або відсутність інфільтрації ракових клітин до периферійних органів, включаючи, наприклад, поширення пухлини у м'яку тканину та кістку; інгібування або відсутність пухлинних метастазів; інгібування або відсутність пухлинного росту; полегшення одного або більше симптомів, пов'язаних з конкретним раковим захворюванням; зменшення важкості захворювання та смертності; покращення якості життя; зниження онкогенності, онкогенної частоти або онкогенної здатності пухлини; зниження кількості або частоти утворення ракових стовбурових клітин в пухлині; диференціація онкогенних клітин в неонкогенний стан; збільшення виживаності без прогресування (PFS), безрецидивної виживаності (DFS) або загальної виживаності (OS), повна відповідь (CR), часткова відповідь (PR), стабілізація захворювання (SD), зменшення прогресування захворювання (PD), зниження часу до прогресування (TTP), зменшення CA125, у випадку раку яєчників, або їх будь-яка комбінація.

[0184] Профілактичні або превентивні заходи відносяться до терапевтичних заходів, які попереджають та/або сповільнюють розвиток патологічного стану або порушення, що таргетується. Таким чином, ті, хто потребує профілактичних або превентивних заходів включають тих, хто схильний до порушення, та тих, у кого порушення потрібно попередити.

[0185] Як використовується у цьому документі термін "медичний працівник" відноситься до індивідів або організацій, які безпосередньо взаємодіють та надають допомогу живим суб'єктам, наприклад, пацієнтам-людям. Не обмежуючі приклади медичних працівників включають лікарів, медсестер, лаборантів, терапевта, фармацевтів, консультантів, практикуючих альтернативну медицину, медичні заклади, лікарські кабінети, лікарні, пункти швидкої допомоги, клініки, пункти невідкладної допомоги, клініки/заклади альтернативної медицини та будь-який інший об'єкт, що забезпечує загальне та/або спеціалізоване лікування, оцінювання, обслуговування, терапію, медикаментозне лікування та/або консультування відносно всіх або будь-якої частини стану здоров'я пацієнта, включаючи, але не обмежуючись, загальним медичним, спеціалізованим медичним, хірургічним та/або будь-яким іншим типом лікування, оцінювання, обслуговування, терапії, медикаментозного лікування та/або консультування.

[0186] У деяких аспектах медичний працівник може надавати допомогу або інструктувати іншого медичного працівника відносно призначення терапії для лікування раку. "Проведення" терапії, як використовується у цьому документі, включає призначення терапії суб'єкту, а також доставку, застосування та надання терапії суб'єкту. Медичний працівник може проводити лікування або інструктувати іншого медичного працівника або пацієнта відносно виконання наступних дій: отримання зразка, обробку зразка, передачу зразка, отримання зразка, передачу зразка, проведення аналізу або вимірювання зразка, кількісне визначення зразка, надання результатів, отриманих після аналізу/вимірювання/кількісного визначення зразка, отримання результатів, отриманих після аналізу/вимірювання/кількісного визначення зразка, порівняння/оцінка результатів, отриманих після аналізу/вимірювання/кількісного визначення зразка, надання порівняння/оцінки для одного або більше зразків, отримання порівняння/оцінки для одного або більше зразків, проведення терапії або введення терапевтичного агенту (наприклад, FOLR1-зв'язуючого агенту), ініціювання проведення терапії, припинення проведення терапії, продовження проведення терапії, тимчасове припинення проведення терапії, збільшення кількості призначеного терапевтичного агенту, зменшення кількості призначеного терапевтичного агенту, продовження введення деякої кількості терапевтичного агенту, збільшення частоти введення терапевтичного агенту, зменшення частоти введення терапевтичного агенту, підтримання такої ж частоти дозування терапевтичного агенту, заміна терапії або терапевтичного агенту щонайменше іншою терапією або терапевтичним агентом, комбінування терапії або терапевтичного агенту щонайменше з іншою терапією або додатковим терапевтичним агентом. Ці дії можуть виконуватися медичним працівником автоматично, використовуючи реалізований на комп'ютері спосіб (наприклад, за допомогою веб-служби або автономної комп'ютерної системи).

[0187] Терміни "полінуклеотид" або "нуклеїнова кислота", що використовуються у цьому документі взаємозаміно, відносяться до полімерів нуклеотидів будь-якої довжини та включають ДНК і РНК. Нуклеотиди можуть бути дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифікованими нуклеотидами або основами та/або їх аналогами, або будь-яким субстратом, який може бути введений до полімеру ДНК- або РНК-полімеразою. Полінуклеотид може містити модифіковані нуклеотиди, такі як метильовані нуклеотиди та їх аналоги. Якщо потрібно, модифікація в нуклеотидну структуру може бути внесена до або після збирання полімеру. Послідовність нуклеотидів може бути перервана ненуклеотидними компонентами. Полінуклеотид може бути додатково модифікованим після полімеризації, таким способом як кон'югація з компонентом, що мітить. Інші типи модифікацій включають, наприклад, "кепи", заміни одного або більше нуклеотидів, що зустрічаються у природі, аналогом, міжнуклеотидні модифікації, такі як, наприклад, нуклеотиди з незарядженими зв'язками (наприклад, метилфосфонати, фосфотриєфіри, фосфоамідати, карбамати і т.п.) та із зарядженими зв'язками (наприклад, фосфоротіоати, фосфородитіоати і т.п.), модифікації, які містять бокові фрагменти, такі як, наприклад, білки (наприклад, нуклеази, токсини, антитіла, сигнальні пептиди, шаруватий L-лізин і т.п.), модифікації з інтеркаляторами (наприклад, акридином, псораленом і т.п.), модифікації, які містять хелатуючі агенти (наприклад, метали, радіоактивні метали, бор, окиснюючі метали і т.п.), модифікації, які містять алкілюючі агенти, модифікації, з модифікованими зв'язками (наприклад, альфа-аномерні нуклеїнові кислоти і т.п.), а також немодифіковані форми полінуклеотиду(ів). Додатково, будь-яка з гідроксильних груп, що звичайно присутні в цукрах, може бути замінена, наприклад, фосфонатними групами, фосфатними групами, захищена стандартними захисними групами або активована для отримання додаткових зв'язків для додаткових нуклеотидів, або може бути кон'югована з твердими підложками. 5'- та 3'-кінцевий ОН може бути фосфорильований або заміщений амінами або органічними фрагментами, кепуючими групи, з від 1 до 20 атомів вуглецю. Інші гідроксиди також можуть бути дериватизовані для отримання стандартних захисних груп. Полінуклеотиди також можуть містити аналогічні форми рибозних та дезоксирибозних цукрів, які звичайно добре відомі у цій галузі техніки, включаючи, наприклад, 2'-О-метил-, 2'-О-аліл-, 2'-фтор- або 2'-азидорибозу, карбоциклічні аналоги цукрів, альфа-аномерні цукри, епімерні цукри, такі як арабіноза, ксилози або ліксози, піранозні цукри, фуранозні цукри, седогептулози, ациклічні аналоги та неосновні нуклеозидні аналоги, такі як метилрибозид. Один або більше фосфодієфірних зв'язків можуть бути замінені альтернативними зв'язуючими групами. Ці альтернативні зв'язуючі групи включають, але не обмежуються, варіантами реалізації винаходу, в яких фосфат замінений P(O)S ("тіоат"), P(S)S ("дитіоат"), (O)NR₂ ("амідат"), P(O)R, P(O)OR', CO або CH₂ ("формацеталь"), в яких кожний R або R' є незалежно H або заміщеним або незаміщеним алкілом (1-20 C), необов'язково таким, що містить будь-який етерний (--O--) зв'язок, аріл, алкеніл, циклоалкіл, циклоалкеніл або аралділ. Не потрібно, щоб всі зв'язки у

полінуклеотиді були ідентичними. Попередній опис може бути застосовано до всіх полінуклеотидів, названих у цьому документі, включаючи РНК і ДНК.

[0188] Термін "вектор" означає конструкцію, яка здатна доставляти та експресувати один або більше ген(ів) або послідовність(ей), що представляють інтерес, до клітини-хазяїна. Приклади векторів включають, але не обмежуються, вірусними векторами, голою ДНК або РНК-експресійним вектором, плазмідною, космідними або фаговими векторами, ДНК- або РНК-експресійними векторами, асоційованими з катіонними конденсуючими агентами, ДНК- або РНК-експресійними векторами, інкапсульованими в ліпосоми, та певними еукаріотичними клітинами, такими як клітини-продуценти.

[0189] Терміни "поліпептид", "пептид" та "білок" застосовуються у цьому документі взаємозаміно відносно полімерів амінокислот будь-якої довжини. Полімер може бути лінійним або розгалуженим, він може містити модифіковані амінокислоти та він може перериватися неамінокислотами. Терміни також охоплюють амінокислотний полімер, який модифікований природним способом або введенням; наприклад, утворенням дисульфідного зв'язку, глікозилюванням, ліпідизацією, ацетилюванням, фосфорилюванням або будь-якою іншою маніпуляцією або модифікацією, такою як кон'югація з компонентом, що мітить. Визначенням також охоплені, наприклад, поліпептиди, які містять один або більше аналогів амінокислот (включаючи, наприклад, неприродні амінокислоти і т.п.), а також інші модифікації, відомі у цій галузі техніки. Мається на увазі, що завдяки тому, що поліпептиди за даним винаходом базуються на антитілах, у деяких варіантах реалізації винаходу поліпептиди можуть зустрічатися у вигляді одноланцюгових або асоційованих ланцюгів. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, пептид або білок не є таким, що зустрічається у природі. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, пептид або білок очищають від інших компонентів, що зустрічаються у природі. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, пептид або білок отримані рекомбінантним способом.

[0190] Терміни "ідентичний" або відсоток "ідентичності" у контексті двох або більше нуклеїнових кислот або поліпептидів відносяться до двох або більше послідовностей або підпослідовностей, які однакові або мають встановлений відсотковий вміст нуклеотидів або амінокислотних залишків, які однакові при порівнянні та вирівнюванні (якщо потрібно, вводячи гепи) на максимальну відповідність, не розглядаючи будь-які консервативні амінокислотні заміни, як частини ідентичності послідовностей. Відсоток ідентичності може вимірюватися з використанням програмного забезпечення або алгоритмів або візуальною перевіркою. Різні алгоритми та програмне забезпечення добре відомі у цій галузі техніки, вони можуть використовуватися для отримання результатів вирівнювань амінокислотних або нуклеотидних послідовностей. Один такий не обмежуючий приклад алгоритму вирівнювання послідовностей являє собою алгоритм, описаний в статті Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268, в модифікованому вигляді в статті Karlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877, та включений до програми NBLAST та XBLAST (Altschul et al., 1991, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). У деяких варіантах реалізації винаходу, може використовуватися BLAST з використанням гепів, як описано в статті Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, м. Південний Сан Франциско, Каліфорнія) або Megalign (DNASTAR) являють собою додаткові загальнодоступні програмні продукти, які можуть використовуватися для вирівнювання послідовностей. У деяких варіантах реалізації винаходу відсоток ідентичності між двома нуклеотидними послідовностями визначається з використанням програми GAP в програмному забезпеченні GCG (наприклад, використовуючи матрицю NWSgapdna.CMP та вагу гепів рівну 40, 50, 60, 70 або 90 і вагу довжини рівну 1, 2, 3, 4, 5 або 6). У деяких альтернативних варіантах реалізації винаходу програма GAP в програмному пакеті GCG, який включає алгоритм Нідлмана та Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), може використовуватися для визначення відсотка ідентичності між двома амінокислотними послідовностями (наприклад, використовуючи або матрицю Blossum 62 або матрицю PAM250 та вагу гепів рівну 16, 14, 12, 10, 8, 6 або 4 і вагу довжини рівну 1, 2, 3, 4, 5). Альтернативно, у деяких варіантах реалізації винаходу відсоток ідентичності між нуклеотидними або амінокислотними послідовностями визначається з використанням алгоритму Майєрса та Мілера (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Наприклад, відсоток ідентичності може визначатися з використанням програми ALIGN (версія 2.0) та, використовуючи PAM120 з таблицею залишків, штрафом за продовження гепів рівним 12 та штрафом за внесення гепів рівним 4. Підходящі параметри для максимального вирівнювання конкретним програмним забезпеченням для вирівнювання можуть визначатися спеціалістом в цій області. У деяких варіантах реалізації винаходу в програмному забезпеченні для вирівнювання використовуються параметри за замовчуванням. У деяких варіантах реалізації

винаходу відсоток ідентичності "X" першої амінокислотної послідовності відносно другої послідовності амінокислот розраховується як $100 \times (Y/Z)$, де Y являє собою кількість амінокислотних залишків, розрахованих як ідентичні відповідності при вирівнюванні першої та другої послідовностей (при вирівнюванні шляхом візуальної перевірки або конкретної програми для вирівнювання послідовностей) та Z являє собою загальну кількість залишків в другій послідовності. Якщо довжина першої послідовності довше другої послідовності, то відсоток ідентичності першої послідовності до другої послідовності буде більше, ніж відсоток ідентичності другої послідовності відносно першої послідовності.

[0191] Не обмежуючий приклад за умови, що будь-який конкретний полінуклеотид має визначений відсоток ідентичності послідовності (наприклад, є щонайменше на 80 % ідентичним, щонайменше на 85 % ідентичним, щонайменше на 90 % ідентичним та, у деяких варіантах реалізації винаходу, щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичним) еталонний послідовності може, у деяких варіантах реалізації винаходу, визначатися з використанням програми Bestfit (пакет аналізу послідовностей Wisconsin, версія 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Програма Bestfit використовує алгоритм локальної гомології Сміта та Уотермана, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), для виявлення найкращого сегмента гомології між двома послідовностями. При використанні Bestfit або будь-якої іншої програми для вирівнювання послідовностей для визначення того, чи є конкретна послідовність, наприклад, на 95 % ідентичною еталонній послідовності у відповідності з даним винаходом, параметри встановлюють таким чином, щоб відсоток ідентичності розраховувався на повній довжині еталонної нуклеотидної послідовності та щоб допускалися гепи в гомології до 5 % від загальної кількості нуклеотидів в еталонній послідовності.

[0192] У деяких варіантах реалізації винаходу дві нуклеїнові кислоти або поліпептиди за даним винаходом є практично ідентичними, що означає, що вони мають щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, та, у деяких варіантах реалізації винаходу, щонайменше 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ідентичності нуклеотидних або амінокислотних залишків, при порівнянні та вирівнюванні на максимальну відповідність, виміряну з використанням алгоритму порівняння послідовностей або отриману візуальною перевіркою. У деяких варіантах реалізації винаходу ідентичність існує на протязі ділянки послідовностей, яка складає щонайменше близько 10, близько 20, близько 40-60 залишків у довжину або будь-яке ціле значення між цими значеннями або на протязі більш довгої ділянки, ніж 60-80 залишків, щонайменше близько 90-100 залишків або послідовностей практично ідентичних на протязі повної довжини послідовностей, яких порівнюють, таких як кодуєча ділянка, наприклад, нуклеотидної послідовності.

[0193] "Консервативна амінокислотна заміна" являє собою заміну, при якій один амінокислотний залишок замінений іншим амінокислотним залишком, що має подібний боковий ланцюг. В цій галузі техніки були визначені родини амінокислотних залишків, що мають подібні бокові ланцюги, включаючи основні бокові ланцюги (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотні амінокислотні ланцюги (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незаряджені полярні бокові ланцюги (наприклад, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярні бокові ланцюги (наприклад, гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалужені бокові ланцюги (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичні бокові ланцюги (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Наприклад, заміна фенілаланіну на тирозин є консервативною заміною. У деяких варіантах реалізації винаходу консервативні заміни в послідовностях поліпептидів та антитіл за даним винаходом не пригнічують зв'язування поліпептиду або антитіла, що містить амінокислотну послідовність, з антигеном(ами), тобто FOLR1, з яким зв'язується поліпептид або антитіло. Способи ідентифікації нуклеотидних та амінокислотних консервативних заміні, які не усувають антигенне зв'язування добре відомі в цій галузі техніки (див., наприклад, статті Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999) та Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

[0194] При використанні у цьому описі та формулі винаходу, форми однини включають форми множини, якщо з контексту вочевидь не випливає зворотне.

[0195] Мається на увазі, що де б не були описані варіанти реалізації винаходу у цьому документі зі словом "той, що містить", також пропонуються аналогічні варіанти реалізації винаходу описані іншим чином в термінах "той, що складається з" та/або "складається переважно з".

[0196] Термін "та/або", як використовується у фразі, такий як "А та/або В" у цьому документі, має на увазі включення всіх варіантів "А та В", "А або В", "А" та "В". Аналогічним чином, термін

"та/або", як використовується у фразі, такий як "А, В та/або С" має на увазі охоплення кожного значення з наступних: А, В та С; А, В або С; А або С; А або В; В або С; А та С; А та В; В та С; А (лише); В (лише) та С (лише).

II. FOLR1-зв'язуючі агенти.

5 [0197] У цьому винаході запропоновані агенти, які специфічно зв'язують FOLR1 людини. Ці агенти у цьому документі називаються "FOLR1-зв'язуючими агентами". У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язуючі FOLR1 агенти є антитілами, імунокон'югатами або поліпептидами. Амінокислотні та нуклеотидні послідовності FOLR1 людини відомі в цій галузі техніки, а також запропоновані у цьому документі як представлені SEQ ID №:1 та SEQ ID №:2.

10 Рецептор фолієвої кислоти 1 людини:

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGAEQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKN
ACSTNTSQEANKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLEYECSPNLGPWIIQQVDQSWRKER
VLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNWNTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEI
WTHSYKVSNSRSGRGIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLSLALMLLWLLS
15 (SEQ ID №:1)

Послідовність нуклеїнової кислоти рецептора фолієвої кислоти 1 людини:

atggctcagcggatgacacacagctgctgctctctagtgtgggtgctgtagtagggaggctcagacaaggattgcatgggccag
gactgagcttctcaatgtctgcatgaacgccaagcaccacaaggaaagccaggcccccaggacaaagtgcagcagtgctgacccctg
gaggaagaatgcctgctgttctaccaacaccagccaggaagcccataaggatgttctctacatatagattcaactggaaccactgtggaga
20 gatggcacctgcctgcaaacggcatttcatccaggacacctgctctacagtgctcccccaactggggccctggatccagcaggtggatca
gagctggcgcaaagagcgggtactgaacgtgccctgtgcaaagaggactgtgagcaatggtgggaagattgtcgacctcctacacctgc
aagagcaactggcacaagggctggaactggactcaggggttaacaagtcgcagtgaggagctgctgccaaccttccatttctactcccca
caccactgttctgtgaatgaaatctggactcactcctacaaggtcagcaactacagccgagggagtgccgctgcatccagatgtggttcga
cccagcccagggaaccccaatgaggaggtggcgaggttctatgtcgcagccatgagtgagggtgggcccctgggcagcctggccttctctgc
25 ttagcctggccctaattgtgtgtgtgctgctcagc (SEQ ID №:2)

[0198] Таким чином, у деяких варіантах реалізації винаходу, зв'язуючі FOLR1 агенти можуть зв'язуватися з епітопом SEQ ID №:1.

[0199] У деяких варіантах реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло може специфічно зв'язуватися з епітопом FOLR1 (SEQ ID №:1), причому епітоп містить N-глікозильовану амінокислоту. Тому, такі антитіла будуть зв'язуватися з FOLR1, коли він глікозильований, та не будуть зв'язуватися з FOLR1, коли він не глікозильований. Іншими словами, зв'язування цих антитіл є глікозалежним. Ці антитіла мають перевагу в тому, що вони можуть застосовуватися для розпізнавання глікозильованих та неглікозильованих форм FOLR1. Враховуючи, що глікозильовання може бути потрібним для мембранної локалізації, антитіла можуть переважно використовуватися для мембраноспецифічного забарвлення.

[0200] У деяких варіантах реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло може специфічно зв'язуватися з епітопом FOLR1, що містить N-глікозильовану амінокислоту 69 FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло може специфічно зв'язуватися з епітопом FOLR1, що містить N-глікозильовану амінокислоту 161 FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло може специфічно зв'язуватися з епітопом FOLR1, що містить N-глікозильовану амінокислоту 201 FOLR1.

[0201] У деяких варіантах реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло являє собою антитіло, отримане з використанням гібридоми, депонованої в Американській колекції типових культур (ATCC), розташованій за адресою 10801 University Boulevard, Манассас, Вірджинія 20110, 16 квітня 2013 г., згідно умов Будапештської угоди, та маючої № ATCC депонування PTA-120196 ("FOLR1-9.20", також названа "IMGN 353.9-20", "353.9-20" або "9.20"). У деяких варіантах реалізації винаходу анти-FOLR1 антитіло являє собою антитіло, отримане з використанням гібридоми, депонованої в ATCC 16 квітня 2013 г., та маючої № ATCC депонування PTA-120197 ("FOLR1-2.1", також названа "IMGN 353.2-1", "353.2-1", "2.1" або "muFRIHC2-1").

50 [0202] FOLR1-зв'язуючі агенти включають FOLR1-зв'язуючі агенти, які включають CDR послідовності важкого та легкого ланцюга (i) muFRIHC2-1, який також відомий як "FOLR1-2.1", "IMGN 353.2-1", "353.2-1" або "2.1", (ii) muFRIHC5-7, який також відомий як "IMGN 353.5-7", "353.5-7" або "5.7", (iii) "muFRIHC9-20", який також відомий як "FOLR1-9.20", "IMGN 353.9-20", "353.9-20" або "9.20", (iv) huFRIHC2-1 зі зміненою поверхнею версії 1.0 або 1.01 або (v) CDR-прищеплений huFRIHC2-1 версії 1.0 або 1.01, які представлені нижче в табл. 1 та 2. FOLR1-зв'язуючі агенти також включають FOLR1-зв'язуючі агенти, які містять послідовності CDR важкого та легкого ланцюга зі складених CDR, представлені нижче в табл. 1 та 2.

Таблиця 1

Варіабельні амінокислотні послідовності CDR важкого ланцюга

Антитіло	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
muFRIHC2-1 ("2.1")	NSYIH (SEQ ID №:3)	WIYPESLNTQYNEKFKA (SEQ ID №:4)	RGIYYSPPYALDH (SEQ ID №:5)
muFRIHC5-7 ("5.7")	NYYIH (SEQ ID №:9)	WIYPGSFNVEYNEKFKA (SEQ ID №:10)	RGIYFYSPYALDY (SEQ ID №:11)
muFRIHC9-20 ("9.20")	NYYIH (SEQ ID №:15)	WIYPENVNRYNDKFKA (SEQ ID №:16)	RGIYYSPPYAMDY (SEQ ID №:17)
Складене	N(Y/S)YIH (SEQ ID №:21)	WIYP(G/E)(S/N)(F/V/L)N(V/T)(E/R/Q)YN(E/D)KFKA (SEQ ID №:22)	RGIY(F/Y)SPYA(L/M)D(Y/H) (SEQ ID №:23)

Таблиця 2

Варіабельні амінокислотні послідовності CDR легкого ланцюга

Антитіло	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
muFRIHC2-1 ("2.1")	KSSKSLNSDGFTYLD (SEQ ID №:6)	LVSNNHFS (SEQ ID №:7)	FQSNYLPLT (SEQ ID №:8)
muFRIHC5-7 ("5.7")	KSTESLLNSDGFTYLD (SEQ ID №:12)	LVSNNHFS (SEQ ID №:13)	FQSNYLPLT (SEQ ID №:14)
muFRIHC9-20 ("9.20")	KSTKSLNSDGFTYLD (SEQ ID №:18)	LVSNNHFS (SEQ ID №:19)	FQSNYLPLT (SEQ ID №:20)
Складене	KS(T/S)(K/E)SLLNSDGFTYLD (SEQ ID №:24)	LVSNNHFS (SEQ ID №:25)	FQSNYLPLT (SEQ ID №:26)

- 5 [0203] Зв'язуючі FOLR1 молекули можуть бути антитілами або антигензв'язуючими фрагментами, які специфічно зв'язуються з FOLR1, які містять CDR антитіла 2.1 (тобто SEQ ID №: 3-8), 5.7 (тобто SEQ ID №: 9-14), 9.20 (тобто SEQ ID №: 15-20), з аж до чотирьох (тобто 0, 1, 2, 3 або 4) консервативних амінокислотних замін на один CDR. Зв'язуючі FOLR1 молекули можуть бути антитілами або антигензв'язуючими фрагментами, які специфічно зв'язуються з FOLR1, які містять CDR зі складеної послідовності, показаної вище (тобто SEQ ID №: 21-26), з
- 10 аж до чотирьох (тобто 0, 1, 2, 3 або 4) консервативних амінокислотних замін на один CDR.

[0204] Зв'язуючі FOLR1 молекули можуть бути антитілами або антигензв'язуючими фрагментами, які специфічно зв'язуються з FOLR1, які містять CDR з антитіла, отриманого з використанням гібридом з № ATCC депонування PTA-120196 або PTA-120197.

- 15 [0205] Поліпептиди можуть містити один з індивідуальних варіабельних легких ланцюгів або варіабельних важких ланцюгів, описаних у цьому документі. Антитіла та поліпептиди також можуть містити як варіабельний легкий ланцюг, так і варіабельний важкий ланцюг. Послідовності варіабельного легкого ланцюга та варіабельного важкого ланцюга мишачих антитіл 2.1, 5.7 і 9.20 та гуманізованого 2.1 представлені нижче в табл. 3 та 4.

Таблиця 3

Варіабельні амінокислотні послідовності важких ланцюгів

Антитіло	Амінокислотна послідовність VH (SEQ ID №)
muFRIHC2-1 ("2.1")	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYIHWVKRPGQGLEWIGWIYPE SLNTQYNEKFKAKATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGIYYSPYALD HWGQGASVTVSS (SEQ ID №:27)
muFRIHC5-7 ("5.7")	QVQLQQSGPEVVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKRPGQGLEWIGWIYPGS FNVEYNEKFKAKATLTADKSSSTVYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGIYFYSPYALDY WGQGASVTVSS (SEQ ID №:29)
muFRIHC9-20 ("9.20")	QVQLQQSGPDLVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKRPGQGLEWIGWIYPEN VNVRYNDKFKAKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGIYYSPYAMDY WGQGASVTVSS (SEQ ID №:31)
huFRIHC2-1 (зі зміненою поверхнею)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTNSYIHWVKRPGQGLEWIGWIYPESL NTQYNQKFQGKATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGIYYSPYALDHW GQGASVTVSS (SEQ ID №:62)
huFRIHC2-1 (прищеплене)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCASGYTFTNSYIHWVRQAPGQGLEWMGWIYPE SLNTQYNEKFKARVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARRGIYYSPYALD HWGQGTLVTVSSAST (SEQ ID №:65)

Таблиця 4

Варіабельні амінокислотні послідовності легких ланцюгів

Антитіло	Амінокислотна послідовність VL (SEQ ID №)
muFRIHC2-1 ("2.1")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSSKSLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL VSNHFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGGGTKL EIKR (SEQ ID №:28)
muFRIHC5-7 ("5.7")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTESLLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIY LVSNHFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGGGTK LEVKR (SEQ ID №:30)
muFRIHC9-20 ("9.20")	SDVVLQTPLSLPVNLGDQASISCKSTKSLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIY LVSNHFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGGGTK LEIKR (SEQ ID №:32)
huFRIHC2-1 v. 1.0 (зі зміненою поверхнею)	DVVLTSPLSLPVNLGQPASISCRSSRSLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPRLIYL VSNHFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGQGTKL EIKR (SEQ ID №:63)
huFRIHC2-1 v. 1.01 (зі зміненою поверхнею)	DVVLTSPLSLPVNLGQPASISCKSSKSLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPRLIYL VSNHFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGQGTK LEIKR (SEQ ID №:64)
huFRIHC2-1 v. 1.0 (прищеплене)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL VSNHFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQSNYLPLTFGQGTKL EIK (SEQ ID №:66)
huFRIHC2-1 v. 1.01 (прищеплене)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSKSLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL VSNHFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQSNYLPLTFGQGTKL EIK (SEQ ID №:67)

- 5 [0206] Запропоновані також поліпептиди, які містять: (а) поліпептид, що має щонайменше близько 90 % ідентичності послідовності SEQ ID №:27, 29, 31, 62 або 65, та/або (b) поліпептид, що має щонайменше близько 90 % ідентичності послідовності SEQ ID №:28, 30, 32, 63, 64, 66 або 67. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид містить поліпептид, що має

щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 96 %, щонайменше близько 97 %, щонайменше близько 98 % або щонайменше близько 99 % ідентичності послідовності SEQ ID №:27-32 або 62-67. Таким чином, у деяких варіантах реалізації винаходу поліпептиди містять (а) поліпептид, що має щонайменше близько 95 % ідентичності послідовності SEQ ID №:27, 29, 31, 62 або 65, та/або (b) поліпептид, що має щонайменше близько 95 % ідентичності послідовності SEQ ID №:28, 30, 32, 63, 64, 66 або 67. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид містить (а) поліпептид, що має амінокислотну послідовність SEQ ID №:27, 29, 31, 62 або 65, та/або (b) поліпептид, що має амінокислотну послідовність SEQ ID №:28, 30, 32, 63, 64, 66 або 67. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид являє собою антитіло та/або поліпептид, специфічно зв'язуючий FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид є мишачим, химерним або гуманізованим антитілом, яке специфічно зв'язує FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, що має визначений відсоток ідентичності послідовностей SEQ ID №:27-32 або 62-67, відрізняється від SEQ ID №:27-32 або 62-67 лише консервативними амінокислотними замінами.

[0207] Запропоновані також поліпептиди, які містять варіабельний легкий ланцюг, який щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичний варіабельній послідовності легкого ланцюга антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120196 або РТА-120197.

[0208] Запропоновані також поліпептиди, які містять варіабельний важкий ланцюг, який щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичний варіабельній послідовності важкого ланцюга антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120196 або РТА-120197.

[0209] Запропоновані також антитіла та їх антигензв'язуючі фрагменти, які містять послідовності варіабельного важкого та варіабельного легкого ланцюга, які щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичні послідовностям варіабельного важкого та варіабельного легкого ланцюга антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120196 або РТА-120197.

[0210] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або антигензв'язуючий фрагмент являє собою антитіло, отримане з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120196, або його антигензв'язуючий фрагмент.

[0211] У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло або антигензв'язуючий фрагмент являє собою антитіло, отримане з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120197, або його антигензв'язуючий фрагмент.

[0212] Поліпептиди можуть містити один з індивідуальних легких ланцюгів або важких ланцюгів, описаних у цьому документі. Антитіла та поліпептиди також можуть містити як легкий ланцюг, так і важкий ланцюг. Послідовності легкого ланцюга та важкого ланцюга антитіл 2.1, 5.7 і 9.20 представлені нижче в табл. 5 і 6.

Повнорозмірні амінокислотні послідовності важких ланцюгів

Антитіло	Повнорозмірна амінокислотна послідовність важкого ланцюга (SEQ ID №)
muFRIHC2-1 ("2.1")	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYIHWVVKRPGQGLEWIGWIYPESL NTQYNEKFKAKATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGIYYSPYALDHW GQGASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDD VEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS KTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYK NTQPIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID №:33)
muFRIHC5-7 ("5.7")	QVQLQQSGPEVVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKRPGQGLEWIGWIYPGS FNVEYNEKFKAKATLTADKSSSTVYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGIYFSPYALDY WGQGASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNS GSLSSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVP RDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFV DDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEK TISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN YKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSP GK (SEQ ID №:35)
muFRIHC9-20 ("9.20")	QVQLQQSGPDLVKPGASVRISCKASGFTFTNYYIHWVKRPGQGLEWIGWIYPEN VNVRYNDKFKAKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGIYYSPYAMDY WGQGASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSG SLSSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDV EVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK KGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQ PIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID №:37)
muhuMov19	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYD GDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLESDLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGC KPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEV HTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK KGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKN TQPIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID №:68)

Таблиця 6

Повнорозмірні амінокислотні послідовності легких ланцюгів

Антитіло	Повнорозмірна амінокислотна послідовність легкого ланцюга (SEQ ID №)
muFRIHC2-1 ("2.1")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSSKSLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLV SNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGGGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSW TDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC (SEQ ID №:34)
muFRIHC5-7 ("5.7")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTESLLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIY LVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGGGT KLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQ NGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSF NRNEC (SEQ ID №:36)
muFRIHC9-20 ("9.20")	SDVVLQTPLSLPVNLGDQASISCKSTKSLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLI YLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGGG TKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQ NGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSF NRNEC (SEQ ID №:38)
muhuMov19	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQSPQLLIYR ASNLEAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISPVEAEDAATYYCQSQREYPYTFGGGTK LEIKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC (SEQ ID №:69)

[0213] Запропоновані також поліпептиди, які містять: (а) поліпептид, що має щонайменше близько 90 % ідентичності послідовності SEQ ID №:33, 35 або 37, та/або (b) поліпептид, що має щонайменше близько 90 % ідентичності послідовності SEQ ID №:34, 36 або 38. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид містить поліпептид, що має щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 96 %, щонайменше близько 97 %, щонайменше близько 98 %, або щонайменше близько 99 % ідентичності послідовності SEQ ID №:33-38. Таким чином, у деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид містить (а) поліпептид, що має щонайменше близько 95 % ідентичності послідовності SEQ ID №:33, 35 або 37, та/або (b) поліпептид, що має щонайменше близько 95 % ідентичності послідовності SEQ ID №:34, 36 або 38. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид містить (а) поліпептид, що має амінокислотну послідовність SEQ ID №:33, 35 або 37, та/або (b) поліпептид, що має амінокислотну послідовність SEQ ID №:34, 36 або 38. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид являє собою антитіло та/або поліпептид, специфічно зв'язуючий FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид є мишачим, химерним або гуманізованим антитілом, яке специфічно зв'язує FOLR1. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, що має визначений відсоток ідентичності послідовностей SEQ ID №:33-38, відрізняється від SEQ ID №:33-38 лише консервативними амінокислотними замінами.

[0214] Запропоновані також поліпептиди, які містять легкий ланцюг, який щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичний послідовності легкого ланцюга антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування PTA-120196 або PTA-120197.

[0215] Запропоновані також поліпептиди, які містять важкий ланцюг, який щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичний послідовності важкого ланцюга антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування PTA-120196 або PTA-120197.

[0216] Запропоновані також антитіла та їх антигензв'язуючі фрагменти, які містять послідовності важкого та легкого ланцюга, які щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичні послідовностям важкого та легкого ланцюга антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування PTA-120196 або PTA-120197.

[0217] Афі́нність або аві́дність антитіла до антигену може визначатися експериментально, використовуючи будь-який підходящий добре відомий в цій галузі техніки метод, наприклад, проточну цитометрію, твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА), або радіоімуний аналіз (РІА), або кінетичний аналіз (наприклад, аналіз BIAcore™). Можуть легко застосовуватися
 5 аналізи з прямим зв'язуванням, а також формати аналізу з конкурентним зв'язуванням. (Див., наприклад, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", в Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992) та способи, описані у цьому документі. Виміряна афі́нність конкретної взаємодії антитіло-антиген може змінюватися при вимірюванні в різних умовах
 10 (наприклад, концентрація солей, pH, температура). Таким чином, вимірювання афі́нності та інших параметрів зв'язування антигенів (наприклад, KD або Kd, Kon, Koff) проводяться зі стандартизованими розчинами антитіла й антигену та стандартизованим буферним розчином, як відомо в цій галузі техніки, і таким буферним розчином як описаний у цьому документі.

[0218] В одному аспекті винаходу, аналізи зв'язування можуть виконуватися з
 15 використанням проточної цитометрії на клітинах, експресуючих на поверхні антиген FOLR1. Наприклад, FOLR1-позитивні клітини, такі як SKOV3, можуть інкубуватися з різними концентраціями анти-FOLR1 антитіл з використанням 1×10^5 клітин на зразок в 100 мкл буферного розчину для FACS (середовище RPMI-1640 з 2 % добавкою нормальної сироватки козла). Потім, клітини можуть осаджуватися, промиватися та інкубуватися протягом 1 год. зі 100
 20 мкл FITC-кон'югованого антитіла козла проти антитіла миші або антитіла козла проти IgG-антитіла людини (такого як отримуване, наприклад, від компанії Jackson Laboratory, 6 мкг/мл в буферному розчині для FACS). Потім клітини осаджують знову, промивають буферним розчином для FACS та ресуспендують в 200 мкл PBS, що містить 1 % формальдегід. Зразки можуть бути отримані, наприклад, з використанням проточного цитометра FACSCalibur з
 25 багатолуночним саплером HTS та проаналізовані з використанням CellQuest Pro (все обладнання від компанії BD Biosciences, м. Сан-Дієго, США). Для кожного зразка може експортуватися середня інтенсивність флуоресценції (СІФ) для FL1 та будуватися залежність проти концентрації антитіла на напівлогарифмічному графіку для створення кривої зв'язування. Підбирається сигмоїдальна крива доза-відповідь для кривих зв'язування та розраховують
 30 значення EC50 з використанням таких програм як GraphPad Prism v4 з параметрами за замовчуванням (програмне забезпечення GraphPad, м. Сан-Дієго, Каліфорнія). Значення EC50 можуть використовуватися в якості показника уявної константи дисоціації "Kd" або "KD" для кожного антитіла.

[0219] Моноклональні антитіла можуть отримувати з використанням гібридомних способів, таких як описані Kohler та Milstein (1975) Nature 256:495. Мишу, хом'яка або іншу підходящу
 35 тварину-хазяїна імунізують, використовуючи гібридомний спосіб, щоб викликати продукцію лімфоцитами антитіл, які будуть специфічно зв'язуватися з імунізуючим антигеном. Лімфоцити також можуть бути імунізовані in vitro. Після імунізації, лімфоцити виділяють та зливають їх з підходящою лінією мієломних клітин з використанням, наприклад, поліетиленгліколю для
 40 утворення гібридомних клітин, які потім можуть бути відібрані від лімфоцитів та мієломних клітин, що не злилися. Гібридами, які продукують моноклональні антитіла, специфічно направлені проти вибраного антигену, як визначено методом імунопреципітації, імуноблотингу або аналізом зв'язування in vitro (наприклад, радіоімуноаналізом (РІА), твердофазним імуоферментним аналізом (ІФА)), потім можуть бути розмножені або культивуванням in vitro з
 45 використанням стандартних методів (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) або in vivo у вигляді асцитних пухлин у тварин. Моноклональні антитіла потім можуть бути очищені від культурального середовища або асцитної рідини як описано для поліклональних антитіл.

[0220] Альтернативно, моноклональні антитіла також можуть бути отримані, використовуючи
 50 способи рекомбінантних ДНК як описано в патенті США 4816567. Полінуклеотиди, кодуєчі моноклональне антитіло, виділяють із зрілих В-клітин або гібридомних клітин, таким методом як ОТ-ПЦР з використанням олігонуклеотидних праймерів, які специфічно ампліфікують гени, кодуєчі важкий та легкий ланцюги антитіла, а їх послідовності визначають з використанням традиційних процедур. Виділені полінуклеотиди, кодуєчі важкий та легкий ланцюги, потім
 55 клонують у підходящі експресійні вектори, які потім трансфекують в клітини-хазяї, такі як клітини E. coli, мавп'ячі клітини COS, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO) або мієломні клітини, які в інших випадках не продукують імуноглобуліновий білок, і клітинами-хазяями синтезуються моноклональні антитіла. Також, рекомбінантні моноклональні антитіла або їх фрагменти потрібного біологічного виду можуть бути виділені з бібліотек фагових дисплеїв, що
 60 експресують CDR потрібного біологічного виду, як описано (McCafferty et al., 1990, Nature,

348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628 та Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[0221] Полінуклеотид(и), кодуєчий моноклональне антитіло може додатково модифікуватися кількома різними шляхами з використанням технології рекомбінантних ДНК для створення альтернативних антитіл. У деяких варіантах реалізації винаходу константні домени легкого та важкого ланцюгів, наприклад, моноклональне антитіло миші, можуть бути заміщені 1) за такими ділянками, наприклад, антитілом людини для створення химерного антитіла або 2) неімуноглобуліновим поліпептидом для створення антитіла злиття. У деяких варіантах реалізації винаходу константні ділянки усічені або видалені для створення потрібного антитільного фрагмента моноклонального антитіла. Для оптимізації специфічності, афінності і т.д. моноклонального антитіла може застосовуватися сайт-направлений мутагенез або мутагенез високої щільності для варіабельної ділянки.

[0222] У деяких варіантах реалізації винаходу моноклональне антитіло проти FOLR1 людини являє собою гуманізоване антитіло. У деяких варіантах реалізації винаходу такі антитіла застосовують з терапевтичною метою для зменшення антигенності та реакцій НАМА (появи антитіл людини проти антитіл миші) при введенні суб'єкту-людині.

[0223] Способи інженерії, гуманізації або зміни поверхні нелюдських або людських антитіл також можуть використовуватися та вони добре відомі в цій галузі техніки. Гуманізоване антитіло, антитіло зі зміненою поверхнею або подібним чином сконструйоване антитіло може мати один або більше амінокислотних залишків з джерела, яке являє собою нелюдський організм, наприклад, але не обмежено, миші, щура, кролика, примата крім людини або іншого ссавця. Ці амінокислотні залишки нелюдських організмів замінюються залишками, що часто називаються "імпортованими" залишками, які як правило взяті з "імпортованого" варіабельного, константного або іншого домену відомої послідовності людини.

[0224] Такі імпортовані послідовності можуть застосовуватися для зниження імуногенності або зниження, посилення або модифікації зв'язування, афінності, швидкості асоціації, швидкості дисоціації, авідності, специфічності, періоду напіввиведення або будь-якої іншої підходящої характеристики, як відомо в цій галузі техніки. Загалом, залишки CDR безпосередньо і практично у своїй більшості залучені до прояву впливу на зв'язування FOLR1. Відповідно, зберігається частина або всі з нелюдських або людських послідовностей CDR, тоді як нелюдські послідовності варіабельних та константних ділянок можуть замінюватися людськими або іншими послідовностями амінокислот.

[0225] Антитіла також можуть необов'язково бути гуманізованими, зі зміненою поверхнею, сконструйованими або бути антитілами людини, сконструйованими зі збереженням високої афінності до антигену FOLR1 та іншими корисними біологічними властивостями. Для досягнення цієї мети гуманізовані (або людські) або сконструйовані анти-FOLR1 антитіла та антитіла зі зміненою поверхнею можуть необов'язково бути отримані у процесі аналізу вихідних послідовностей та різних концептуальних гуманізованих та сконструйованих продуктів з використанням тримірних моделей вихідних, сконструйованих та гуманізованих послідовностей. Тримірні моделі імуноглобулінів повсюдно доступні та знайомі спеціалістам в цій галузі техніки. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють та зображують ймовірні тримірні конформаційні структури вибраних ймовірних імуноглобулінових послідовностей. Перевірка цих зображень дозволяє провести аналіз ймовірної ролі залишків у функціонуванні імуноглобулінової послідовності-кандидата, тобто аналіз залишків, які впливають на здатність імуноглобуліну-кандидата зв'язувати свій антиген, такий як FOLR1. Таким шляхом можуть бути відібрані каркасні залишки (FR) та скомбіновані консенсусна і імпортована послідовності таким чином, щоб досягти потрібну характеристику антитіла, таку як збільшена афінність до цільового антигену(iv).

[0226] Гуманізація, зміна поверхні або інжиніринг антитіл за даним винаходом може виконуватися з використанням будь-яких відомих способів, таких як, але не обмежених описаними у публікаціях Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia та Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), патентах США № 5639641, 5723323; 5976862; 5824514; 5817483; 5814476; 5763192; 5723323; 5766886; 5714352; 6204023; 6180370; 5693762; 5530101; 5585089; 5225539; 4816567; PCT/: US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; EP 229246; 7557189; 7538195 та 7342110, кожний з яких включений до цього документа у повному обсязі як посилання, включаючи згадані тут посилання.

[0227] У деяких альтернативних варіантах реалізації винаходу антитіло до FOLR1 являє

собою антитіло людини. Антитіла людини можуть бути безпосередньо отримані з використанням різних методик, відомих в цій галузі техніки. Можуть бути отримані іморталізовані В-лімфоцити, імунізовані *in vitro* або виділені з імунізованого індивіда, які продукують антитіло, направлене проти цільового антигену (див., наприклад, статті Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95 та патент США 5750373). Також, антитіло людини може бути вибране з фагової бібліотеки, якщо ця фагова бібліотека експресує антитіла людини, як описано, наприклад, в Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom та Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381 та Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Методики для створення та використання фагових бібліотек антитіл описані також в патентах США № 5969108, 6172197, 5885793, 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081; 6300064; 6653068; 6706484 і 7264963 та статті Rothe et al., 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018 (кожний з яких включений у повному обсязі як посилання). Принципи визрівання афінності та принципи перестановки ланцюгів (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783, включена у повному обсязі як посилання) відомі в цій галузі техніки та можуть застосовуватися для створення високоафінних антитіл людини.

[0228] Гуманізовані антитіла також можуть бути отримані на трансгенних мишах, які містять імуноглобулінові локуси людини, що здатні при імунізації продукувати повний репертуар антитіл людини при відсутності ендогенної продукції імуноглобулінів. Цей підхід описаний в патентах США 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 і 5661016.

[0229] У деяких варіантах реалізації винаходу запропонований фрагмент антитіла, наприклад, для збільшення пенетрації до пухлини. Щодо продукції фрагментів антитіл відомі різні методики. Традиційно вважається, що ці фрагменти є похідними при протеолітичному розщепленні інтактних антитіл (наприклад, Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229:81). У деяких варіантах реалізації винаходу фрагменти антитіл отримують рекомбінантним способом. Всі фрагменти антитіл Fab, Fv та scFv можуть експресуватися та секретуватися *E. coli* або іншими клітинами-хазяями, таким чином дозволяючи продукувати великі кількості цих фрагментів. Такі фрагменти антитіл також можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл. Фрагмент антитіла також може бути лінійним антитілом, як описано в патенті США 5641870, наприклад, та може бути моноспецифічним або біспецифічним. Інші методики для продукції фрагментів антитіл будуть очевидними кваліфікованому практику.

[0230] Для цілей цього винаходу слід враховувати, що модифіковані антитіла можуть містити будь-який тип варіабельної ділянки, яка забезпечує асоціацію антитіла з поліпептидами FOLR1 людини. У цьому зв'язку, варіабельна ділянка може включати або походити від будь-якого типу антитіла ссавця, яке може індукуватися для підготовки гуморальної відповіді та синтезу імуноглобулінів проти потрібного асоційованого з пухлиною антигену. По суті, варіабельна ділянка модифікованих антитіл може, наприклад, походити з організму людини, миші, примата крім людини (наприклад, яванських мавп, макак і т.д.) або вовка. У деяких варіантах реалізації винаходу як варіабельні, так і константні ділянки модифікованих імуноглобулінів є людськими. В інших варіантах реалізації винаходу варіабельні ділянки сумісних антитіл (що звичайно походять з нелюдського джерела) можуть бути сконструйованими або спеціально розробленими для покращення властивостей зв'язування або зменшення імуногенності молекул. У зв'язку з цим, варіабельні ділянки, придатні для цього винаходу, можуть бути гуманізовані або іншим чином змінені за допомогою включення імпортованих амінокислотних послідовностей.

[0231] У деяких варіантах реалізації винаходу варіабельні домени в обох важкому та легкому ланцюгах змінюються шляхом щонайменше часткової заміни одного або більше CDR та, за необхідністю, шляхом часткової заміни каркасних ділянок та зміни послідовностей. Хоча CDR можуть походити з антитіла того ж класу або навіть підкласу, що й антитіло, з якого походять каркасні ділянки, передбачається, що CDR будуть походити і з антитіла іншого класу, та у деяких варіантах реалізації винаходу – з антитіла з іншого біологічного виду. Може бути не потрібною заміна всіх CDR повними CDR з донорської варіабельної ділянки для переносу антигензв'язуючої здатності з однієї варіабельної ділянки до іншої. Скоріше, може бути необхідним лише перенести ті залишки, які необхідні для підтримання активності антигензв'язуючого сайту. Дані пояснення викладені в пат. США № 5585089, 5693761 і 5693762, вони будуть знаходитися у межах компетенції спеціаліста в цій галузі техніки, як відносно проведення рутинного експерименту, так і перевірки методом проб і помилок для отримання функціонального антитіла зі зменшеною імуногенністю.

[0232] Зміни варіабельної ділянки, не дивлячись на те, що спеціалісти в цій галузі техніки

розуміють, що модифіковані антитіла за цим винаходом будуть включати антитіла (наприклад, повнорозмірні антитіла або їх імунореактивні фрагменти), в яких щонайменше фракція одного або більше доменів константних ділянок видалені або іншим чином змінені так, щоб забезпечити отримання потрібних біохімічних властивостей, таких як збільшена локалізація в пухлині або зменшений період напіввиведення з сироватки у порівнянні з антитілом приблизно такої ж імуногенності, що містить нативну або незмінену константну ділянку. У деяких варіантах реалізації винаходу константна ділянка модифікованих антитіл буде містити константну ділянку людини. Модифікації константної ділянки, сумісні з цим винаходом, включають добавлення, делеції або заміни однієї або більше амінокислот в одному або більше доменів. Тобто, модифіковані антитіла, описані у цьому документі, можуть містити зміни або модифікації в одному або більше з трьох константних доменів важкого ланцюга (CH1, CH2 або CH3) та/або в константному домені легкого ланцюга (CL). У деяких варіантах реалізації винаходу передбачаються модифіковані константні ділянки, в яких один або більше доменів частково або повністю видалені. У деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані антитіла будуть містити конструкції з видаленими доменами або варіанти, в яких видалений цілий домен CH2 (конструкції Δ CH2). У деяких варіантах реалізації винаходу пропущений домен константної ділянки буде замінений коротким амінокислотним спейсером (наприклад, з 10 залишків), який забезпечує деяку молекулярну гнучкість, яка, як правило, надається відсутньою константною ділянкою.

[0233] Необхідно відмітити, що у деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані антитіла можуть бути сконструйовані для злиття домену CH3 безпосередньо з шарнірною ділянкою відповідних модифікованих антитіл. В інших конструкціях може бути потрібним ввести пептидний спейсер між шарнірною ділянкою та модифікованими доменами CH2 та/або CH3. Наприклад, можуть експресуватися сумісні конструкції, в яких домен CH2 видалений, а домен CH3 (модифікований або немодифікований), що залишився, приєднаний до шарнірної ділянки спейсером з 5-20 амінокислот. Такий спейсер може додаватися, наприклад, для забезпечення того, щоб регуляторні елементи константного домену залишалися вільними та доступними або щоб шарнірна ділянка залишалася гнучкою. Однак, слід відмітити, що амінокислотні спейсери можуть, у деяких випадках, виявитися імуногенними та викликати небажану імунну відповідь проти конструкції. Відповідно, у деяких варіантах реалізації винаходу будь-який спейсер, доцільний до конструкції, буде відносно неімуногенним або навіть повністю пропущеним для того, щоб забезпечити отримання потрібних біохімічних характеристик модифікованих антитіл.

[0234] Крім делеції цілих доменів константних ділянок, слід враховувати, що антитіла за даним винаходом можуть бути наділені частковою делецією або заміною кількох або навіть єдиної амінокислоти. Наприклад, мутація єдиної амінокислоти у вибраних областях домену CH2 може бути достатньою для значного зменшення зв'язування Fc і, внаслідок цього, збільшення локалізації в пухлині. Подібним чином, може бути потрібним просто видалити ту частину одного або більше доменів константної ділянки, яка контролює ефекторну функцію (наприклад, зв'язування комплементу C1q), яка потребує модуляції. Такі часткові делеції константних ділянок можуть покращити вибрані характеристики антитіла (період напіввиведення з сироватки), в то ж час зберігаючи інші потрібні функції, зв'язані з інтактним доменом константної ділянки суб'єкта. Більш того, як згадується вище, константні ділянки описаних антитіл можуть модифікуватися за допомогою мутації або заміни однієї або більше амінокислот, що посилює профіль результуючої конструкції. В цьому зв'язку, може існувати можливість зруйнувати активність, яка забезпечується збереженням сайтом зв'язування (наприклад, Fc-зв'язування), при практично повному забезпеченні конфігурації імуногенного профілю модифікованого антитіла. Деякі варіанти реалізації винаходу можуть включати добавлення до константної ділянки однієї або більше амінокислот для посилення потрібних характеристик, таких як зменшення або збільшення ефекторної функції або забезпечення більшого приєднання цитотоксину або вуглеводу. У таких варіантах реалізації винаходу може бути потрібною вставка або реплікація специфічних послідовностей, що походять з вибраних доменів константних ділянок.

[0235] цей винахід додатково охоплює варіанти та еквіваленти, які є практично гомологічними химерним, гуманізованим та людським антитілам або їх антитільним фрагментам, викладеним у цьому документі. Вони можуть містити, наприклад, консервативні мутації-заміни, тобто заміни однієї або більше амінокислот подібними амінокислотами. Наприклад, консервативна заміна відноситься до заміни амінокислоти іншою у межах того ж загального класу, такої як, наприклад, одна кислотна амінокислота іншою кислотною амінокислотою, одна основна амінокислота іншою основною амінокислотою або одна нейтральна амінокислота іншою нейтральною амінокислотою. Те, що розуміється під

консервативною амінокислотною заміною добре відомо в цій галузі техніки.

[0236] Поліпептиди за даним винаходом можуть бути рекомбінантними поліпептидами, природними поліпептидами або синтетичними поліпептидами, що містять антитіло або його фрагмент проти FOLR1 людини. В цій галузі техніки слід визнати, що деякі амінокислотні послідовності за даним винаходом можуть бути змінені без значимого впливу на структуру та функцію білка. Таким чином, винахід додатково включає варіації поліпептидів, які показують значну активність або які включають ділянки антитіла або його фрагмента проти рецепторного білка фолієвої кислоти людини. Такі мутанти включають делеції, інсерції, інверсії, повтори і типові заміни.

[0237] Поліпептиди та аналоги можуть бути додатково модифіковані для того, щоб містити додаткові хімічні фрагменти, що звичайно не є частиною білка. Такі дериватизовані фрагменти можуть покращувати розчинність, біологічний період напіввиведення або абсорбцію білка. Фрагменти також можуть зменшувати або виключати будь-які потрібні побічні ефекти білків і тому подібне. Огляд таких фрагментів може бути знайдений у книзі REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

[0238] Виділені поліпептиди, описані у цьому документі, можуть бути отримані будь-яким підходящим способом, відомим в цій галузі техніки. Такі способи знаходяться в діапазоні від прямих білкових синтетичних способів до конструювання послідовності ДНК, що кодує послідовності виділених поліпептидів, та експресії цих послідовностей у підходящому трансформованому хазяїні. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність ДНК конструюють з використанням рекомбінантної технології виділенням або синтезом послідовності ДНК, що кодує білок дикого типу, який представляє інтерес. Необов'язково, послідовність може пройти мутагенез шляхом сайт-специфічного мутагенезу для отримання своїх функціональних аналогів. Див., наприклад, Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) та пат. США № 4588585.

[0239] У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність ДНК, кодує поліпептид, який представляє інтерес, може бути сконструйована методом хімічного синтезу з використанням олігонуклеотидного синтезатора. Такі олігонуклеотиди можуть бути розроблені на основі амінокислотної послідовності потрібного поліпептиду та відбору таких кодонів, які сприятливі для синтезу в клітині-хазяїні, в якій буде продукуватися рекомбінантний поліпептид, що представляє інтерес. Для синтезу виділеної поліпептидної послідовності, яка кодує виділений поліпептид, що представляє інтерес, можуть застосовуватися стандартні способи. Наприклад, для конструювання зворотно-трансльованого гена може застосовуватися повна амінокислотна послідовність. Додатково, може бути синтезований ДНК-олігомер, що містить нуклеотидну послідовність, кодує конкретний виділений поліпептид. Наприклад, можуть бути синтезовані та потім лігвані кілька малих олігонуклеотидів, кодує частини потрібного поліпептиду. Індивідуальні олігонуклеотиди, як правило, містять 5'- або 3'-виступи для комплементарної збірки.

[0240] Відразу після збірки (синтезом, сайт-направленим мутагенезом або іншим способом) поліпептидні послідовності, кодує конкретний виділений поліпептид, що представляє інтерес, будуть вставлені в експресійний вектор та функціонально зв'язані з послідовністю, яка контролює експресію, підходящою для експресії білка у потрібному хазяїні. Правильна збірка може підтверджуватися нуклеотидним секвенуванням, рестрикційним картуванням та експресією біологічно активного поліпептиду у відповідному хазяїні. Як добре відомо в цій галузі техніки, для того, щоб отримати високі рівні експресії трансфегованого гена в хазяїні, ген повинен бути функціонально зв'язаним з транскрипційними та трансляційними послідовностями, що контролюють експресію, які функціональні у вибраному експресійному хазяїні.

[0241] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантні експресійні вектори застосовуються для ампліфікації та експресії ДНК, що кодує антитіла або їх фрагменти проти FOLR1 людини. Рекомбінантні експресійні вектори є ДНК-конструкціями, що реплікуються, які мають синтетичні або отримані з кДНК фрагменти ДНК, кодує поліпептидний ланцюг анти-FOLR1 антитіла або його фрагмента, функціонально зв'язані з підходящими транскрипційними або трансляційними регуляторними елементами, отриманими з генів ссавців, мікроорганізмів, вірусів або комах. Транскрипційна одиниця звичайно містить збірку з (1) генетичного елемента або елементів, які мають регуляторну роль для генної експресії, наприклад, транскрипційних промоторів або енхансерів, (2) структурної або кодує послідовності, яка транскрибується в мРНК і транлюється у білок, та (3) відповідні послідовності ініціювання і термінації транскрипції і трансляції. Такі регуляторні елементи можуть включати послідовність оператора для контролю транскрипції. Для полегшення розпізнавання трансформантів додатково може вводитися

здатність до реплікації в організмі хазяїна, що звичайно надається точкою початку реплікації, та ген селекції. Ділянки ДНК функціонально зв'язані, коли вони є функціонально відповідними одна іншій. Наприклад, ДНК сигнального пептиду (секреторний лідер) функціонально зв'язана з ДНК поліпептиду, якщо вона експресується як попередник, який приймає участь в секреції поліпептиду; промотор функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він контролює транскрипцію послідовності, або сайт зв'язування рибосоми функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він розташований так, щоб забезпечувати трансляцію. Структурні елементи, які передбачаються для використання в дріжджових системах експресії, включають лідерну послідовність, здатну до позаклітинної секреції клітиною-хазяїном білка, що транслюється. Альтернативно, коли рекомбінантний білок експресується без лідерної або транспортної послідовності, то він включає N-кінцевий залишок метіоніну. Цей залишок необов'язково може згодом відщеплюватися від експресованого рекомбінантного білка для отримання кінцевого продукту.

[0242] Вибір послідовності контролю експресії та експресійного вектора буде залежати від вибору хазяїна. Може використовуватися велике різноманіття комбінацій хазяїв/векторів. Придатні експресійні вектори для еукаріотичних хазяїв, включають, наприклад, вектори, які містять послідовності контролю експресії з SV40, вірусу папіломи бика, аденовірусу та цитомегаловірусу. Придатні експресійні вектори для бактеріальних хазяїв, включають відомі бактеріальні плазмиди, такі як плазмиди з *Escherichia coli*, включаючи pCR 1, pBR322, pMB9 та їх прохідні, більш широкий діапазон хазяїв плазмід, таких як M13 і нитчастих фагів з одноланцюговою ДНК.

[0243] Підходящі клітини-хазяї для експресії FOLR1-зв'язуючого поліпептиду або антитіла (або білка FOLR1 для застосування в якості антигену) включають клітини прокаріот, дріжджів, комах або вищих еукаріот під контролем відповідних промоторів. Прокаріоти включають грамнегативні та грампозитивні організми, наприклад *E. coli* або бацили. Клітини вищих еукаріот включають стабільні лінії клітин, що походять із ссавців. Також можуть застосовуватися безклітинні системи трансляції. Відповідні клонуючі та експресійні вектори для застосування разом з бактеріальними, грибовими, дріжджовими хазяями та клітинами-хазяями ссавців описані в публікації Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), відповідний опис якої тим самим включено як посилання. Додаткова інформація відносно способів продукції білків, включаючи продукцію антитіл, може бути знайдена, наприклад, в патентній публікації США № 2008/0187954, патентах США № 6413746 і 6660501 та міжнародній патентній публікації № WO 04009823, кожна з яких тим самим включена до цього документу в повному обсязі як посилання.

[0244] Різні системи культивування клітин ссавців або комах також переважно застосовуються для експресії рекомбінантного білка. Експресію рекомбінантних білків в клітинах ссавців можуть проводити через те, що такі білки звичайно коректно згортаються, належним чином модифікуються та виходять повністю функціональними. Приклади підходящих ліній клітин-хазяїв ссавців включають HEK-293 і HEK-293T, лінії COS-7 клітин нирки мавпи, описані автором Gluzman (Cell 23:175, 1981), та інші лінії клітин, що включають, наприклад, L-клітини, лінії клітин C127, 3T3, яєчника китайського хом'яка (CHO), HeLa і BHK. Експресійні вектори ссавців можуть містити елементи, що не транскрибуються, такі як точка початку реплікації, підходящий промотор і енхансер, зв'язані з геном, який потрібно експресувати, і інші 5'- або 3'-фланкуючі послідовності, які не транскрибуються, та 5'- або 3'-послідовності, що не транслюються, такі як необхідні сайти зв'язування рибосом, сайт поліаденілювання, донорський і акцепторний сайти сплайсингу та транскрипційні послідовності термінації. Бакуловирусні системи для продукції гетерологічних білків в клітинах комах представлені в огляді Luckow та Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

[0245] Білки, що продукуються трансформованим хазяїном, можуть очищуватися у відповідності з будь-яким підходящим методом. Такі стандартні методи включають хроматографію (наприклад, іонообмінну, афінну і ексклюзійну колонкову хроматографію), центрифугування, диференціальну розчинність або будь-яку іншу стандартну методику для очищення білка. Афінні маркери, такі як гексагістидин, мальтозозв'язуючий домен, послідовність білка оболонки вірусу грипу та глутатіон-S-трансфераза, можуть приєднуватися до білка для забезпечення легкого очищення пропусканням через підходящу афінну колонку. Виділені білки також можуть бути охарактеризовані фізичними методами, використовуючи такі методики як протеоліз, ядерний магнітний резонанс та рентгенівську кристалографію.

[0246] Наприклад, супернатанти з систем, які секретують рекомбінантний білок до культурального середовища, спочатку можуть бути сконцентровані з використанням комерційно доступного фільтра для концентрування білків, наприклад, установки для ультрафільтрації

Amicon або Millipore Pellicon. Після стадії концентрування концентрат може подаватися на підходящу матрицю для очищення. Альтернативно, може застосовуватися смола для аніонного обміну, наприклад, матриця або субстрат, що має виступаючі діетиламіноетильні (ДЕАЕ) групи. Матриці можуть бути представлені акриламідом, агарозою, декстраном, целюлозою та іншими типами, що звичайно застосовуються для очищення білків. Альтернативно, може застосовуватися стадія катіонного обміну. Підходящі катіонообмінники включають різні нерозчинні матриці, які містять сульфопропільні або карбоксиметильні групи. Нарешті, для подальшого очищення FOLR1-зв'язуючого агенту можуть застосовуватися одна або більше стадій обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ОФ-ВЕРХ), що використовує ОФ-ВЕРХ середовище, таке як силікагель, що має виступаючі метильні або інші аліфатичні групи. Деякі або всі з вищевикладених стадій очищення, в різних комбінаціях, також можуть застосовуватися для отримання гомогенного рекомбінантного білка.

[0247] Рекомбінантний білок, що продукується до бактеріальної культури, може виділятися, наприклад, початковою екстракцією з осадів клітин, з наступною однією або більше стадій концентрування, висолювання, водного іонного обміну або ексклюзійної хроматографії. На кінцевих стадіях очищення може застосовуватися високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Мікробні клітини, що застосовуються для експресії рекомбінантного білка можуть руйнуватися будь-яким зручним способом, включаючи цикли заморожування-відтаювання, обробку ультразвуком, механічне руйнування або використання агентів для лізування клітин.

[0248] Способи, відомі в цій галузі техніки, для очистки антитіл та інших білків також включають, наприклад, описані в патентних публікаціях США № 2008/0312425, 2008/0177048 і 2009/0187005, кожна з яких тим самим включена до цього документу в повному обсязі як посилання.

III. Полінуклеотиди.

[0249] У деяких варіантах реалізації винахід охоплює полінуклеотиди, які містять полінуклеотиди, які кодують поліпептид, що специфічно зв'язує FOLR1-рецептор людини або фрагмент такого поліпептиду. Наприклад, у винаході запропонований полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіло до FOLR1 людини або кодує фрагмент такого антитіла. Полінуклеотиди за даним винаходом можуть знаходитися у формі РНК або у формі ДНК. ДНК включає кДНК, геномну ДНК і синтетичну ДНК та може бути дволанцюговою або одноланцюговою та, у випадку одноланцюгової, може бути кодучим ланцюгом або некодуючим (антисмисловим) ланцюгом. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид являє собою кДНК або ДНК з відсутністю одного або більше ендегенних інтронів.

[0250] У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид являє собою полінуклеотид, що не зустрічається у природі. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид отриманий рекомбінантним способом.

[0251] У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотиди є виділеними. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотиди є практично чистими. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотид очищають від природних компонентів.

[0252] У винаході запропонований полінуклеотид, що містить полінуклеотид, кодуючий поліпептид, що містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID №:3-38 і 59-67. Запропонований також полінуклеотид, кодуючий поліпептид, що має щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 96 %, щонайменше близько 97 %, щонайменше близько 98 % або щонайменше близько 99 % ідентичності послідовностей SEQ ID №:3-38 і 59-67.

[0253] У винаході додатково запропонований полінуклеотид, що містить послідовність, вибрану з показаних нижче в табл. 7 та 8.

Варіабельні полінуклеотидні послідовності важких ланцюгів

Антитіло	Варіабельна полінуклеотидна послідовність важкого ланцюга (SEQ ID №)
muFRIHC2-1 ("2.1")	Caggtccaactgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaggatatcctgcaaggct Tctggctacaccttcacaaactcctatattcactggtgaaaaagaggcctggacagggacttgagtggattgg Atggattatcctgaaagtcttaataactcaatacaatgagaagttcaaggccaaggccacactgactgctgaca Agtctccagcacatcctacatgcagctcagcagctgacacctgaggactctgcggtctatttctgtgcaagaa ggggtatttactactctccctatgctctggaccactggggtcaaggagcctcagtcaccgtctcctca (SEQ ID №:39)
muFRIHC5-7 ("5.7")	Caggtccaactgcagcagctctggacctgaggtggtgaagcctggggcttcagtgaggatatcctgcaag Gcttctggctacaccttcacaaactactatatacactggtgaaagcagaggcctggacagggacttgagt Ggattggatggattatcctggaagtttaattgttgagtacaatgagaagttcaaggccaaggccacactga Ctgagacaaatcctccagcacagctctacatgcaactcagcagcctgacctctgaggactctgcggtcta Tttctgtgcaagaagggtatttatttactctccctatgctttggactactggggtcaaggagcctcagtcac cgtctcctca (SEQ ID №:41)
muFRIHC9-20 ("9.20")	Caggtccaactgcagcagctctggacctgacctggtgaagcctggggcttcagtgaggatatcctgcaag Gcttctggctacaccttcacaaactactatatacactggtgaaagcagaggcctggacagggacttgagt Gattggatggattatcctgaaaatgttaattgttaggtacaatgacaagttcaaggccaaggccacactga Ctgagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacctctgaggactctgcggtct Attctgtgcaagaagggtatttattactactctccctatgctatggactactggggtcaaggagcctcagtc accgtctcctca (SEQ ID №:43)
huFRIHC2-1 (зі зміненою поверхнею)	aagcttgccaccATGGGTTGGAGCTGCATTATCCTTTTCCTTGTGGCTAC AGCTACTGGCGTTCACTCTCAGGTACAATTGGTTCAGTCAGGAGCC GAGGTCGTAAAGCCCGGTGCCAGTGTGAAGATCTCATGCAAGGCAA GCGGTTATACTTTTACAACTCTTACATTCATTGGGTGAAAAAGCGG CCCGGCCAGGGTCTCGAATGGATCGGCTGGATCTACCCAGAAAGT CTGAACACTCAATACAACCAGAAGTTTCAGGGTAAGGCAACTCTCA CTGCCGACAAGAGCTCTAGCACAAGCTATATGCAGTTGTCTAGTTT GACAAGCGAGGATAGCGCAGTTTACTTTTGTGCTCGGCGTGGTATT TATTACTACTCACCTTATGCTCTGGATCACTGGGGACAGGGTGCCT CTGTTACCGTTTCCAGTGCATCCACCaagggtccc (SEQ ID №:70)
huFRIHC2-1 (прищеплене)	aagcttgccaccATGGGCTGGAGCTGCATAATCCTCTTCCTCGTAGCTAC CGCCACTGGGGTGCATTCTCAAGTACAGTTGGTGACGTCCGGAGCT GAAGTCAAGAAGCCAGGGGCTTCTGTTAAGGTGAGCTGTAAGGCTT CCGGATATACCTTCACAAACAGTTATATCCATTGGGTGAGGCAAGCT CCAGGCCAGGGTCTCGAATGGATGGGATGGATCTACCCCGAGAGTC TGAACACCCAGTACAACGAGAAGTTCAAGGCACGTGTGACCATGACA AGAGACACCTCCATCAGTACAGCCTATATGGAATTGAGCCGTCTCAG AAGTGATGATACAGCAGTGTACTACTGCGCCAGGCGGGGCATCTACT ACTACAGCCCATACGCTCTCGACCACTGGGGACAAGGAACACTGGTA ACCGTAAGCTCAGCTTCTACAaagggtccc (SEQ ID №:71)

Варіабельні полінуклеотидні послідовності легких ланцюгів

Антитіло	Варіабельна полінуклеотидна послідовність легкого ланцюга (SEQ ID №)
muFRIHC2-1 ("2.1")	Agtgatgtgttctgacccaaactccactctctctgctgtcaatattggagatcaagcctctatcttgcgaagtct Tctaagagtcttctgaatagtgatggattcacttattggactggtacctgcagaagccaggccagctccacag Ctctaataatattggtttctaatacattttctggagttccagacaggttcagtggtcagtggtcaggaacagatttca Cactcaagatcagcagagtggaggctgaggattgggagttattattgctccagagtaactatcttctctcacgt tcggaggggggaccaagctggaataaaaacgg (SEQ ID №:40)
muFRIHC5-7 ("5.7")	Agtgatgtgttctgacccaaactccactctctctgctgtcaatattggagatcaagcctctatcttgcgaagtc Tactgagagtcttctgaatagtgatggattcacttattggactggtacctgcagaagccaggccagctccaca Gctctaataatattggtttctaatacattttctggagttccagacaggttcagtggtcagtggtcaggaacagatttc Aactcaagatcagcagagtggaggctgaggattgggagttattattgctccagagtaactatcttctctca cggtcggaggggggaccaagctggaagtaaaaacgg (SEQ ID №:42)
muFRIHC9-20 ("9.20")	Agtgatgtgttctgacccaaactccactctctctgctgtcaatattggagatcaagcctctatcttgcgaagtcta Ctaagagtcttctgaatagtgatggattcacttattggactggtacctgcagaagccaggccagctccacagct Cctaataatattggtttctaatacattttctggagttccagacaggttcagtggtcagtggtcaggaacagatttcacc Ctaagatcagcagagtggaggctgaggattgggagttattattgctccagagtaactatcttctctcacgttc ggagggggggaccaagctggaataaaaacgg (SEQ ID №:44)
huFRIHC2-1 v. 1.0 (зі зміненою поверхнею)	gaattcgccaccATGGGTTGGTCATGTATAATACTTTTCCTGGTAGCTACTGC TACTGGTGTGCATTACAGATGTGGTGCTGACTCAGTCACCCTTGTCTCTCC CAGTCAATCTTGGGCAGCCAGCATCTATCAGCTGCCGAAGCAGCAGGTCT CTCCTGAACTCCGATGGCTTTACTTATCTTGACTGGTATCTCCAGAAGCCA GGACAGTCCCCCGGCTGCTCATCTACCTGGTTTCTAATCATTTTGTGGC GTCCCTGACCGCTTCTCTGGGAGTGGAAGTGGGACCGATTTTACACTGAA GATCTCCAGGGTCGAAGCTGAGGACCTTGGGGTTTACTACTGTTTCCAGA GCAACTACCTTCCCTTGACATTCGGCCAGGGAACCAAGCTGGAAATCAA Gcgtacg (SEQ ID №:72)
huFRIHC2-1 v. 1.01 (зі зміненою поверхнею)	gaattcgccaccATGGGTTGGTCTTGTATCATTCTGTTCTTGGTCGCTACTGCC ACAGGAGTTCACTCAGACGTGGTACTCACACAATCTCCCCTTTCCCTGCC TGTGAACCTGGGACAGCCAGCCTCAATCAGTTGCAAGAGCTCTAAATCTC TGCTCAATAGCGATGGCTTTACCTACTTGGATTGGTACCTCCAGAAGCCC GGCCAGTCTCCTCGGCTCCTGATTACCTTGTTCAAATCACTTTTCAGG CGTGCTGACCGGTTCTCCGGATCTGGCTCAGGGACAGACTTCACCTTG AAGATCTCCCGCGTCGAGGCAGAGGATCTCGGCGTGATTACTGTTTCC AAAGTAACTACCTGCCATTGACTTTTGGACAAGGAACCTAACTGGAAATC AAAcgtacg (SEQ ID №:73)
huFRIHC2-1 v. 1.0 (прищеплене)	gaattcgccaccATGGGATGGAGTTGTATTATTCTGTTCTTGGTCGCTACTGCA ACAGGCGTTTCACTCTGACATCGTAATGACCCAGACACCTCTGAGTCTGAG TGCTACTCCCGGCCAGCCCGCCTCTATTTTCATGTCGTAGCTCTCGCTCCC TGCTCAATTCCGACGGTTTTACCTACTTGGACTGGTATCTTCAGAAACCTG GGCAGAGCCCTCAGCTTCTGATCTATCTGGTGTCCAATCACTTCAGTGGC GTCCAGACCGATTTTCCGGAAGCGGAAGCGGAACCGACTTTACCCTGAA GATATCCCGCGTCGAAGCAGAGGACGTGGGCGTGATTATTGCTTTCAAAG CAATTACTTGCCATTGACTTTCCGACAAGGCACAAAACCTGGAGAT TAAGcgtacg (SEQ ID №:74)
huFRIHC2-1 v. 1.01 (прищеплене)	gaattcgccaccATGGGCTGGTCATGCATCATACTGTTCTTGGTGGCTACAG CAACCGGGGTGCACAGCGATATTGTTATGACACAGACACCACTGAGTT TGTCAGTGACCCCCGGCCAGCCAGCCTCTATATCCTGCAAGTCCTCAA AAAGTCTCCTGAATAGCGATGGCTTTACCTACCTCGACTGGTATCTTCA GAAGCCCGGTCAAAGCCCTCAGCTGCTGATATATCTGGTGTCTAACCA TTTTAGCGGAGTCCCCGACCGCTTTTCAGGCTCCGGCAGTGGCACCGA CTTCACCTTAAGATTTCTCGCGTGGAGGCTGAAGATGTAGGGGTCTAC TACTGTTTCCAGTCAAACCTACCTGCCACTGACCTTTGGTCAAGGCACTA AGCTCGAAATTAAGcgtacg (SEQ ID №:75)

[0254] Запропонований також полінуклеотид, що має щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 96 %, щонайменше близько 97 %, щонайменше близько 98 % або щонайменше близько 99 % ідентичності послідовності будь-якої з SEQ ID №:39-44.

[0255] Запропоновані також полінуклеотиди, кодуючі варіабельний легкий ланцюг, який щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичний варіабельній послідовності легкого ланцюга антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120196 або РТА-120197.

[0256] Запропоновані також полінуклеотиди, які містять варіабельну послідовність, кодуючу легкий ланцюг, який щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичний варіабельній послідовності, кодуючій легкий ланцюг, який кодує варіабельний легкий ланцюг антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120196 або РТА-120197.

[0257] Запропоновані також полінуклеотиди, кодуючі варіабельний важкий ланцюг, який щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичний варіабельній послідовності важкого ланцюга антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120196 або РТА-120197.

[0258] Запропоновані також полінуклеотиди, які містять варіабельну послідовність, кодуючу важкий ланцюг, який щонайменше на близько 85 %, щонайменше на близько 90 %, щонайменше на близько 95 % або щонайменше на близько 99 % або повністю ідентичний варіабельній послідовності, кодуючій важкий ланцюг, який кодує варіабельний важкий ланцюг антитіла, отриманого з використанням гібридоми, що має № ATCC депонування РТА-120196 або РТА-120197.

[0259] У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотиди містять кодуючу послідовність зрілого поліпептиду, злитого в одній і тій же рамці зчитування з полінуклеотидом, який сприяє, наприклад, експресії та секреції поліпептиду із клітини-хазяїна (наприклад, лідерна послідовність, яка функціонує як секреторна послідовність для керування транспорту поліпептиду з клітини). Поліпептид, який має лідерну послідовність, являє собою пребілок та може мати лідерну послідовність, розщеплену клітиною-хазяїном з утворенням зрілої форми поліпептиду. Полінуклеотид також може кодувати пробілок, який являє собою зрілий білок плюс додаткові 5'-амінокислотні залишки. Зрілий білок, має пропослідовність, є пробілком та являє собою неактивну форму білка. Як тільки пропослідовність розщеплюється, то залишається активний зрілий білок.

[0260] У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотиди містять кодуючу послідовність зрілого поліпептиду, злитого в одній і тій же рамці зчитування з маркерною послідовністю, яка дозволяє, наприклад, проводити очищення кодованого поліпептиду. Наприклад, маркерна послідовність може бути гексагістидиновим маркером, що постачається вектором рQE-9, для забезпечення очищення зрілого поліпептиду, злитого з маркером, у випадку використання бактеріального хазяїна, або маркерна послідовність може бути гемаглютиніновим (НА) маркером, що походить з білка гемаглютиніну вірусу грипу, коли використовується хазяїн-ссавець (наприклад, клітини COS-7).

[0261] Цей винахід додатково відноситься до варіантів вищевказаних описаних полінуклеотидів, кодуючих, наприклад, фрагменти, аналоги та прохідні.

[0262] Полінуклеотидні варіанти можуть містити зміни в кодуючих ділянках, некодуючих ділянках або обох видах ділянок. У деяких варіантах реалізації винаходу полінуклеотидні варіанти містять зміни, які створюють заміни, добавки або делеції, що мовчать, але не змінюють властивості або види активності кодованого поліпептиду. У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидні варіанти створюються замінами, що мовчать, завдяки виродженості генетичного коду. Полінуклеотидні варіанти можуть продукуватися з різних причин, наприклад, для оптимізації експресії кодонів у конкретному хазяїні (змінюючи кодонів в мРНК людини на ті, які мають перевагу для бактеріального хазяїна, такого як *E. coli*).

[0263] Запропоновані також вектори і клітини, які містять полінуклеотиди, описані у цьому документі.

IV. Біологічні зразки.

[0264] Біологічні зразки часто фіксують фіксатором. Як правило, використовуються альдегідні фіксатори, такі як формалін (формальдегід) та глутаральдегід. Зразки тканин фіксують з використанням методик фіксації, таких як занурення у спирт (Battifora та Kopinski, J.

Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095), що також є підходящими. Зразки, що використовуються, також можуть заливати парафіном. В одному варіанті реалізації винаходу зразки є і фіксованими формаліном і залитими парафіном (ФФЗП). В іншому варіанті реалізації винаходу ФФЗП блок забарвлюють гематоксиліном та еозином перед відбором однієї або більше частин

на аналіз для того, щоб відібрати певну область(і) основного ФФЗП зразка. Способи приготування блоків з тканинами з цих конкретних зразків використовувалися у попередніх ІГХ дослідженнях різних прогностичних факторів та/або добре відомі спеціалістам в цій галузі техніки (див., наприклад, Abbondanzo et al., Am J Clin Pathol. 1990 May;93(5):698-702; Allred et al., Arch Surg. 1990 Jan;125(1):107-13).

[0265] Коротко, будь-який інтактний орган або тканина може бути розрізана на достатньо малі фрагменти та інкубована в різних фіксаторах (наприклад, формаліні, спирті і т.п.) протягом різних періодів часу до тих пір, поки тканина стане "зафіксованою". Зразки можуть бути фактично будь-якою інтактною тканиною, хірургічним шляхом видаленою з організму. Зразки можуть розрізатися до прийнятого малого фрагмента(ів), який підходить для обладнання, що звичайно використовується в гістопатологічних лабораторіях. Розмір відрізаних фрагментів, як правило, знаходиться в діапазоні від кількох міліметрів до кількох сантиметрів. Біологічний зразок також може бути представлений рідкими екстрактами, кров'ю, плазмою, сироваткою, спинномозковою рідиною, лімфатичною рідиною або препаратами селезінки.

V. Кореляції експресії FOLR1 та терапевтична ефективність.

[0266] Кон'югат антитіло-майтанзиноїд (KAM) IMG853 містить FOLR1-зв'язуюче моноклональне антитіло, huMov19 (M9346A), кон'юговане з мایتанзиноїдом, DM4 (N(2')-дезацетил-N2'-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтанзин), приєднаний через сульфо-SPDB (N-сукцинімідил 4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат) лінкер, що розщеплюється. Послідовності антитіла IMG853 (huMov19) представлені нижче як SEQ ID №: 45 і 47, а IMG853 і huMov19 описані в опубл. заявці США № 2012/0009181 (зараз 8557966), яка включена до цього документу в повному обсязі як посилання.

SEQ ID №:45-huMov19 vHC

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPY
DGDFTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDY
WGQGTTTVTVSS

SEQ ID №:46-huMov19 vLCv1.00

DIVLTQSPSLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRAS
NLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTCKLEIKR

SEQ ID №:47-huMov19 vLCv1.60

DIVLTQSPSLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRAS
NLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTCKLEIKR

SEQ ID №:48-huMov19 vLC CDR1

KASQSVSFAGTSLMH

SEQ ID №:49-huMov19 vLC CDR2

RASNLEA

SEQ ID №:50-huMov19 vLC CDR3

QQSREYPYT

SEQ ID №:51-huMov19 vHC CDR1

GYFMN

SEQ ID №:52-huMov19 vHC CDR2 – визначена за Кабатом

RIHPYDGDFTFYNQKFQG

SEQ ID №:53 – huMov19 vHC CDR2 – визначена за Abm

RIHPYDGDFT

SEQ ID №:54-huMov19 vHC CDR3

YDGSRAMDY

SEQ ID №:55 - амінокислотна послідовність huMov19 HC

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGR
IHPYDGDFTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDG
SRAMDYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:56-huMov19 LCv1.00

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLI
YRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFG
GGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

SEQ ID №:57-huMov19 LCv1.60

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLI
YRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF
GGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID №:58 – huMov19 vHC CDR2 – визначена за Кабатом

RIHPYDGDTFYNQNFKD

[0267] У теперішній час IMGN853 знаходиться на клінічних випробуваннях для різних терапевтичних показань, які включають FOLR1-позитивний рак яєчників, недрібноклітинний рак легень, рак ендометрію, рак нирок та інші епітеліальні злоякісні утворення. Ракові захворювання яєчників проявляють найбільшу FOLR1-пенетрантність та вважаються основними показаннями для лікування за допомогою IMGN853 (Antony AC. Ann Rev Nutr 16:501–21 (1996); Yuan Y et al. Hum Pathol 40(10):1453-1460 (2009)). Виміряні рівні FOLR1 у зразках плазми пацієнтів можуть допомогти ідентифікувати популяції пацієнтів, які з більшою часткою ймовірності піддаються лікуванню КАМ.

[0268] У деяких варіантах реалізації у винаході запропонований спосіб ідентифікації суб'єктів, які ймовірно сприятливо піддаються FOLR1-таргетованим протираковим видам терапії, завдяки підвищеним рівням експресії FOLR1, що експресуються у суб'єкта, зокрема з використанням антитіл та їх антигензв'язуючих фрагментів, наведених у цьому документі, які можуть виявляти динамічний діапазон рівнів експресії FOLR1, наприклад, при ІГХ аналізі.

[0269] Оцінка зразків, отриманих від пацієнтів, та кореляція з ефективністю *in vivo* з використанням моделей з ксенотрансплантатами демонструє можливості аналізу експресії для вибору суб'єктів, які з більшою ймовірністю піддаються лікуванню. При ІГХ аналізі отримують показник експресії FOLR1 для пухлинних клітин: від 0 (експресії немає) до 3 (або 3+) (дуже високий рівень експресії). Дані *in vivo* з використанням моделей з ксенотрансплантатами демонструють, що зразки з показниками 2 або 3 (або 3+) за експресією FOLR1 мають підвищену ймовірність піддаватися FOLR1-таргетним протираковим видам терапії у клінічно значимих дозах FOLR1-імунокон'югатів (див. наприклад, попередні заявки США № 61/823 317 і 61/828 586 та міжнародну заявку № PCT/US2014/037911, всі з яких включені до цього документу в повному обсязі як посилання). Таким чином, ідентифікація індивідів, що мають підвищений показник FOLR1, може допомогти ідентифікувати тих індивідів, які можуть відповісти на клінічно значиме дозування. Більш того, експресія більш однорідних рівнів FOLR1 забезпечує кращу кореляцію з терапевтичною дією. Таким чином, однорідність гомогенного забарвлення або комбінація посиленого забарвлення з однорідністю гетерогенного забарвлення може вказати на збільшену експресію FOLR1. Наприклад, показник більше ніж 2 гетеро може використовуватися як критерій відбору пацієнтів для лікування терапевтичним агентом до FOLR1 (див., наприклад, опубліковану заявку США № 2012/0282175, яка включена до цього документу в повному обсязі як посилання).

[0270] Аналіз експресії FOLR1 також ідентифікує пацієнтів, у яких понижені рівні препаратів FOLR1-таргетованої протиракової терапії ("низькодозова терапія") можуть бути ефективними для реалізації протипухлинних відповідей. Як прийнято в цій галузі техніки, сполуки звичайно вводяться в найменшому дозуванні, яке досягає потрібної терапевтичної відповіді. Це особливо важливо для терапевтичних засобів, які викликають клінічні побічні ефекти. Здатність розпізнавання таких суб'єктів з підвищеними рівнями експресії FOLR1 дозволяє провести мінімізацію дозування FOLR1-таргетованого терапевтичного засобу, таким чином, зменшуючи ймовірні побічні ефекти, при збереженні терапевтичної ефективності.

[0271] Відповідно, антитіла та антигензв'язуючі фрагменти, наведені у цьому документі, дають особливі переваги для застосування в таких способах, завдяки тому, що вони здатні виявляти динамічний діапазон рівнів експресії FOLR1, наприклад, при ІГХ аналізі.

VI. Метод аналізу скинутих антигенів.

[0272] Виміряні рівні циркулюючого антигену в зразках плазми пацієнтів (скинутий антиген) можуть допомогти ідентифікувати популяції пацієнтів, які з більшою часткою ймовірності піддаються лікуванню, наприклад, лікуванню кон'югатом антитіло-майтанзиноїд (КАМ).

Повідомлялося, що високі рівні скинутого антигену помітно впливають на фармакокінетику терапевтичних антитіл (Tolcher A. et al. 20th Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics; October 21-24, 2008; Geneva, Switzerland: EORTC-NCI-AACR, p163, №514; Baselga J, et al. J Clin Oncol 14:737-744 (1996)). Ймовірно, рівні скинутого антигену в зразках плазми, отриманих від пацієнтів, будуть варіабельними в залежності від таких факторів як антигенна мішень, симптоми захворювання та проходження захворювання. До теперішнього часу рівні скинутого антигену при симптомах захворювання для застосування анти-FOLR1 імунокон'югата IMGN853 досліджені недостатньо, тоді як кореляція з експресією солідними пухлинами є обмеженою. У той же час повідомлялося про підвищення рівня FOLR1 при аденокарциномах яєчника, виходячи з даних передбачається, що він не підвищений при інших симптомах FOLR1+ пухлин, таких як дрібноклітинна карцинома легень (Mantovani LT, et al. Eur J Cancer 30A(3):363-9 (1994); Basal E, et al. PLoS ONE 4(7): e6292 (2009)). цей метод дозволяє проводити виявлення FOLR1-рецептора у присутності високого рівня фолієвої кислоти з використанням антитіл та їх антигензв'язуючих фрагментів, які запропоновані у цьому документі та здатні виявляти динамічні діапазони скинутого FOLR1. У попередніх визначеннях для розробки методу аналізу використовували Mov19. Оскільки IMGN853 містить Mov19 та в одному варіанті реалізації запропонована таргетна терапія за даним винаходом, життєво важливим є те, щоб методом виявлявся FOLR1 у присутності або відсутності Mov19. У попередніх методах аналізу, в яких використовували Mov19, мають місце конкурентні ефекти та FOLR1 буде виявлятися у значно меншій кількості або не виявлятися у пацієнтів, що отримують лікування IMGN853.

[0273] В одному варіанті реалізації винаходу цей спосіб для виявлення FOLR1 в рідких зразках, отриманих у людей, використовується традиційний формат "сендвіч"-ІФА. В одному варіанті реалізації винаходу в методі застосовується агент для захвату (тобто антитіло) до FOLR1, приєднаний до твердої підложки. В одному варіанті реалізації винаходу тверда підложка являє собою планшет для мікротитрування. Для цього, зразок (асцитні рідини, плазма і т.п.) додають без розведення та проводять виявлення іншим агентом для виявлення (інше антитіло), яке не перешкоджає зв'язуванню першого агенту для захвату. Потім агент для виявлення виявляють за допомогою використання вторинного агенту для виявлення (біотин/стрептавідин, антилюдське вторинне моно- або поліклональне антитіло і т.п.), яке може зв'язуватися більше одного разу з першим агентом для виявлення, таким чином, посилюючи виявлення сигналу. Потім вторинний агент для виявлення кількісно визначають використанням деяких інших методів (наприклад, з ТМБ/пероксидазою, підрахунком сцинтиляцій, флуоресцентними зондами і т.п.). На додаток до цього, при аналізі виявляється FOLR1 та на нього не виявляє негативного впливу присутність Mov19, IMGN853, інших представників родини FOLR1 або фолієвої кислоти.

[0274] Аналізи за даним винаходом включають аналізи як для відбору пацієнтів, які підходять як для отримання терапії на основі FOLR1, так і для проведення аналізів для моніторингу відповіді організмів пацієнтів. Аналізи для передбачення відповіді проводять перед вибором терапії, а рівні FOLR1 можуть впливати на рішення з вибору терапії. Для моніторингу відповіді організму пацієнта аналіз проводять на початку терапії для визначення вихідних (або попередньо визначених) рівнів FOLR1 у зразку. Потім аналізують такий же зразок та рівні FOLR1 порівнюють з вихідними або попередньо визначеними рівнями. Як використовується у цьому документі, термін "попередньо визначений рівень" звичайно відноситься до граничного значення аналізу, яке використовується для оцінки результатів діагностики порівнянням результатів аналізу з попередньо визначеним рівнем, та коли попередньо визначений рівень уже зв'язаний або асоційований з різними клінічними параметрами (наприклад, моніторингом того, чи досяг суб'єкт, що лікувався лікарською речовиною, ефективного рівня лікарської речовини у крові, моніторингом відповіді суб'єкта, що отримує лікування від ракового захворювання протираковою лікарською речовиною, моніторингом реакції пухлини у суб'єкта, що отримує лікування від вказаної пухлини і т.д.). Попередньо визначений рівень може бути або абсолютною величиною або величиною, нормалізованою відніманням значення, отриманого для пацієнта, до початку проведення терапії. Приклад попередньо визначеного рівня, який може використовуватися, являє собою вихідний рівень, отриманий для одного або більше суб'єктів, які необов'язково можуть страждати від одного або більше захворювань або патологічних станів. Порівняння (або інформаційний аналіз) рівня біомаркера, що аналізують, з вихідним або попередньо визначеним рівнем може проводитися автоматизованою системою, такою як програмне забезпечення або інтелектуальна система, яка представляє частину або сумісна з обладнанням (наприклад, комп'ютерною платформою), на якій виконується аналіз. Альтернативно, це порівняння або інформаційний аналіз може проводитися лікарем. В одному варіанті реалізації винаходу, якщо рівні залишаються такими ж або зменшуються, то терапія

може бути ефективною і може бути продовжена. Коли відбувається статистично значиме перевищення вихідного рівня (або попередньо визначеного рівня), то організм пацієнта може не проявляти відповіді. В іншому варіанті реалізації винаходу збільшення рівнів скинутого FOLR1 може вказувати на збільшену загибель клітин та збільшене вивільнення скинутого FOLR1. В цьому варіанті реалізації винаходу збільшення скинутого FOLR1 вказує на терапевтичну ефективність.

[0275] Аналізи за даним винаходом можуть виконуватися будь-якими методами аналізу білків. Методи аналізу білків, придатні для цього винаходу, добре відомі в цій галузі техніки та включають методи імуноаналізу, що включають зв'язування специфічного неміченого або міченого антитіла або білка з експресованим білком або фрагментом FOLR1. Придатні методи імуноаналізу, що включають аналізи обох розчинних фаз, проводяться з використанням будь-якого формату, відомого в цій галузі техніки, такого як, але не обмеженого, аналізом Біасоге, резонансним переносом енергії флуоресценції з розрізненням за часом (TR-FRET), форматом ІФА ("сендвіч", прямого та зворотного конкурентного інгібування) або форматом флуоресцентної поляризації та аналізами на твердій фазі, такими як імуногістохімічні аналізи. FOLR1-антитіла та їх антигензв'язуючі фрагменти, наведені у цьому документі, особливо придатні для цих методів імуноаналізу, завдяки тому, що вони, наприклад, здатні виявляти динамічний діапазон FOLR1.

VII. Методи визначення циркулюючих пухлинних клітин.

[0276] Анти-FOLR1 антитіла, описані у цьому документі, також можуть застосовуватися для виявлення FOLR1 при визначенні циркулюючих пухлинних клітин. Циркулюючі пухлинні клітини (ЦПК) являють собою клітини, які скинуті з пухлини у судинне русло і циркулюють у кровотоці. ЦПК присутні в системі кровообігу в дуже малих кількостях. Загалом, ЦПК виділяють з крові або плазми пацієнтів різними методиками, відомими в цій галузі техніки. ЦПК можуть забарвлюватися специфічними маркерами з використанням методів, відомих в цій галузі техніки, які включають, але не обмежені, методами на основі проточної цитометрії та методами на основі ІГХ. ЦПК можуть бути забарвлені на наявність білкових маркерів, унікальних для пухлинних клітин, які дозволяють проводити ідентифікацію та відрізнити ЦПК від нормальних клітин крові. ЦПК також можуть забарвлюватися на наявність FOLR1 з використанням антитіл, запропонованих у цьому документі, що включають, але не обмежуються антитілами 2.1, 5.7 і 9.20. Метод визначення ЦПК також може включати кількісний аналіз числа ЦПК та/або числа FOLR1-позитивних ЦПК. FOLR1-антитіла, описані у цьому документі, можуть застосовуватися для забарвлення ЦПК, виділених у суб'єкта, який має ракове захворювання, для вимірювання FOLR1, що присутній у ЦПК. Збільшення FOLR1-експресуючих ЦПК може сприяти ідентифікації суб'єкта, як такого, що має ракове захворювання, яке ймовірно піддається терапії на основі FOLR1, або забезпечує проведення оптимізації терапевтичного режиму із застосуванням FOLR1-антитіла або імунокон'югату. Кількісне визначення FOLR1 в ЦПК може давати інформацію про стадію розвитку пухлини, відповідь на терапію та/або прогресування захворювання. Воно може використовуватися в якості прогностичного, прогностного та фармакодинамічного біомаркера. На додаток до цього, забарвлення ЦПК на наявність FOLR1 з використанням антитіл, запропонованих у цьому документі, може застосовуватися в якості аналізу рідкого біоптату як саме по собі, так і в комбінації з додатковим аналізом визначення пухлинних маркерів зразків солідних біоптатів.

VIII. Виявлення.

[0277] У цьому винаході додатково запропоновані антитіла проти FOLR1, в основному моноклонального типу, які зв'язані з щонайменше одним агентом з утворенням кон'югату антитіла для виявлення. Для того, щоб збільшити ефективність молекул антитіл в якості діагностичних прийнято їх приєднувати або ковалентно зв'язувати або створювати комплекс з щонайменше однією потрібною молекулою або фрагментом. Така молекула або фрагмент може бути, але не обмежуватися, щонайменше однією репортерною молекулою. Репортерну молекулу визначають як будь-який фрагмент, який може виявлятися з використанням методу аналізу. Не обмежуючі приклади репортерних молекул, які кон'югують з антитілами включають ферменти, радіомітки, гаптени, флуоресцентні мітки, фосфоресцентні молекули, хемілюмінесцентні молекули, хромофори, люмінесцентні молекули, фотоафінні молекули, забарвлені частинки та/або ліганди, такі як біотин.

[0278] Визначені приклади кон'югатів антитіл представлені такими кон'югатами, в яких антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, запропонований у цьому документі, зв'язаний з міткою, що виявляється. "Мітки, що виявляються" представляють собою сполуки та/або елементи, які можуть виявлятися завдяки їх специфічним функціональним властивостям та/або хімічним характеристикам, використання яких дозволяє виявляти антитіло або

антигензв'язуючий фрагмент, до якого вони приєднані та який повинен виявлятися, та/або проводити, якщо потрібно, додаткове кількісне визначення.

[0279] В цій галузі техніки відомо багато відповідних агентів для візуалізації, як і способів їх приєднання до антитіл (див., наприклад, пат. США № 5021236, 4938948 і 4472509, кожний включений до цього документу як посилання). Фрагменти, що використовуються для візуалізації, можуть бути парамагнітними іонами, радіоактивними ізотопами, флуорохромами, речовинами, що виявляються ЯМР, та/або, наприклад, речовинами для рентгенівської візуалізації.

[0280] Типові флуоресцентні мітки, які передбачається використати в якості кон'югатів зв'язуючого агента (наприклад, антитіла) включають, наприклад, Alexa 350, Alexa 430, Alexa 488, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Dylight 488, ізотіоціанат флуоресцеїну (FITC), зелений флуоресцентний білок (GFP), HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, фікоеритрин, REG, родаміновий зелений, родаміновий червоний, тетраметилродамін (TMR), ренографін, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамін, техаський червоний та похідні цих міток (тобто галогеновані аналоги, модифіковані ізотіоціанатом або іншим лінкером для кон'югування і т.д.). Типовою радіоміткою є тритій.

[0281] Кон'югати для виявлення антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, що передбачені у цьому винаході, включають ті, що застосовуються *in vitro*, коли антитіло або фрагмент приєднаний до вторинного зв'язуючого ліганду та/або до ферменту (ферментного маркера), який буде утворювати забарвлений продукт при контакті з хромогенним субстратом. FOLR1-антитіла та їх антигензв'язуючі фрагменти, наведені у цьому документі, особливо придатні для методів із застосуванням кон'югатів, завдяки тому, що вони, наприклад, здатні виявляти динамічний діапазон FOLR1. Приклади підходящих ферментів включають уреазу, лужну фосфатазу, гідрогенпероксидазу (хрину) та/або глюкооксидазу. У деяких варіантах реалізації винаходу вторинні зв'язуючі ліганди є сполуками біотину та/або авідину і стрептавідину. Застосування таких міток добре відомо спеціалістам в цій галузі техніки та описані, наприклад, в пат. США № 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 і 4366241, кожний включений до цього документу як посилання.

[0282] Молекули, які містять азидогрупи, також можуть використовуватися для утворення ковалентних зв'язків з білками за допомогою реакційно-здатних нітренових інтермедіатів, які утворюються при ультрафіолетовому опроміненні низької інтенсивності (Potter та Haley, 1983). Зокрема, 2- та 8-азидні аналоги пуринових нуклеотидів застосовують як сайт-направлені фотозонди для ідентифікації нуклеотидзв'язуючих білків в неочищених екстрактах клітин (Owens та Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- та 8-азидонуклеотиди також застосовують для картування нуклеотидзв'язуючих доменів очищених білків (Khatoun et al., 1989; King et al., 1989 та Dholakia et al., 1989) та їх можуть застосовувати як антитілозв'язуючі агенти.

[0283] Декілька способів приєднання або кон'югації антитіла з його кон'югатним фрагментом відомі в цій галузі техніки. Деякі способи включають використання металохелатного комплексу, що використовує, наприклад, органічний хелатуючий агент, такий як ангідрид діетилентриамінпентаоцтової кислоти (ДТПК), етилентриамінтетраоцтова кислота, N-хлор-п-толуолсульфонамід та/або тетрахлор-3 α -6 α -дифенілглікоуріл-3, приєднаний до зв'язуючого агента (наприклад, антитіла) (пат. США № 4472509 і 4938948, кожний включений до цього документу як посилання). Моноклональні антитіла також можуть реагувати з ферментом у присутності зшиваючого агента, такого як глутаральдегід або періодат. Кон'югати, зв'язуючі білки (наприклад, антитіла) з флуоресцеїновими маркерами, отримують у присутності цих зшиваючих агентів або реакцією з ізотіоціанатом. В пат. США № 4938948, візуалізацію пухлин молочної залози, наприклад, досягають з використанням моноклональних антитіл, а фрагменти, що виявляють, для візуалізації зв'язують з антитілом, використовуючи такі лінкери як метил-п-гідроксибензімідат або N-сукцинімідил-3-(4-гідроксифеніл)пропіонат.

[0284] В інших варіантах реалізації винаходу передбачається дериватизація імуноглобулінів вибіркоким введенням сульфгідрильних груп до Fc-ділянки імуноглобуліну з використанням умов реакції, які не змінюють активний центр зв'язування антитіла. Кон'югати антитіл, отримувані у відповідності з цією методологією, описані як такі, що проявляють збільшену тривалість існування, покращену специфічність і чутливість (пат. США № 5196066, включений до цього документу як посилання). Сайт-специфічне приєднання ефекторної або репортерної молекул, при якому репортерна або ефекторна молекула кон'югує із залишком вуглеводу на Fc-ділянці, також описано в літературі (O'Shannessy et al., 1987).

[0285] В інших варіантах реалізації винаходу імуноглобуліни мітять радіомітками з нуклідами, такими як тритій. У додаткових варіантах реалізації винаходу застосовуються

наночастинки золота (таких розмірів як близько 0,5 нм-40 нм) та/або частинки Quantum Dots (м. Хейворд, Каліфорнія).

[0286] Коли використовується формат "сендвіч"-аналізу, антитіло для захвату буде неміченим. Антитіло для виявлення буде або мічене безпосередньо або виявлятися опосередковано додаванням (після відмивання надлишкового антитіла для виявлення) молекулярного надлишку другого міченого антитіла направлено проти першого антитіла.

[0287] Мітка, що використовується для виявлення антитіла, являє собою будь-яку функціональну активність, що виявляється, яка не перешкоджає зв'язуванню FOLR1-антитіл. Приклади підходящих міток представлені тими багаточисельними мітками, які як відомо застосовуються в імуноаналізі, включаючи фрагменти, які можуть виявлятися безпосередньо, такі як флуорохромні, хемілюмінесцентні та радіоактивні мітки, а також фрагменти, такі як ферменти, які для виявлення повинні забезпечувати проходження реакції або дериватизації. Приклади таких міток включають радіоізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H і ^{131}I , флуорофори, такі як хелати рідкоземельних металів або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люциферазу жука-світляка та бактеріальні люциферази (пат. США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу хрину (HRP), лужну фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, сахаридоксидази, наприклад, глюкозоксидазу, галактозоксидазу та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, гетероциклічні оксидази, такі як уриказо- та ксантинооксидазу, зв'язані з ферментом, який використовує пероксид водню для окиснення попередника барвника, такого як HRP, лактопероксидазу або мікропероксидазу, біотин/авідин, біотин/стрептавідин, біотин/стрептавідин- β -галактозидазу з МУГ, спинові мітки, бактеріофагові мітки, стабільні вільні радикали і тому подібне. Як відмічено у цьому документі, флуорометричне виявлення представляє собою один приклад.

[0288] Загальноприйняті способи дають можливість ковалентно зв'язувати ці мітки з білками або поліпептидами. Наприклад, зшиваючі агенти, такі як діальдегіди, карбодіміди, дималеїміди, біс-імідати, біс-діазотований бензидин та їм подібні, можуть використовуватися для маркування антитіл з описаними у цьому документі флуоресцентними, хемілюмінесцентними та ферментними мітками. Див., наприклад, пат. США № 3940475 (флуориметрія) та 3645090 (ферменти); Hunter et al. *Nature* 144:945 (1962); David et al. *Biochemistry* 13:1014-1021 (1974); Pain et al. *J. Immunol. Methods* 40:219-230 (1981) та Nygren J. *Histochem. and Cytochem.* 30:407-412 (1982). У деяких варіантах реалізації винаходу мітки у цьому документі є флуоресцентними для збільшення посилення та чутливості до 8 пг/мл, переважніше використовувати біотин зі стрептавідин- β -галактозидазою та МУГ для посилення сигналу. У деяких варіантах реалізації винаходу використовується колориметрична мітка, наприклад, коли антитіло, що виявляється, біотинільовано, а засіб для виявлення являє собою авідин або стрептавідинпероксидазу та 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

[0289] Кон'югація такої мітки, що включає ферменти, з антитілом являє собою стандартну маніпулятивну процедуру для середнього спеціаліста за методиками імуноаналізів. Див., наприклад, O'Sullivan et al. "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", в *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone та H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166.

[0290] Після додавання останнього міченого антитіла, кількість зв'язаного антитіла визначається видаленням надлишкового незв'язаного міченого антитіла за допомогою промивання та наступного вимірювання кількості приєднаної мітки з використанням методу виявлення, підходящого для мітки, та визначенням кореляції вимірюваної кількості з кількістю скинутого FOLR1 в біологічному зразку. Наприклад, у випадку ферментів, величина забарвлення, яке розвивається та вимірюється, буде прямим вимірюванням кількості скинутого FOLR1, що присутній. А саме, якщо міткою є HRP, забарвлення може виявлятися з використанням субстрату 3,3',5,5'-тетраметилбензидину за поглинанням при 450 нм.

IX. Субстрати та індикатори.

[0291] Для виявлення FOLR1 передбачається використання субстратів та індикаторів.

[0292] Пероксидаза хрину (HRP) являє собою фермент, який спочатку утворює комплекс з пероксидом водню, а потім викликає його розкладення, що дає в результаті воду та атомарний кисень. Як для багатьох інших ферментів, HRP та деякі HRP-подібні види активності можуть інгібуватися надлишком субстрату. Комплекс, утворений HRP та надлишком пероксиду водню, є каталітично неактивним та у відсутності донору електронів (наприклад, хромогенної речовини) зворотно інгібується. Саме надлишок пероксиду водню та відсутність донору електронів обумовлює пригнічення активності ендогенної HRP. При використанні в системах для аналізу, HRP також може застосовуватися для конверсії певного субстрату в його активований хромоген, таким чином, викликаючи зміну кольору. Фермент HRP може бути кон'югований з

антитілом, пептидом, полімером або іншою молекулою кількома способами, які відомі в цій галузі техніки. Додавання глутаральдегіду до розчину, що містить суміш HRP та антитіла, буде приводити до того, що більше молекул антитіла будуть кон'юговані одне з одним, ніж з ферментом. У двостадійній процедурі HRP реагує спочатку з біфункціональними реагентами.

5 На другій стадії з антитілом змішується лише активована HRP, що в результаті призводить до набагато більш ефективного введення мітки та відсутності полімеризації. HRP також кон'югують зі (стрепт)авідином, використовуючи двостадійну процедуру з глутаральдегідом. Ця форма застосовується у процедурі, в якій субстратами, наприклад, є LAB та LSAB. Кон'югація з біотином також включає дві стадії, так як біотин спочатку повинен пройти дериватизацію в біотиніл-N-гідроксисукцинімідний естер або в біотингідрозид перед тим, як він може прореагувати з епсилон-аміногрупами ферменту HRP.

10 [0293] Субстратом для таких ферментів як HRP є 3,3'-діамінобензидин (DAB), який утворює коричневий кінцевий продукт, який у вищій мірі нерозчинний в спирті та інших органічних розчинниках. Окиснення DAB також викликає полімеризацію, що дає можливість реагувати з тетраоксидом осмію, і, таким чином, збільшувати інтенсивність забарвлення та електронну густину. З декількох металів та способів, що використовуються для інтенсифікації оптичної густини полімеризованого DAB, найбільш результативним виявляється хлорид золота в комбінації з сульфідом срібла.

20 [0294] Субстратом для таких ферментів як HRP є 3-аміно-9-етилкарбазол (AEC), і при окисненні він утворює рожево-червоний кінцевий продукт, який розчинний в спирті. Тому, зразки, оброблені AEC, не повинні занурюватися у спирт або спиртові розчини (наприклад, гематоксилін Харіса). Замість цього слід використовувати водне контрастування та водне середовище для заливки.

25 [0295] Субстратом для таких ферментів як HRP є 4-хлор-1-нафтол (CN), який осаджується у вигляді синього кінцевого продукту. Через те, що CN розчинний у спирті та інших органічних розчинниках, зразки не повинні дегідратуватися, піддаватися спиртовим контрастуванням або покривні скельця поміщатися у середовище для заливки, що містить органічні розчинники. На відміну від DAB, CN має схильність дифундувати з місця осадження.

30 [0296] Субстратом для таких ферментів як HRP є дигідрохлорид п-фенілендіаміну/пірокاتهін (реактив Ханкера-Яте), який дає синьо-чорний продукт реакції, нерозчинний в спирті та інших органічних розчинниках. Як і полімеризований DAB, цей продукт реакції може бути насичений осмієм. З використанням реактиву Ханкера-Яте в імунопероксидазних методиках можуть отримуватися результати, що різняться.

35 [0297] Лужна фосфатаза кишкового теляти (AP) (молекулярна маса 100 кДа) видаляє (гідролізом) та переносить фосфатні групи з органічних естерів, руйнуванням зв'язку P-O; при цьому короткочасно утворюється проміжний зв'язок фермент-субстрат. Основними активаторами-металами для AP є Mg^{++} , Mn^{++} і Ca^{++} .

40 [0298] AP не використовувалася активно в методах імуногістохімії до публікації процедури з неміченою лужною фосфатазою-антитілом до лужної фосфатази (APAAP). Розчинні імунні комплекси, які використовують цю процедуру, мають молекулярні маси приблизно 560 кДа. Головна перевага процедури APAAP у порівнянні з методикою з пероксидазою-антитілом до пероксидази (PAP) полягає у відсутності впливу, що виникає через активність ендогенної пероксидази. Ендогенна пероксидаза може блокуватися використанням розбавленого розчину пероксиду водню. Через потенціальний невизначений вплив активності ендогенної пероксидази при PAP-забарвленні, методика APAAP рекомендована для застосування для мазків крові та кісткового мозку. Активність ендогенної лужної фосфатази з кісток, нирок, печінки та деяких білих клітин крові може інгібуватися додаванням 1 мМ левамізолу до розчину субстрату, хоча виявилось, що 5 мМ розчин є більш ефективним. Кишкові лужні фосфатази недостатньо інгібуються левамізолом.

50 [0299] У методі забарвлення з імунолужною фосфатазою фермент гідролізує естери нафтолфосфату (субстрат) до фенольних сполук та фосфатів. Феноли з'єднуються з безбарвними діазонієвими солями (хромоген) з утворенням нерозчинних забарвлених азобарвників. Успішно застосовуються кілька різних комбінацій субстратів та хромогенів.

55 [0300] Може використовуватися субстрат AP – фосфат нафтолу AS-MX в його кислотній формі або у вигляді натрієвої солі. Хромогенні субстрати міцного червоного TR та міцного синього BB утворюють, відповідно, яскраво-червоний або синій кінцевий продукт. Обидва вони розчинні в спиртових та інших органічних розчинниках, тому повинно використовуватися водне середовище для заливки. При забарвленні мазків клітин переважно використовують міцний червоний TR.

60 [0301] Додаткові типові субстрати включають фосфат нафтолу AS-BI, фосфат нафтолу AS-

TR і 5-бром-4-хлор-3-індоксилфосфат (BCIP). Інші можливі хромогени включають, наприклад, міцний червоний LB, міцний Гарнета GBC, нітросиній тетразолій (NBT) та йодонітротетразоловий фіолетовий (INT).

X. Методи імунодетекції.

5 [0302] У додаткових варіантах реалізації цей винахід стосується методів імунодетекції зі зв'язування, очищення, видалення, кількісного визначення та/або іншого звичного виявлення біологічних компонентів, таких як ліганди, як передбачається даним винаходом. Можуть застосовуватися антитіла, отримані у відповідності з даним винаходом. Деякі методи імунодетекції включають, згадуючи деякі, методи імуногістохімії, проточну цитометрію, 10 твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА), радіоімуноаналіз (РІА), імунорадіометричний аналіз, флуороімуноаналіз, хемілюмінесцентний аналіз, біоломінесцентний аналіз та вестерн-блот. Стадії різних придатних методів імунодетекції описані у науковій літературі, такий як, наприклад, Doolittle M H та Ben-Zeev O, Methods Mol Biol. 1999;109:215-37; Gulbis B та Galand P, Hum Pathol. 1993 Dec;24(12):1271-85 та De Jager R et al., Semin Nucl Med. 1993 Apr;23(2):165-79, 15 кожна включена до цього документу як посилання.

[0303] Загалом, методи імунозв'язування, в залежності від випадків, включають отримання зразка, що передбачено містити лігандний білок, поліпептид та/або пептид, та приведення у контакт зразка з першим лігандзв'язуючим агентом (наприклад, антилігандним антитілом) у 20 відповідність з даним винаходом в умовах, ефективних для того, щоб забезпечити утворення імунокомплексів.

[0304] В термінах виявлення антигенів біологічний зразок, що аналізується, може бути будь-яким зразком, в якому потрібно виявити FOLR1, такий як рідкий екстракт, кров, плазма, сироватка, спинномозкова рідина, лімфоїдна рідина, зріз або зразок тканини, екстракт 25 гомогенізованої тканини, аспіраційні біоптати, клітина, виділені та/або очищені форми FOLR1-містячих композицій або будь-яка біологічна рідина. У деяких варіантах реалізації винаходу використовують зразки або екстракти крові, плазми або лімфи.

[0305] Приведення у контакт вибраного біологічного зразка з антитілом в ефективних умовах та протягом періоду часу, достатнього для забезпечення утворення імунних комплексів (первинних імунних комплексів), звичайно являє собою просто додавання композиції антитіла 30 до зразка та інкубування суміші протягом достатньо тривалого періоду часу для того, щоб антитіла утворили імунні комплекси, тобто для зв'язування будь-яких присутніх лігандних білкових антигенів. При проходженні цього часу композиція зразок-антитіло, така як зріз тканини, планшет ІФА, дот-блот або вестерн-блот, звичайно буде промиватися для видалення будь-яких неспецифічно зв'язаних видів антитіл, забезпечуючи збереження лише тих антитіл, 35 які специфічно зв'язуються з первинними імунними комплексами, які необхідно виявити.

[0306] Загалом, виявлення утворення імунокомплексів добре відомо в цій галузі техніки та може досягатися за допомогою застосування багаточислених підходів. Ці способи звичайно засновані на виявленні мітки або маркера, такого як будь-який з радіоактивних, флуоресцентних, біологічних та ферментних маркерів. Патенти США, що стосуються 40 застосування таких міток включають пат. США № 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 і 4366241, кожен включений до цього документу як посилання. Звичайно, хтось може знайти додаткові переваги при використанні вторинного зв'язуючого ліганду, такого як вторинне антитіло та/або лігандзв'язуюча комбінація біотин/авідин, як відомо в цій галузі техніки.

45 [0307] Антилігандне антитіло, що застосовується для виявлення, саме по собі може бути зв'язане з міткою, що виявляється, щоб потім можна було просто виявляти цю мітку, тим самим забезпечуючи визначення в композиції кількості первинних імунних комплексів. В альтернативному варіанті, перше антитіло, яке стає зв'язаним у первинних імунних комплексах, може виявлятися за допомогою другого зв'язуючого агенту, який має афінність зв'язування до 50 антитіла. У цих випадках, другий зв'язуючий агент може бути зв'язаний з міткою, що виявляється. Другий зв'язуючий агент часто сам по собі є антитілом, яке тому може називатися "вторинним" антитілом. Первинні імунні комплекси приводять у контакт з міченим вторинним зв'язуючим агентом, або антитілом, в ефективних умовах та протягом періоду часу, достатнього для утворення вторинних імунних комплексів. Далі вторинні імунні комплекси звичайно промивають для видалення будь-яких неспецифічно зв'язаних мічених вторинних антитіл або 55 лігандів, а потім виявляють мітку, що залишилася, у вторинних імунних комплексах.

[0308] Додаткові способи включають виявлення первинних імунних комплексів двостадійною методикою. Другий зв'язуючий агент, такий як антитіло, яке має афінність зв'язування до 60 антитіла, використовується для утворення вторинних імунних комплексів, як описано у цьому документі. Після промивання, вторинні імунні комплекси приводять у контакт з третім

зв'язуючим агентом або антитілом, яке має афінність зв'язування з другим антитілом, знову в ефективних умовах та протягом періоду часу, достатнього для утворення імунних комплексів (третинні імунні комплекси). Третій ліганд або антитіло зв'язується з міткою, що виявляється, забезпечуючи виявлення третинних імунних комплексів, які утворюються таким способом. Ця система, якщо потрібно, може забезпечувати посилення сигналу.

[0309] В іншому варіанті реалізації винаходу біотинільоване моноклональне або поліклональне антитіло застосовується для виявлення цільового антигену(ів), а антитіло другої стадії потім використовується для виявлення біотину, приєднуючись до біотину в утвореному комплексі. В цьому способі зразок, який потребує дослідження, спочатку інкубується в розчині, що містить антитіло першої стадії. Якщо присутній цільовий антиген, то деяка кількість антитіла зв'язується з антигеном з утворенням комплексу біотинільоване антитіло/антиген. Потім комплекс антитіло/антиген посилюється інкубацією в розчинах, що слідуєть один за одним, стрептавідину (або авідину), біотинільованої ДНК та/або комплементарної біотинільованої ДНК, з додаванням на кожній стадії додаткових біотинових сайтів до комплексу антитіло/антиген. Стадії посилення повторюються до досягнення підходящого рівня посилення, при якому місце приєднання зразка інкубується в розчині, що містить антитіло другої стадії проти біотину. Це антитіло другої стадії позначають міткою, такою як, наприклад, фермент, який може застосовуватися для виявлення наявності комплексу антитіло/антиген методом гістоензимології з використанням хромогенного субстрату. При підходящому посиленні може утворюватися кон'югат в кількості, яка стає макроскопічно видимою.

[0310] В одному варіанті реалізації винаходу для імунологічного виявлення може використовуватися метод імуногістохімії (ІГХ). З використанням методу ІГХ, виявлення FOLR1 у зразку може досягатися таргетингом зразка зондом, наприклад, анти-FOLR1 антитілом. Зонд може бути зв'язаний, безпосередньо або опосередковано, з міткою, що виявляється, або може виявлятися іншим зондом, який зв'язаний, безпосередньо або опосередковано, з міткою, що виявляється.

[0311] У деяких варіантах реалізації винаходу метод ІГХ може розрізняти різні рівні експресії білків, наприклад, калібрована методика ІГХ. У деяких варіантах реалізації винаходу метод ІГХ може розрізняти інтенсивність забарвлення зразків, які мають низьку експресію FOLR1, середню експресію FOLR1 або високу експресію FOLR1.

[0312] В одному варіанті реалізації винаходу імунологічне виявлення (методом імуногістохімії) FOLR1 визначається як за інтенсивністю, так і однорідністю (відсоток забарвлених клітин – лише мембран). Порівняльні рівні градації експресії FOLR1 за інтенсивністю корелюють так: 0 – негативний результат, 0-1 - дуже слабка, 1 – слабка, 1-2 - від слабкої до помірної, 2 – помірна, 2-3 - від помірної до сильної, 3 – сильна, 3+ - дуже сильна. При кількісній інтерпретації, показник 0 вказує, що забарвлення мембран не спостерігається. Показник 1 вказує, що виявляється слабо/ледь помітне забарвлення мембран. Для показника 2 спостерігається забарвлення мембран від слабого до помірно повного. Нарешті, показник 3 (або 3+) вказує, що спостерігається забарвлення мембран від помірного до повного. Зразки з показником 0 або 1 за експресією FOLR1 можуть бути охарактеризовані, як такі, що не мають підвищену експресію FOLR1, в той же час як зразки з показниками 2 або 3 можуть бути охарактеризовані, як надекспресуючі або такі, що мають підвищену експресію FOLR1. В іншому варіанті реалізації винаходу з використанням антитіл, їх антигензв'язуючих фрагментів або поліпептидів, запропонованих у цьому документі, зразки з показником 0 за експресією FOLR1 можуть бути охарактеризовані, як такі, що не мають підвищену експресію FOLR1, зразки з показником 1 можуть бути охарактеризовані, як такі, що мають підвищену експресію FOLR1, а зразки з показниками 2 або 3 можуть бути охарактеризовані, як надекспресуючі або такі, що мають підвищений FOLR1.

[0313] Зразки, надекспресуючі FOLR1, також можуть оцінюватися за імуногістохімічними показниками, що відповідають кількості копій молекул FOLR1, що експресуються, на клітину, або числу зв'язаних антитіл на одну клітину (ABC), та можуть визначатися біохімічним методом. Порівняльні рівні градації однорідності FOLR1 (відсоток забарвлення мембран клітин) є наступними: Негативний результат = 0 %; фокальне = <25 %; гетерогенне (гетеро) = 25-75 % та гомогенне (гомо) = >75 %.

[0314] В одному варіанті реалізації винаходу імунологічне виявлення (методом імуногістохімії) FOLR1 визначається з використанням Н-показників. Н-показники поєднують показники інтенсивності забарвлення (наприклад, показник від 0 до 3, причому 0 відповідає відсутності забарвлення, а 3 відповідає сильному забарвленню) з відсотковим вмістом клітин, які позитивні за забарвленням мембран (тобто однорідність). Н-показник може розраховуватися наступним чином:

Н показник = [0*(відсотковий вміст клітин, забарвлених з інтенсивністю 0)] + [1*(відсотковий вміст клітин, забарвлених з інтенсивністю 1)] + [2*(відсотковий вміст клітин, забарвлених з інтенсивністю 2)] + [3*(відсотковий вміст клітин, забарвлених з інтенсивністю 3)]. Відповідно, Н-показник може знаходитися в діапазоні від 0 (відсутнє забарвлення мембран клітин) до 300 (всі мембрани клітин забарвлені з інтенсивністю 3).

[illegible]

[0316] В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає від 75 до 300. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 75. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 100. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 125. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 150. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 175. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад,

IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 200. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 225. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 250. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 275. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчників, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини яєчників, отриманому від суб'єкта, складає 300.

[illegible]

[0318] В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає від 50 до 300. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 50. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMGN853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 75. В іншому варіанті реалізації

винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 100. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 125. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 150. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 175. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 200. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 225. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 250. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає щонайменше 275. В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо Н-показник експресії FOLR в зразку пухлини ендометрію, отриманому від суб'єкта, складає 300.

[0319] В якості прикладу, Н-показник у суб'єкта, який має рак яєчників, може бути розрахованим наступним чином:

Н показник = (75 % з інтенсивністю 0) + (0 % з інтенсивністю 1) + (0 % з інтенсивністю 2) + (25 % з інтенсивністю 3) = 75 або

Н показник = (0 % з інтенсивністю 0) + (75 % з інтенсивністю 1) + (0 % з інтенсивністю 2) + (25 % з інтенсивністю 3) = 150.

В іншому прикладі, Н-показник у суб'єкта, який має рак ендометрію, може бути розрахованим наступним чином:

Н показник = (75 % з інтенсивністю 0) + (0 % з інтенсивністю 1) + (25 % з інтенсивністю 2) + (0 % з інтенсивністю 3) = 50 або

Н показник = (0 % з інтенсивністю 0) + (75 % з інтенсивністю 1) + (25 % з інтенсивністю 2) + (0 % з інтенсивністю 3) = 125.

У всіх чотирьох варіантах реалізації винаходу, наведених вище, суб'єкт може бути ідентифікований як кандидат на лікування режимом лікування з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853).

[0320] В одному варіанті реалізації винаходу імунологічне виявлення (методом імуногістохімії) FOLR1 визначається з використанням відсотка позитивної реакції та інтенсивності у всьому зразку. У цьому варіанті реалізації винаходу вибір лікування режимом лікування з анти-FOLR1 заснований на відсотковому вмісті клітин у зразку, який виявлений як експресуючий мембранний FOLR1 на встановленому рівні, що відображає як інтенсивність забарвлення (наприклад, 1, 2 або 3), так і однорідність (наприклад, гетерогенне або гомогенне (див. табл. 11)). Наприклад, зразок, що має щонайменше 25 % (тобто 25-75 % або > 75 %) забарвлення клітин з позитивним результатом FOLR1 рівним 3, може бути охарактеризований як "3 гетеро" та "3 гомо" або, у сукупності, як "щонайменше 25 % позитивного результату рівного 3".

[0321] В одному варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак яєчника, ідентифікується як кандидат на лікування режимом лікування з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 в пухлинному зразку, отриманому від суб'єкта, має показник інтенсивності 3, визначений методом ІГХ. В одному варіанті реалізації винаходу ІГХ аналіз виконують, використовуючи антитіло FOLR1-2.1.

[0322] В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має рак ендометрію, ідентифікується як кандидат на лікування режимом лікування з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR в пухлинному

зразку, отриманому від суб'єкта, має показник інтенсивності 2, визначений методом ІГХ. В одному варіанті реалізації винаходу ІГХ аналіз виконують, використовуючи антитіло FOLR1-2.1.

[0323] В іншому варіанті реалізації винаходу суб'єкт, що має НДРЛ, ідентифікують як кандидата на лікування режимом лікування з анти-FOLR1 антитілом (наприклад, IMG853), якщо щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR в пухлинному зразку, отриманому у суб'єкта, має показник інтенсивності 2, визначений методом ІГХ. В одному прикладі ІГХ аналіз виконують, використовуючи для ІГХ аналізу антитіло FOLR1-2.1.

[0324] ІГХ аналіз може виконуватися вручну або з використанням автоматизованої системи (наприклад, використовуючи автоматизований пристрій для забарвлення). ІГХ аналіз може виконуватися на клітинах, осадах клітин, тканинах, препаратах з крові, плазми, сироватки або лімфатичної рідини. У деяких варіантах реалізації винаходу зразки являють собою фіксовані зразки. У деяких варіантах реалізації винаходу зразки являють собою залиті парафіном зразки. У деяких варіантах реалізації винаходу зразки являють собою фіксовані формаліном та залиті парафіном зразки.

[0325] В одному варіанті реалізації винаходу для імунологічного виявлення використовується проточна цитометрія. Таким чином, наприклад, число зв'язаних антитіл на одну клітину (ABC), може оцінюватися з використанням проточної цитометрії. Велика кількість анти-FOLR1 антитіл, зв'язаних на одну клітину, може вказувати на високі рівні експресії FOLR1 та високу ймовірність сприйнятливості до лікування анти-FOLR1 антитілом або його імунокон'югатом.

XI. Композиції та набори.

[0326] Винаходом також запропоновані композиції і набори для практичного застосування за даним винаходом, як описано в цьому документі. Такі набори можуть включати контейнери, кожний містить один або більше різних реактивів (як правило, в концентрованій формі), що використовуються в способах, включаючи, наприклад, один або більше зв'язуючих агентів (антитіл) вже приєднаних до маркера або, необов'язково, з реактивами для зшивання зв'язуючого агента з антитілом (а також самим маркером), буферні розчини та/або реактиви та інструмент для виділення (необов'язково мікропрепаруванням) для забезпечення практичного застосування винаходу. Опис міток або індикаторів, або послідовність інструкцій із застосування компонентів набору в методі виявлення лігандів за даним винаходом, як правило також будуть включені, причому інструкції можуть бути асоційовані з листком-вкладишем та/або упаковкою набору або його компонентів.

[0327] У додаткових варіантах реалізації винаходу цей винахід стосується наборів для імунодетекції для використання з методами імунодетекції, описаними у цьому документі. Так як антитіла звичайно застосовуються для виявлення FOLR1, то антитіла, як правило, будуть включені у набір. Таким чином, набори для імунодетекції будуть у підходящих контейнерах включати, перше антитіло, яке зв'язується з FOLR1 та/або, необов'язково, реактив для імунодетекції та/або додатково, необов'язково, білок FOLR1 або зразок клітин, що містять FOLR1.

[0328] Реактиви для імунодетекції набору можуть приймати будь-яку з різноманітних форм, включаючи мітки, що виявляються, які асоційовані та/або зв'язані з даним антитілом. Мається на увазі також наявність міток, що виявляються, які асоційовані з та/або приєднані до вторинного зв'язуючого ліганду. Типові вторинні ліганди являють собою такі вторинні антитіла, які мають афінність зв'язування до першого антитіла.

[0329] Додаткові відповідні реактиви для імунодетекції для використання в цьому наборі включають двокомпонентний реактив, який містить вторинне антитіло, яке має афінність зв'язування до першого антитіла, разом з третім антитілом, яке має афінність зв'язування до другого антитіла, третє антитіло зв'язане з міткою, що виявляється. Як відмічено в цьому документі, багато типових міток відомо в цій галузі техніки та/або всі такі мітки можуть належним чином застосовуватися в зв'язку з даним винаходом.

[0330] Набори можуть додатково включати терапевтичний агент, такий як анти-FOLR1 імунокон'югат, для лікування раку.

[0331] Набір може додатково включати реактив для виявлення FOLR1, що застосовується для вимірювання експресії FOLR1 у суб'єкта, що включає реактив для виявлення FOLR1 та інструкції із застосування. В одному варіанті реалізації винаходу реактив для виявлення FOLR1 містить FOLR1-зв'язуючий пептид або анти-FOLR1 антитіло. В іншому варіанті реалізації винаходу набір додатково включає вторинне антитіло, яке зв'язується з анти-FOLR1 антитілом.

[0332] В одному варіанті реалізації винаходу FOLR1-специфічне антитіло включене в концентрації від близько 0,1 до близько 20 мкг/мл, від близько 0,1 до близько 15 мкг/мл, від близько 0,1 до близько 10 мкг/мл, від близько 0,5 до близько 20 мкг/мл, від близько 0,5 до

близько 15 мкг/мл, від близько 0,5 до близько 10 мкг/мл, від близько 1 до близько 20 мкг/мл, від близько 1 до близько 15 мкг/мл, від близько 1 до близько 10 мкг/мл, від близько 2 до близько 20 мкг/мл, від близько 2 до близько 15 мкг/мл або від близько 2 до близько 10 мкг/мл. В іншому варіанті реалізації винаходу FOLR1-специфічне антитіло включене в концентрації близько 1,5 мкг/мл, близько 2 мкг/мл, близько 3 мкг/мл, близько 4 мкг/мл, близько 5 мкг/мл, близько 6 мкг/мл, близько 7 мкг/мл, близько 8 мкг/мл, близько 9 мкг/мл або близько 10 мкг/мл. В іншому варіанті реалізації винаходу FOLR1-специфічне антитіло включене в концентрації близько 2 мкг/мл. В іншому варіанті реалізації винаходу FOLR1-специфічне антитіло включене в концентрації близько 10 мкг/мл.

[0333] В іншому варіанті реалізації винаходу антитіло міститься в концентрованому розчині з інструкціями з розведення для досягнення кінцевої концентрації від близько 1 до близько 20 мкг/мл, від близько 1 до близько 15 мкг/мл, від близько 1 до близько 10 мкг/мл, від близько 2 до близько 20 мкг/мл, від близько 2 до близько 15 мкг/мл або від близько 2 до близько 10 мкг/мл. В іншому варіанті реалізації винаходу антитіло міститься в концентрованому розчині з інструкціями з розведення для досягнення кінцевої концентрації близько 1,5 мкг/мл, близько 2 мкг/мл, близько 3 мкг/мл, близько 4 мкг/мл, близько 5 мкг/мл, близько 6 мкг/мл, близько 7 мкг/мл, близько 8 мкг/мл, близько 9 мкг/мл або близько 10 мкг/мл. В іншому варіанті реалізації винаходу антитіло міститься в концентрованому розчині з інструкціями з розведення для досягнення кінцевої концентрації близько 2 мкг/мл. В іншому варіанті реалізації винаходу антитіло міститься в концентрованому розчині з інструкціями з розведення для досягнення кінцевої концентрації близько 10 мкг/мл.

[0334] В іншому варіанті реалізації винаходу набір додатково містить реактив для виявлення, вибраний з групи, що складається з: ферменту, флуорофору, радіоактивної мітки і люмінофору. В іншому варіанті реалізації винаходу реактив для виявлення вибраний з групи, що складається з: біотину, дигоксигеніну, флуоресцеїну, тритію і родаміну.

[0335] Набір також включає інструкції для виявлення та визначення показника експресії FOLR1. Набір також включає контрольні або еталонні зразки. Необмежуючі приклади контрольних або еталонних зразків включають осаді клітин або лінії культур клітин тканин, отриманих з нормальних (нормальний контроль) або пухлинних (позитивний контроль) зразків. Типові лінії клітин включають лінії клітин стабільно або транзійтно трансфected експресійним вектором, який експресує FOLR1. Додаткові приклади включають осаді клітин і зразки тканин, описані у прикладах.

[0336] В деяких варіантах реалізації винаходу набір являє собою комбінацію в упаковці, що включає основні елементи: (а) реактиви для захвату, які містять моноклональні антитіла проти FOLR1 людини, і (b) реактиви для виявлення, які також можуть містити FOLR1-моноклональні антитіла, але також можуть містити (мічені або немічені) антитіла, що виявляються, які зв'язуються з FOLR1. Ці основні елементи визначені у цьому документі.

[0337] В одному варіанті реалізації винаходу набір додатково містить тверду підложку для реактивів для захвату, яка може бути представлена як окремий елемент або на ній вже іммобілізовані реактиви для захвату. Отже, антитіла для захвату в наборі можуть бути іммобілізовані на твердій підложці або вони можуть бути іммобілізовані на такій підложці, яка включена до набору або представлена окремо від набору.

[0338] В одному варіанті реалізації винаходу реактив для захвату нанесений на планшет для мікротитрування. Реактиви для виявлення можуть бути міченими антитілами, що виявляються безпосередньо, або неміченими антитілами, які виявляються міченими антитілами, направленими проти немічених антитіл, індукованих в іншому біологічному виді. Коли мітка являє собою фермент, то набір звичайно буде включати субстрати і кофактори, що потрібні для ферменту, а коли мітка являє собою флуорофор – то попередник барвника, який забезпечує хромофор, що виявляється. Коли реактив для виявлення є неміченим, то набір може додатково містити засіб для виявлення антитіл, що виявляються, такий як мічені антитіла, направлені на немічені антитіла, наприклад, у форматі, що виявляється флуорометрично. Коли мітка являє собою фермент, то набір звичайно буде включати субстрати і кофактори, потрібні для ферменту, а коли мітка являє собою флуорофор – то попередник барвника, який забезпечує хромофором, що виявляється, а коли мітка є біотином – то авідин у вигляді авідину, стрептавідину або стрептавідину, кон'югованого з HRP, або β -галактозидазою з МУГ.

[0339] В одному варіанті реалізації винаходу реактив для захвату являє собою FOLR1-антитіло 2.1, 5.7 або 9.20 або антитіло, що містить послідовності антитіл 2.1, 5.7 або 9.20. В одному варіанті реалізації винаходу реактив для виявлення являє собою FOLR1-антитіло 2.1, 5.7 або 9.20 або антитіло, що містить послідовності антитіл 2.1, 5.7 або 9.20. В іншому варіанті реалізації винаходу реактив для виявлення являє собою біотинільоване FOLR1-антитіло 2.1, 5.7

або 9.20 або біотинільоване антитіло, що містить послідовності антитіл 2.1, 5.7 або 9.20.

[0340] Набір також, як правило, містить інструкції для проведення аналізу та/або білок FOLR1 або його фрагмент (наприклад, позаклітинний домен FOLR1 або позаклітинний домен FOLR1 та весь або частину зв'язуючого ГФІ домену) в якості стандарту антигену, а також інші

5 добавки, такі як стабілізатори, буферні розчини для промивання та інкубації і тому подібне. В одному варіанті реалізації винаходу стандарт антигену FOLR1 являє собою імуноадгезин FOLR1-Fc. Набір також включає інструкції для виявлення та визначення показника експресії FOLR1.

[0341] Компоненти набору можуть постачатися у попередньо визначених співвідношеннях з

10 відносними кількостями різних реактивів, які відповідно змінюються для забезпечення концентрацій реактивів в розчині, які значно максимізують чутливість аналізу. Конкретно, реактиви можуть постачатися у вигляді сухих порошків, звичайно ліофілізованих, включаючи допоміжні речовини, які при розчиненні будуть забезпечувати отримання розчину реактиву, що має відповідну концентрацію для з'єднання зі зразком, який повинен досліджуватися.

15 [0342] Запропоновані також композиції, що містять антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти, описані в цьому документі. В одному варіанті реалізації винаходу композиція містить анти-FOLR1 антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, описаний в цьому документі, і буферний розчин, наприклад, буферний розчин, який може використовуватися в аналізі на

20 виявлення, такому як FACS, ІГХ або ІФА. Такі буферні розчини відомі спеціалістам в цій галузі техніки і включають розчинники. Як приклад, певні буферні розчини для FACS запропоновані в цьому документі, наприклад, у демонстраційних прикладах. Буферні розчини для FACS можуть також містити, наприклад, сироватку або альбумін (такі як сироватку теляти, сироватку козла або БСА) та/або азид натрію. Буферні розчини для FACS можуть також містити PBS, EDTA та/або ДНКазу або їх будь-яку комбінацію. Буферні розчини для ІГХ аналізу також

25 запропоновані в цьому документі і відомі спеціалістам в цій галузі техніки. Буферні розчини для ІГХ аналізу можуть містити, наприклад, казеїнову сироватку або альбумін (такі як сироватку теляти, сироватку козла або БСА), твін або тритон, PBS та/або азид натрію або будь-яку їх комбінацію. Буферні розчини для ІФА також запропоновані в цьому документі і відомі

30 спеціалістам в цій галузі техніки. Буферні розчини для ІФА можуть містити, наприклад, сироватку або альбумін (такі як сироватку теляти, сироватку козла або БСА), знежирене сухе молоко, казеїн та/або желатин або будь-яку їх комбінацію.

[0343] Варіанти реалізації за даним описом можуть додатково визначатися за допомогою

35 посилення на наступні необмежуючі приклади, які детально описують отримання визначених антитіл за даним описом і способи використання антитіл за даним описом. Спеціалістам в цій галузі техніки буде очевидно, що багато модифікацій, як матеріалів, так і способів, може бути практично реалізовано без відхилення від обсягу цього опису.

ПРИКЛАДИ

[0344] Мається на увазі, що приклади та варіанти реалізації винаходу, описані в цьому документі, наведені лише з ілюстративними цілями і що різні модифікації або зміни у такому

40 світлі будуть передбачатися спеціалістами в цій галузі техніки та повинні бути включені до суті і сфери дії цієї заявки.

Приклад 1. Отримання FOLR1-гібридом.

[0345] Гібридами, що продукують антилюдські FOLR1-моноклональні антитіла, які підходять

45 для імуногістохімічного (ІГХ) забарвлення (антитіл за даним винаходом), відбирали з більше ніж 16000 гібридом. Гібридами отримували імунізацією мишей Balb/c дикого типу різними антигенами, включаючи: фіксовані формаліном клітини 300-19, яких трансфекували FOLR1 людини, рекомбінантний білок FOLR1 людини-IgG2a Fc миші та рекомбінантний білок FOLR1 людини. Імунізацію фіксованими клітинами 300-19 проводили підшкірною ін'єкцією

50 трансфетованих клітин 300-19 в PBS (5Е6 клітин/мишу/ін'єкцію) у відсутності будь-якого ад'юванту. Імунізацію рекомбінантними білками FOLR1 виконували підшкірною ін'єкцією білка, емульгованого в повному ад'юванті Фрейнда (ПАФ) або неповному ад'юванті Фрейнда для стимуляції (Sigma) або мишачому ад'юванті Magic (Creative Diagnostics). Звичайно, мишей імунізували п'ять разів з двотижневими інтервалами перед отриманням фінальної стимуляції

внутрішньочеревною ін'єкцією імуногену за три дня до злиття.

55 [0346] Всього проводили 16 незалежних злиттів клітин (включаючи злиття 352, 353 і 354), використовуючи клітини селезінки, які походили з імунізованих мишей Balb/c дикого типу, та клітин мієломи миші P3 × 63Ag8.653 (клітини P3). Злиття клітин проводили з використанням обладнання для електрозлиття ECM200 (BTX Harvard Apparatus) у відповідності зі стандартними протоколами. Для кожного злиття на виході отримували більше 1000 гібридом.

60 Антитіла, продуковані цими гібридами, піддавали скринінгу та підтверджували аналізом

FACS, заснованим на методі використання денатурованих FOLR1-позитивних і FOLR1-негативних клітин. З більш ніж 16000 гібридом, що піддали скринінгу, виявили 14 гібридом, які були позитивні за результатами скринінгу FACS. Всі позитивні гібридами, походили з організмів мишей, імунізованих рекомбінантним білком FOLR1 людини-IgG2a Fc миші.

5 [0347] З 14 гібридом, які початково були позитивними за результатами скринінгу FACS, лише десять показали достатню концентрацію IgG для подальшого аналізу.

Приклад 2. Імуногістохімічна оцінка супернатантів гібридом.

10 [0348] Десять з початкових 14 гібридом проаналізували методом ІГХ. Аналіз виконували з використанням автоматизованого пристрою для забарвлювання Leica Bond RX та реактивів і умов, перелічених в табл. 9.

Таблиця 9

Реактиви для ІГХ і умови проведення аналізу

Стадія	Дія/реактив (Постачальник)	Час
Прогрів	Температура: 60 °C	30 хвилин
Депарафінізація	Розчин Bond Dewax (Leica) 100 % етанол (Pharmco Aaper)	Встановлений
Демаскування антигену	Розчин Bond Epitope Retrieval 2 (розчин на основі етилендіамінтетраоцтової кислоти pH 9,0)	20 хвилин
Блокування ендогенної пероксидази	Розчин Peroxide (Leica)	5 хвилин
Випробування зразка	Антитіла, створені ImmunoGen Inc., в різних концентраціях, приготовлені розведенням в розчиннику для антитіл Leica	15 хвилин
Виявлення	Реактив Post Primary (Leica)	8 хвилин
	Реактив Polymer (Leica)	8 хвилин
	Реактив Mixed DAB (Leica)	10 хвилин
Контрастування	Гематоксилін (Leica)	5 хвилин

15 [0349] Слайди, що містили фіксовані формаліном залиті парафіном (ФФЗП) клітини, нормальні тканини, біоптати пухлин легень пацієнтів і біоптати пухлин яєчників пацієнтів прогрівали при 60 °C та депарафінізували з використанням розчину Bond Dewax і 100 % етанолу. Індуковане нагріванням демаскування епітопів з використанням розчину Bond Epitope Retrieval 2 (розчин на основі етилендіамінтетраоцтової кислоти pH 9,0) виконували протягом 20 хвилин, а ендогенну пероксидазу блокували розчином peroxide протягом 5 хвилин. Слайди інкубували з антитілами, створеними ImmunoGen Inc., або контрольними антитілами muIgG1

20 Leica/Novocastra в різних концентраціях протягом 15 хвилин. Зв'язані антитіла виявляли інкубацією з системою для виявлення Leica Bond Refine. Після нанесення антитіл, слайди інкубували з реактивом Post Primary (антитіло кролика-IgG миші) протягом 8 хвилин, реактивом Polymer (полімер антитіл козла-кролика) протягом 8 хвилин і DAB (тетрагідроклорид 3,3-діамінобензидину) протягом 10 хвилин, що привело до отримання сигналу коричневого забарвлення. Слайди контрастували гематоксиліном протягом 5 хвилин.

25 [0350] ФФЗП зразки тканин походили з блоків тканин людини, отриманих від компанії Proteogenex і Мережі з питань тканин людини (CHTN), як відмічено нижче. ФФЗП зразки клітин походили з лінії клітин KB, що постачається Американською колекцією тканинних культур. Слайди, які містили зрізи зразків, готували з ФФЗП блоків з використанням мікротома,

30 встановленого на 5 мкм, та поміщали на позитивно заряджені слайди. Перед забарвленням цим слайдам давали можливість висохнути на повітрі протягом ночі.

Таблиця 10

Випробувані ФФЗП зразки

Тип тканини людини	Комерційне джерело
Нормальні легені	CHTN
Нормальна підшлункова залоза	CHTN
Нормальна слинна залоза	CHTN
Папілярна серозна аденокарцинома яєчників	Proteogenex
Аденокарцинома легень	CHTN

- [0351] Визначали показники інтенсивності забарвлення FOLR1 та профілів розподілу відносно контрольного забарвлення IgG (неспецифічним). Показники інтенсивності визначали за шкалою від 0 до 3, де 0 = забарвлення немає, 1 = слабе забарвлення, 2 = помірне забарвлення і 3 = сильне забарвлення. Показник однорідності забарвлення визначали як негативний (клітини не проявили позитивного забарвлення), фокальний (забарвлено <25 % клітин), гетерогенний (забарвлено 25-75 % клітин) і гомогенний (забарвлено >75 % клітин). Інтенсивність забарвлення і шкали визначення показників описані нижче. Всі результати забарвлення оцінювалися сертифікованим патологом Комісії.

Таблиця 11

Інтенсивність і однорідність забарвлення

Інтенсивність (величина мембранного забарвлення)		Однорідність (відсоток позитивних клітин)	
0	Негативна	0	Негативна
1	Слабка	Фокальна	<25 %
2	Помірна	Гетерогенна (гетеро)	25-75 %
3	Сильна	Гомогенна (гомо)	>75 %

- Процес відбору з використанням ІГХ для ідентифікації гібридом(и) для ІГХ аналізу ФФЗП FOLR1.
- [0352] Методом ІГХ оцінювали первинні клони, позитивні за результатами FACS на FOLR1-позитивні денатуровані клітини (всього десять клонів). Два клони отримані із злиття 352 (клони 352.1 і 352.2). Шість клонів отримані із злиття 353 (клони 353.1, 353.2, 353.3, 353.5, 353.9, 353.15), а два клони, отримані із злиття 354 (клони 354.1 і 354.2). Супернатанти гібридом збирали з культивованих клітин гібридом та використовували в аналізі. Концентрації антитіл в супернатантах гібридом визначали методом ІФА з використанням антимишачого специфічного до L-ланцюгів поліклонального антитіла для захвату мишачого моноклонального антитіла із супернатанту та антимишачого Fc-специфічного поліклонального антитіла для виявлення захопленого антитіла; зразок мишачого моноклонального IgG1 з відомою концентрацією використовували в якості стандарту для розрахунку концентрації IgG. Як показано, середовище для культивування клітин (нерозбавлене) не заважало методам ІГХ забарвлення (коли середовище використовувалося замість первинного антитіла, то не було відмічено появи фонового/неспецифічного забарвлення). Десять супернатантів (IMGN 352.1, 352.2, 353.1, 353.2, 353.3, 353.5, 353.9, 353.15, 354.1 і 354.2), розведених в різних концентраціях до 10 мкг/мл в розчиннику для антитіл Leica, забарвлювали з використанням відомих позитивних контрольних зразків за FOLR1 (нормальні легені людини, отримані від пацієнта з серозною папілярною аденокарциномою, і клітини KB) та оцінювали для ідентифікації потенціальних позитивних клонів (клони, що відображають на FOLR1-позитивних зразках прийнятне мембранне забарвлення і специфічність). П'ять з десяти клонів проявили прийнятне мембранне забарвлення в FOLR1-позитивних зразках та гарну специфічність. Підходяща концентрація для забарвлення була експериментально визначена для кожного з п'яти потенціальних клонів наступним чином: 353.1 (0,7 мкг/мл), 353.2 (2,3 мкг/мл), 353.3 (2,3 мкг/мл), 353.5 (2 мкг/мл і 10 мкг/мл) та 353.9 (2 мкг/мл і 10 мкг/мл). З 5 клонів, що залишилися, клон 353.15 (забарвлений при 2 і 10 мкг/мл) проявив прийнятне мембранне забарвлення в клітинах KB і тканині нормальних легень; однак, цитоплазматичне забарвлення спостерігалось лише у випробуваній тканині пухлини яєчника пацієнта. Клони 352.1, 352.2 і 354.1 не проявили видимого забарвлення в будь-

яких зразках, а клон 354.2 проявив лише явне неспецифічне цитоплазматичне забарвлення, всі результати визнані неприйнятними.

[0353] Додатково клонували п'ять потенційних клонів. Успішно ідентифікували субклони для чотирьох клонів (353.2, 353.3, 353.5 і 353.9), для клону 353.1 не було створено жодного клону. 5 Всього очистили вісім субклонів. Два субклони отримали з клону 353.5 (353.5-7 і 353.5-10). Два субклони отримали з клону 353.9 (353.9-20 і 353.9-21). Два субклони отримали з клону 353.3 (353.3-8 і 353.3-9), та два субклони отримали з клону 353.2 (353.2-1 і 353.2-12). (Слід відмітити, що ці субклони також названі, відповідно, 5.7, 5.10, 9.20, 9.21, 3.8, 3.9, 2.1 і 2.12). Визначення ІГХ характеристик субклонів виконували з використанням методик, описаних вище (табл. 9, 10 реактиви для ІГХ і умови проведення аналізу) при концентраціях антитіл 2 і 10 мкг/мл. Для восьми субклонів також провели секвенування як описано в прикладі 3, нижче. Потенціальні субклони додатково оцінювали для ідентифікації і ранжування оптимального мембранного забарвлення та специфічності наступним чином: [353.2-1, 353.2-12], [353.9-20, 353.9-21], [353.5-7, 353.5-10] і [353.3-8, 353.3-9] та вибирали для додаткового визначення характеристик 15 (субклони заключені разом у квадратні дужки у відповідності з ідентичністю послідовностей, як описано в прикладі 3).

[0354] Два субклони відбирали для додаткової оптимізації ІГХ аналізу: 353.2-1 і 353.9-20. Обидва антитіла застосовували для забарвлення нормальних легень людини, нормальної слинної залози людини, нормальної підшлункової залози людини, біоптатів раку яєчників 20 пацієнтів, біоптатів недрібноклітинного раку легень (НДРЛ) пацієнтів та біоптатів світлоклітинної карциноми нирок пацієнтів. При оптимальних умовах (див. табл. 12 нижче та фіг. 13) обидва субклони проявили специфічне та належно чутливе забарвлення як нормальних тканин людини, так і пухлинних тканин пацієнтів. Протоки підшлункової залози, респіраторний епітелій нормальних легень та проміжні протоки проявили позитивне асоційоване з мембранами 25 забарвлення. Ацинарні клітини/острівці підшлункової залози, міжальвеолярна тканина легень й ацинарні клітини слинної залози, ймовірно будучи негативними, не проявили позитивного забарвлення з будь-яким субклоном. Пухлинні клітини раку яєчників, НДРЛ та світлоклітинної карциноми нирок, ймовірно будучи позитивними, проявили позитивне асоційоване з мембранами забарвлення, яке було локалізоване в пухлинних клітинах. Субструктури пухлин, 30 ймовірно будучи негативними (строма, судини і лімфоцити), не проявили позитивного забарвлення з 353.2-1 або 353.9-20. Результати додаткового забарвлення нормальних тканин за допомогою 353-2.1 (FOLR1-2.1) зібрані в табл. 13 нижче та показані на фіг. 14. У своїй сукупності, дані за визначенням ІГХ характеристик передбачають, що антитіла 353.2-1 і 353.9-20 є специфічними до FOLR1 в ФФЗП тканинах (див. фіг. 1 і фіг. 2).

Таблиця 12

Оптимізовані умови проведення аналізу

Стадія	Дія/реактив (Постачальник)	Час
Прогрів	Температура: 60 °C	30 хвилин
Депарафінізація	Розчин Bond Dewax (Leica) 100 % етанол (Pharmco Aaper)	Встановлений
Демаскування антигену	Розчин Bond Epitope Retrieval 2 (розчин на основі етилендіамінтетраоцтової кислоти pH 9,0)	20 хвилин
Блокування ендогенної пероксидази	Розчин Peroxide (Leica)	5 хвилин
Випробування зразка	IMGN353.2-1 при 1,5 мкг/мл IMGN353.9-20 при 6,0 мкг/мл	15 хвилин
Виявлення	Реактив Post Primary (Leica)	8 хвилин
	Реактив Polymer (Leica)	8 хвилин
	Реактив Mixed DAB (Leica)	10 хвилин
Контрастування	Гематоксилін (Leica)	5 хвилин

Оптимізовані умови проведення аналізу

Нормальна тканина, структура	Забарвлення 2.1
Наднирники	+
Молочні залози	+
Фалопієва труба, поверхневий епітелій	+
Нирки, каналі	+
Підшлункова залоза, протоки	+
Гіпофіз, гіпофізарні клітини	+
Слинна залоза, проміжні протоки	+
Молочна залоза, сполучна тканина	-
Підслизова та м'язова оболонки стравоходу	-
Око, роговиця	-
Нирки, клубочки	-
Легені, міжальвеолярна сполучна тканина	-
Печінка, гепатоцити	-
Підшлункова залоза, ацинарні клітини	-
Легені, епітелій	-/+
Шлунок, поверхневий епітелій, ямки	-

Приклад 3. Визначення характеристик вибраних анти-FOLR1 антитіл.

- 5 [0355] Як описано вище в прикладі 2 з чотирнадцяти клонів гібридом, вибраних на основі первинного та підтверджуючого скринінгу FACS, десять первинних клонів проаналізували імуногістохімічним (ІГХ) аналізом. З десяти первинних клонів (тобто 352.1, 352.2, 353.1, 353.2, 353.3, 353.5, 353.9, 353.15, 354.1 і 354.2) п'ять були позитивними за результатами ІГХ аналізу (тобто 353.1, 353.2 і 353.3, 353.5 і 353.9) та всі п'ять отримані від одного і того ж злиття (злиття 353). Чотири з п'яти клонів успішно субклонували. Вибрали один субклон первинного клону 353.2 і назвали його 353.2-1 ("2.1"). Вибрали один субклон первинного клону 353.3 і назвали його 353.3-8 ("3.8"). Вибрали один субклон первинного клону 353.5 і назвали його 353.5-7 ("5.7"), та вибрали два субклони первинного клону 353.9 і назвали їх 353.9-20 ("9.20") та 353.9-21 ("9.21"). Для субклонів 9.20 і 9.21 провели секвенування і, як очікувалося, обидва субклони мали одну і ту ж послідовність. На додаток до цього, двоє з клонів, 2.1 і 9.20, депонували в ATCC 16 квітня 2013 р., відповідно, як PTA-120197 та PTA-120196.

Специфічність анти-FOLR1 антитіл, визначена методом вестерн-блот.

- 20 [0356] Специфічність створених антитіл проаналізували методом вестерн-блот з набором лізатів клітин, приготованих з FOLR1-позитивних (Igrov-1, Ovcар-3, Caov-3, Wish і Skov-3) та FOLR1-негативних (BxPC3, Panc-1 і ASPC1) ліній клітин. Для проведення аналізу з лізатами проводили електрофорез у поліакриламідному гелі з ДСН та результати переносили стандартними процедурами на нітроцелюлозну мембрану. Мембрану інкубували з анти-FOLR1 антитілами за даним винаходом та комплекси антиген-антитіло, що утворилися, виявляли вторинними антимишачими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрину (hrp) (фіг. 3). Всі досліджені анти-FOLR1 антитіла впізнавали FOLR1 в лініях клітин з високими рівнями експресії FOLR1 (тобто Igrоv-1 і Wish). FOLR1 в лініях клітин з низькою експресією Ovcар-3, Caov-3 і Skov-3 виявляли лише анти-FOLR1 клонами 2.1 і 9.21; клони 3.8 і 5.7 не забарвлювали ці лізати клітин, ймовірно, через недостатню чутливість антитіл. Цими клонами не виявлено додаткових неспецифічних полос для FOLR1-позитивних ліній клітин; не спостерігалось забарвлення для FOLR1-негативних ліній клітин.

- 30 Зв'язування анти-FOLR1 антитіл з денатурованими та неденатурованими клітинами.

- 35 [0357] Здатність анти-FOLR1 антитіл зв'язуватися з денатурованим та неденатурованим (нативна конформація) FOLR1 проаналізували методом опосередкованого FACS з FOLR1-позитивними клітинами KB і T47D. Клітини збирали розчином Версена і промивали фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS). Денатуровані клітини отримували інкубацією клітин в PBS, який містив 10 % формальдегіду, при 4 °C протягом ночі з подальшим промиванням PBS та інкубацією при 95 °C протягом 30 хв. Потім денатуровані та неденатуровані клітини інкубували з анти-FOLR1 антитілами, розведеними в буферному розчині для FACS (середовище RPMI-1640 з додаванням 2 % нормальної сироватки козла), на льоді протягом 2 годин. Клітини центрифугували, промивали PBS та інкубували протягом 40 хв з FITC-кон'югованим антитілом

козла проти антитіла-IgG миші. Клітини центрифугували знову, промивали PBS та ресуспендували в 0,2 мл PBS, який містив 1 % формальдегід. Асоційовану з клітинами флуоресценцію вимірювали з використанням проточного цитометру FACSCalibur з багатолучним саплером HTS та аналізували з використанням CellQuest Pro (BD Biosciences, м. Сан-Дієго, США). Як показано на фіг. 4, всі анти-FOLR1 антитіла зв'язувалися як з денатурованими, так і з неденатурованими клітинами.

Афінність анти-FOLR1 антитіл, визначена методом ІФА.

[0358] Афінність зв'язування анти-FOLR1 антитіл перевіряли методом ІФА, в якому в якості антигену використовували рекомбінантний білок FOLR1 людини-Fc2a миші. Рекомбінантний білок іммобілізували на планшетах для мікротитрування та на планшети в діапазоні концентрацій додавали антитіла. Планшети інкубували протягом двох годин при кімнатній температурі, промивали PBS з добавкою 0,05 % Твін-20 та інкубували з hrp-міченим антитілом козла проти вторинного антитіла миші протягом однієї години при кімнатній температурі. Планшети знову промивали PBS/Твін-20 та зв'язане hrp-кон'юговане антитіло виявляли додаванням hrp-субстрату ТМБ (Bio-FX). Репрезентативні результати показані на фіг. 5. Анти-FOLR1 антитіла мали подібну афінність до FOLR1 людини при напівмаксимальній ефективній концентрації (EC50) від 0,5 до 0,9 нМ.

Відсутність перехресної реактивності анти-FOLR1 антитіл з FOLR2 і FOLR3.

[0359] FOLR1 є представником родини рецепторів фолієвої кислоти. Перехресну реактивність анти-FOLR1 антитіл з іншими представниками родини FOLR2 і FOLR3 проаналізували методом ІФА. Рекомбінантний білок FOLR2-His або FOLR3-His (R&D Systems) іммобілізували з планшетами Ni-NTA (QIAGEN), на планшети додавали анти-FOLR1 антитіла та інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. В якості позитивних контролів для FOLR2 і FOLR3 використовували, відповідно, поліклональні анти-FOLR2 і FOLR3-антитіла для ІФА (R&D systems). Комплекси антитіло-антиген, що утворилися, виявляли з hrp-міченим антитілом козла проти вторинного антитіла миші. Як показано на фіг. 6, анти-FOLR1 антитіла за даним винаходом не зв'язувалися з FOLR2 або FOLR3; лише контрольні антитіла виявили відповідні антигени.

Приклад 4. Визначення характеристик антигенного епітопу.

[0360] У FOLR1 людини є три потенціальних сайти для N-глікозилювання в положеннях 69, 161 і 201 (UniProt) та, як повідомлялося у літературі, всі три сайти є глікозильованими. Для визначення характеристик природи епітопу, що впізнається анти-FOLR1 антитілами, описаними в цьому документі, експерименти зі зв'язування виконували з деглікозильованим та необробленим рецептором. Із створених анти-FOLR1 клонів у дослідженні використовували лише клон 2.1 через те, що на основі даних секвенування клони є спорідненими та ймовірно зв'язуються з одним і тим же епітопом. На додаток до клону 2.1, двоє інших анти-FOLR1 антитіл включали: huMov19 (WO 2011/106528) і клон BN3.2 (Leica). Для того, щоб деглікозилювати FOLR1, рекомбінантний FOLR1 людини або лізати FOLR1-позитивних клітин KB або Igrov-1 їх обробляли сумішшю ферментів для деглікозилювання (ферментативний набір DeGlycoMX, QA-bio) у відповідності з протоколом виробника. Потім зразки оброблених та необроблених FOLR1 використовували в ІФА та аналізі вестерн-блот. Для проведення ІФА деглікозильовані та необроблені FOLR1 іммобілізували на планшети для ІФА (Immulon) і додавали анти-FOLR1 антитіла FRIHC2-1 ("2.1") або huMov19. Через 2 год. інкубації комплекси антитіло-антиген виявляли з hrp-міченим антитілом козла проти антитіла людини (для huMov19) або проти вторинного антитіла миші (для 2.1) (фіг. 7). Для проведення аналізу вестерн-блот зразки деглікозильованих і необроблених лізатів або рекомбінантного білка huFOLR1 розділяли електрофорезом у поліакриламідному гелі з ДСН та переносили їх стандартними процедурами на нітроцелюлозну мембрану. Мембрану інкубували з анти-FOLR1 антитілами 2.1, huMov19 або BN3.2 та комплекси антиген-антитіло виявляли відповідними вторинними антимишачими або антилюдськими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрину (фіг. 8). Як показано на фіг. 7 та 8 зв'язування антитіла 2.1 з деглікозильованим у порівнянні з необробленим FOLR1 було значно зменшено, з чого можливо припустити, що антитіло зв'язується з глікозалежним епітопом. У протилежність цьому, два інших анти-FOLR1 антитіла, huMov19 і BN3.2, подібним чином зв'язувалися з деглікозильованим та необробленим рецептором, що вказує на те, що (i) білок FOLR1 не був пошкоджений при процедурі деглікозилювання та (ii) huMov19 і BN3.2 впізнають білкові епітопи FOLR1.

Приклад 5. Клонування та секвенування ділянок VL і VH антилюдських FOLR1-антитіл.

[0361] Сумарну клітинну РНК отримували з 5 × 10⁶ клітин FOLR1-гібридом, описаних в прикладі 1, з використанням набору RNeasy (QIAGEN) у відповідності з протоколом виробника. Після цього з сумарної РНК синтезували кДНК восьми субклонів клонів (2.1, 2.12, 3.8, 3.9, 5.7,

5.10, 9.20 і 9.21) з використанням набору для синтезу кДНК SuperScript II (Invitrogen).

[0362] Процедури ПЦР для ампліфікації кДНК варіабельних ділянок антитіл, що походили з клітин гібридом, були засновані на способах, описаних у статтях Wang et al. ((2000) J Immunol Methods. 233:167-77) та Co et al. ((1992) J Immunol. 148:1149-54). Послідовності варіабельного легкого ланцюга (VL) і варіабельного важкого ланцюга (VH) ампліфікували за допомогою вироджених праймерів на 5'-кінці та специфічних праймерів, або мишачої каппа або константної ділянки IgG1, відповідно на 3'-кінці. Потім проводили ПЦР-реакції на 1 % легкоплавкому агарозному гелі з подальшим вирізанням смуг ампліконів від 300 до 400 п.н., які згодом очищали з використанням мініколонок для ДНК компанії Зумо. Очищені амплікони відправляли в компанію Beckman Coulter Genomics для секвенування, використовуючи такі ж 5'- і 3'-праймери ПЦР-реакцій для того, щоб створити послідовності кДНК варіабельних ділянок в обох напрямках.

[0363] Оскільки для клонування послідовностей кДНК VL і VH використовувалися вироджені праймери, що змінюють 5'-кінець, то були потрібні додаткові дослідження з секвенування, щоб перевірити повні послідовності кДНК. Попередні послідовності вводили у пошуковий запит на сайт IgBlast NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) для ідентифікації послідовностей мишачої зародкової лінії, з якої походили послідовності антитіл. Потім конструювали ПЦР-праймери для відпалювання зі зв'язаною із зародковою лінією лідерною послідовністю мишачого антитіла так, щоб ця нова ПЦР-реакція могла на виході дати повну послідовність кДНК варіабельної ділянки, незмінену застосуванням ПЦР-праймерів. ПЦР-реакції, очищення полос та секвенування виконували, як описано вище.

Визначення мас для підтвердження послідовностей.

[0364] Послідовності кДНК варіабельних ділянок, отримані для кожного з анти-FOLR1 антитіл, об'єднували з послідовностями константної ділянки зародкової лінії для отримання послідовностей кДНК повнорозмірних антитіл. Потім розраховували молекулярні маси важкого і легкого ланцюгів для результатів трансляцій послідовностей кДНК та порівнювали їх з молекулярними масами, отриманими РХ/МС-аналізами очищених мишачих анти-FOLR1 антитіл. РХ/МС-аналіз виконували деглікозилюванням та відновленням антитіла для виділення повних ланцюгів пептидів легкого і важкого ланцюга. Молекулярні маси, що спостерігалися, для кожного з важких ланцюгів співпадали з очікуваними, але для кожного з легких ланцюгів була невідповідність на приблизно 85 Да. Подальший аналіз фрагментації пептидів методом РХ/МС фрагментів легких ланцюгів показав, що кінцевий серин лідерного пептиду легкого ланцюга фактично зберігався на зрілому легкому ланцюгу, додаючи близько 87 Да до очікуваної ММ, отже, отримано підтвердження послідовності кДНК для кожного з FOLR1-антитіл.

Складені послідовності CDR для анти-FOLR1 антитіл.

[0365] Вирівнювання послідовностей антитіл для 8 субклонів виявили, що 3 з 4 вихідних гібридом продукували близькоспоріднені, але унікальні антитіла. Як очікувалося, всі з 4 пар дочірніх субклонів були ідентичними. На додаток до цього два набори субклонів також дали ідентичні результати у вигляді 3 унікальних послідовностей антитіл (SEQ ID №:27-32) (2.1, 5.7 і 9.20). Варіабельні каркасні послідовності легких і важких ланцюгів цих 3 унікальних антитіл є близькоспорідненими, але кожне антитіло містить унікальні CDR, ймовірно в результаті соматичних амінокислотних замін (див. нижче табл. 14). Завдяки тому, що виявлено, що ці варіанти CDR мишачих анти-FOLR1 антитіл є функціонально ідентичними, то вони дають деяке структурне розуміння пластичності послідовностей CDR анти-FOLR1 антитіл за даним винаходом. CDR 2 і 3 легких ланцюгів в кожному з антитіл були ідентичними, що дає можливість припустити, що ці сильно консервативні CDR можуть забезпечувати узгоджену структурну основу для зв'язування FOLR1. З іншого боку, амінокислотні заміни в CDR, що залишилися, особливо в CDR 2 і 3 важких ланцюгів, дозволяють припустити, що ці положення є критичними для покращення афінності та специфічності цих антитіл. Специфічні заміни залишків в цих положеннях CDR також представляють приклади залишків, які можуть включатися до версій цих антитіл, що конструюються. В табл. 14 представлені переліки складених послідовностей CDR, скомпільованих з анти-FOLR1 антитіл за даним винаходом. Складені CDR, ідентифіковані в цьому документі, можуть використовуватися для розробки рекомбінантних антитіл, які, як передбачається, можуть зберігати функціональні атрибути анти-FOLR1 антитіл за цим винаходом.

Складені CDR

Складені анти-FOLR1 CDR	
Легкий ланцюг	
CDR1:	KS[T/S][K/E]SLLNSDGFTYLD (SEQ ID №:24)
CDR2:	LVSNHFS (SEQ ID №:25)
CDR3:	FQSNYLPLT (SEQ ID №:26)
Важкий ланцюг	
CDR1:	N[Y/S]YIH (SEQ ID №:21)
CDR2:	WIYP[G/E][S/N][F/V/L]N[V/T][E/R/Q]YN[E/D]KFKA (SEQ ID №:22)
CDR3:	RGIY[F/Y]YSPYA[L/M]D[Y/H] (SEQ ID №:23)

Гуманізація антитіл.

[0366] Антитіла FRIHC2-1 гуманізували, дотримуючись описаних раніше способів зміни поверхні, таких як, наприклад, в статтях Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994) та Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996), які включені в цей документ в повному обсязі як посилання. Зміна поверхні включає ідентифікацію поверхневих залишків каркасу варіабельних ділянок в обох важкому і легкому ланцюгах та заміну їх еквівалентами людського антитіла. В антитілі зі зміненою поверхнею зберігали мишачі CDR. Типові CDR антитіла FRIHC2-1 визначали як вказано в табл. 14. Для мінімізації ускладнень щодо впливу кон'югуючих лізінів, які попадали в CDR, лізін 24 і лізін 27 в CDR1 легкого ланцюга мишачого антитіла FRIHC2-1 замінювали для гуманізованої версії 1.0 аргініном (показано курсивом), таким чином надані обидві версії LC CDR1. На додаток до визначення CDR2 важких ланцюгів за AbM, застосованому для зміни поверхні, в таблиці представлені типові CDR2 важких ланцюгів, визначених за Кабатом, для обох мишачої і людської версій антитіла FRIHC2-1. Підкреслена послідовність відмічає частину CDR2 важкого ланцюга за Кабатом, яка не розглядалася як CDR для зміни поверхні.

[0367] Положення поверхневих залишків визначали як будь-яке положення з відносною доступністю рівною 30 % або більше (Pedersen J.T. et. Al, J. Mol. Biol. 1994; 235: 959-973). Розраховані поверхневі залишки потім піддавали вирівнюванню з поверхневими послідовностями зародкової лінії людини для ідентифікації найбільшої гомологічної поверхневої послідовності людини. В якості заміни поверхні для доменів VL антитіла FRIHC2-1 використовували послідовність зародкової лінії людини IGKV2-30*01, тоді як для заміни поверхні для VH антитіла FRIHC2-1 використовували IHV1-69*10. Зміни специфічних залишків каркасної поверхні для антитіла FRIHC2-1 подані на фіг. 9. Оскільки у переважній версії легкий ланцюг зі зміненою поверхнею включав заміни лізінів CDR1, також була створена версія зі зміненою поверхнею (v1.01) з лізинами антитіла миші, збереженими в CDR-L1. На фіг. 10 показано вирівнювання послідовностей змінених поверхонь для варіабельного домену FRIHC2-1 обох легкого і важкого ланцюга з їх мишачими еквівалентами послідовностей.

[0368] На додаток до гуманізації шляхом зміни поверхні варіабельних доменів, антитіло FRIHC2-1 також гуманізували відповідно з технологією прищеплення визначаючих комплементарність ділянок (CDR) (Jones et al., Nature 321: 604-608 (1986) та Verhoeven et al., Science 239: 1534-1536 (1988)). Спосіб CDR-прищеплення полягає у переносі CDR з антитіла миші, що утворилося у природних умовах, на каркасні ділянки Fv (FR) антитіла людини. Для CDR-прищеплення антитіла FRIHC2-1 використовували схему нумерації Кабат та визначення CDR за Кабатом. Типові CDR FRIHC2-1 для CDR-прищеплення подані в табл. 14. Послідовність імуноглобуліну зародкової лінії людини з найбільшою гомологією до антитіла FRIHC2-1 миші ідентифікували за допомогою інтерактивного засобу, V-QUEST, Міжнародної інформаційної системи ImMunoGeneTics® (IMGT) (<http://imgt.cines.fr/>), як описано в статті Lefranc, Nucleic Acids Res. 29: 207-209 (2001). В якості акцепторних каркасів для VL- і VH-доменів антитіла FRIHC2-1 використовували, відповідно, послідовності зародкової лінії людини IGKV2D-29*02 і IGHV1-2*02. Для мінімізації ускладнень відносно впливу кон'югованих лізінів, які потрапляли до CDR, лізін 24 і лізін 27 в CDR1 легкого ланцюга мишачого антитіла FRIHC2-1 замінювали в CDR-прищеплених конструкціях аргініном (табл. 15). Зміни специфічних каркасних залишків, а також заміна в CDR-L1 в CDR-прищеплюваному антитілі FRIHC2-1 подані на фіг. 11, а результати вирівнювань CDR-прищеплених послідовностей для варіабельних доменів антитіла FRIHC2-1 з їх мишачими еквівалентами послідовностей проілюстровані на фіг. 12.

Таблиця 15

CDR FRIHC2-1 (зі зміненою поверхнею)	CDR FRIHC2-1 (CDR-прищеплені)
Легкий ланцюг	Легкий ланцюг
CDR1 миші зі зміненою поверхнею v1.01: KSSKSLNSDGFTYLD (SEQ ID №:6)	CDR1 CDR-прищеплене миші v1.01: KSSKSLNSDGFTYLD (SEQ ID №:6)
CDR1 зі зміненою поверхнею v1.0: RSSRSLNSDGFTYLD (SEQ ID №:59)	CDR1 CDR-прищеплене миші v1.0: RSSRSLNSDGFTYLD (SEQ ID №:59)
CDR2: LVSNHFS (SEQ ID №:7)	CDR2: LVSNHFS (SEQ ID №:7)
CDR3: FQSNYLPLT (SEQ ID №:8)	CDR3: FQSNYLPLT (SEQ ID №:8)
Важкий ланцюг	Важкий ланцюг
CDR1: NSYIH (SEQ ID №:3)	CDR1: NSYIH (SEQ ID №:3)
CDR2: WIYPESLNTQ (SEQ ID №:60)	CDR2: WIYPESLNTQYNEKFKA (SEQ ID №:4)
CDR3: RGIYYSPYALDH (SEQ ID №:5)	CDR3: RGIYYSPYALDH (SEQ ID №:5)
CDR2 HC FRIHC2-1 за Кабатом	
CDR2 HC миші: WIYPESLNTQYNEKFKA (SEQ ID №:4)	
CDR2 HC зі зміненою поверхнею: WIYPESLNTQYNQKFQG (SEQ ID №:61)	

Приклад 6. ІГХ оцінка антитіла 353-2.1 (FOLR1-2.1) з використанням пухлинних зразків людини.

- 5 [0369] Репрезентативні пухлинні зразки людини раку яєчників (n=63), аденокарциноми легень (n=104) та аденокарциноми ендометрію (n=58) оцінювали на експресію FOLR1 методом ІГХ з використанням антитіла 353-2.1. Інтенсивність забарвлення FOLR1 та розподіл показників зібрані нижче в табл. 16. На фіг. 15 показаний приклад забарвлення тканини пухлини яєчників та аденокарциноми легень антитілом 353-2.1. Ці результати демонструють корисність 353-2.1 як
- 10 специфічного і чутливого антитіла для застосування в ІГХ методах аналізу для ідентифікації пацієнтів як потенціальних кандидатів для терапії FOLR1-таргетуючими агентами (наприклад, IMG853).

Таблиця 16

Розподіл показників (% позитивних)

ТИП ПУХЛИНИ:	РАК ЯЄЧНИКІВ n=63	АДЕНОКАРЦИНОМА ЛЕГЕНЬ n=104	АДЕНОКАРЦИНОМА ЕНДОМЕТРІЮ n=58
Позитивні (будь-яка інтенсивність):	65 %	70 %	64 %
Інтенсивність ≥ 2 рівня з щонайменше 25 % забарвлених пухлинних клітин:	59 %	47 %	33 %
Інтенсивність ≥ 3 рівня з щонайменше 25 % забарвлених пухлинних клітин:	51 %	19 %	14 %

- 15 [0370] Унікальна антигенна специфічність та висока афінність зв'язування антитіла FOLR1-2.1 (FOLR1 353-2.1) додатково продемонстрована з використанням додаткового ІГХ аналізу. У цьому ІГХ аналізі використовували набір для виявлення DAB OptiView на автоматизованому пристрої для забарвлення слайдів Ventana BenchMark XT для напівкількісного визначення експресії білка FOLR1 у фіксованих формаліном залитих парафіном зразках тканин. Аналіз
- 20 оптимізували та валідували щодо специфічності, чутливості і прецизійності з використанням контролів нормальних та пухлинних тканин. В оптимізованих умовах на пухлинних клітинах спостерігали чітке мембранне забарвлення, тоді як нормальні стромальні тканини були повністю негативними (фіг. 16). Додатково в цьому аналізі також досягнутий більш широкий

динамічний діапазон, що тим самим дозволяє отримати краще розрізнення інтенсивності помірного забарвлення (рівень 2, коричневе забарвлення середовища, фіг. 17) від найбільш сильної інтенсивності забарвлення (рівень 3, темно-коричнєве забарвлення середовища, фіг. 17). Збільшений динамічний діапазон покращує можливість ранжування FOLR1-позитивних зразків на основі інтенсивності забарвлення та дає можливість проводити додаткову ідентифікацію субпопуляції пацієнтів з найвищим рівнем експресії FOLR1.

[0371] Порівнювали антитіло BN3.2 (Leica) та антитіло FOLR1-2.1 (FOLR1 353-2.1) з використанням мікроаналізу (ТМА) тканини пухлини яєчників. Використовуючи антитіло BN3.2 (Leica) в ІГХ аналізі (аналіз з BN3.2) близько 50 % зразків (16 з 35) були віднесені до найвищої категорії (рівень 3 інтенсивності забарвлення щонайменше 25 % пухлинних клітин). У протилежність цьому, застосування антитіла FOLR1-2.1 (FOLR1 353-2.1) в ІГХ аналізі, описаному вище, при використанні набору для виявлення DAB OptiView на автоматизованому пристрої для забарвлення слайдів Ventana BenchMark XT (аналіз з FOLR1-2.1), дозволило провести додаткове розділення цих 16 зразків на 2 різні категорії: 6 віднесено до найвищої категорії (рівень 3 інтенсивності забарвлення щонайменше 25 % пухлинних клітин, табл. 17), а решта 10 – до другої найвищої категорії (рівень 2 інтенсивності забарвлення щонайменше 25 % пухлинних клітин, табл. 17). Таким чином, більш адекватне забарвлення, отримане з антитілом FOLR1-2.1 в аналізі з FOLR1-2.1, дозволяє розрізняти згруповані всі разом зразки, визначені з використанням антитіл BN3.2 в аналізі з BN3.2, як зразки з рівнем експресії 3.

Таблиця 17

Порівняння переважання FOLR1 при ракових захворюваннях яєчників ТМА (n=35)

Показник	Аналіз з FOLR1-2.1	Аналіз з BN3.2
Позитивні (будь-яка інтенсивність)	24 (69 %)	28 (80 %)
Інтенсивність \geq рівня 1 з щонайменше 25 % забарвлених пухлинних клітин:	21 (60 %)	27 (77 %)
Інтенсивність \geq рівня 2 з щонайменше 25 % забарвлених пухлинних клітин:	17 (49 %)	25 (71 %)
Інтенсивність \geq рівня 3 з щонайменше 25 % забарвлених пухлинних клітин:	6 (17 %)	16 (46 %)

[0372] Всі публікації, патенти, патентні заявки, інтернет-сайти і номери доступу/послідовності баз даних (включаючи полінуклеотидні і поліпептидні послідовності), які цитовані в цьому документі, тим самим включені у повному обсязі як посилання у всіх смислах у тому ж ступені, як якщо б кожна індивідуальна публікація, патент, патентна заявка, інтернет-сайт або номер доступу/послідовності баз даних була конкретно і самостійно вказана для того, щоб таким чином бути включеною як посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> IMMUNOGEN, INC.

AB, OLGA

TAVARES, DANIEL

SETIADY, JULIANTO

LADD, SHARRON

CARRIGAN, CHRISTINA N

RUI, LINGYUN

<120> АНТИТИЛА ТА МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ РЕЦЕПТОРА ФОЛІЕВОЇ
КИСЛОТИ 1

<130> 2921.044PC03/EKS/CLD

<140> Повинен бути призначений

<141> 2014-08-29

<150> 61/940184

<151> 2014-02-14

<150> 61/875475

<151> 2013-09-09

<150> 61/872407

<151> 2013-08-30

<160> 75

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 257

<212> БИМОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

Ser

<210> 2

<211> 771

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctccttctag tgtgggtggc tgtagtaggg
60

gaggctcaga caaggattgc atgggccagg actgagcttc tcaatgtctg catgaacgcc
120

aagcaccaca aggaaaagcc aggccccgag gacaagttgc atgagcagtg tcgaccctgg
180

aggaagaatg cctgctgttc taccaacacc agccaggaag cccataagga tgtttcctac
240

ctatatagat tcaactggaa ccaactgtgga gagatggcac ctgcctgcaa acggcatttc
300

atccaggaca cctgcctcta cgagtgtctc cccaacttgg gccctggat ccagcaggtg
360

gatcagagct ggcgcaaaga gcgggtactg aacgtgcccc tgtgcaaaga ggactgtgag
420

caatggtggg aagattgtcg cacctcctac acctgcaaga gcaactggca caagggtgg
480

aactggactt caggggttaa caagtgcgca gtgggagctg cctgccaaacc tttccatttc
540

tacttcccca caccactgt tctgtgcaat gaaatctgga ctactccta caaggtcagc
600

aactacagcc gagggagtgg ccgtgtcatc cagatgtggt tcgaccacgc ccagggaac
660

cccaatgagg aggtggcgag gttctatgct gcagccatga gtggggctgg gccctgggca
720

gcctggcctt tctgtcttag cctggcccta atgctgctgt ggctgctcag c
771

<210> 3

<211> 5

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VH-CDR1

<400> 3

Asn Ser Tyr Ile His

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VH-CDR2

<400> 4

Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ala

<210> 5

<211> 13

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VH-CDR3

<400> 5

Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His

1 5 10

<210> 6

<211> 16

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VL-CDR1

<400> 6

Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 7

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VL-CDR2

<400> 7

Leu Val Ser Asn His Phe Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VL-CDR3

<400> 8

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VH-CDR1

<400> 9

Asn Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VH-CDR2

<400> 10

Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ala

<210> 11

<211> 13

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VH-CDR3

<400> 11

Arg Gly Ile Tyr Phe Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 16

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VL-CDR1

<400> 12

Lys Ser Thr Glu Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 13

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VL-CDR2

<400> 13

Leu Val Ser Asn His Phe Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VL-CDR3

<400> 14

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VH-CDR1

<400> 15

Asn Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VH-CDR2

<400> 16

Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Val Asn Val Arg Tyr Asn Asp Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ala

<210> 17

<211> 13

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VH-CDR3

<400> 17

Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 16

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VL-CDR1

<400> 18

Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VL-CDR2

<400> 19

Leu Val Ser Asn His Phe Ser

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VL-CDR3

<400> 20

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Складена VH-CDR1

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Хаа може бути тирозином або серином

<400> 21

Asn Xaa Tyr Ile His

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Складена VH-CDR2

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Хаа може бути гліцином або глутаматом

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Хаа може бути серином або аспарагіном

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Хаа може бути фенілаланіном або валіном, або лейцином

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Хаа може бути валіном або треоніном

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Хаа може бути глутаматом або аргініном, або глутаміном

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Хаа може бути глутаматом або аспартатом

<400> 22

Trp Ile Tyr Pro Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Asn Xaa Lys Phe Lys

1

5

10

15

Ala

<210> 23

<211> 13

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Складена VH-CDR3

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Хаа може бути фенілаланіном або тирозином

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Хаа може бути лейцином або метіоніном

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Хаа може бути тирозином або піктидином

<400> 23

Arg Gly Ile Tyr Xaa Tyr Ser Pro Tyr Ala Xaa Asp Xaa

1 5 10

<210> 24

<211> 16

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Складена VL-CDR1

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Хаа може бути треоніном або серином

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Хаа може бути лізином або глутаматом

<400> 24

Lys Ser Xaa Xaa Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Складена VL-CDR2

<400> 25

Leu Val Ser Asn His Phe Ser
 1 5

<210> 26

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Складена VL-CDR3

<400> 26

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 27

<211> 122

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VH ланцюг

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Lys Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

UA 120166 C2

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

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

Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 114

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VL ланцюг

<400> 28

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

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn

UA 120166 C2

20

25

30

Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

65

70

75

80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln

85

90

95

Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100

105

110

Lys Arg

<210> 29

<211> 122

<212> БИЖОК

<213> Методика обработки данных

<220>

<223> muFRIHC5-7 VH ланцюг

<400> 29

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Phe Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 114

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VL ланцюг

<400> 30

Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile

1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Glu Ser Leu Leu Asn

20 25 30

Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val

50 55 60

UA 120166 C2

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln
85 90 95

Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val
100 105 110

Lys Arg

<210> 31

<211> 122

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VH ланцюг

<400> 31

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

UA 120166 C2

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Val Asn Val Arg Tyr Asn Asp Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 114

<212> БІЛІОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VL ланцюг

<400> 32

Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn
20 25 30

Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln
85 90 95

UA 120166 C2

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

Lys Arg

<210> 33

<211> 446

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRHC2-1 повнорозмірний важкий ланцюг

<400> 33

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp
100 105 110

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His

420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 34

<211> 220

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 повнорозмірний легкий ланцюг

<400> 34

Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile

1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn

20 25 30

Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val

50 55 60

UA 120166 C2

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln
85 90 95

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

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
145 150 155 160

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr

UA 120166 C2

180 185 190

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
195 200 205

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215 220

<210> 35

<211> 446

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 повнорозмірний важкий ланцюг

<400> 35

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

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

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

UA 120166 C2

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Phe Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro

UA 120166 C2

165	170	175	
Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val			
180	185	190	
Pro Ser Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His			
195	200	205	
Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys			
210	215	220	
Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe			
225	230	235	240
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro			
245	250	255	
Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val			
260	265	270	
Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr			
275	280	285	

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

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

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

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

<210> 36

<211> 220

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 повнорозмірний легкий ланцюг

<400> 36

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

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Glu Ser Leu Leu Asn
 20 25 30

Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

UA 120166 C2

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln
85 90 95

Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val
100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
145 150 155 160

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

UA 120166 C2

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

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
195 200 205

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215 220

<210> 37

<211> 446

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRHC9-20 повнорозмірний важкий ланцюг

<400> 37

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

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

UA 120166 C2

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Val Asn Val Arg Tyr Asn Asp Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp

405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His

420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 38

<211> 220

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 повнорозмірний легкий ланцюг

<400> 38

Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu

1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn

20 25 30

Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

UA 120166 C2

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln
85 90 95

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

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
145 150 155 160

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp

UA 120166 C2

165

170

175

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr

180

185

190

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr

195

200

205

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

215

220

<210> 39

<211> 366

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VH ланцюг

<400> 39

cagggtccaac tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaggata
60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca aactcctata ttcactgggt gaaaaagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg aaagtcttaa tactcaatac
180

aatgagaagt tcaaggccaa gccacactg actgctgaca agtcctccag cacatcctac
240

atgcagctca gcagtctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaggggt
300

atttattact actctcccta tgctctggac cactggggtc aaggagcctc agtcaccgtc
360

tcttca
366

<210> 40

<211> 342

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC2-1 VL ланцюг

<400> 40

agtgatgttg ttctgaccca aactccactc tctctgcctg tcaatattgg agatcaagcc
60

tctatctctt gcaagtcttc taagagtctt ctgaatagtg atggattcac ttatttggac
120

tggtacctgc agaagccagg ccagtctcca cagctcctaa tatatttggg ttctaatacat
180

ttttctggag ttccagacag gttcagtggc agtgggtcag gaacagattt cacactcaag
240

atcagcagag tggaggctga ggatttggga gtttattatt gcttccagag taactatctt
300

cctctcacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gg
342

<210> 41

<211> 366

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VH ланцюг

<400> 41

caggtccaac tgcagcagtc tggacctgag gtggtgaagc ctggggcttc agtgaggata
60

tcttgaagg ctcttggtca caccttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg gaagttttaa tgttgagtac
180

aatgagaagt tcaaggccaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagtctac
240

atgcaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaggggt
300

atttatttct actctcccta tgctttggac tactggggtc aaggagcctc agtcaccgtc
360

tcctca
366

<210> 42

<211> 342

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC5-7 VL ланцюг

<400> 42

agtgatgttg ttctgaccca aactccactc tctctgcctg tcaatattgg agatcaagcc
60

tctatctctt gcaagtctac tgagagtctt ctgaatagtg atggattcac ttatttggac
120

tggtacctgc agaagccagg ccagtctcca cagctcctaa tatatttggg ttctaatacat
180

ttttctggag ttccagacag gttcagtggc agtgggtcag gaacagattt cacactcaag
240

atcagcagag tggaggctga ggatttggga gtttattatt gcttccagag taactatctt
300

cctctcacgt tcggaggggg gaccaagctg gaagtaaaac gg
342

<210> 43

<211> 366

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VH ланцюг

<400> 43

cagggtccaac tgcagcagtc tggacctgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaggata
60

tcctgcaagg cttctggctt caccttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg aaaatgtaa tgtaggtac
180

aatgacaagt tcaaggccaa ggccacctg actgcagaca aatcctccag cacagcctac
240

atgcagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaggggt
300

atttattact actctcccta tgctatggac tactggggtc aaggagcctc agtcaccgtc
360

tcctca
366

<210> 44

<211> 342

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muFRIHC9-20 VL ланцюг

<400> 44

agtgatgttg ttctgaccca aactccactc tctctgcctg tcaatcttgg agatcaagcc
60

tctatctctt gcaagtctac taagagtctt ctgaatagtg atggattcac ttatttggac
120

tggtaacctgc agaagccagg ccagtctcca cagctcctaa tatatttggg ttctaatacat
180

ttttctggag ttccagacag gttcagtggc agtgggtcag gaacagattt caccctcaag
240

atcagcagag tggaggctga ggatttggga gtttattatt gcttccagag taactatctt
300

cctctcacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gg
342

<210> 45

<211> 118

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vHC

<400> 45

UA 120166 C2

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46

<211> 112

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vLCv1.00

<400> 46

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

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

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser

65 70 75 80

UA 120166 C2

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

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

<210> 47

<211> 112

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vLCv1.60

<400> 47

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

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

<210> 48

<211> 15

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vLC CDR1

<400> 48

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

<210> 49

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vLC CDR2

<400> 49

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1

5

<210> 50

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vLC CDR3

<400> 50

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 51

<211> 5

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vHC CDR1

<400> 51

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

<210> 52

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vHC CDR2 - визначений за Кабатом

<400> 52

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

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 10

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vHC CDR2 - визначений за Abm

<400> 53

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe

1 5 10

<210> 54

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vHC CDR3

<400> 54

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 55

<211> 448

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 HC амінокислотна послідовність

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

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

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

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

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

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

355

360

365

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

370

375

380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385

390

395

400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405

410

415

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

420

425

430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

445

<210> 56

<211> 218

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 LCv1.00

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115

120

125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130

135

140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145

150

155

160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165

170

175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180

185

190

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

195

200

205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 57

<211> 218

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 LCv1.60

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

UA 120166 C2

100	105	110	
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
115	120	125	
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
130	135	140	
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
145	150	155	160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
165	170	175	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
180	185	190	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
195	200	205	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		

<210> 58

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muMov19 vHC CDR2 - визначений за Кабатом

<400> 58

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

1 5 10 15

Asp

<210> 59

<211> 16

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> FRIHC2-1 зі зміненою поверхнею або з прищепленим CDR1 v1.0
легкого ланцюга

<400> 59

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 60

<211> 10

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> FRIHC2-1 зі зміненою поверхнею CDR2 важкого ланцюга

<400> 60

Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln

1 5 10

<210> 61

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> FRIHC2-1 зі зміненою поверхнею HC CDR2

<400> 61

Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 122

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 (зі зміненою поверхнею) VH ланцюг

<400> 62

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

<211> 113

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (зі зміненою поверхнею) VL ланцюг

<400> 63

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

UA 120166 C2

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
85 90 95

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

Arg

<210> 64

<211> 113

<212> ВІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (зі зміненою поверхнею) VL ланцюг

<400> 64

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
85 90 95

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

Arg

<210> 65

<211> 125

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRHC2-1 (прищеплене) VH ланцюг

<400> 65

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

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

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

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

UA 120166 C2

Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp
100 105 110

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

<210> 66

<211> 112

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (прицеплене) VL ланцюг

<400> 66

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser

UA 120166 C2

20

25

30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser

85

90

95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 67

<211> 112

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (прицеплене) VL ланцюг

<400> 67

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
85 90 95

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

<210> 68

<211> 442

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muhMov19 повнорозмірний важкий ланцюг

<400> 68

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

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro

UA 120166 C2

210	215	220	
Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro			
225	230	235	240
Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys			
	245	250	255
Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp			
	260	265	270
Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu			
	275	280	285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met			
	290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser			
305	310	315	320
Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly			
	325	330	335

UA 120166 C2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 69

<211> 218

<212> BIJOK

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> muhuMov19 повнорозмірний легкий ланцюг

<400> 69

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

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

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

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

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

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

UA 120166 C2

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

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

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

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

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 180 185 190

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

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 70

<211> 452

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 (зі зміненою поверхнею) VH ланцюг

<400> 70

aagcttgcca ccatgggttg gagctgcatt atccttttcc ttgtggctac agctactggc
60

gttcactctc aggtacaatt ggttcagtca ggagccgagg tcgtaaagcc cggtgccagt
120

gtgaagatct catgcaaggc aagcggttat acttttaca actcttacat tcattgggtg
180

aaaaagcggc cgggccaggg tctcgaatgg atcggctgga tctaccaga aagtctgaac
240

actcaataca accagaagtt tcagggttaag gcaactctca ctgccgacaa gagctctagc
300

acaagctata tgcagttgtc tagtttgaca agcgaggata gcgcagttta cttttgtgct
360

cggcgtggta tttattacta ctcaccttat gctctggatc actggggaca gggtcctct
420

gttaccgttt ccagtgcac caccaagggc cc
452

<210> 71

<211> 452

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRHC2-1 (прищеплене) VH ланцюг

<400> 71

aagcttgcca ccatgggctg gagctgcata atcctcttcc tcgtagctac cgccactggg
60

gtgcattctc aagtacagtt ggtgcagtcc ggagctgaag tcaagaagcc aggggcttct
120

gttaaggatga gctgtaaggc ttccggatat accttcacaa acagttatat ccattgggtg
180

aggcaagctc caggccaggg tctcgaatgg atgggatgga tctaccccgga gagtctgaac
240

accagttaca acgagaagtt caaggcacgt gtgaccatga caagagacac ctccatcagt
300

acagcctata tggaaattgag ccgtctcaga agtgatgata cagcagtgtg ctactgcgcc
360

aggcggggca tctactacta cagcccatat gctctcgacc actggggaca aggaacactg
420

gtaaccgtaa gctcagcttc tacaagggc cc
452

<210> 72

<211> 411

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (зі зміненою поверхнею) VL ланцюг

<400> 72

gaattcgcca ccatgggttg gtcattgata atacttttcc tggtagctac tgctactggt
60

gtgcattcag atgtgggtct gactcagtc ccttctctc tcccagtc aa tcttgggcag
120

ccagcatcta tcagctgccg aagcagcagg tctctctga actccgatgg ctttacttat
180

cttgactggt atctccagaa gccaggacag tccccccggc tgctcatcta cctgggttct
240

aatcatttta gtggcgctcc tgaccgcttc tctgggagtg gaagtgggac cgattttaca
300

ctgaagatct ccagggtcga agctgaggac cttgggggtt actactgttt ccagagcaac
360

taccttcct tgacattcgg ccagggaacc aagctggaaa tcaagcgtac g
411

<210> 73

<211> 411

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (зі зміненою поверхнею) VL ланцюг

<400> 73

gaattcgcca ccatgggttg gtcttgatc attctgttcc tggtcgccac tgccacagga
60

gttcactcag acgtggtact cacacaatct cccctttccc tgcctgtgaa cctgggacag
120

ccagcctcaa tcagttgcaa gagctctaaa tctctgtcca atagcgatgg ctttacctac
180

ttggattggg acctccagaa gcccggccag tctcctcggc tcctgattta ccttgtttca
240

aatcactttt caggcgtgcc tgaccggttc tccggatctg gctcagggac agacttcacc
300

ctgaagatct cccgcgtcga ggcagaggat ctcggcgtgt attactgttt ccaaagtaac
360

tacctgccat tgacttttgg acaaggaact aaactgaaa tcaaacgtac g
411

<210> 74

<211> 411

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (прищеплене) VL ланцюг

<400> 74

gaattcgcca ccatgggatg gagttgtatt attctgttct tggtcgctac tgcaacaggc
60

gttcattctg acatcgtaat gaccagaca cctctgagtc tgagtgtcac tcccgccag
120

cccgctcta tttcatgtcg tagctctcgc tccctgctca attccgacgg ttttacctac
180

ttggactggt atcttcagaa acctgggcag agccctcagc ttctgatcta tctggtgtcc
240

aatcacttca gtggcgctcc agaccgattt tccggaagcg gaagcggaac cgactttacc
300

ctgaagatat cccgcgtcga agcagaggac gtgggcgtgt attattgctt tcaaagcaat
360

tacttgccat tgactttcgg acaaggcaca aaactggaga ttaagcgtac g
411

<210> 75

<211> 411

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (прищеплене) VL ланцюг

<400> 75

gaattcgcca ccatgggctg gtcatgcac atactgttcc tggaggctac agcaaccggg
60

gtgcacagcg atattgttat gacacagaca ccactgagtt tgtagtgac ccccgccag
120

ccagcctcta tatcctgcaa gtcctcaaaa agtctcctga atagcgatgg ctttacctac
180

ctcgactggg atcttcagaa gcccggtcaa agccctcagc tgctgatata tctggtgtct
240

aaccatttta gcggagtcgc cgaccgcttt tcagggtccg gcagtggtac cgacttcacc
300

cttaagattt ctgcgctgga ggctgaagat gtaggggtct actactgttt ccagtcaaac
360

tacctgccac tgacctttgg tcaaggcact aagctcgaaa ttaagcgtag g
411

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) CDR1, CDR2 та CDR3 і варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) CDR1, CDR2 та CDR3, де вказані послідовності являють собою SEQ ID NOs:21-26, відповідно.
- 10 2. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що специфічно зв'язується з епітопом FOLR1, що містять N-глікозиловану амінокислоту, де антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить ділянки CDR1-3 VH та CDR1-3 VL та специфічно зв'язується з тим же самим епітопом FOLR1 або конкурентно інгібує зв'язування з FOLR1 антитіла, що містить VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27, і VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28.
- 15 3. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за п. 1 або п. 2, де антитіло або його фрагмент містить поліпептидні послідовності CDR1-3 VH і CDR1-3 VL, вибрані з групи, яка складається з:
SEQ ID NOs:3-8, відповідно;
SEQ ID NOs:9-14, відповідно;
SEQ ID NOs:15-20, відповідно;
- 20 SEQ ID NOs:3-5 та SEQ ID NOs:59, 7 і 8, відповідно;
SEQ ID NOs:3, 60 і 5, та SEQ ID NOs:6-8, відповідно;
SEQ ID NOs:3, 61 і 5, та SEQ ID NOs:6-8, відповідно;
SEQ ID NOs:3, 60 і 5, та SEQ ID NOs:59, 7 і 8, відповідно, та
SEQ ID NOs:3, 61 і 5, та SEQ ID NOs:59, 7 і 8, відповідно.
- 25 4. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить поліпептидні послідовності VH і VL, що містять амінокислотні послідовності, вибрані з групи, яка складається з:
SEQ ID NO:27 і SEQ ID NO:28, відповідно;
SEQ ID NO:29 і SEQ ID NO:30, відповідно;
- 30 SEQ ID NO:31 і SEQ ID NO:32, відповідно;

SEQ ID NO:62 і SEQ ID NO:63 або SEQ ID NO:64, відповідно;
 SEQ ID NO:65 і SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:67, відповідно; і
 SEQ ID NO:68 і SEQ ID NO:69, відповідно.

5. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-4, де антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить:
 - (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34;
 - (b) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; або
 - (c) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38.
6. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що специфічно зв'язуються з FOLR1, де антитіло або його фрагмент містить:
 - гуманізовану варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить ділянки CDR1, CDR2 і CDR3, які містять амінокислоти SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52 або 53, та SEQ ID NO:54, відповідно,
 - гуманізовану варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить ділянки CDR1, CDR2 і CDR3, які містять амінокислоти SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 і SEQ ID NO:50, відповідно, та константну ділянку миші.
7. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за п. 6, у якому гуманізована варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислоти SEQ ID NO:45, і гуманізована варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислоти SEQ ID NO:47.
8. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5, де антитіло одержане рекомбінантним способом.
9. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5 або 8, де антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент є мишачим, гуманізованим, химерним, зі зміненою поверхнею або людським.
10. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5, 8 або 9, де антитіло зв'язується з FOLR1 людини, але не з FOLR2 або FOLR3.
11. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5 або 8-10, що являє собою повнорозмірне антитіло.
12. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5 або 8-10, що являє собою антигензв'язуючий фрагмент.
13. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5 або 8-12, що зв'язується з рецептором фолієвої кислоти 1 людини з Kd від приблизно 0,5 до приблизно 10 nM.
14. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5 або 8-13, що зв'язується з рецептором фолієвої кислоти 1 людини з Kd близько 1,0 nM або краще.
15. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5 або 8-14, де антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент мічені здатною до виявлення міткою.
16. Спосіб створення антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента за будь-яким з пп. 1-15, який включає (a) культивування клітини, що продукує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-15; та (b) виділення вказаного антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента з вказаної культивованої клітини.
17. Композиція, яка містить антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5 або 8-15 та буферний розчин, вибраний з групи, яка складається з: буферного розчину для FACS, буферного розчину для ІГХ і буферного розчину для ІФА.
18. Спосіб *in vitro* виявлення експресії FOLR1 у зразку, який включає приведення у контакт вказаного зразка з антитілом або його антигензв'язуючим фрагментом за будь-яким з пп. 1-5 або 8-15 або композицією за п. 17.
19. Спосіб за п. 18, у якому антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент мітять здатною до виявлення міткою.
20. Спосіб за п. 19, у якому мітку вибирають з групи, яка складається з імуофлуоресцентної мітки, хемілюмінесцентної мітки, фосфоресцентної мітки, ферментної мітки, радіомітки, авідину/біотину, колоїдних частинок золота, забарвлених частинок і магнітних частинок.
21. Спосіб за п. 18, у якому експресію FOLR1 визначають радіоімуноаналізом, аналізом вестерн-блот, цитометрією, імуофлуоресцентним аналізом, імуоферментним аналізом, аналізом імуопреципітації, хемілюмінесцентним аналізом або імуогістохімічним аналізом.
22. Спосіб за п. 21, у якому цитометрія являє собою проточну цитометрію.
23. Спосіб за п. 21, у якому експресію FOLR1 визначають методом ІГХ.

24. Застосування діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:45 та VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:47, у виготовленні лікарського засобу для збільшення ефективності терапії раку у суб'єкта, де у злویкісному зразку, отриманому від вказаного суб'єкта, була виявлена збільшена експресія FOLR1, з використанням антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента за будь-яким з пп. 1-5 або 8-15, або композиції за п. 17.
25. Застосування діючої речовини, що містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:45 та VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:47, у виготовленні лікарського засобу для лікування раку у пацієнта, де у злویкісному зразку, отриманому від вказаного пацієнта, був визначений показник експресії FOLR1 за виявленою експресією FOLR1, з використанням антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента за будь-яким з пп. 1-5 або 8-15, або композиції за п. 17; причому зазначений показник вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини.
26. Застосування за п. 24 або п. 25, у якому вказаний злویкісний зразок або біологічний зразок являє собою фізіологічну рідину, клітину або зразок тканини.
27. Застосування за п. 26, у якому вказана фізіологічна рідина являє собою кров, асцит, сечу, плазму, сироватку або периферійну кров.
28. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 18-27, у якому FOLR1 являє собою мембранний FOLR1.
29. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 18-27, у якому FOLR1 являє собою скинутий FOLR1.
30. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 18-20 або 24-27, у якому виявлення виконують методом імуноферментного твердофазного аналізу (ІФА).
31. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 18-20, 24-26 або 28, у якому виявлення виконують методом імуногістохімії (ІГХ).
32. Спосіб або застосування за п. 31, у якому метод ІГХ являє собою калібрований метод ІГХ, який може розрізняти різні рівні експресії FOLR1.
33. Спосіб або застосування за п. 31 або 32, у якому при вказаному ІГХ-аналізі отримують діапазон інтенсивності забарвлення зразків, які мають низьку експресію FOLR1 на клітинній поверхні, середню експресію FOLR1 на клітинній поверхні або високу експресію FOLR1 на клітинній поверхні.
34. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 31-33, у якому при вказаному ІГХ-аналізі розрізняють інтенсивність забарвлення та однорідність забарвлення в експресуючому FOLR1 злویкісному зразку або біологічному зразку у порівнянні з еталонним зразком.
35. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 31-34, у якому ІГХ-аналіз виконують вручну.
36. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 31-34, у якому ІГХ-аналіз виконують з використанням автоматизованої системи.
37. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 31-36, у якому показник FOLR1 визначають при ІГХ-аналізі.
38. Спосіб або застосування за п. 37, у якому показник, рівний щонайменше 2 у 25 % або більше клітин, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.
39. Спосіб або застосування за п. 38, у якому показник, рівний щонайменше 2 гомо, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.
40. Спосіб або застосування за п. 38, у якому показник, рівний щонайменше 2 гетеро, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримає користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.
41. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 38-40, у якому ракове захворювання являє собою рак легень, рак яєчників, рак очеревини або рак ендометрію.
42. Спосіб або застосування за п. 38, у якому показник, рівний щонайменше 3 у 25 % або більше клітин, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує,

що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

43. Спосіб або застосування за п. 38, у якому показник, рівний щонайменше 3 гомо, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

44. Спосіб або застосування за п. 38, у якому показник, рівний щонайменше 3 гетеро, ідентифікує ракове захворювання як таке, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

45. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 42-44, у якому ракове захворювання являє собою рак легень, рак ендометрію, рак очеревини або рак яєчників.

46. Спосіб або застосування за п. 38, у якому ракове захворювання являє собою рак яєчників, і при цьому щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 з інтенсивністю щонайменше 2 ідентифікує рак яєчників як такий, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

47. Спосіб або застосування за п. 38, у якому ракове захворювання являє собою рак очеревини, і при цьому щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 з інтенсивністю щонайменше 2 ідентифікує рак очеревини як такий, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

48. Спосіб або застосування за п. 38, у якому ракове захворювання являє собою рак яєчників або рак очеревини, і при цьому щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 з інтенсивністю щонайменше 2 ідентифікує рак яєчників або рак очеревини як такі, що ймовірно піддаються лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

49. Спосіб або застосування за п. 38, у якому ракове захворювання являє собою рак яєчників, і при цьому щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 з інтенсивністю щонайменше 3 ідентифікує рак яєчників як такий, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

50. Спосіб або застосування за п. 38, у якому ракове захворювання являє собою недрібноклітинний рак легень або рак ендометрію, і при цьому щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 з інтенсивністю щонайменше 2 ідентифікує недрібноклітинний рак легень або рак ендометрію як такий, що ймовірно піддається лікуванню діючою речовиною, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або вказує, що пацієнт отримує користь від введення діючої речовини, яка містить анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

51. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 33-50, у якому еталонний зразок являє собою позитивний еталонний зразок або негативний еталонний зразок.

52. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 33-51, у якому еталонний зразок містить клітини, осади клітин або тканину.

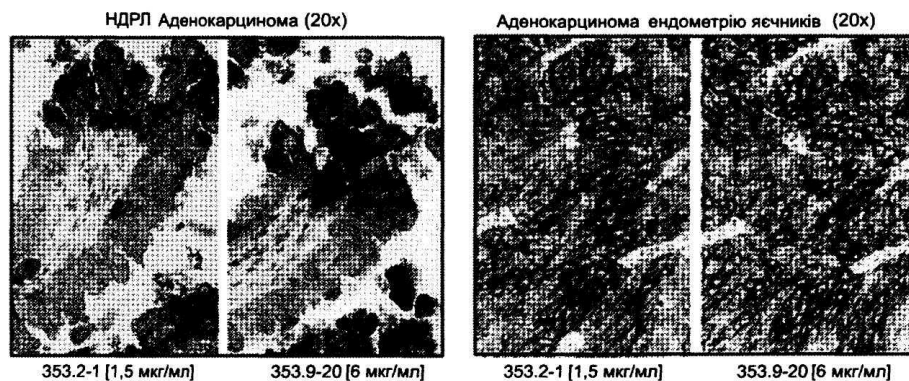
53. Спосіб або застосування за будь-яким з пп. 33-52, у якому антитіло, його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-5 або 8-14, додатково містить реактив для виявлення, вибраний з групи, яка складається з: ферменту, флуорофору, радіоактивної мітки і люмінофору.

54. Спосіб або застосування за п. 53, у якому реактив для виявлення вибраний з групи, яка складається з: біотину, дигоксигеніну, флуоресцеїну, тритію і родаміну.

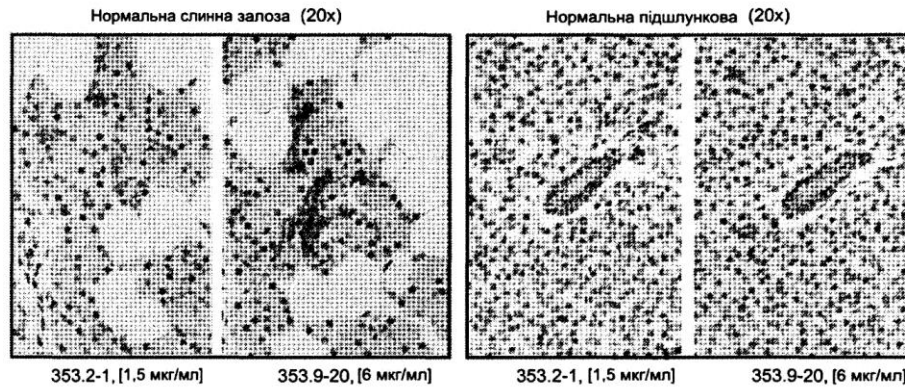
55. Застосування за будь-яким з пп. 24-54, у якому ракове захворювання являє собою FOLR1-позитивний рак.

56. Застосування за будь-яким з пп. 24-55, у якому ракове захворювання вибране з групи, яка складається з раку яєчників, головного мозку, молочної залози, матки, ендометрію, підшлункової залози, нирок і легень.

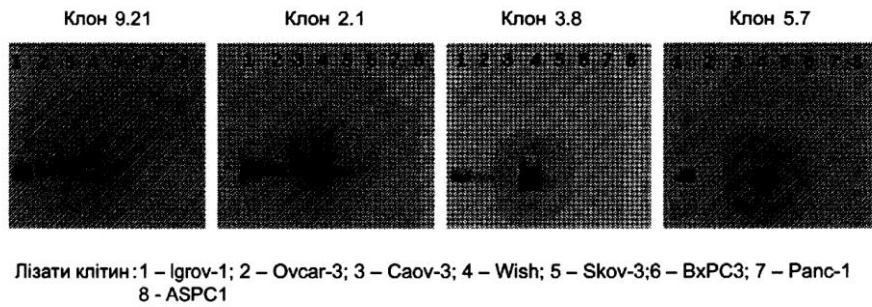
57. Застосування за п. 45, у якому рак легень являє собою недрібноклітинний рак легень або бронхіолоальвеолярну карциному.
58. Застосування за п. 45, у якому рак яєчників являє собою епітеліальний рак яєчників.
59. Застосування за п. 58, у якому ракове захворювання є стійким до лікування препаратами платини, рецидивуючим або рефрактерним.
60. Застосування за будь-яким з пп. 24-59, у якому вказану експресію FOLR1 виявляють, використовуючи щонайменше одне додаткове анти-FOLR1 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.
61. Застосування за п. 60, у якому експресію FOLR1 вимірюють, використовуючи два анти-FOLR1 антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти.
62. Застосування за п. 60 або 61, у якому щонайменше одне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язані з твердою підкладкою.
63. Застосування за п. 60 або 61, у якому щонайменше одне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язані з планшетом для мікротитрування.
64. Застосування за будь-яким з пп. 60-63, у якому щонайменше одне додаткове антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить агент для виявлення.
65. Застосування за п. 64, у якому агент для виявлення являє собою хромогенний агент для виявлення, флуорогенний агент для виявлення, ферментний агент для виявлення або електрохемілюмінесцентний агент для виявлення.
66. Застосування за п. 64 або 65, у якому агент для виявлення являє собою пероксидазу хрону (HRP).
67. Спосіб або застосування за п. 30, у якому ІФА являє собою "сендвіч"-ІФА.
68. Застосування за будь-яким з пп. 24-67, у якому діюча речовина додатково містить майтанзиноїд DM4 і сульфо-SPDB лінкер.
69. Спосіб ідентифікації ракового захворювання як сприйнятливо до лікування кон'югатом антитіло-майтанзиноїд, який містить анти-FOLR1 антитіло, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:45 і варіабельну ділянку легкого ланцюга з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:47, майтанзиноїд DM4 і сульфо-SPDB лінкер (IMGN853), причому спосіб включає вимірювання FOLR1 з використанням антитіла, що містить важкий ланцюг, який містить амінокислоти SEQ ID NO:27, і легкий ланцюг, який містить амінокислоти SEQ ID NO:28, в ІГХ-аналізі, при цьому щонайменше 25 % експресії мембранного FOLR1 з інтенсивністю щонайменше 2 вказує на те, що ракове захворювання є сприйнятливим до лікування.
70. Спосіб за п. 69, де ракове захворювання являє собою епітеліальний рак яєчників.
71. Спосіб за п. 69, де ракове захворювання являє собою рак очеревини.



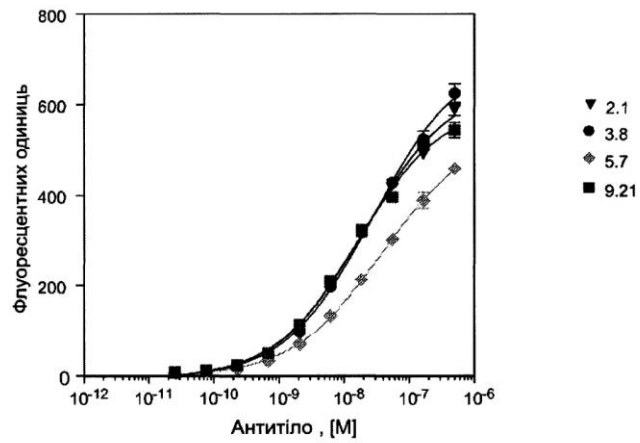
ФІГ. 1.



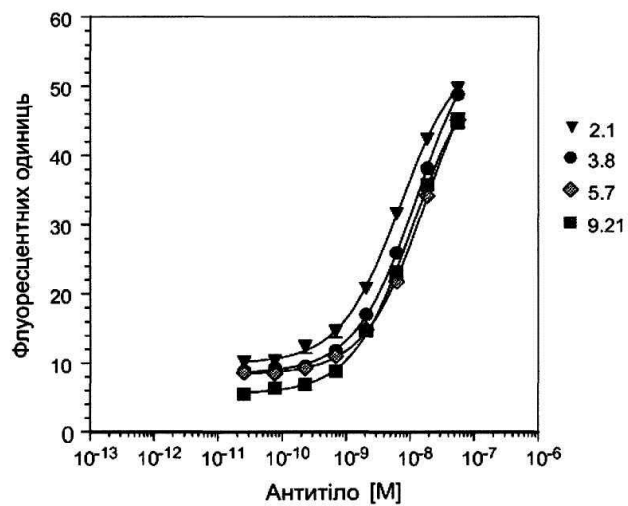
ФІГ. 2.



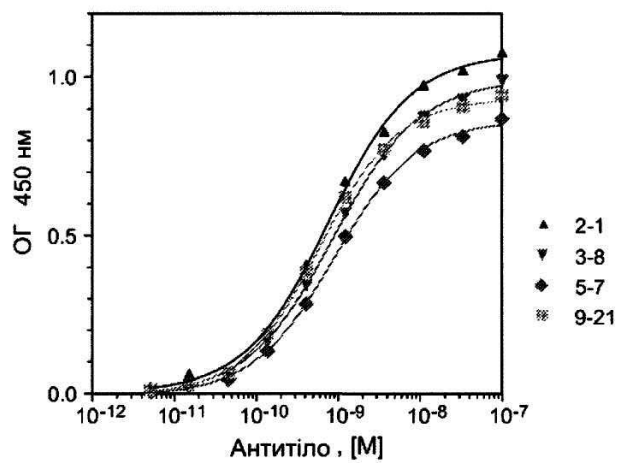
ФІГ. 3.



ФІГ. 4А.

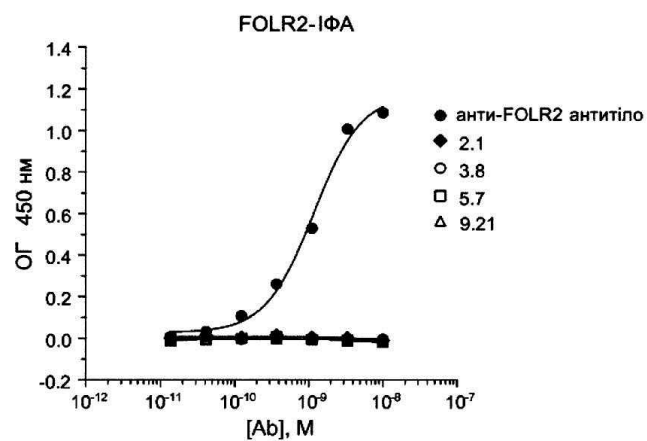


ФІГ. 4В.

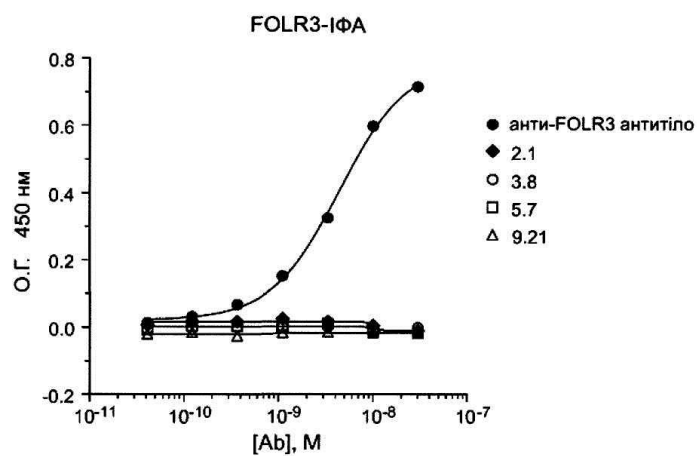


Клон	EC50, нМ
2.1	0,5
3.8	0,7
5.7	0,9
9.21	0,7

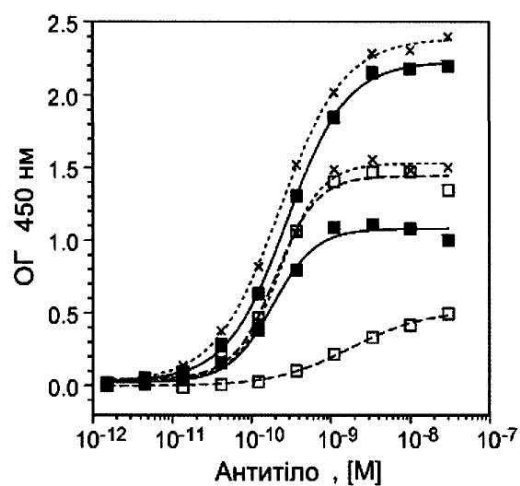
ФІГ. 5.



ФІГ. 6А.

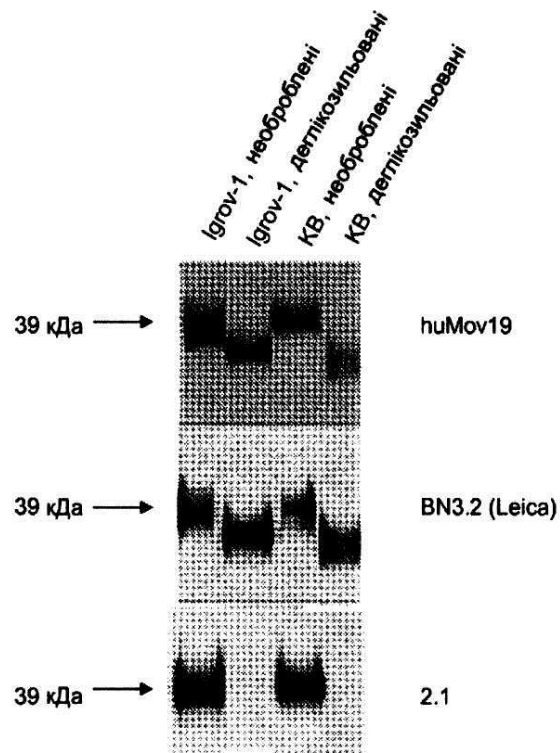


ФІГ. 6В.



- huMov19, зв'язування з необробленим FOLR1
- x huMov19, зв'язування з необробленим FOLR1, інкубованим у буферному розчині для деглікозилювання (без додавання ферментів деглікозилювання)
- huMov19, зв'язування з деглікозильованим FOLR1 у буферному розчині для деглікозилювання
- 2.1, зв'язування з необробленим FOLR1
- x 2.1, зв'язування з необробленим FOLR1, інкубованим у буферному розчині для деглікозилювання (без додавання ферментів деглікозилювання)
- 2.1, зв'язування з деглікозильованим FOLR1 у буферному розчині для деглікозилювання

ФІГ. 7.



ФІГ. 8.

Зміна поверхні FRIHC2-1

FRIHC2-1- V _L			
Положення за Кабатом	Залишок мишачого антитіла	Залишок людського v 1.0	Залишок людського v 1.01
1	D	D	D
3	V	V	V
7	T	<u>S</u>	<u>S</u>
9	L	L	L
15	I	<u>L</u>	<u>L</u>
17	D	<u>Q</u>	<u>Q</u>
18	Q	<u>P</u>	<u>P</u>
40	P	P	P
41	G	G	G
42	K	K	K
45	Q	<u>R</u>	<u>R</u>
57	G	G	G
60	D	D	D
67	S	S	S
77	R	R	R
81	E	E	E
100	G	<u>Q</u>	<u>Q</u>
103	K	K	K
107	K	K	K
108	R	R	R
24	K	<u>R</u>	K
27	K	<u>R</u>	K

FRIHC2-1- V _H		
Положення за Кабатом	Залишок мишачого антитіла	Залишок людського антитіла
1	Q	Q
3	Q	Q
5	Q	<u>V</u>
9	P	<u>A</u>
11	L	<u>V</u>
13	K	K
14	P	P
19	R	<u>K</u>
23	K	K
28	T	T
41	P	P
42	G	G
43	Q	Q
61	E	<u>Q</u>
62	K	K
64	K	<u>Q</u>
65	A	<u>G</u>
73	K	K
74	S	S
82b	S	S
84	S	S
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

ФІГ. 9.

Результати вирівнювання за змінами поверхні

A	
muFRIHC2-1 VL	1 DMVLTQTPLSLPVNIGDQASTISKSSKSLHSDGFTYLDWYLQKPGQSPOLLITVLSNHFS 61
huFRIHC2-1 VLv1.0	-----S-----L-QP-----R-R-----R-----
huFRIHC2-1 VLv1.01	-----S-----L-QP-----R-----R-----
B	
muFRIHC2-1 VL	62 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPPLTFGGGTKLEIKR 113
huFRIHC2-1 VLv1.0	-----Q-----
huFRIHC2-1 VLv1.01	-----Q-----
B	
muFRIHC2-1 VH	1 QVQLQQSGPELVKPGASVRIISKASGYTFTNSYIHNVKKRPGQGLEWIGWITYPESLNTQYN 61
huFRIHC2-1 VH	-----V-----A-V-----K-----
muFRIHC2-1 VH	62 EKFKAKATLTADKSSSTSYNQLSSLTSEDSAVYFCARRGIYYSPYALDHMCQGASVTVSS 122
huFRIHC2-1 VH	Q--QG-----

ФІГ. 10.

CDR-прищеплення FRIHC2-1

FRIHC2-1- V _L				FRIHC2-1- V _H		
Положення за Кабатом	Залишок мишачого антитіла	Залишок людського (CDR-прищепл.) v 1.0	Залишок людського (CDR-прищепл.) v 1.01	Положення за Кабатом	Залишок мишачого антитіла	Залишок людського (CDR-прищепл.)
2	V	I	I	5	Q	V
4	L	M	M	9	P	A
12	P	S	S	11	L	V
14	N	T	T	12	V	K
15	I	P	P	19	R	K
17	D	Q	Q	20	I	V
18	Q	P	P	38	K	R
83	L	V	V	39	K	Q
100	G	Q	Q	40	R	A
24	K	R	K	48	I	M
27	K	R	K	66	K	R
				67	A	V
				69	L	M
				71	A	R
				73	K	T
				75	S	I
				78	S	A
				81	Q	E
				82b	S	R
				83	T	R
				85	E	D
				87	S	T
				91	F	Y
				107	A	T
				108	S	L

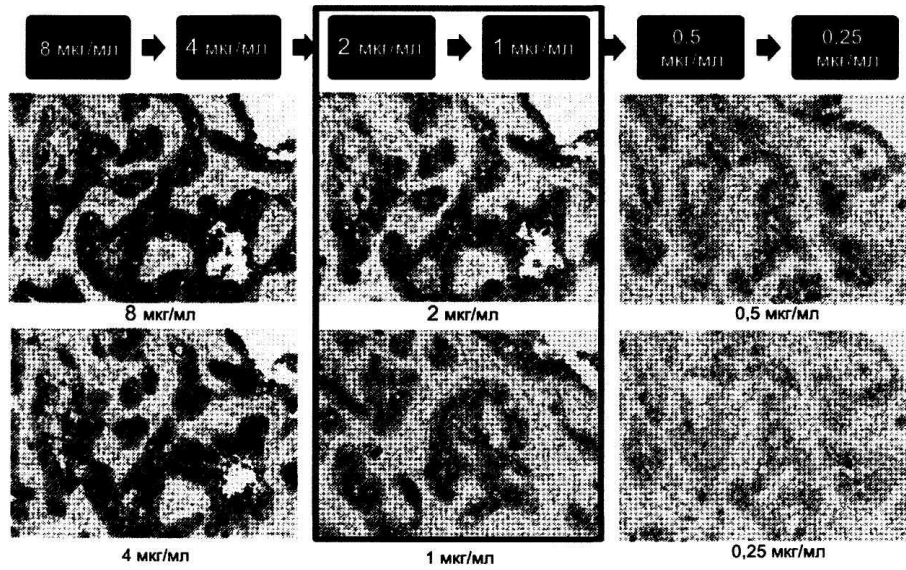
ФІГ. 11.

Результати вирівнювання за CDR-прищепленням

A	muFRIHC2-1 VL	1	DVLTQTPLSLPVNIGDQASISCKSSKSLNSDGFTYLDWYLPKPGQSPQLLIYLVSNHFS	61
	huFRIHC2-1 VLGv1.0	-I-M-----S-TP-QP-----R-R-----		
	huFRIHC2-1 VLGv1.01	-I-M-----S-TP-QP-----		
B	muFRIHC2-1 VH	62	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPITFGGGTKLEIKR	113
	huFRIHC2-1 VLGv1.0	-----V-----Q-----		
	huFRIHC2-1 VLGv1.01	-----V-----Q-----		
	muFRIHC2-1 VH	1	QVQLQQSGPELVKPGASVRIISCKASGYTFSTNSYIHNVKKRPGGLEWIGWITYPESLNTQYN	61
	huFRIHC2-1 VH	-----V-A-VK-----KV-----RQA-----N-----		
	muFRIHC2-1 VH	62	EKFKAATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGTYYYSPYALDHNGQASVTVSS	122
	huFRIHC2-1 VH	-----RV-M-R-T-I-A--E--R-R-D-T--Y-----TL-----		

ФІГ. 12.

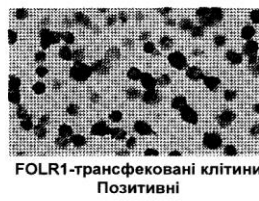
Титрування антитіла FOLR1 2.1



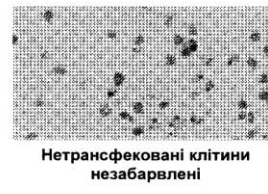
ФІГ. 13.



ФІГ. 14А.



ФІГ. 14В.



ФІГ. 14С.



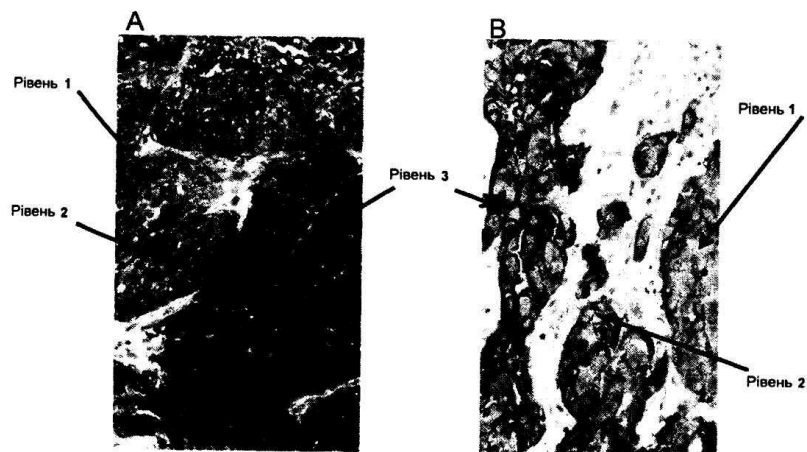
ФІГ. 15А.



ФІГ. 15В.



ФІГ. 16.



ФІГ. 17.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601