



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113150145 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 14

(21) 申请号 202110062804.4

克里斯蒂娜·N·卡里根 芮玲云

(22) 申请日 2014.08.29

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理师 樊英如 李献忠

申请公布号 CN 113150145 A

(51) Int.Cl.

(43) 申请公布日 2021.07.23

G07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/82 (2006.01)

61/872,407 2013.08.30 US

G01N 33/574 (2006.01)

61/875,475 2013.09.09 US

G01N 33/68 (2006.01)

61/940,184 2014.02.14 US

A61K 47/68 (2017.01)

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

201480054040.2 2014.08.29

Roberts SJ.Role of individual N-linked glycosylation sites in the function and intracellular transport of the human alpha folate receptor.《Arch Biochem Biophys》.1998,第351卷(第2期),第227-235页.

(83) 生物保藏信息

PTA-120196 2013.04.16

PTA-120197 2013.04.16

(73) 专利权人 伊缪诺金公司

审查员 滕瑞芳

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 奥尔加·阿布 丹尼尔·塔瓦雷斯

权利要求书4页 说明书68页

尤利娅托·塞蒂亚迪 沙龙·拉德

序列表38页 附图19页

(54) 发明名称

用于检测叶酸受体1的抗体和测定

(57) 摘要

本发明总体上涉及结合人叶酸受体的抗体以及用于基于叶酸受体1的疗法的诊断测定。还提供了使用所述抗体监测疗法的方法。

1. 一种试剂盒,其包括:

用于诊断的特异性地结合FOLR1的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自自由以下组成的组的VH CDR1-3和VL CDR1-3多肽序列:

- (a) 分别是SEQ ID NO:3-8;
- (b) 分别是SEQ ID NO:9-14;
- (c) 分别是SEQ ID NO:15-20;
- (d) 分别是SEQ ID NO: 3-5以及SEQ ID NO: 59、7和8;
- (e) 分别是SEQ ID NO: 3、60和5以及SEQ ID NO: 6-8;
- (f) 分别是SEQ ID NO: 3、61和5以及SEQ ID NO: 6-8;
- (g) 分别是SEQ ID NO: 3、60和5以及SEQ ID NO: 59、7和8;和
- (h) 分别是SEQ ID NO: 3、61和5以及SEQ ID NO: 59、7和8。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段包含选自以下的VH和VL多肽序列:

- (a) 分别是SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;
- (b) 分别是SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30;
- (c) 分别是SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32;
- (d) 分别是SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:64;和
- (e) 分别是SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67。

3. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段是重组产生的。

4. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段是鼠的、人源化的、嵌合的、表面重构的或人的。

5. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段结合人FOLR1但不结合FOLR2或FOLR3。

6. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体是全长抗体。

7. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段是抗原结合片段。

8. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段以0.5至10 nM的Kd结合人叶酸受体1。

9. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段以1.0 nM或更高的Kd结合人叶酸受体1。

10. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段被可检测地标记。

11. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段通过IHC检测FOLR1表达。

12. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段通过ELISA检测FOLR1表达。

13. 如权利要求1或2所述的试剂盒,还包含用于治疗的抗 FOLR1 免疫缀合物,该免疫缀合物包含与 DM4 (N (2') -脱乙酰基-N2' - (4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基) -美登素) 缀合的

抗FOLR1 单克隆抗体,通过可裂解的磺基-SPDB(N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基丁酸酯)接头连接,其中所述抗FOLR1抗体包括分别包含SEQ ID NO:45和47的氨基酸序列的VH和VL。

14.一种多肽,其特异性地结合FOLR1,其中所述多肽包含抗 FOLR-1 抗原结合片段,所述片段包含 VH 和 VL,所述 VH 和 VL 分别包含 VH CDR1-3 和 VL CDR1-3 序列,其选自以下组成的组:

- (a) 分别是SEQ ID NO:3-8;
- (b) 分别是SEQ ID NO:9-14;
- (c) 分别是SEQ ID NO:15-20;
- (d) 分别是SEQ ID NO: 3-5以及SEQ ID NO: 59、7和8;
- (e) 分别是SEQ ID NO: 3、60和5以及SEQ ID NO: 6-8;
- (f) 分别是SEQ ID NO: 3、61和5以及SEQ ID NO: 6-8;
- (g) 分别是SEQ ID NO: 3、60和5以及SEQ ID NO: 59、7和8;和
- (h) 分别是SEQ ID NO: 3、61和5以及SEQ ID NO: 59、7和8。

15.如权利要求14所述的多肽,其中所述多肽是重组产生的。

16.如权利要求14所述的多肽,其中所述多肽结合人FOLR1但不结合FOLR2或FOLR3。

17.如权利要求14所述的多肽,其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv 片段组成的组。

18.如权利要求14所述的多肽,其以0.5至10 nM的Kd结合人叶酸受体1。

19.如权利要求14所述的多肽,其以1.0 nM或更高的Kd结合人叶酸受体1。

20.如权利要求14所述的多肽,其中所述多肽被可检测地标记。

21.一种细胞,其产生如权利要求14-20中任一项所述的多肽。

22.一种制备如权利要求14-20中任一项所述的多肽的方法,所述方法包括(a)培养如权利要求21所述的细胞;以及(b)从所述培养的细胞分离所述多肽。

23.一种组合物,其包含如权利要求14-20中任一项所述的多肽以及选自以下组成的组的缓冲液:FACS缓冲液、IHC缓冲液以及ELISA缓冲液。

24.如权利要求14-20中任一项所述的多肽或如权利要求23所述的组合物在制备用于检测样本中的FOLR1表达的方法的检测试剂中的用途,其中所述方法包括使所述样本与如权利要求14-20中任一项所述的多肽或如权利要求23所述的组合物相接触。

25.如权利要求24所述的用途,其中所述多肽被可检测地标记。

26.如权利要求25所述的用途,其中所述标记选自以下组成的组:免疫荧光标记、化学发光标记、磷光标记、酶标记、放射性标记、胶体金颗粒、有色颗粒以及磁性颗粒。

27.如权利要求25所述的用途,其中所述标记是抗生物素蛋白和/或生物素。

28.如权利要求24-27中任一项所述的用途,其中通过放射免疫测定、蛋白质印迹测定、细胞计数、免疫荧光测定、酶免疫测定、免疫沉淀测定、化学发光测定或免疫组织化学测定来测定FOLR1表达。

29.如权利要求28所述的用途,其中所述细胞计数是流式细胞术。

30.如权利要求28所述的用途,其中通过IHC测定FOLR1表达。

31.如权利要求14-20中任一项所述多肽或如权利要求23所述的组合物在制备用于使

用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂增加癌症疗法的功效的方法的检测试剂中的用途,所述方法包括使用所述检测试剂检测患有癌症的受试者的样本中 FOLR1 表达的增加,并将所述活性剂施用于所述受试者。

32. 一种抗体或其抗原结合片段,其特异性地结合FOLR1,其中所述抗体或其抗原结合片段包含包括SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链和包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链。

33. 一种抗体或其抗原结合片段,其特异性地结合FOLR1,其中所述抗体或其抗原结合片段包含包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链和包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链。

34. 一种抗体或其抗原结合片段,其特异性地结合FOLR1,其中所述抗体或其抗原结合片段包含包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链和包括SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链。

35. 如权利要求32-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是重组产生的。

36. 如权利要求32-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段结合人FOLR1但不结合FOLR2或FOLR3。

37. 如权利要求32-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其是全长抗体。

38. 如权利要求32-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其是抗原结合片段。

39. 如权利要求32-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其以0.5至10 nM的Kd结合人叶酸受体1。

40. 如权利要求32-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其以1.0 nM或更高的Kd结合人叶酸受体1。

41. 如权利要求32-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段被可检测地标记。

42. 一种细胞,其产生如权利要求32-40中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

43. 一种制备如权利要求32-41中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括 (a) 培养如权利要求42所述的细胞;以及 (b) 从所述培养的细胞分离所述抗体或其抗原结合片段。

44. 一种组合物,其包含如权利要求32-41中任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及选自由以下组成的组的缓冲液:FACS缓冲液、IHC缓冲液以及ELISA缓冲液。

45. 如权利要求32-41中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求44所述的组合物在制备用于检测样本中的FOLR1表达的方法的检测试剂中的用途,其中所述方法包括使所述样本与如权利要求32-41中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或多肽或如权利要求44所述的组合物相接触。

46. 如权利要求45所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段被可检测地标记。

47. 如权利要求46所述的用途,其中所述标记选自由以下组成的组:免疫荧光标记、化学发光标记、磷光标记、酶标记、放射性标记、胶体金颗粒、有色颗粒以及磁性颗粒。

48. 如权利要求46所述的用途,其中所述标记是抗生物素蛋白和/或生物素。

49. 如权利要求45-48中任一项所述的用途,其中通过放射免疫测定、蛋白质印迹测定、

细胞计数、免疫荧光测定、酶免疫测定、免疫沉淀测定、化学发光测定或免疫组织化学测定来测定FOLR1表达。

50. 如权利要求49所述的用途,其中所述细胞计数是流式细胞术。

51. 如权利要求49所述的用途,其中通过IHC测定FOLR1表达。

52. 如权利要求32-41中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求44所述的组合物在制备用于使用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂增加癌症疗法的功效的方法的检测试剂中的用途,所述方法包括使用所述检测试剂检测患有癌症的受试者的样本中 FOLR1 表达的增加,并将所述活性剂施用于所述受试者。

53. 一种试剂盒,其包括:

用于诊断的如权利要求14-20和32-41中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或多肽、或如权利要求23或44所述的组合物;和

用于治疗的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂。

54. 如权利要求53所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段或多肽通过IHC检测FOLR1表达。

55. 如权利要求53所述的试剂盒,其中用于诊断的所述抗体或其抗原结合片段或多肽通过ELISA检测FOLR1表达。

56. 如权利要求53所述的试剂盒,还包含用于治疗的抗 FOLR1 免疫缀合物,该免疫缀合物包含与 DM4 (N(2')-脱乙酰基-N2'-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素) 缀合的 抗 FOLR1 单克隆抗体,通过可裂解的磺基-SPDB (N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基丁酸酯) 接头连接,其中抗FOLR1抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链分别包含SEQ ID NO: 55和57的氨基酸序列。

57. 如权利要求1、2和53中任一项所述的试剂盒,其进一步包括用于免疫组织化学(IHC)的试剂以及一种或多种标准化参考样本。

58. 如权利要求57所述的试剂盒,其中所述标准化参考样本包括细胞、细胞团块或福尔马林固定石蜡包埋的组织样本。

59. 如权利要求57所述的试剂盒,其中所述一种或多种标准化参考样本来自无FOLR1表达、低FOLR1表达或高FOLR1表达的细胞、细胞团块或组织。

## 用于检测叶酸受体1的抗体和测定

[0001] 本申请是申请日为2014年8月29日、中国专利申请号为201480054040.2 (国际申请号为PCT/US2014/053512)、发明名称为“用于检测叶酸受体1的抗体和测定”的发明专利申请的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明的领域总体上涉及用于基于叶酸受体1的疗法的诊断测定和试剂盒以及结合人叶酸受体1的抗体。

### 发明背景

[0003] 癌症是发达国家中死亡的主导原因之一,仅在美国每年就有超过一百万人被诊断患有癌症并且有500,000例死亡。总的来说,估计超过三分之一的人会在他们的一生中出现某种形式的癌症。癌症有200多种不同类型,其中四种——乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌和前列腺癌——占有新发病例的一半以上(Jemal等,2003,Cancer J.Clin.53:5-26)。53:5-26)。

[0004] 叶酸受体1(FOLR1)(也被称为叶酸受体- $\alpha$ 或叶酸结合蛋白)是在细胞质膜上表达的N-糖基化蛋白。FOLR1具有对叶酸和若干还原的叶酸衍生物的高亲和力。FOLR1介导生理叶酸(5-甲基四氢叶酸)向细胞内部的递送。

[0005] FOLR1在绝大多数的卵巢癌以及在许多子宫癌、子宫内膜癌、胰腺癌、肾癌、肺癌和乳腺癌中过度表达,而在正常组织上的FOLR1表达仅限于肾近端小管、肺的肺泡肺细胞、膀胱、睾丸、脉络丛以及甲状腺中的上皮细胞顶端膜上(Weitman SD等,Cancer Res 52:3396-3401(1992);Antony AC,Annu Rev Nutr 16:501-521(1996);Kalli KR等,Gynecol Oncol 108:619-626(2008))。FOLR1的这种表达模式使其成为FOLR1引导的癌症治疗的理想靶标。

[0006] 因为卵巢癌在晚期之前通常是无症状的,所以它经常是在晚期被诊断出来,并且用目前可用的程序(通常是手术减积之后的化学治疗药物)治疗时具有不良预后(von Gruenigen V等,Cancer 112:2221-2227(2008);Ayhan A等,Am J Obstet Gynecol 196:81e81-86(2007);Harry VN等,Obstet Gynecol Surv 64:548-560(2009))。因此,对用于卵巢癌的更有效的诊断存在明显的尚未满足的医疗需求。

[0007] 用于检测脱落FOLR1的一些先前测定不足以对FOLR1具有特异性。例如,一些测定不能区分FOLR1和其他叶酸受体家族成员(FOLR2、3和4)或报道总FBP(叶酸结合蛋白)的值。此外,一些测定要求用轻质酸洗涤步骤预处理人样本(例如,血浆)以使叶酸与受体解离。一些测定结果还可由于抗体疗法与诊断抗体之间的竞争性作用而具有不准确性。此外,许多可商购的试剂盒在其试剂及其批次稳定性两者上均是传统上不可靠的。对这些试剂盒的评价给出非常混合的结果,且意图用于仅研究用途。许多要求人样本在分析之前预先稀释以降低由于“基质效应”所致的假阳性的可能性。因此,对于作为基于FOLR1的疗法的伴随物的能够检测FOLR1的临床上相关的动态范围的高度灵敏和精确的诊断测定存在明显需要。

## 发明概述

[0008] 抗FOLR1抗体及其抗原结合片段以及用于检测FOLR1、诊断FOLR1介导的疾病和病症(如癌症)、监测抗FOLR1疗法的功效、优化抗FOLR1疗法以及对患者分级的方法都在本文提供。

[0009] 本文提供的抗FOLR1抗体可具有诊断作用。例如,本文提供的抗FOLR1抗体用于区分肿瘤和非肿瘤细胞或组织或用于鉴定肿瘤类型、亚型或分级。在一个实施方案中,本文提供的抗FOLR1抗体和/或本文提供的FOLR1检测测定可用于区分非小细胞肺癌(NSCLC)的亚型,包括如本文所述的腺癌和鳞状细胞癌。在另一个实施方案中,本文提供的抗FOLR1抗体和/或本文提供的FOLR1检测测定可用于排除某种类型的癌症(例如,用于确定细胞或组织不是某种类型的癌症),例如肉瘤。

[0010] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段可特异性地结合FOLR1的表位,其中所述表位包含至少一个、至少两个或三个N-糖基化氨基酸。糖基化对于膜定位可能是关键的。参见例如,Yan等,J. Am. Soc. Nephrol. 13:1385-1389 (2002)。有利地,本文的抗体和抗原结合片段可检测细胞膜上的FOLR1表达并且检测FOLR1的临床上相关的动态范围。用本文提供的抗体和抗原结合片段获得的更谨慎的染色允许使用结合不同FOLR1表位、缺乏足够特异性和/或缺乏足够灵敏度的抗体区分全部一起分组为高表达水平(具有得分3)的样本。

[0011] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段可与选自以下组成的组的抗体特异性地结合相同FOLR1表位:(a) 包含SEQ ID NO:27的多肽和SEQ ID NO:28的多肽的抗体;(b) 包含SEQ ID NO:29的多肽和SEQ ID NO:30的多肽的抗体;(c) 包含SEQ ID NO:31的多肽和SEQ ID NO:32的多肽的抗体;(d) 包含SEQ ID NO:62的多肽和SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:64的多肽的抗体;以及(e) 包含SEQ ID NO:65的多肽和SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67的多肽的抗体。在一些实施方案中,所述表位包含N-糖基化氨基酸。

[0012] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段可特异性地结合FOLR1,其中所述抗体或其片段竞争性地抑制选自以下组成的组的抗体与FOLR1的结合:(a) 包含SEQ ID NO:27的多肽和SEQ ID NO:28的多肽的抗体;(b) 包含SEQ ID NO:29的多肽和SEQ ID NO:30的多肽的抗体;(c) 包含SEQ ID NO:31的多肽和SEQ ID NO:32的多肽的抗体;(d) 包含SEQ ID NO:62的多肽和SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:64的多肽的抗体;以及(e) 包含SEQ ID NO:65的多肽和SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67的多肽的抗体。

[0013] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含选自以下组成的组的VH CDR1-3和VL CDR1-3多肽序列:(a) 分别是SEQ ID NO:3-8;(b) 分别是SEQ ID NO:9-14;(c) 分别是SEQ ID NO:15-20;(d) 分别是SEQ ID NO:21-26;(e) 分别是SEQ ID NO:3-5和SEQ ID NO:59、7和8;(f) 分别是SEQ ID NO:3、60和5以及SEQ ID NO:6-8;(g) 分别是SEQ ID NO:3、61和5以及SEQ ID NO:6-8;(h) 分别是SEQ ID NO:3、60和5以及SEQ ID NO:59、7和8;以及(i) 分别是SEQ ID NO:3、61和5以及SEQ ID NO:59、7和8。

[0014] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合FOLR1,其中所述抗体或其片段包含选自以下组成的组的VH CDR1-3和VL CDR1-3多肽序列:(a) 分别是SEQ ID NO:3-8;(b) 分别是SEQ ID NO:9-14;(c) 分别是SEQ ID NO:15-20;(d) 分别是SEQ ID NO:21-26;(e) 分别是SEQ ID NO:3-5和SEQ ID NO:59、7和8;(f) 分别是SEQ ID

NO:3、60和5以及SEQ ID NO:6-8; (g) 分别是SEQ ID NO:3、61和5以及SEQ ID NO:6-8; (h) 分别是SEQ ID NO:3、60和5以及SEQ ID NO:59、7和8; (i) 分别是SEQ ID NO:3、61和5以及SEQ ID NO:59、7和8; 以及 (j) (a) 至 (i) 的包含1、2、3或4个保守氨基酸取代的变体。

[0015] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含与选自由以下组成的组的多肽序列具有至少90%、至少95%或至少99%同一性的多肽序列: (a) SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28; (b) SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30; (c) SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32; (d) SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:64; (e) SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67; (f) SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69。在一些实施方案中,所述多肽序列包含选自由以下组成的组的序列的氨基酸或基本上由所述氨基酸组成或由所述氨基酸组成: (a) SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28; (b) SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30; (c) SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32; (d) SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:64; (e) SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67; (f) SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69。

[0016] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段可特异性地结合FOLR1,其中所述抗体或其片段包含人源化重链可变区,所述重链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3区,所述CDR1、CDR2和CDR3区分别包含SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52或53和SEQ ID NO:54的氨基酸;人源化轻链可变区,所述轻链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3区,所述CDR1、CDR2和CDR3区分别包含SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50的氨基酸;以及鼠恒定区。在一些实施方案中,所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:45的氨基酸,并且所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:47的氨基酸。

[0017] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是重组产生的。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是鼠的、非人的、人源化的、嵌合的、表面重构的或人的。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合人FOLR1,但不结合FOLR2或FOLR3。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项、基本上由其组成或由其组成: Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、单链Fv或scFv、二硫键连接的Fv、V-NAR域、IgNar、胞内抗体、IgG ΔCH2、微型抗体、F(ab')<sub>3</sub>、四链抗体、三链抗体、双链抗体、单域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb2、(scFv)<sub>2</sub>或scFv-Fc。

[0018] 在一些实施方案中,本文提供的多肽可特异性地结合FOLR1,其中所述多肽包含选自由以下组成的组的序列: (a) 分别是SEQ ID NO:3-8; (b) 分别是SEQ ID NO:9-14; (c) 分别是SEQ ID NO:15-20; (d) 分别是SEQ ID NO:21-26; (e) 分别是SEQ ID NO:3-5和SEQ ID NO:59、7和8; (f) 分别是SEQ ID NO:3、60和5以及SEQ ID NO:6-8; (g) 分别是SEQ ID NO:3、61和5以及SEQ ID NO:6-8; (h) 分别是SEQ ID NO:3、60和5以及SEQ ID NO:59、7和8; (i) 分别是SEQ ID NO:3、61和5以及SEQ ID NO:59、7和8; 以及 (j) (a) 至 (i) 的包含1、2、3或4个保守氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,所述多肽包含与选自由以下组成的组的序列具有至少90%、至少95%或至少99%同一性的序列: (a) SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28; (b) SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30; (c) SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32; (d) SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:64; (e) SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67; 以及 (f) SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69。在一些实施方案中,所述多肽包含以下各项的氨基酸: (a) SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28; (b) SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30; (c) SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:



32; (d) SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:64; (e) SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67;或(f) SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69。

[0019] 在一些实施方案中,所述抗体、其抗原结合片段或多肽以约0.5至约10nM的Kd结合FOLR1。在一些实施方案中,所述抗体、其抗原结合片段或多肽以约1.0nM或更好的Kd结合人FOLR1。在一些实施方案中,通过流式细胞术、Biacore、ELISA或放射免疫测定来测量结合亲和力。

[0020] 在一些实施方案中,所述抗体、其抗原结合片段或多肽结合FOLR1的表位,所述表位包含为N-糖基化的氨基酸。

[0021] 在一些实施方案中,可检测地标记所述抗体、其抗原结合片段或多肽。

[0022] 在一些实施方案中,本文提供的细胞产生所述抗体、其抗原结合片段或多肽。在一些实施方案中,将细胞分离。

[0023] 还提供制备所述抗体、其抗原结合片段或多肽的方法。所述方法可包括(a)培养本文提供的细胞;以及(b)从所述培养的细胞分离所述抗体、其抗原结合片段或多肽。

[0024] 还提供包含所述抗体、其抗原结合片段或多肽的组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含所述抗体、其抗原结合片段或多肽以及选自由以下组成的组的缓冲液:FACS缓冲液、IHC缓冲液和ELISA缓冲液。

[0025] 还提供使用所述抗体、其抗原结合片段或多肽的方法。

[0026] 在一些实施方案中,检测样本中的FOLR1表达的方法包括使所述样本与本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物相接触。在一些实施方案中,可检测地标记所述抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述标记选自由以下组成的组:免疫荧光标记、化学发光标记、磷光标记、酶标记、放射性标记、抗生物素蛋白/生物素、胶体金颗粒、有色颗粒以及磁性颗粒。在一些实施方案中,通过放射免疫测定、蛋白质印迹测定、细胞计数、免疫荧光测定、酶免疫测定、免疫沉淀测定、化学发光测定或免疫组织化学测定来测定FOLR1表达。在一些实施方案中,细胞计数是流式细胞术。在一些实施方案中,通过IHC测定FOLR1表达。

[0027] 在一些实施方案中,使用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂增加癌症疗法的功效的方法包括向患有癌症的受试者施用活性剂,其中已使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物在来自所述受试者的癌性样本中检测到增加的FOLR1表达。

[0028] 在一些实施方案中,用于鉴定可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应的癌症的方法包括:(a)使包含来自所述癌症的细胞的生物样本与本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物相接触;(b)检测所述抗体、抗体片段或多肽与(a)的生物样本中的FOLR1的结合;(c)为步骤(b)的所述结合指定分数,其中所述分数基于与一种或多种参考样本的比较来指定;以及(d)将步骤(c)中的分数与参考组织或细胞的分数进行比较,其中所述癌症FOLR1水平的分数大于表达正常或低FOLR1的参考样本的分数或者所述癌症FOLR1水平的分数等于或大于表达高FOLR1的参考样本的分数将所述癌症鉴定为可能对抗FOLR1抗体有反应。

[0029] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的患者的方法包括:(a)从自所述患者获得的癌性样本中的FOLR1表达的检测确定FOLR1表达分数,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;以及(b)如果所述分数指示所述患者将受益于包含抗

FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用,则向所述患者施用所述活性剂。

[0030] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的患者的方法包括:(a)从自所述患者获得的癌性样本中的FOLR1表达的检测确定FOLR1表达分数,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;以及(b)如果所述分数指示所述患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用,则通知医疗保健提供者向所述患者施用所述活性剂。

[0031] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的患者的方法包括:(a)提交从患有癌症的患者取得的癌性样本以用于使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物从FOLR1表达的检测确定FOLR1表达分数;以及(b)如果所述分数指示所述患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用,则向所述受试者施用所述活性剂。

[0032] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的患者的方法包括:(a)检测从所述患者获得的癌性样本中的FOLR1表达,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;(b)确定所述癌性样本的FOLR1表达分数;以及(c)如果所述分数指示所述患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用,则向所述患者施用所述活性剂。

[0033] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的患者的方法包括:(a)向所述患者施用固定剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂;(b)相对于参考样本中的FOLR1水平检测所述患者的FOLR1,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;以及(c)如果所述患者的FOLR1水平升高,则增加随后固定剂量的量或频率。

[0034] 在一些实施方案中,优化用于患有癌症的受试者的使用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的治疗方案的方法包括:(a)向患有癌症的受试者施用增加剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂,其中已使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测到所述受试者中增加的FOLR1表达;或(b)向患有癌症的受试者施用减少剂量的所述活性剂,其中已检测到所述受试者中减少的FOLR1表达。

[0035] 在一些实施方案中,优化用于患有癌症的受试者的使用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的治疗方案的方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自所述受试者的癌性样本中的FOLR1表达水平;(b)确定所述癌性样本的FOLR1表达分数;以及(c)如果所述分数较低,则向所述受试者施用增加剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂,或如果所述分数较高,则向所述受试者施用减少剂量的所述活性剂。

[0036] 在一些实施方案中,减少癌症患者中的表达FOLR1的癌细胞的方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物,相较于参考样本中的FOLR1水平检测从患者取得的癌性样本中的FOLR1水平;以及(b)如果所述患者的FOLR1水平相较于所述参考样本升高,则向所述患者施用固定剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂;其中所述活性剂的所述施用减少所述患者中的表达FOLR1的癌细胞的数目。在一些实施方案中,治疗患者中的癌症的方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物,相较于参考样本中的FOLR1水平检测从患者取得的癌性样本中的FOLR1水平;以及(b)如果所述患者的FOLR1水平相较于所述参考样本升高,则向所述患者施用固定剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂;其中所述活性剂的所述施用减小表达FOLR1的肿瘤

的大小或降低CA125水平。

[0037] 在一些实施方案中,减少癌症患者中的表达FOLR1的癌细胞的方法包括:(a)向患有癌症的患者施用固定剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂;(b)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物相对于参考样本中的FOLR1水平检测所述患者的FOLR1水平;以及(c)如果所述患者的FOLR1水平相较于所述参考样本升高,则增加随后固定剂量的量或频率;其中所述活性剂的所述施用减少所述患者中的表达FOLR1的癌细胞的数目。在一些实施方案中,治疗患者中的癌症的方法包括:(a)向患有癌症的患者施用固定剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂;(b)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物相对于参考样本中的FOLR1水平检测所述患者的FOLR1水平;以及(c)如果所述患者的FOLR1水平相较于所述参考样本升高,则增加随后固定剂量的量或频率;其中所述活性剂的所述施用减小表达FOLR1的肿瘤的大小或降低CA125水平。

[0038] 在一些实施方案中,监测固定剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂在患者中的治疗功效的方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自患有癌症的患者的生物样本中的第一FOLR1水平;(b)向所述患者施用固定剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂;(c)在活性剂施用之后检测来自所述患者的生物样本中的第二FOLR1水平,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;以及(d)将所述第二FOLR1水平与所述第一FOLR1水平进行比较;其中所述第一与第二FOLR1水平之间的降低指示治疗功效。

[0039] 在一些实施方案中,将患有癌症的受试者鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗方案有反应的方法包括:(a)使包含来自所述癌症的细胞的生物样本与本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物相接触;(b)检测所述抗体、抗原结合片段或多肽与(a)的生物样本的结合;(c)为步骤(b)的所述结合指定分数,其中所述分数基于与一种或多种参考样本的比较来指定;以及(d)将步骤(c)中的分数与参考组织或细胞的分数进行比较,其中所述癌症FOLR1水平的分数大于表达正常或低FOLR1的参考样本的分数或者所述癌症FOLR1水平的分数等于或大于表达高FOLR1的参考样本的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。

[0040] 在一些实施方案中,将癌症鉴定为对用抗FOLR1活性剂治疗敏感的方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的FOLR1表达水平,其中所述检测包括使用相较于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达FOLR1的癌性样本中的染色强度或染色均匀度的方法;(b)确定所述癌性样本的FOLR1染色强度或染色均匀度分数;以及(c)将在步骤(b)中确定的FOLR1染色强度或染色均匀度分数与通过测量至少一种参考样本中的FOLR1蛋白质表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗不敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的FOLR1染色强度分数高于所述相对值将所述癌症鉴定为对用所述活性剂治疗敏感。

[0041] 在一些实施方案中,将癌症鉴定为对用抗FOLR1活性剂治疗敏感的方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的FOLR1表达水平,其中所述检测包括使用相较于一种或多种参考样本中的膜FOLR1来特异性地对表达FOLR1的癌性样本中的膜FOLR1的染色的方法;(b)确定所述癌性样本的FOLR1分

数;以及(c)将在步骤(b)中确定的FOLR1分数与通过测量至少一种参考样本中的FOLR1所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗不敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的FOLR1分数高于所述相对值将所述癌症鉴定为对用所述活性剂治疗敏感。

[0042] 在一些实施方案中,将癌症鉴定为对用抗FOLR1活性剂治疗敏感的方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的FOLR1表达水平,其中所述检测包括使用相较于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达FOLR1的癌性样本中的染色强度或染色均匀度的方法;(b)确定所述癌性样本的FOLR1染色强度或染色均匀度分数;以及(c)将在步骤(b)中确定的FOLR1染色强度或染色均匀度分数与通过测量至少一种参考样本中的FOLR1蛋白质表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的FOLR1染色强度分数大于或等于所述相对值将所述癌症鉴定为对用所述活性剂治疗敏感。

[0043] 在一些实施方案中,将癌症鉴定为对用抗FOLR1活性剂治疗敏感的方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的FOLR1表达水平,其中所述检测包括使用相较于一种或多种参考样本中的膜FOLR1来特异性地对表达FOLR1的癌性样本中的膜FOLR1染色的方法;(b)确定所述癌性样本的FOLR1分数;以及(c)将在步骤(b)中确定的FOLR1分数与通过测量至少一种参考样本中的FOLR1所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的FOLR1分数大于或等于所述相对值将所述癌症鉴定为对用所述活性剂治疗敏感。

[0044] 在一些实施方案中,所述方法还包括向自其获得所述癌性样本或生物样本的受试者施用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂。

[0045] 在一些实施方案中,在从所述患者获得的癌性样本或生物样本中检测所述患者的FOLR1水平。在一些实施方案中,所述癌性样本或生物样本是体液、细胞或组织样本。在一些实施方案中,所述细胞是循环肿瘤细胞。在一些实施方案中,体液是血液、腹水、尿液、血浆、血清或外周血。

[0046] 在一些实施方案中,所述FOLR1是膜定位的FOLR1。

[0047] 在一些实施方案中,所述FOLR1是脱落FOLR1。

[0048] 在一些实施方案中,所述检测通过酶联免疫吸附测定(ELISA)进行。

[0049] 在一些实施方案中,所述检测通过免疫组织化学(IHC)进行。在一些实施方案中,所述IHC是可区分不同水平的FOLR1表达的校准的IHC。在一些实施方案中,所述IHC对具有低细胞表面FOLR1表达、中等FOLR1细胞表面表达或高FOLR1细胞表面表达的样本产生一系列染色强度。在一些实施方案中,所述IHC相较于参考样本区分表达FOLR1的癌性样本或生物样本中的染色强度和染色均匀度。在一些实施方案中,所述IHC检测膜FOLR1。在一些实施方案中,所述IHC手动进行。在一些实施方案中,使用自动系统进行所述IHC。

[0050] 在一些实施方案中,从所述IHC确定FOLR1分数。

[0051] 在一些实施方案中,至少1的分数指示增加的FOLR1表达并将所述癌症鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。

[0052] 在一些实施方案中,至少2、至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,至少3、至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0053] 在一些实施方案中,至少50的H分数将癌症鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一些实施方案中,至少75的H分数将卵巢癌鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一些实施方案中,至少50的H分数将NSCLC鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一些实施方案中,至少50的H分数将子宫内膜癌鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一个实施方案中,使用FOLR1-2.1抗体确定H分数。

[0054] 在一些实施方案中,卵巢肿瘤样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少3的强度将卵巢癌鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一些实施方案中,NSCLC样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少2的强度将NSCLC鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一些实施方案中,子宫内膜肿瘤样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少2的强度将子宫内膜癌鉴定为可能对包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。在一个实施方案中,使用FOLR1-2.1抗体确定表达分数。

[0055] 在一些实施方案中,至少1的分数指示增加的FOLR1表达并指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,至少2、至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,至少3、至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)的分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0056] 在一些实施方案中,至少50的H分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,至少75的H分数指示患有卵巢癌的患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,至少50的H分数指示患有NSCLC的患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,至少50的H分数指示患有子宫内膜癌的患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一个实施方案中,使用FOLR1-2.1抗体确定H分数。

[0057] 在一些实施方案中,卵巢肿瘤样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少3的强度指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,NSCLC样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少2的强度指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,子宫内膜肿瘤样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少2的强度指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一个实施方案中,使用FOLR1-2.1抗体确定表达分数。

[0058] 在一些实施方案中,至少1的分数指示增加的FOLR1表达。在一些实施方案中,至少2、至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数指示应施用减少剂量

的活性剂。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,至少3、至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)的分数指示应施用减少剂量的活性剂。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0059] 在一些实施方案中,至少1的分数指示增加的FOLR1表达。在一些实施方案中,至少2、至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,至少3、至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0060] 在一些实施方案中,至少2、至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,至少3、至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)的分数将癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0061] 在一些实施方案中,至少50的H分数将癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,至少75的H分数将卵巢癌鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,至少50的H分数将NSCLC鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,至少50的H分数将子宫内膜癌鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一个实施方案中,使用FOLR1-2.1抗体确定H分数。

[0062] 在一些实施方案中,卵巢肿瘤样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少3的强度将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,NSCLC样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少2的强度将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,子宫内膜肿瘤样本中至少25%的FOLR1膜表达与至少2的强度将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一个实施方案中,使用FOLR1-2.1抗体确定表达分数。

[0063] 在一些实施方案中,所述参考样本是阳性参考样本或阴性参考样本。在一些实施方案中,参考样本包括细胞、细胞团块或组织。

[0064] 在一些实施方案中,所述抗体、其抗原结合片段或多肽包含选自由以下组成的组的检测试剂:酶、荧光团、放射性标记以及发光团。在一些实施方案中,所述检测试剂选自由以下组成的组:生物素、地高辛、荧光素、氘以及罗丹明。

[0065] 在一些实施方案中,癌症是FOLR1阳性癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自由以下组成的组:卵巢癌、脑癌、乳腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、胰腺癌、肾癌以及肺癌。在一些实施方案中,肺癌是非小细胞肺癌或细支气管肺泡癌。在一些实施方案中,卵巢癌是上皮性卵巢癌。在一些实施方案中,卵巢癌是铂抗性、复发性或难治性的。

[0066] 在一些实施方案中,使用至少一种另外抗FOLR1抗体或其抗原结合片段检测FOLR1表达。在一些实施方案中,使用两种抗FOLR1抗体或其抗原结合片段测量FOLR1表达。在一些实施方案中,至少一种抗体或其抗原结合片段结合至固体支持物。在一些实施方案中,至少

一种抗体或其抗原结合片段结合至微量滴定板。

[0067] 在一些实施方案中,至少一种另外抗体或其抗原结合片段包含检测剂。在一些实施方案中,检测剂是显色检测剂、荧光检测剂、酶检测剂或电化学发光检测剂。在一些实施方案中,检测剂是辣根过氧化物酶(HRP)。

[0068] 在一些实施方案中,ELISA是夹心ELISA。

[0069] 在一些实施方案中,活性剂包括FOLR1抗体huMov19。在一些实施方案中,活性剂是抗体美登木素偶联物,其包含FOLR1抗体huMov19(包含SEQ ID NO:45的重链可变区和SEQ ID NO:47的轻链可变区)、美登木素DM4以及可裂解的磺基-SPDB接头(IMGN853)。

[0070] 在一些实施方案中,将癌症鉴定为可能对用包含FOLR1抗体huMov19、美登木素DM4和磺基-SPDB接头(IMGN853)的抗体美登木素偶联物治疗有反应的方法包括在IHC测定中使用包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸的重链和含有SEQ ID NO:28的氨基酸的轻链的抗体测量FOLR1,其中至少2异质的分数指示所述癌症可能对所述治疗有反应。

[0071] 在一些实施方案中,将癌症鉴定为可能对用包含FOLR1抗体huMov19、美登木素DM4和磺基-SPDB接头(IMGN853)的抗体美登木素偶联物治疗有反应的方法包括在IHC测定中使用包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸的重链和含有SEQ ID NO:28的氨基酸的轻链的抗体测量FOLR1,其中至少1异质的分数指示所述癌症可能对所述治疗有反应。

[0072] 在一些实施方案中,本文提供的制品包括包含本文所述的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂、容器以及包装插页或标签,所述包装插页或标签指示所述活性剂可用于治疗特征在于FOLR1的表达增加的癌症。在一些实施方案中,本文提供的制品包括包含本文所述的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂、容器以及包装插页或标签,所述包装插页或标签指示所述活性剂可用于治疗特征在于在使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物测量的FOLR1的表达在2或3的水平下的癌症。在一些实施方案中,所述活性剂的抗FOLR1抗体偶联至细胞毒素。在一些实施方案中,所述包装插页或标记指示所述活性剂可用于治疗特征在于FOLR1的表达在至少1的水平下的癌症。在一些实施方案中,所述包装插页或标记指示所述活性剂可用于治疗特征在于FOLR1的表达在至少2、至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)水平下的癌症。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,所述包装插页或标记指示所述活性剂可用于治疗特征在于FOLR1的表达在至少3、至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)水平下的癌症。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0073] 在一些实施方案中,本文提供的组合诊断和药物试剂盒包括用于诊断中的本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物,以及用于治疗中的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂。在一些实施方案中,检测抗体能够通过IHC检测FOLR1表达。在一些实施方案中,检测抗体能够通过ELISA检测FOLR1表达。在一些实施方案中,活性剂中的抗FOLR1抗体偶联至细胞毒素。

[0074] 在一些实施方案中,本文提供的诊断试剂盒包括本文提供的抗体、其抗原结合片段或多肽,用于免疫组织化学(IHC)的试剂以及一种或多种标准化参考样本,其中所述标准化参考样本包括细胞、细胞团块或福尔马林固定石蜡包埋的组织样本,并且其中所述一种或多种标准化参考样本来自无FOLR1表达、低FOLR1表达或高FOLR1表达的细胞、细胞团块或组织。



[0075] 在一些实施方案中,用于检测样本中的脱落FOLR1的免疫测定试剂盒包括:(a) 本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物,以及(b) 检测试剂。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括用于捕获试剂的固体支持物。在一些实施方案中,所述捕获试剂固定在固体支持物上。在一些实施方案中,所述捕获试剂涂覆在微量滴定板上。在一些实施方案中,检测试剂是第二FOLR1抗体。在一些实施方案中,检测试剂使用物种特异性抗体检测。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括用于检测试剂的检测装置。在一些实施方案中,检测装置是比色的。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括FOLR1多肽作为抗原标准品。在一些实施方案中,所述FOLR1多肽是FOLR1-Fc。

[0076] 本文还提供活性剂。在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,其中向患有癌症的受试者施用所述活性剂,其中已使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物在从所述受试者获得的癌性样本中检测到增加的FOLR1表达。

[0077] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,所述方法包括:(a) 从自所述患者获得的癌性样本中的FOLR1表达的检测确定FOLR1表达分数,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;以及(b) 如果所述分数指示所述患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用,则向所述患者施用所述活性剂。

[0078] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,所述方法包括:(a) 从自所述患者获得的癌性样本中的FOLR1表达的检测确定FOLR1表达分数,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;以及(b) 如果所述分数指示所述患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用,则通知医疗保健提供者向所述患者施用所述活性剂。

[0079] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,所述方法包括:(a) 提交从患有癌症的患者获得的癌性样本以用于使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物从FOLR1表达的检测确定FOLR1表达分数;以及(b) 如果所述分数指示所述患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用,则向所述患者施用所述活性剂。

[0080] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,所述方法包括:(a) 检测从所述患者获得的癌性样本中的FOLR1表达,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;(b) 确定所述癌性样本的FOLR1表达分数;以及(c) 如果所述分数指示所述患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用,则向所述患者施用所述活性剂。

[0081] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,所述方法包括:(a) 向患者施用固定剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂;(b) 相对于参考样本中的FOLR1水平检测从所述患者获得的癌性样本中的FOLR1表达水平,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;以及(c) 如果所述患者的FOLR1水平升高,则增加随后固定剂量的量或频率。

[0082] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,所述方法包括优化所述活性剂的治疗方案的步骤,所述步骤包括:(a) 向



患有癌症的受试者施用增加剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂,其中已使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测到来自所述受试者的癌性样本中增加的FOLR1表达;或(b)向患有癌症的受试者施用减少剂量的所述活性剂,其中已检测到来自所述受试者的癌性样本中减少的FOLR1表达。

[0083] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,所述方法包括优化所述活性剂的治疗方案的步骤,所述步骤包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自所述受试者的癌性样本中的FOLR1表达水平;(b)确定所述癌性样本的FOLR1表达分数;以及(c)如果所述分数较低,则向所述受试者施用增加剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂,或如果所述分数较高,则向所述受试者施用减少剂量的所述活性剂。

[0084] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,其中癌症患者中的表达FOLR1的癌细胞减少,其中(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物通过将从患者获得的癌性样本中的FOLR1水平与参考样本中的FOLR1水平进行比较来检测从患者获得的癌性样本中的FOLR1水平;以及(b)如果所述患者的FOLR1水平升高,则向所述患者施用固定剂量的所述活性剂;其中所述活性剂的施用减少所述患者中的表达FOLR1的癌细胞的数目。

[0085] 在一些实施方案中,活性剂包含用于在治疗癌症的方法中使用的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段,其中癌症患者中的表达FOLR1的癌细胞减少,其中:(a)向患有癌症的患者施用固定剂量的所述活性剂;(b)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物相对于参考样本中的FOLR1水平检测从所述患者获得的癌性样本中的FOLR1水平;以及(c)如果所述患者的FOLR1水平相较于所述参考样本升高,则增加随后固定剂量的量或频率;其中所述活性剂的施用减少所述患者中的表达FOLR1的癌细胞的数目。

[0086] 本文还提供用于在监测方法和诊断方法中使用的抗FOLR1抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段用于在监测固定剂量的活性剂在患者中的治疗功效的方法中使用,所述方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自患有癌症的患者的生物样本中的第一FOLR1水平;(b)向所述患者施用固定剂量的所述活性剂;(c)在活性剂施用之后检测来自所述患者的生物样本中的第二FOLR1水平,其中使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物进行所述检测;以及(d)将所述第二FOLR1水平与所述第一FOLR1水平进行比较;其中所述第一与第二FOLR1水平之间的降低指示治疗功效。

[0087] 在一些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段用于在诊断患有癌症的受试者是否可能对低剂量抗FOLR1治疗方案有反应的方法中使用,所述方法包括:(a)使包含来自所述癌症的细胞的生物样本与本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物相接触;(b)检测所述抗体、抗原结合片段或多肽与(a)的所述生物样本的结合;(c)对步骤(b)的所述结合指定分数,其中所述分数基于与一种或多种参考样本的比较来指定;以及(d)将步骤(c)中的所述分数与参考组织或细胞的分数进行比较,其中所述癌症FOLR1水平的分数大于表达正常或低FOLR1的参考样本的分数或者所述癌症FOLR1水平的分数等于或大于表达高FOLR1的参考样本的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量的包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂有反应。

[0088] 在一些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段用于在诊断癌症是否对用抗FOLR1治疗敏感的方法中使用,所述方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的FOLR1表达水平,其中所述检测包括使用相较于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达FOLR1的癌性样本中的染色强度或染色均匀度的方法;(b)

[0089] 确定所述癌性样本的FOLR1染色强度或染色均匀度分数;以及(c)将在步骤(b)中确定的FOLR1染色强度或染色均匀度分数与通过测量至少一种参考样本中的FOLR1蛋白质表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗不敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的FOLR1染色强度分数高于所述相对值将所述癌症鉴定为对用所述活性剂治疗敏感。

[0090] 在一些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段用于在诊断癌症是否对用抗FOLR1治疗敏感的方法中使用,所述方法包括:(a)使用本文提供的抗体、其抗原结合片段、多肽或组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的FOLR1表达水平,其中所述检测包括使用相较于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达FOLR1的癌性样本中的染色强度或染色均匀度的方法;(b)确定所述癌性样本的FOLR1染色强度或染色均匀度分数;以及(c)将在步骤(b)中确定的FOLR1染色强度或染色均匀度分数与通过测量至少一种参考样本中的FOLR1蛋白质表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的FOLR1染色强度分数高于所述相对值将所述癌症鉴定为对用所述活性剂治疗敏感。

[0091] 在一些实施方案中,所述活性剂或抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的用途还包括向自其获得所述癌性样本或生物样本的受试者施用包含抗FOLR1抗体或其抗原片段的活性剂。

[0092] 在一些实施方案中,所述癌性样本或生物样本是体液、细胞或组织样本。在一些实施方案中,所述细胞是循环肿瘤细胞。在一些实施方案中,体液是血液、腹水、尿液、血浆、血清或外周血。

[0093] 在所述活性剂或抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的一些实施方案中,所述检测通过酶联免疫吸附测定(ELISA)和/或通过免疫组织化学(IHC)进行。在一些实施方案中,所述IHC是可区分不同水平的FOLR1表达的校准的IHC。在一些实施方案中,所述IHC对具有低细胞表面FOLR1表达、中等FOLR1细胞表面表达或高FOLR1细胞表面表达的样本产生一定范围的染色强度。在一些实施方案中,所述IHC相较于参考样本区分表达FOLR1的癌性样本或生物样本中的染色强度和染色均匀度。在一些实施方案中,IHC手动进行。在一些实施方案中,使用自动系统进行所述IHC。在一些实施方案中,从所述IHC确定FOLR1分数。在一些实施方案中,使用本文所述的抗体或抗原结合片段的IHC产生对于具有增加的FOLR1表达的细胞的一系列染色,特别是染色水平等于或大于2的那些细胞。

[0094] 在一些实施方案中,至少2的分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施

用。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。

[0095] 在一些实施方案中,至少3的分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)的分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0096] 在一些实施方案中,至少2的分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数指示患者将受益于包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂的施用。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0097] 在一些实施方案中,至少2的分数指示应施用减少剂量的活性剂。在一些实施方案中,至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数指示应施用减少剂量的活性剂。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0098] 在一些实施方案中,至少2的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。在一些实施方案中,至少2均质(>75%均匀度)或2异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。

[0099] 在一些实施方案中,至少3的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。在一些实施方案中,至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0100] 在一些实施方案中,至少2的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。在一些实施方案中,至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为可能对低剂量抗FOLR1治疗有反应。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0101] 在一些实施方案中,至少2的分数将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌或子宫内膜癌。

[0102] 在一些实施方案中,至少3的分数将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,至少3均质(>75%均匀度)或至少3异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0103] 在一些实施方案中,至少2的分数将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,至少2均质(>75%均匀度)或至少2异质(25%-75%均匀度)的分数将所述癌症鉴定为对用包含抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的活性剂治疗敏感。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌、子宫内膜癌或卵巢癌。

[0104] 在一些实施方案中,参考样本是阳性参考样本或阴性参考样本。在一些实施方案中,参考样本包含细胞、细胞团块或组织。

[0105] 在用于本文提供的用途的活性剂或抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的一些实施方

案中,本文提供的抗体、抗原结合片段或多肽还包含选自由以下组成的组的检测试剂:酶、荧光团、放射性标记以及发光团。在一些实施方案中,所述检测试剂选自由以下组成的组:生物素、地高辛、荧光素、氘以及罗丹明。

[0106] 在用于本文提供的用途的活性剂或抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的一些实施方案中,所述癌症是FOLR1阳性癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自由以下组成的组:卵巢癌、脑癌、乳腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、胰腺癌、肾癌以及肺癌。在一些实施方案中,肺癌是非小细胞肺癌或细支气管肺泡癌。在一些实施方案中,卵巢癌是上皮性卵巢癌。在一些实施方案中,所述癌症是铂抗性、复发性或难治性的。

[0107] 在用于本文提供的用途的活性剂或抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的一些实施方案中,使用至少一种另外的抗FOLR1抗体或其抗原结合片段检测FOLR1表达。在一些实施方案中,使用两种抗FOLR1抗体或其抗原结合片段测量FOLR1表达。在一些实施方案中,至少一种抗体或其抗原结合片段结合至固体支持物。在一些实施方案中,至少一种抗体或其抗原结合片段结合至微量滴定板。在一些实施方案中,至少一种抗体或其抗原结合片段包含检测剂。在一些实施方案中,检测剂是显色检测剂、荧光检测剂、酶检测剂或电化学发光检测剂。在一些实施方案中,检测剂是辣根过氧化物酶(HRP)。在一些实施方案中,ELISA是夹心ELISA。

[0108] 在用于本文提供的用途的活性剂或抗FOLR1抗体或其抗原结合片段的一些实施方案中,所述活性剂包含FOLR1抗体huMov19或是FOLR1抗体huMov19。在一些实施方案中,所述活性剂作为还包含美登木素DM4和可裂解的磺基SPDB接头(IMG853)的抗体美登木素偶联物施用。

[0109] 在一些实施方案中,本文提供的抗体、抗原结合片段、多肽或组合物用作诊断剂。

[0110] 在一些实施方案中,本文提供的抗体、抗原结合片段、多肽或组合物用于在诊断患有癌症的患者中的癌症的方法中使用。在一些实施方案中,所述癌症与升高的FOLR1水平相关。

[0111] 在一些实施方案中,抗体、抗原结合片段或多肽的结合亲和力是在实施例3中获得和/或图4、5和/或6中所示的结合亲和力。

## 附图简述

[0112] 图1提供使用353.2-1和353.9-20抗体进行的NSCLC和卵巢子宫内膜样腺癌样本的IHC染色的图像。

[0113] 图2提供使用353.2-1和353.9-20抗体进行的正常唾液腺和胰腺样本的IHC染色的图像。

[0114] 图3提供使用353.9-21、353.2-1、353.3-8以及353.5-7抗体进行的细胞溶解产物的蛋白质印迹的图像。

[0115] 图4示出使用荧光活化细胞分选仪(FACS)测定的353.2-1、353.3-1、353.5-7以及353.9-21抗体与变性KB细胞(A)和未变性T47D细胞(B)的结合。

[0116] 图5示出使用ELISA测定的353.2-1、353.3-1、353.5-7以及353.9-21抗体与重组人FOLR1的结合。

[0117] 图6示出通过ELISA测定的抗FOLR2抗体和353.2-1、353.3-1、353.5-7以及353.9-

21抗体与FOLR2的结合(A)以及抗FOLR3抗体和353.2-1、353.3-1、353.5-7以及353.9-21抗体与FOLR3的结合(B)。

[0118] 图7示出通过ELISA测定的抗FOLR1抗体2.1和huMov19与去糖基化的和未处理的重组人FOLR1的结合。

[0119] 图8示出通过蛋白质印迹分析测定的抗FOLR1抗体2.1、huMov19和BN3.2与去糖基化的和未处理的KB和Igrov-1细胞溶解产物的结合。

[0120] 图9示出用于表面重构抗FOLR1 FRIHC2-1抗体的相关氨基酸和对应于每个残基的kabat位置。

[0121] 图10示出用于表面重构的鼠和人源化FRIHC2-1抗体序列的比对。鼠重链和轻链序列分别对应于SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28。表面重构的人源化重链序列对应于SEQ ID NO:62,并且表面重构的人轻链型式1.0和型式1.1序列分别对应于SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64。轻链序列中的前导序列“S”(框架位置-1)对于人源化不考虑并且不用于人源化抗体序列中,所以其未在图中示出。

[0122] 图11示出用于CDR接枝抗FOLR1 FRIHC2-1抗体的相关氨基酸和对应于每个残基的kabat位置。

[0123] 图12示出用于CDR接枝的鼠和人源化FRIHC2-1序列的比对。鼠重链和轻链序列分别对应于SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28。接枝的人源化重链序列对应于SEQ ID NO:65,并且接枝的人轻链型式1.0和型式1.1序列分别对应于SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67。轻链序列中的前导序列“S”(框架位置-1)对于人源化不考虑并且不用于人源化抗体序列中,所以其未在图中示出。

[0124] 图13提供使用在不同稀释度下的FOLR1-2.1(353-2.1)抗体进行的肺腺癌组织的IHC染色的图像。

[0125] 图14提供使用FOLR1-2.1(353-2.1)抗体进行的阳性正常组织(输卵管)(A)和细胞(FOLR1转染的细胞(B))和阴性细胞(未转染的细胞(C))的IHC染色的图像。

[0126] 图15提供使用FOLR1-2.1(353-2.1)抗体进行的卵巢癌组织(A)和肺腺癌组织样本(B)的IHC染色的图像。

[0127] 图16示出使用FOLR1-2.1测定进行的子宫内膜癌样本中的肿瘤细胞的膜染色。基质细胞未染色。

[0128] 图17示出(A)FOLR1-2.1测定与(B)BN3.2测定之间的染色和计分差异的比较。

## 发明详述

[0129] 本公开提供检测循环肿瘤细胞上的人叶酸受体1(FOLR1)(包括膜FOLR1、脱落FOLR1以及FOLR1)的方法以及提高以FOLR1的过度表达为特征的癌症的治疗的功效或对所述治疗有反应的可能性的方法。所述检测方法可检测FOLR1的临床上相关的动态范围并且因此可用于患者分级,用于监测或测定治疗功效或或对以FOLR1的过度表达为特征的癌症的治疗有反应的可能性。还公开了适用于FOLR1检测方法(例如,用于膜结合和细胞缔合的FOLR1的IHC)的新型FOLR1结合多肽,如抗体。还提供相关多肽和多核苷酸、包含所述FOLR1结合剂的组合物以及制备FOLR1结合剂的方法。

[0130] I.定义

[0131] 为了有助于理解本发明,在下文中定义一些术语和短语。

[0132] 除非另外指明,否则如本文使用的术语“人叶酸受体1”、“FOLR1”或“叶酸受体 $\alpha$  (FR- $\alpha$ )”是指任何天然人FOLR1。因此,所有这些术语可指如本文所指示的蛋白质或核酸序列。术语“FOLR1”涵盖“全长”未加工的FOLR1以及由细胞内的加工所产生的任何形式的FOLR1。所述术语还涵盖天然存在的FOLR1蛋白或核酸变体,例如剪接变体、等位基因变体以及同种型。本文所述的FOLR1多肽和多核苷酸可从多种来源如人组织类型或另一种来源分离,或者通过重组或合成的方法来制备。FOLR1序列的实例包括但不限于NCBI参考号P15328、NP\_001092242.1、AAX29268.1、AAX37119.1、NP\_057937.1和NP\_057936.1。

[0133] 术语“脱落抗原”和“脱落FOLR1”在本文中可互换使用。这些术语是指可溶且不为细胞缔合的FOLR1蛋白。在一些实施方案中,它包括细胞外结构域(ECD)和糖基磷脂酰肌醇(GPI)接头。在一个实施方案中,脱落FOLR1仅包括ECD。FOLR1蛋白包括信号肽(氨基酸1-24)、FOLR1蛋白链(氨基酸25-233或234)以及可裂解的前肽(氨基酸235至257)。成熟的FOLR1蛋白缺乏信号肽。脱落FOLR1可包括氨基酸1至257、1至233、1至234、25至233、25至234或其任何其他片段。在一些实施方案中,信号序列被裂解。在其他实施方案中,ECD和GPI部分可包埋于膜中(例如,可溶性脂筏)。在一个实施方案中,脱落FOLR1可包括氨基酸1-233或其片段。

[0134] 术语“抗体”意指通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点来识别并特异性地结合靶标(如蛋白质、多肽、肽、糖类、多核苷酸、脂质或前述的组合)的免疫球蛋白分子。如本文所用,术语“抗体”涵盖完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>以及Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体(如双特异性抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白,以及包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要所述抗体表现出所需的生物活性。抗体可以是以下五种主要类别的免疫球蛋白中的任一种: IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM(基于其重链恒定区的身份而分别被称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ ),或其亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。不同类别的免疫球蛋白具有不同的且众所周知的亚单位结构和三维构型。抗体可为裸露的或与其他分子如毒素、放射性同位素等偶联。

[0135] 在一些实施方案中,抗体是非天然存在的抗体。在一些实施方案中,抗体是从天然组分纯化的。在一些实施方案中,抗体是重组产生的。在一些实施方案中,抗体是由杂交瘤产生的。

[0136] “阻断性”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或减小其结合的抗原如FOLR1的生物活性的抗体。在某个实施方案中,阻断性抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。理想地,生物活性被降低10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0137] 术语“抗FOLR1抗体”或“结合FOLR1的抗体”是指能够以足够的亲和力结合FOLR1的抗体,以使得所述抗体在靶向FOLR1中适用作诊断剂和/或治疗剂。除非另外说明,抗FOLR1抗体与不相关的非FOLR1蛋白的结合程度小于约10%的抗体与FOLR1的结合,如例如通过放射性免疫测定法(RIA)所测量的。在某些实施方案中,结合FOLR1的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。在一个实施方案中,抗FOLR1抗体不结合FOLR2、FOLR3、FOLR4或叶酸。FOLR1抗体的实例是在本领域中已知的并且公开于美国公布申请号2012/0009181和2012/0282175以及美国临时申请号61/695,791和61/756,254以及PCT

公布W02011/106528中,所述申请各自以引用的方式并入本文。抗FOLR1抗体及其抗原结合片段的序列提供于表1-8中。

[0138] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>以及Fv片段、线性抗体、单链抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。术语抗体的“抗原结合片段”包括抗体的保留与抗原特异性结合的能力的一个或多个片段。已显示可由全长抗体的特定片段执行抗体的抗原结合功能。涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括(但不限于): (i) Fab片段,其为由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段(例如,由木瓜蛋白酶消化的抗体产生三个片段:两个抗原结合Fab片段和不会结合抗原的一个Fc片段); (ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,其为由包含由在铰链区的二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段(例如,由胃蛋白酶消化的抗体产生两个片段:二价抗原结合F(ab')<sub>2</sub>片段和不会结合抗原的pFc'片段)及其相关F(ab')单价单位; (iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段(即,重链的包括于Fab中的所述部分); (iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,以及相关二硫键连接的Fv; (v) 由VH结构域组成的dAb(结构域抗体)或sdAb(单结构域抗体)片段(Ward等,Nature 341:544-546,1989);以及(vi) 分离的互补决定区(CDR)。

[0139] “单克隆抗体”是指在单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合中涉及的均质抗体群。这与通常包含针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体形成对照。术语“单克隆抗体”涵盖完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白以及包含抗原识别位点的任何其他经修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指以任何数量的方式形成的这类抗体,这些方式包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达以及转基因动物。

[0140] 术语“人源化抗体”是指为包含最少非人(例如,鼠)序列的特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段的非人(例如,鼠)抗体形式。通常,人源化抗体是其中来自互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔、仓鼠)的CDR的具有所需特异性、亲和力以及能力的残基置换的人免疫球蛋白(Jones等,1986,Nature,321:522-525; Riechmann等,1988,Nature,332:323-327; Verhoeyen等,1988,Science,239:1534-1536)。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被来自非人物种的抗体中的具有所需特异性、亲和力以及能力的相应残基置换。人源化抗体可通过Fv框架区中的和/或所置换的非人残基内的另外残基的取代来进行进一步修饰,以便改善和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。一般来说,人源化抗体将基本上包含所有的至少一个并且通常两个或三个可变结构域,所述可变结构域含有所有或基本上所有对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还可包含免疫球蛋白恒定区或结构域的至少一部分(Fc),通常为人免疫球蛋白的一部分。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利5,225,539和5,639,641、Roguska等,Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3): 969-973(1994)以及Roguska等,Protein Eng. 9(10):895-904(1996)中。在一些实施方案中,“人源化抗体”是表面重构的抗体。在一些实施方案中,“人源化抗体”是CDR接枝的抗体。

[0141] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。重链和轻链的可变区各自自由通过三个互补决定区(CDR)(还被称为高变区)连接的四个框架区(FR)组成。每个链中的CDR通过FR紧密保持在一起,并且与来自另一链的CDR一起有助于抗



体的抗原结合位点的形成。存在至少两种用于确定CDR的技术：(1) 基于跨物种序列变异的方法(即,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,(第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda Md.));和(2) 基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani等(1997)J.Molec.Biol.273:927-948))。此外,在本领域中有时使用这两种方法的组合来确定CDR。

[0142] 当提及可变结构域中的残基时,通常使用Kabat编号系统(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)(例如,Kabat等,Sequences of Immunological Interest.第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。

[0143] 如Kabat中的氨基酸位置编号是指Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中用于抗体的编译的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这种编号系统,实际线性氨基酸序列可包含对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或向其中的插入的几个或另外氨基酸。例如,重链可变结构域可包含在H2的残基52之后的单一氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后的多个插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b以及82c等)。对于给定抗体,可通过在具有同源性的区域处抗体序列与“标准”Kabat编号的序列的比对来确定残基的Kabat编号。而Chothia是指结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。当使用Kabat编号规则编号时,取决于Chothia CDR-H1环的长度,所述环的末端在H32与H34之间变化(这是因为Kabat编号方案将插入安置在H35A和H35B处;如果35A和35B都不存在,那么所述环在32处终止;如果仅35A存在,那么所述环在33处终止;如果35A与35B都存在,那么所述环在34处终止)。AbM高变区代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且被Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用。

环	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34
[0144]			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Chothia 编号)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0145] 术语“人抗体”意指由人产生的抗体或使用本领域中已知的任何技术制备的具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的这个定义包括完整或全长抗体、其片段和/或包含至少一个人重链和/或轻链多肽的抗体,例如像包含鼠轻链多肽和人重链多肽的抗体。

[0146] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列衍生自两种或更多种物



种的抗体。通常,轻链与重链二者的可变区对应于衍生自一种哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔等)的抗体的具有所需特异性、亲和力以及能力的可变区,而恒定区与衍生自另一物种(通常是人)的抗体中的序列是同源的以避免在所述物种中引起免疫反应。

[0147] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可互换使用并且是指能够被特定抗体识别并特异性地结合的抗原的所述部分。当所述抗原是多肽时,表位可由连续氨基酸和通过蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在蛋白质变性时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在蛋白质变性时丧失。在独特的空间构象中表位通常包含至少3个并且更通常至少5个或8至10个氨基酸。

[0148] “结合亲和力”总体上是指一个分子(例如,抗体)的单一结合位点与它的结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力可通常由解离常数(Kd)或半最大有效浓度(EC50)表示。亲和力可通过本领域中已知的常用方法(包括本文所述的那些)进行测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持结合时间更长。测量结合亲和力的多种方法是本领域已知的,其中的任何方法可用于本发明的目的。在本文描述具体说明性实施方案。

[0149] 当本文提及结合亲和力时使用的“或更好”是指在分子与它的结合配偶体之间更强的结合。当本文使用时,“或更好”是指由更小的数值Kd值表示的更强的结合。例如,对抗原具有“0.6nM或更好”的亲和力的抗体,所述抗体对所述抗原的亲和力是<0.6nM,即0.59nM、0.58nM、0.57nM等或小于0.6nM的任何值。在一个实施方案中,如通过Kd测定的抗体的亲和力将介于约 $10^{-3}$ 至约 $10^{-12}$ M之间、介于约 $10^{-6}$ 至约 $10^{-11}$ M之间、介于约 $10^{-6}$ 至约 $10^{-10}$ M之间、介于约 $10^{-6}$ 至约 $10^{-9}$ M、介于约 $10^{-6}$ 至约 $10^{-8}$ M或介于约 $10^{-6}$ 至约 $10^{-7}$ M之间。

[0150] 如本文所用,短语“基本上相似”或“基本上相同”表示两个数值(通常一个数值与本发明的抗体相关并且另一个数值与参考/比较抗体相关)之间的足够高的相似度,以使得本领域技术人员将认为在通过所述值(例如,Kd值)测量的生物学特性的背景下这两个值之间的差异几乎没有或没有生物学和/或统计学显著性。所述两个值之间的差异随参考/比较抗体的值变化而小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%。

[0151] 如本文使用的术语“免疫偶联物”或“偶联物”是指连接至细胞结合剂(即,抗FOLR1抗体或其片段)并由以下通式定义的化合物或其衍生物:A-L-C,其中C=细胞毒素,L=接头,并且A=细胞结合剂或抗FOLR1抗体或抗体片段。免疫偶联物还可由以下呈相反顺序的通式来定义:C-L-A。

[0152] “接头”是能够将化合物(通常是药物,如美登木素)以稳定的、共价的方式连接至细胞结合剂如抗FOLR1抗体或其片段的任何化学部分。在化合物或抗体保持活性的条件下,接头可易感于或基本上抵抗酸诱导的裂解、光诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、酯酶诱导的裂解以及二硫键裂解。适合的接头是本领域熟知的并且包括,例如,二硫基、硫醚基、酸不稳定性基团、光不稳定性基团、肽酶不稳定性基团以及酯酶不稳定性基团。接头还包括如本文所描述的和在本领域已知的带电荷的接头及其亲水形式。

[0153] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是呈在自然界中未发现的形式多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或

组合物包括已经被纯化到不再呈它们在自然界被发现的形式的那些。在一些实施方案中,被分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本上纯的。

[0154] 如本文所用,“基本上纯的”是指至少50%纯的(即,不含污染物)、至少90%纯的、至少95%纯的、至少98%纯的或至少99%纯的材料。

[0155] 术语“升高的”FOLR1、FOLR1的“增加的表达”以及FOLR1的“过度表达”是指含有升高的FOLR1表达水平的样本。FOLR1可相较于对照值(例如,来自无癌症的受试者的生物样本、组织或细胞、已知不表达或表达低FOLR1的样本或癌症、正常样本或不具有升高的FOLR1值的癌症中的表达水平)升高、增加或过度表达。例如,具有增加的表达的样本可含有相对于对照值至少2倍、至少3倍或至少5倍的增加。

[0156] FOLR1表达可通过免疫组织化学来测量并且通过与展示确定分数的校准的对照进行比较来给出染色强度分数或染色均匀度分数(例如,如果强度与3级校准的对照可比,则将3的强度分数给予测试样本,或者如果强度与2级校准的对照可比,则将2的强度给予测试样本)。例如,通过免疫组织化学测得的1、2或3(3+)的分数,优选2或3(3+)的分数指示增加的FOLR1表达。异质或均质的染色均匀度也指示FOLR1表达。染色强度和染色均匀度分数可单独或组合(例如,2均质、2异质、3均质、3异质等)使用。参见表11。在另一个实例中,FOLR1表达的增加可通过检测相对于对照值(例如,在来自未患有癌症或患有FOLR1值未升高的癌症的受试者的组织或细胞中的表达水平)至少2倍、至少3倍或至少5倍增加来测定。

[0157] “参考样本”可用于关联并比较以本发明的方法从测试样本中获得的结果。参考样本可为细胞(例如,细胞系、细胞团块)或组织。“参考样本”中的FOLR1水平可以是FOLR1的绝对量或相对量、一个范围的量、最小和/或最大量、平均量和/或中位量。“参考样本”还可充当测试样本与其相比较的FOLR1表达的基线。“参考样本”可包括来自同一患者的先前样本或基线样本、具有已知的FOLR1表达水平的正常参考或来自具有已知的FOLR1表达水平的相关患者群体的参考。FOLR1水平还可表示为标准曲线中的值。标准曲线是绘制测定数据以确定样本中的FOLR1的浓度的定量方法。在一个实施方案中,参考样本是包含纯化的FOLR1或FOLR1-Fc的抗原标准品。本发明的诊断方法可涉及测试样本中的FOLR1表达水平与“参考值”之间的比较。在一些实施方案中,所述参考值是参考样本中的FOLR1的表达水平。参考值可以是预先确定的值并且还可从与测试样本同时进行测试的参考样本(例如对照生物样本或参考样本)来确定。参考值可为单一截止值,如中位值或平均值或一个范围的值,如置信区间。可以为个体的不同亚组确立参考值,所述个体如易患癌症的个体、患有早期或晚期癌症的个体、男性和/或女性个体、或者经受癌症治疗的个体。正常参考样本或值和阳性参考样本或值的实例在本文描述并且还描述于以引用的方式并入本文的W02012/135675的实施例1和实施例8-10中。

[0158] 在一些实施方案中,参考样本是来自健康组织的样本,具体地说不受癌症影响的相应组织或不受过度表达FOLR1的癌症影响的相应组织或已知不表达可检测水平的FOLR1的相应健康组织。这些类型的参考样本被称为阴性对照样本或“正常”对照样本。在其他实施方案中,所述参考样本是来自表达可检测的FOLR1的肿瘤或健康组织的样本。这些类型的参考样本被称为阳性对照或阳性参考样本。阳性对照样本还可用作与FOLR1表达水平相关的染色强度的类型(异质对均质)和/或程度(0、1、2、3)的比较指标。阳性对照比较样本还被称为校准的参考样本。低或非FOLR1表达参考在本文中在实施例8-10中描述并且还包括食管、胰腺

的腺泡细胞/胰岛、肺的肺泡间结缔组织以及唾液腺的腺泡细胞的所有结构。对于细胞系,示例性非表达者包括BxPC3、Panc-1和ASPC1。阳性FOLR1参考在本文(例如在实施例)中描述并且还包括胰腺的导管、正常肺的呼吸上皮以及唾液腺的闰管。在一些实施方案中,阳性FOLR1参考包括胰腺的导管和唾液腺的闰管。对于细胞系,示例性高FOLR1表达者在本文(例如在实施例)中描述并且还包括KB、HeLa、用FOLR1转染的300.19细胞、Igrov-1和Wish,并且示例性低FOLR1表达者包括Ovcar-3、Caov-3、SW620、T47D以及Skov-3。另一种阳性高FOLR1参考是用FOLR1稳定或瞬时转染的细胞系。FOLR1的另外阳性和阴性样本描述于表13中。用于特定癌症的适当阳性和阴性参考FOLR1水平可通过测量一个或多个适当受试者中的FOLR1的水平来确定,并且可针对受试者的特定群体来定制这类参考水平(例如,参考水平可以是年龄相匹配的,以使得可在来自一定年龄的受试者的样本中的FOLR1水平与一定年龄组中关于特殊疾病状态、表型或其缺乏的参考水平之间作出比较)。这类参考水平还可针对用于测量生物样本中的FOLR1的水平的具体技术(例如,免疫测定等)进行定制。

[0159] 如本文所用,“免疫组织化学”是指用于分析例如细胞或组织的组织化学和免疫学方法。因此,术语“免疫组织化学”、“免疫细胞化学”以及“免疫化学”可互换使用。

[0160] 本文中的术语“第一抗体”是指特异性地结合样本中的靶蛋白抗原的抗体。第一抗体通常是ELISA测定或IHC程序中使用的的第一种抗体。在一个实施方案中,所述第一抗体是在IHC程序中使用的唯一抗体。本文中的术语“第二抗体”是指特异性地结合第一抗体、从而在第一抗体与后续试剂(如果有的话)之间形成桥或连接的抗体。所述第二抗体通常是免疫组织化学程序中使用的第二种抗体。

[0161] 在具体实施方案中,本发明的“样本”或“生物样本”来源于生物,如来自真核生物体。在一些实施方案中,所述样本是人样本,但是也可使用动物样本。用于在本发明中使用的样本的非限制性来源例包括实体组织、活检抽吸物、腹水、流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤的外部切片、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、泪液、唾液、乳汁、肿瘤、器官、细胞培养物和/或细胞培养物成分。“癌性样本”是包含癌性细胞的样本。所述方法可用于检查FOLR1的表达方面或样本的状态,包括但不限于:比较细胞或组织的不同类型、比较不同发育阶段以及检测或确定疾病或异常的存在和/或类型。

[0162] 出于本文的目的,组织样本的“切片”是指组织样本的单一部分或一片,例如从组织样本切下的组织薄片或细胞。应了解,根据本发明可取得组织样本的多个切片并对其进行分析。在一些情况下,所选择的组织部分或切片包含同源细胞群体。在其他情况下,所选择的部分包括组织的一个区域,例如作为非限制性实例的管腔。例如,所选择的部分可例如像一个细胞或两个细胞那样小,或者可以代表成千上万个细胞。在大多数情况下,细胞的收集是重要的,并且虽然已经描述了本发明用于在细胞组分的检测中使用,但所述方法还可用于检测生物体的非细胞组分(例如作为非限制性实例的在血液中的可溶性组分)。

[0163] 如本文所用,术语“捕获试剂”是指能够结合且捕获样本中的靶分子的试剂,以使得在适合条件下捕获试剂-靶分子复合物可与样本的剩余部分分离。在一个实施方案中,捕获试剂是固定的。在一个实施方案中,夹心免疫测定中的捕获试剂是针对靶抗原的抗体或不同抗体的混合物。

[0164] 如本文所用,术语“可检测的抗体”是指能够通过由检测装置放大的标记直接检测或通过例如经标记的另一种抗体间接检测的抗体。对于直接标记,所述抗体通常偶联至可

通过一些装置检测的部分。在一个实施方案中,可检测的抗体是生物素化的抗体。

[0165] 如本文所用,术语“检测装置”是指用于检测可检测抗体的存在的部分或技术并且包括放大固定的标记如捕获到微量滴定板上的标记的检测试剂。在一个实施方案中,检测装置是荧光检测剂如抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。

[0166] 通常,“夹心ELISA”采用以下步骤:(1)将微量滴定板涂覆捕获抗体;(2)添加样本,并且存在的任何抗原结合捕获抗体;(3)添加检测抗体并且其结合抗原;(4)添加酶联第二抗体并且其结合检测抗体;以及(5)添加底物并且将其通过酶转化成可检测形式。

[0167] 词语“标记”当在本文使用时是指直接地或间接地与抗体偶联以便产生“标记的”抗体的可检测化合物或组合物。所述标记本身是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可催化可检测的底物化合物或组合物的化学变化。

[0168] 所谓“关联(correlate)”或“关联(correlating)”意指以任何方式对第一次分析的性能和/或结果与第二次分析的性能和/或结果进行比较。例如,可将第一次分析的结果用于执行第二次分析、和/或可将第一次分析的结果用于确定是否应该进行第二次分析、和/或可将第一次分析的结果与第二次分析的结果进行比较。在一个实施方案中,增加的FOLR1表达与FOLR1靶向性抗癌治疗的增加的效力可能性相关联。

[0169] 术语“癌症”和“癌性的”是指或描述哺乳动物中的生理状态,其中细胞群体以未调控的细胞生长为特征。癌症的实例包括但不限于癌瘤(carcinoma)、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤以及白血病。这类癌症的更具体实例包括内皮、间质或上皮起源的癌症,如肺癌(例如,鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、间皮瘤以及肺鳞状癌)、腹膜癌(例如,原发性腹膜癌)、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌(浆液性或子宫内膜样)、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌(例如,子宫内膜样腺癌)或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌(liver cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、脑癌(例如脉络丛的成胶质细胞瘤、肿瘤)以及各种类型的头颈部癌,以及还有血管和输卵管的肿瘤。癌症还涵盖包含具有升高的FOLR1表达水平的癌症。这类FOLR1升高的癌症包括但不限于,卵巢癌、非小细胞肺癌(腺癌)、子宫癌、子宫内膜癌、胰腺癌、肾癌、肺癌以及乳腺癌。

[0170] “肿瘤(Tumor)”和“赘生物(neoplasm)”是指由过度细胞生长或增殖所引起的任何组织块,是良性的(非癌的)或恶性的(癌的),包括癌前病变。

[0171] 术语“癌细胞”、“肿瘤细胞”以及语法同等术语是指来源于肿瘤或癌前病变的总细胞群,包括非致瘤性细胞(包括肿瘤细胞群块)和致瘤性干细胞(癌干细胞)二者。如本文所用,术语“肿瘤细胞”当仅仅是指缺乏更新和分化能力的那些肿瘤细胞时,将由术语“非致瘤性”修饰,以区分那些肿瘤细胞和癌干细胞。

[0172] 术语“受试者”是指待成为具体治疗的接受者的任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类、啮齿类等。通常,提及人受试者时术语“受试者”和“患者”在本文可互换使用。

[0173] 术语“药物制剂”是指呈允许活性成分的生物活性有效的形式并且不含有对进行所述制剂施用的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制剂。这类制剂可以是无菌的。

[0174] 如本文所公开的抗体或免疫偶联物的“有效量”是足以执行明确说明的目的的量。关于所说明的目的,“有效量”可凭经验且以常规方式来确定。

[0175] 术语“治疗有效量”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物中的疾病或病症的抗体或其他药物的量。在癌症的情况下,药物的治疗有效量可减少癌细胞的数量;减小肿瘤大小;抑制(即,在某种程度上减慢并且在某一实施方案中停止)癌细胞对周边器官的浸润;抑制(即,在某种程度上减慢并在某一实施方案中停止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤生长;在某种程度上减轻与癌症相关的一种或多种症状;和/或产生有利反应如增加的无进展生存期(PFS)、无疾病生存期(DFS)或总生存期(OS)、完全反应(CR)、部分反应(PR)或在一些情况下,稳定疾病(SD)、进行性疾病的减少(PD)、进展时间减少(TTP)、在卵巢癌的情况下CA125的减少或其任何组合。。参见本文中“治疗”的定义。在药物可防止生长和/或杀灭现有的癌细胞的程度上,它可为细胞抑制的和/或细胞毒性的。在某些实施方案中,增加的FOLR1水平的鉴定允许施用减少量的FOLR1靶向性治疗剂,以实现与更高剂量所见到的相同的治疗效果。“预防有效量”是指在剂量和持续时间上有效实现所需预防结果所需要的量。通常但不一定地,由于预防剂量在疾病前或疾病早期阶段用于受试者,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0176] 术语“良好反应”通常是指在受试者中引起有利的状态。关于癌症治疗,所述术语是指在受试者身上提供治疗效果。在癌症中的积极治疗效果可以按许多方式来测量(参见, W.A.Weber, J.Nucl.Med.50:1S-10S(2009))。例如,肿瘤生长抑制、分子标记物表达、血清标记物表达以及分子成像技术全部可用来评定抗癌治疗剂的治疗功效。关于肿瘤生长抑制,根据NCI标准,  $T/C \leq 42\%$  是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$  被认为是高抗肿瘤活性水平, 其中  $T/C(\%) = \text{处理物的中位肿瘤体积} / \text{对照物的中位肿瘤体积} \times 100$ 。有利反应可例如通过以下各项来评定:增加的无进展生存期(PFS)、无疾病生存期(DFS)或总生存期(OS)、完全反应(CR)、部分反应(PR)或在一些情况下,稳定疾病(SD)、进行性疾病的减少(PD)、进展时间减少(TTP)、在卵巢癌的情况下CA125的减少或其任何组合。

[0177] PFS、DFS和OS可通过由美国国家癌症研究所(National Cancer Institute)和美国食品和药品管理局(U.S.Food and Drug Administration)对于新药物的批准所设定的标准进行测量。参见Johnson等,(2003)J.Clin.Oncol.21(7):1404-1411。

[0178] “无进展生存期”(PFS)是指从招募至疾病进展或死亡的时间。通常使用卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)方法和实体肿瘤反应评价标准(RECIST)1.1标准测量PFS。通常,无进展生存期是指其中患者保持存活而无癌症恶化的情况。

[0179] “肿瘤进展时间”(TTP)被定义为从招募至疾病进展的时间。通常使用RECIST1.1标准测量TTP。

[0180] “完全反应”或“完全缓解”或“CR”指示响应于治疗肿瘤或癌症的所有迹象的消失。这并不总是意味着癌症已被治愈。

[0181] “部分反应”或“PR”是指响应于治疗,一种或多种肿瘤或病灶的大小或体积或体内癌症的程度的降低。

[0182] “疾病稳定”是指无进展或复发的疾病。在稳定疾病中,既不存在足够的肿瘤萎缩来有资格作为部分反应,也不存在足够的肿瘤增加来适合被称为进行性疾病。

[0183] “进行性疾病”是指现有非靶病变的又一个新病变或肿瘤的出现和/或明确进展。进行性疾病还可指自治疗开始由于肿瘤的质量或扩散增加所致的超过20%的肿瘤生长。

[0184] “无疾病生存期”(DFS)是指在治疗期间或之后患者保持无疾病的时间长度。

[0185] “总生存期”(OS)是指从患者招募至死亡或在最后已知存活的日期审查的时间。OS包括相较于原初或未治疗的个体或患者预期寿命的延长。总生存期是指其中患者保持存活持续确定时间段如(例如从诊断或治疗时间)一年、五年等的情况。

[0186] “CA125水平的降低”可根据妇科癌症协作组(GCIG)准则进行评定。例如,可在治疗之前测量CA125水平以确立基线CA125水平。可在治疗期间或之后一次或多次测量CA125水平,并且CA125水平随时间推移相较于基线水平的降低被视为CA125水平的降低。

[0187] 术语如“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“治疗(to treat)”或“缓和(alleviating)”或“缓和(to alleviate)”是指治愈、减缓、减轻所诊断的病理病状或病症的症状和/或阻止其进展的治疗措施。因此,需要治疗的那些包括已经诊断患有或疑似患有所述病症的那些。在某些实施方案中,如果患者显示出一种或多种下列情况,那么受试者被成功地根据本发明的方法针对癌症“治疗”:癌细胞的数量减少或完全不存在;肿瘤尺寸减小;抑制或不存癌细胞浸润至周边器官,包括例如癌症扩散至软组织和骨骼;抑制或不存肿瘤转移;抑制或不存肿瘤生长;与特定癌症相关的一种或多种症状减轻;发病率和死亡率降低;生命质量改善;致瘤性、致瘤性发生频率或肿瘤的致瘤能力减少;肿瘤中癌症干细胞的数量或发生频率减少;致瘤性细胞分化成非致瘤性状态;增加的无进展生存期(PFS)、无疾病生存期(DFS)或总生存期(OS)、完全反应(CR)、部分反应(PR)、稳定疾病(SD)、进行性疾病的减少(PD)、进展时间减少(TTP)、在卵巢癌的情况下CA125的减少或其任何组合。

[0188] 预防(Prophylactic)或防止(preventative)措施是指防止和/或减缓所靶向的病理病状或病症的发展的治疗措施。因此,需要预防或防止措施的那些包括易患所述病症的那些和其中待预防所述病症的那些。

[0189] 如本文所使用,术语“医疗保健提供者”是指直接与活受试者(例如,人患者)相互作用和向其施用的个体或机构。医疗保健提供者的非限制性实例包括医生、护士、技术人员、治疗学家、药剂师、顾问、可选的医学从业者、医疗机构、医生办公室、医院、急诊室、诊所、紧急护理中心、可选的医学诊所/机构以及任何其他提供以下服务的实体:一般和/或专门的治疗、评定、维持、疗法、药物治疗和/或涉及所有或任何部分的患者的健康状态的建议,包括但不限于一般医疗、专门医疗、手术和/或任何其他类型的治疗、评定、维持、疗法、药物治疗和/或建议。

[0190] 在一些方面中,医疗保健提供者可施用或指示另一个医疗保健提供者施用疗法以治疗癌症。疗法的“施用”如本文所述包括向受试者开出疗法以及将所述疗法递送、施加或给予至受试者。医疗保健提供者可实施或指示另一个医疗保健提供者或患者进行以下行为:获得样本;处理样本;递交样本;接收样本;转移样本;分析或测量样本;定量样本;提供在分析/测量/定量样本之后所获得的结果;接收在分析/测量/定量样本之后所获得的结果;比较/计分在分析/测量/定量一个或多个样本之后所获得的结果;提供来自一个或多个样本的比较/得分;获得来自一个或多个样本的比较/得分;施用疗法或治疗剂(例如,FOLR1结合剂);开始施用疗法;终止施用疗法;继续施用疗法;暂时中断施用疗法;增加施用的治疗剂的量;减少施用的治疗剂的量;继续施用一定量的治疗剂;增加施用治疗剂的频率;减少施用治疗剂的频率;维持治疗剂的相同给药频率;通过至少另一种疗法或治疗剂替代一种疗法或治疗剂;将一种疗法或治疗剂与至少另一种疗法或额外的治疗剂组合。这些行为

可通过医疗保健提供者自动使用计算机实施的方法(例如,经由网络服务或独立计算机系统)来进行。

[0191] 如本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指具有任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。所述核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物、或可通过DNA或RNA聚合酶并入至聚合物中的任何基质。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和它们的类似物。如果存在,可在聚合物的组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可被非核苷酸组分间断。多核苷酸可在聚合之后进行进一步修饰,如通过与标记组分偶联。其他类型的修饰包括,例如,“加帽(cap)”、用类似物取代一种或多种天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰,例如像,具有不带电荷的键联(例如,磷酸甲酯、磷酸三酯、磷酰胺酸酯(phosphoamidate)、氨基甲酸酯(cabamate),等)和具有带电荷的键联(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯,等)的那些、含有侧基部分(例如像,蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸,等))的那些、具有嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素等)的那些、含有螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化金属,等)的那些、含有烷化剂(alkylator)的那些、具有经修饰的键联(例如, $\alpha$ 端基异构核酸,等等)的那些、以及一种或多种多核苷酸的未修饰形式。此外,通常存在于糖类中的任何羟基可被(例如)磷酸酯基、磷酸酯基置换、被标准保护基保护或被活化以提供与另外核苷酸的另外键联,或可与固体支持物偶联。5'和3'末端OH可被磷酸化或被胺或具有1至20个碳原子的有机封端基团部分而取代。其他羟基还可衍生化成标准保护基。多核苷酸还可含有本领域中通常已知的类似形式的核糖或脱氧核糖,包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟或2'-叠氨基-核糖、碳环糖类似物、 $\alpha$ -端基异构糖、差向异构糖类(如阿拉伯糖、木糖或来苏糖)、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物以及无碱基核苷类似物如甲基核苷。一个或多个磷酸二酯键联可被可选的连接基置换。这些可选的连接基包括但不限于,其中磷酸酯被P(O)S(“硫代磷酰胺酯(thioate)”)、P(S)S(“二硫代磷酰胺酯(dithioate)”)、(O)NR<sub>2</sub>(“酰胺化物(amidate)”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH<sub>2</sub>(“甲缩醛(formacetal)”)置换的实施方案,其中每个R或R'独立地是H或任选含有醚(--O--)键联的取代的或未取代的烷基(1-20个C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。多核苷酸中并非所有的键联都需要一致。前文描述适用于本文所提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0192] 术语“载体”意指能够在宿主细胞中递送且表达一种或多种目标基因或序列的构建体。载体的实例包括,但不限于,病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝缩剂相关的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体以及某些真核细胞(如生产者细胞)。

[0193] 术语“多肽”、“肽”以及“蛋白质”在本文可互换使用,以指具有任何长度的氨基酸的聚合物。所述聚合物可以是直链的或支链的,它可包含经修饰的氨基酸,并且它可被非氨基酸间断。所述术语还涵盖已经天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化,或任何其他操作或修饰,如与标记组分偶联。在所述定义内还包括,例如,含有氨基酸的一种或多种类似物(包括,例如,非天然氨基酸,等)的多肽、以及本领域已知的其他修饰。应了解,因为本发明的多肽是基于抗体,所以在某些实施方案中,所述多肽可作为单链或缔合的链而存在。在一些实施方案中,多肽、肽或蛋白质是非天然存在的。在一些实施方案中,多肽、肽或蛋白质是从其他天然存在的组分纯化的。在



一些实施方案中,多肽、肽或蛋白质是重组产生的。

[0194] 在两种或更多种核酸或多肽的情形中的术语“相同的”或“同一性”百分比是指当针对最大对应进行比较和比对时(如果必要,引入空位),两个或更多个序列或子序列是相同的或具有相同的指定百分比的核苷酸或氨基酸残基,而不考虑任何保守性氨基酸取代作为序列同一性的一部分。可使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量同一性百分比。可用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对的算法和软件是本领域已知的。序列比对算法的一个这样的非限制性实例是在Karlin等,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.,87:2264-2268中进行描述、在Karlin等,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.,90:5873-5877中进行修改并且并入至NBLAST和XBLAST程序(Altschul等,1991,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402)中的算法。在某些实施方案中,可如Altschul等,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402中所述而使用Gapped BLAST。BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschul等,1996,Methods in Enzymology,266:460-480)、ALIGN、ALIGN-2(Genentech,South San Francisco,California)或Megalign(DNASTAR)是可用于比对序列的另外可公开获得的软件程序。在某些实施方案中,两个核苷酸序列之间的同一性百分比使用GCG软件中的GAP程序来确定(例如,使用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70或90的空位权重以及1、2、3、4、5或6的长度权重)。在某些替代实施方案中,合并Needleman和Wunsch算法(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))的GCG软件包中的GAP程序可用于确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比(例如,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵和16、14、12、10、8、6或4的空位权重以及1、2、3、4、5的长度权重)。或者,在某些实施方案中,使用Myers和Miller算法(CABIOS,4:11-17(1989))来确定核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比。例如,可使用ALIGN程序(版本2.0)和使用具有残基表、12的空位长度罚分以及4的空位罚分的PAM120来确定同一性百分比。可由本领域技术人员确定用于通过具体比对软件实现最大比对的适当参数。在某些实施方案中,使用比对软件的默认参数。在某些实施方案中,第一氨基酸序列与第二氨基酸序列的同一性百分比“X”计算为 $100 \times (Y/Z)$ ,其中Y是在所述第一序列和第二序列的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目(如通过目视检查或具体序列比对程序来比对),并且Z是所述第二序列中的残基的总数目。如果第一序列的长度比第二序列长,那么所述第一序列与第二序列的同一性百分比将比所述第二序列与所述第一序列的同一性百分比长。

[0195] 作为非限制性实例,在某些实施方案中,可以使用Bestfit程序(Wisconsin序列分析包,Unix版本8,Genetics Computer Group,University Research Park,575Science Drive,Madison,WI 53711)来确定任何特定多核苷酸是否与参考序列具有一定百分比的序列同一性(例如,至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性并且在一些实施方案中至少95%、96%、97%、98%或99%同一性)。Bestfit使用Smith和Waterman的局部同源性算法(Advances in Applied Mathematics 2:482-489(1981)),以找到两个序列之间具有同源性的最佳片段。当根据本发明使用Bestfit或任何其他序列比对程序来确定特定序列是否与参考序列具有例如95%同一性时,设定参数,以使得在参考核苷酸序列的全长上计算同一性百分比并且允许同源性中的空位高达所述参考序列中核苷酸总数的5%。

[0196] 在一些实施方案中,本发明的两种核酸或多肽是基本上相同的,意味着当针对最大对应进行比较和比对时,如使用序列比较算法或通过目视检查所测量,它们具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%并且在一些实施方案中至少95%、96%、



97%、98%、99%核苷酸或氨基酸残基同一性。在某些实施方案中,同一性存在于长度为至少约10、约20、约40-60个残基或其间的任何整数值的序列的区域,或存在于比60-80个残基长的区域,例如,至少约90-100个残基,或所述序列在所比较的序列的全长(例如像核苷酸序列的编码区)上基本上相同。

[0197] “保守性氨基酸取代”是以下取代,其中一个氨基酸残基被具有相似侧链的另一个氨基酸残基置换。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已经在本领域中进行了定义,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 $\beta$ 分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,以苯丙氨酸取代酪氨酸是保守性取代。在某些实施方案中,本发明的多肽和抗体的序列中的保守性取代不会消除含有所述氨基酸序列的多肽或抗体与抗原(即,所述多肽或抗体所结合的FOLR1)的结合。鉴定不会消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守性取代的方法是本领域熟知的(参见,例如,Brummell等,Biochem.32:1180-1 187(1993);Kobayashi等.Protein Eng.12(10):879-884(1999);以及Burks等.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。

[0198] 除非上下文另外清楚地规定,如本公开和权利要求中使用的单数形式“一个(种)(a)”、“一个(种)(an)”以及“所述(the)”包括复数形式。

[0199] 应了解,无论本文何处用语言“包括”来描述实施方案,都还提供以“由...组成”和/或“主要由...组成”的措辞来描述的其他相似实施方案。

[0200] 如本文的短语如“A和/或B”中使用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”以及“B”。同样地,如在短语如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”意图涵盖以下各实施方案中的每一种:A、B以及C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0201] II.FOLR1结合剂

[0202] 本发明提供特异性地结合人FOLR1的药剂。这些药剂在本文被称为“FOLR1结合剂”。在某些实施方案中,FOLR1结合剂是抗体、免疫偶联物或多肽。人FOLR1的氨基酸和核苷酸序列在本领域是已知的并且在本文中还可由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所代表来提供。

[0203] 人叶酸受体1:

MAQRM T T Q L L L L L V W V A V V G E A Q T R I A W A R T E L L N V C M N A K H H K E K P G P E D K L H  
E Q C R P W R K N A C C S T N T S Q E A H K D V S Y L Y R F N W N H C G E M A P A C K R H F I Q D T C L Y E C

[0204] S P N L G P W I Q Q V D Q S W R K E R V L N V P L C K E D C E Q W W E D C R T S Y T C K S N W H K G W N W T  
S G F N K C A V G A A C Q P F H F Y F P T P T V L C N E I W T H S Y K V S N Y S R G S G R C I Q M W F D P A Q G  
N P N E E V A R F Y A A M S G A G P W A A W P F L L S L A L M L L W L L S (SEQ ID NO:1)

[0205] 人叶酸受体1核酸序列:

atggctcagcgatgacaacacagctgctgctccttctagtgtgggtggctgtagtagggaggctcagacaaggattgcatgggccc  
aggactgagcttctcaatgtctgcatgaacgccaagcaccacaaggaaaagccaggccccaggacaagttgcatgagcagtgctg  
acctggaggagaatgctgctgttctaccaacaccagccaggaaagccataaggatgttctacctatatagattcaactggaacc  
actgtggagagatggcacctgacctgcaaacggcatttcacaggacacctgacctctacgagtgtccccaaactggggccctggat  
[0206] ccagcaggtggatcagagctggcgcaaagagcgggtactgaacgtgccctgtgcaaaggaggactgtgcaatggtgggaagat  
tgtcgacacctctacacctgaaggaactggcacaagggtggaaactggacttcagggtttaacaagtgcgcagtgaggagctgcc  
tgccaacctttccatttctactccccacaccactgttctgtgcaatgaaatctggactcactcctacaaggtcagcaactacagccgag  
ggagtgccgctgcatccagatgtgttcgaccagcccagggaacccaatgaggaggtggcgagggttctatgctgcagccatg  
agtggggctggggccctgggcagcctggccttctcttagcctggccctaatgtgctgtgtgctgctcagc (SEQ ID NO:2)

[0207] 因此,在一些实施方案中,FOLR1结合剂可结合SEQ ID NO:1的表位。

[0208] 在一些实施方案中,抗FOLR1抗体可特异性地结合FOLR1 (SEQ ID NO:1) 的表位,其中表位包含N-糖基化的氨基酸。这类抗体因此在其被糖基化时将结合FOLR1并且在其未糖基化时将不会结合FOLR1。换言之,这些抗体的结合是乙二醇依赖性的。这些抗体是有利的,在于它们可用于区分FOLR1的糖基化和非糖基化形式。鉴于膜定位可能需要糖基化,所以所述抗体可有利地用于膜特异性染色。

[0209] 在一些实施方案中,抗FOLR1抗体可特异性地结合FOLR1的包含FOLR1的N-糖基化氨基酸69的表位。在一些实施方案中,抗FOLR1抗体可特异性地结合FOLR1的包含FOLR1的N-糖基化氨基酸161的表位。在一些实施方案中,抗FOLR1抗体可特异性地结合FOLR1的包含FOLR1的N-糖基化氨基酸201的表位。

[0210] 在某些实施方案中,抗FOLR1抗体是由在2013年4月16日根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 的条款寄存在美国典型培养物保藏所 (ATCC) (位于10801University Boulevard,Manassas,VA 20110) 并具有ATCC寄存号PTA-120196 (“FOLR1-9.20”,还被称为“IMGN 353.9-20”、“353.9-20”或“9.20”) 的鼠杂交瘤产生的抗体。在某些实施方案中,抗FOLR1抗体是由在2013年4月16日寄存在ATCC且具有ATCC寄存号PTA-120197 (“FOLR1-2.1”,还被称为“IMGN353.2-1”、“353.2-1”、“2.1”或“muFRIHC2-1”) 的鼠杂交瘤产生的抗体。

[0211] FOLR1结合剂包括包含以下各项的重链和轻链CDR序列的FOLR1结合剂: (i) muFRIHC2-1,其还被称为“FOLR1-2.1”、“IMGN 353.2-1”、“353.2-1”或“2.1”; (ii) muFRIHC5-7,其还被称为“IMGN 353.5-7”、“353.5-7”或“5.7”; (iii) “muFRIHC9-20”,其还被称为“FOLR1-9.20”、“IMGN 353.9-20”、“353.9-20”或“9.20”; (iv) 表面重构的huFRIHC2-1型式1.0或1.01; 或 (v) CDR接枝的huFRIHC2-1型式1.0或1.01,其在以下表1和2中提供。FOLR1结合剂还包括包含在以下表1和2中提供的复合CDR的重链和轻链CDR序列的FOLR1结合剂。

[0212] 表1:可变重链CDR氨基酸序列

[0213]

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

[0214] 表2:可变轻链CDR氨基酸序列

[0215]

抗体	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
muFRIHC2-1 ("2.1")	KSSKSLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:6)	LVSNHFS (SEQ ID NO:7)	FQSNYLPLT (SEQ ID NO:8)
muFRIHC5-7 ("5.7")	KSTESLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:12)	LVSNHFS (SEQ ID NO:13)	FQSNYLPLT (SEQ ID NO:14)
muFRIHC9-20 ("9.20")	KSTKSLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:18)	LVSNHFS (SEQ ID NO:19)	FQSNYLPLT (SEQ ID NO:20)
复合	KS(T/S)(K/E)SLNSDGFTY LD (SEQ ID NO:24)	LVSNHFS (SEQ ID NO:25)	FQSNYLPLT (SEQ ID NO:26)

[0216] FOLR1结合分子可以是特异性地结合FOLR1的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含抗体2.1(即SEQ ID NO:3-8)、5.7(即SEQ ID NO:9-14)或9.20(即SEQ ID NO:15-20)的CDR,其中每个CDR具有至多四个(即0、1、2、3或4)保守氨基酸取代。FOLR1结合分子可以是特异性地结合FOLR1的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含以上所示的复合序列的CDR(即,SEQ ID NO:21-26),其中每个CDR具有至多四个(即0、1、2、3或4)保守氨基酸取代。

[0217] FOLR1结合分子可以是特异性地结合FOLR1的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含由ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的CDR。

[0218] 多肽可包含本文所描述的单独可变轻链或可变重链中的一种。抗体和多肽还可包含可变轻链和可变重链。鼠抗体2.1、5.7和9.20以及人源化2.1的可变轻链和可变重链序列在以下表3和4中提供。

[0219] 表3:可变重链氨基酸序列

[0220]

抗体	VH氨基酸序列 (SEQ ID NO)
muFRIHC2-1 ("2.1")	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYIHWVKRPGQGL EWIGWIYPESLNTQYNEKFKAKATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDS AVYFCARRGIYYSPPYALDHWGQGASVTVSS (SEQ ID NO:27)
muFRIHC5-7 ("5.7")	QVQLQQSGPEVVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKRPGQGL EWIGWIYPGSFNVEYNEKFKAKATLTADKSSSTVYMQLSSLTSEDS AVYFCARRGIYFYSPPYALDYWGQGASVTVSS (SEQ ID NO:29)
muFRIHC9-20 ("9.20")	QVQLQQSGPDLVKPGASVRISCKASGFTFTNYYIHWVKRPGQGL EWIGWIYPENVNRYNDKFKAKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCARRGIYYSPPYAMDYWGQGASVTVSS (SEQ ID NO:31)
huFRIHC2-1 (表面重构的)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTNSYIHWVKRPGQGL EWIGWIYPESLNTQYNQKFQGKATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDS AVYFCARRGIYYSPPYALDHWGQGASVTVSS (SEQ ID NO:62)
huFRIHC2-1 (接枝的)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCASGYTFTNSYIHWVRQAPGQG LEWMGWIYPESLNTQYNEKFKARVTMTDRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARRGIYYSPPYALDHWGQGTLVTVSSAST (SEQ ID NO:65)

[0221] 表4: 可变轻链氨基酸序列

[0222]

抗体	VL氨基酸序列 (SEQ ID NO)
muFRIHC2-1 ("2.1")	SDVVLVTQTPLSLPVNIGDQASISCKSSKSLNNSDGFTYLDWYLQKPG QSPQLLIYLVSNHFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPPLTFGGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:28)
muFRIHC5-7 ("5.7")	SDVVLVTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTESLLNSDGFTYLDWYLQKPG QSPQLLIYLVSNHFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPPLTFGGGGTKLEVKR (SEQ ID NO:30)
muFRIHC9-20 ("9.20")	SDVVLVTQTPLSLPVNLGDQASISCKSTKSLNNSDGFTYLDWYLQKP GQSPQLLIYLVSNHFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY CFQSNYLPPLTFGGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:32)
huFRIHC2-1 v. 1.0(表面重构的)	DVVLVTQSPLSLPVNLGQPASISCRSSRSLNNSDGFTYLDWYLQKPGQ SPRLLIYLVSNHFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF QSNYLPPLTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:63)
huFRIHC2-1 v. 1.01(表面重构的)	DVVLVTQSPLSLPVNLGQPASISCKSSKSLNNSDGFTYLDWYLQKPG QSPRLLIYLVSNHFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPPLTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:64)
huFRIHC2-1 v. 1.0(接枝的)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLNNSDGFTYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLVSNHFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QSNYLPPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:66)
huFRIHC2-1 v. 1.01(接枝的)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSKSLNNSDGFTYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLVSNHFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QSNYLPPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:67)

[0223] 还提供包括以下的多肽: (a) 与SEQ ID NO:27、29、31、62或65具有至少约90%序列同一性的多肽;和/或 (b) 与SEQ ID NO:28、30、32、63、64、66或67具有至少约90%序列同一性的多肽。在某些实施方案中,所述多肽包括与SEQ ID NO:27-32或62-67具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性的多肽。因此,在某些实施方案中,所述多肽包括: (a) 与SEQ ID NO:27、29、31、62或65具有至少约95%序列同一性的



多肽;和/或(b)与SEQ ID NO:28、30、32、63、64、66或67具有至少约95%序列同一性的多肽。在某些实施方案中,所述多肽包括(a)具有SEQ ID NO:27、29、31、62或65的氨基酸序列的多肽;和/或(b)具有SEQ ID NO:28、30、32、63、64、66或67的氨基酸序列的多肽。在某些实施方案中,所述多肽是抗体和/或所述多肽特异性地结合FOLR1。在某些实施方案中,所述多肽是特异性地结合FOLR1的鼠、嵌合或人源化抗体。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:27-32或62-67具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:27-32或62-67的不同仅在于保守性氨基酸取代。

[0224] 还提供多肽,所述多肽包含与由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的可变轻链序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的可变轻链。

[0225] 还提供多肽,所述多肽包含与由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的可变重链序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的可变重链。

[0226] 还提供抗体及其抗原结合片段,所述抗体及其抗原结合片段包含与由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的可变重链和可变轻链序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的可变重链和可变轻链序列。

[0227] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是由具有ATCC寄存号PTA-120196的鼠杂交瘤产生的抗体或其抗原结合片段。

[0228] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是由具有ATCC寄存号PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体或其抗原结合片段。

[0229] 多肽可包含本文所描述的单独轻链或重链中的一种。抗体和多肽还可包含轻链与重链二者。抗体2.1、5.7和9.20的轻链和重链序列在以下表5和6中提供。

[0230] 表5:全长重链氨基酸序列

[0231]

抗体	全长重链氨基酸序列(SEQ ID NO)
muFRIHC2-1 ("2.1")	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYIHVVKRPGQGLE WIGWIYPESLNTQYNEKFKAKATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDSAV YFCARRGIYYSPYALDHWGQGASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAA QTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESPLYT LSSSVTVPPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTV PEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDV EVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFP APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDIT VEWQWNGQPAENYKNTQPIMNNTNGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNT

[0232]

muFRIHC5-7 ("5.7")	FTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:33) QVQLQQSGPEVVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKQRPQGGL WIGWIYPGSFNVEYNEKFKAKATLTADKSSSTVYMQLSLTS VYFCARRGIYFYSPYALDYWGQASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLTSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQ FSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE FKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV SLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNNTNGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:35)
muFRIHC9-20 ("9.20")	QVQLQQSGPDLVKPGASVRISCKASGFTFTNYYIHWVKQRPQGGL WIGWIYPENNVRYNDKFKAKATLTADKSSSTAYMQLSLTS VYFCARRGIYYSPYAMDYWGQASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLTSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQ FSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE FKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV SLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNNTNGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:37)
muhuMov19	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSL EWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDF AVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVYPLAPGSA AQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLTSSSVTPSSMRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQ FSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE FKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV SLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNNTNGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:68)

[0233] 表6:全长轻链氨基酸序列

[0234]

抗体	全长轻链氨基酸序列(SEQ ID NO)
muFRIHC2-1 ("2.1")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSSKSLNSDGFTYLDWYLQKPG QSPQLLIYLVSNHFGVGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPLTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL NNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:34)
muFRIHC5-7 ("5.7")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTESLLNSDGFTYLDWYLQKPG QSPQLLIYLVSNHFGVGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPLTFGGGTKLEVKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL LNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:36)

[0235]

muFRIHC9-20 ("9.20")	SDVVLQTPLSLPVNLGDQASISCKSTKSLNSDGFTYLDWYLQKP GQSPQLLIYLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY CFQSNYLPLTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:38)
muhuMov19	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQ PRLLIYRASNLVAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQ SREYPYTFGGGKLEIKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:69)

[0236] 还提供包括以下的多肽：(a) 与SEQ ID NO:33、35或37具有至少约90%序列同一性的多肽；和/或 (b) 与SEQ ID NO:34、36或38具有至少约90%序列同一性的多肽。在某些实施方案中，所述多肽包括与SEQ ID NO:33-38具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性的多肽。因此，在某些实施方案中，所述多肽包括 (a) 与SEQ ID NO:33、35或37具有至少约95%序列同一性的多肽，和/或 (b) 与SEQ ID NO:34、36或38具有至少约95%序列同一性的多肽。在某些实施方案中，所述多肽包括 (a) 具有SEQ ID NO:33、35或37的氨基酸序列的多肽；和/或 (b) 具有SEQ ID NO:34、36或38的氨基酸序列的多肽。在某些实施方案中，所述多肽是抗体和/或所述多肽特异性地结合FOLR1。在某些实施方案中，所述多肽是特异性地结合FOLR1的鼠、嵌合或人源化抗体。在某些实施方案中，与SEQ ID NO:33-38具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:33-38的不同仅在于保守性氨基酸取代。

[0237] 还提供多肽，所述多肽包含与由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的轻链序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的轻链。

[0238] 还提供多肽，所述多肽包含与由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的重链序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的重链。

[0239] 还提供抗体及其抗原结合片段，所述抗体及其抗原结合片段包含与由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的重链和轻链序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的重链和轻链序列。

[0240] 抗体对抗原的亲合力或亲合力可使用本领域中熟知的任何适合的方法通过实验测定，例如流式细胞术、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或放射性免疫测定 (RIA) 或动力学 (例如，BIACORE™分析)。可容易地采用直接结合测定以及竞争性结合测定。(参见例如，Berzofsky等，"Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W.E., 编辑, Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); 以及本文所述的方法。如果在不同条件 (例如盐浓度、pH、温度) 下测量，特定抗体-抗原相互作用的所测量的亲合力可变化。因此，用抗体和抗原的标准化溶液和标准化缓冲液 (如本领域中所已知和如本文所述的缓冲液) 对亲合力和其他抗原结合参数 (例如，KD或Kd、K<sub>on</sub>、K<sub>off</sub>) 进行测量。

[0241] 在一方面,可使用流式细胞术在表达FOLR1抗原的细胞上在表面上进行结合测定。例如,FOLR1阳性细胞如SKOV3可在100 $\mu$ L FACS缓冲液(补充有2%正常山羊血清的RPMI-1640培养基)中使用 $1 \times 10^5$ 个细胞/样本与不同浓度的抗FOLR1抗体一起孵育。随后,可将所述细胞沉淀、洗涤并且与100 $\mu$ L的FITC偶联的山羊抗小鼠或山羊抗人IgG抗体(如可例如从Jackson Laboratory获得,6 $\mu$ g/mL于FACS缓冲液中)一起孵育1小时。随后将所述细胞再次沉淀,用FACS缓冲液洗涤且重新悬浮于200 $\mu$ L的含有1%甲醛的PBS中。可例如使用FACSCalibur流式细胞仪与HTS多孔取样器获得样本并且使用CellQuest Pro(全部来自BD Biosciences, San Diego, US)进行分析。对于每一样本,可输出FL1的平均荧光强度(MFI)并且在半对数曲线中针对抗体浓度绘图以产生结合曲线。将S形剂量反应曲线针对结合曲线拟合并且使用程序如GraphPad Prism v4用默认参数(GraphPad软件, San Diego, CA)计算EC50值。EC50值可用作每一抗体的表观解离常数“Kd”或“KD”的量度。

[0242] 单克隆抗体可使用杂交瘤方法(如由Kohler和Milstein(1975)Nature 256:495所描述的那些)来制备。使用所述杂交瘤方法,使小鼠、仓鼠或其他适当的宿主动物进行免疫,以引发淋巴细胞产生将特异性地结合免疫抗原的抗体。淋巴细胞还可在体外进行免疫。在免疫之后,将淋巴细胞分离并且使用(例如)聚乙二醇与适合的骨髓瘤细胞系融合以形成杂交瘤细胞,然后可从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞选择所述杂交瘤细胞。然后可对产生特异性地针对选定抗原的单克隆抗体的杂交瘤(如通过免疫沉淀法、免疫印迹法或通过体外结合测定(例如,放射免疫测定(RIA);酶联免疫吸附测定(ELISA))确定)使用标准方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)在体外繁殖或在动物中体内作为腹水肿瘤来进行繁殖。然后可如针对多克隆抗体所描述从培养基或腹水纯化所述单克隆抗体。

[0243] 或者,还可使用如美国专利4,816,567中所描述的重组DNA方法来制备单克隆抗体。将编码单克隆抗体的多核苷酸从成熟的B细胞或杂交瘤细胞分离,如通过RT-PCR使用特异性地扩增编码所述抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸引物;并且使用常规工序确定它们的序列。然后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆至适合的表达载体中,所述表达载体当转染至不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞(如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中时,由所述宿主细胞产生单克隆抗体。此外,可如所描述从表达所需的物种的CDR的噬菌体展示文库分离所需的物种的重组单克隆抗体或其片段(McCafferty等,1990,Nature,348:552-554;Clackson等,1991,Nature,352:624-628;以及Marks等,1991,J.Mol.Biol.,222:581-597)。

[0244] 可使用重组DNA技术以许多不同的方式对编码单克隆抗体的多核苷酸进一步修饰以产生替代抗体。在一些实施方案中,(例如)小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域可被取代为:1) (例如)人抗体的那些区以产生嵌合抗体或2) 非免疫球蛋白多肽以产生融合抗体。在一些实施方案中,所述恒定区被截短或去除以便产生单克隆抗体的所需的抗体片段。可变区的定点或高密度诱变可用于优化单克隆抗体的特异性、亲和力等。

[0245] 在一些实施方案中,针对人FOLR1的单克隆抗体是人源化抗体。在某些实施方案中,当施用至人受试者时,这类抗体在治疗上用于减少抗原性和HAMA(人抗小鼠抗体)反应。

[0246] 用于工程化改造、人源化或表面重构非人或人抗体的方法也可使用并且是本领域中熟知的。人源化、表面重构或类似工程化改造的抗体可具有来自非人来源的一个或多个



氨基酸残基,所述来源例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类或其他哺乳动物。这些非人氨基酸残基被经常被称为“引入”残基的残基置换,所述“引入”残基通常取自已知人序列的“引入”可变、恒定或其他结构域。

[0247] 这类引入的序列可用于降低免疫原性或降低、增强或修饰结合、亲和力、结合速率(on-rate)、解离速率(off-rate)、亲合力、特异性、半衰期或任何其他适合的特征,如本领域中所已知。通常,CDR残基直接或最基本地涉及影响FOLR1结合。因此,部分或全部非人或人CDR序列被维持,而可变区和恒定区的非人序列可被人或其他氨基酸置换。

[0248] 抗体还可任选地进行人源化、表面重构、工程化改造或人抗体在保留对抗原FOLR1的高亲和力和其他有利的生物特性的情况下而被工程化改造。为实现这一目标,可使用亲本序列、工程化改造序列和人源化序列的三维模型通过亲本序列和各种概念上人源化和工程化改造产物的分析方法任选地制备人源化(或人)或工程化改造的抗FOLR1抗体和表面重构的抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可获得的且是本领域的技术人员所熟悉的。说明且展示选定候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原如FOLR1的能力的残基。以此方式,可选择框架(FR)残基且与共有序列和引入序列组合以使得实现所需的抗体特征,如对靶抗原的亲和力增加。

[0249] 人源化、表面重构或工程化改造本发明的抗体可使用任何已知的方法来进行,所述方法如但不限于描述于以下中的那些:Winter (Jones等,Nature 321:522 (1986); Riechmann等,Nature 332:323 (1988); Verhoeyen等,Science 239:1534 (1988)); Sims等,J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia和Lesk,J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter等,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta等,J. Immunol. 151:2623 (1993); 美国专利号5,639,641;5,723,323;5,976,862;5,824,514;5,817,483;5,814,476;5,763,192;5,723,323;5,766,886;5,714,352;6,204,023;6,180,370;5,693,762;5,530,101;5,585,089;5,225,539;4,816,567;PCT/:US98/16280;US96/18978;US91/09630;US91/05939;US94/01234;GB89/01334;GB91/01134;GB92/01755;W090/14443;W090/14424;W090/14430;EP 229246;7,557,189;7,538,195;以及7,342,110,其各自以引用的方式整体并入本文,包括本文引用的参考文献。

[0250] 在某些替代实施方案中,FOLR1的抗体是人抗体。可使用本领域已知的各种技术直接制备人抗体。可生成体外免疫的或从产生针对靶标抗原的抗体的免疫个体分离的永生化人B淋巴细胞(参见,例如,Cole等,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77页 (1985); Boemer等,1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95; 以及美国专利5,750,373)。此外,所述人抗体可选自噬菌体文库,其中所述噬菌体文库表达人抗体,如(例如)以下中所描述:Vaughan等,1996, Nat. Biotech., 14: 309-314; Sheets等,1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95: 6157-6162; Hoogenboom和Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227: 381; 以及Marks等,1991, J. Mol. Biol., 222: 581。还在美国专利号5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915;6,593,081;6,300,064;6,653,068;6,706,484;以及7,264,963;以及Rothe等,2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j. jmb.2007.12.018 (所述文献各自以引用的方式整体并入本文)中描述了用于抗体噬菌体文库的产生和使用的技术。亲和力成熟策略和链改组策略 (Marks等,1992, Bio/Technology 10: 779-783, 以引

用的方式整体并入)是本领域已知的并且可用于产生高亲和力人抗体。

[0251] 还可在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中来制备人源化抗体,在免疫时所述小鼠能够在不产生内源性免疫球蛋白的情况下产生人抗体的全部谱系。此方法描述于美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;以及5,661,016中

[0252] 在某些实施方案中提供用于(例如)增加肿瘤渗透的抗体片段。已知用于产生抗体片段的各种技术。传统上,这些片段经由完整抗体的蛋白水解消化而产生(例如Morimoto等,1993,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117;Brennan等,1985,Science,229:81)。在某些实施方案中,重组产生抗体片段。Fab、Fv以及scFv抗体片段都可在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达并且从其分泌,从而允许产生大量这些片段。这类抗体片段还可从抗体噬菌体文库分离。所述抗体片段还可以是如(例如)美国专利5,641,870中所描述的线性抗体,并且可为单特异性的或双特异性的。用于产生抗体片段的其他技术对于熟练的从业人员将是显而易见的。

[0253] 出于本发明的目的,应当认识到修饰的抗体可包含提供抗体与人FOLR1的多肽的缔合的任何类型的可变区。在此方面,所述可变区可包括或源自可被诱导发生体液反应并且产生针对所需肿瘤相关抗原的免疫球蛋白的任何类型的哺乳动物。这样,修饰的抗体的可变区可为(例如)人、鼠、非人灵长类(例如,食蟹猴、猕猴等)或狼来源。在一些实施方案中,修饰的免疫球蛋白的可变区与恒定区均为人的。在其他实施方案中,相容的抗体的可变区(通常源自非人来源)可被工程化改造或特别地修改以改进结合特性或减少分子的免疫原性。在这方面,本发明中有用的可变区可人源化或另外通过包含所引入的氨基酸序列来改变。

[0254] 在某些实施方案中,重链与轻链二者中的可变结构域通过一个或多个CDR的至少部分置换并且必要时通过部分框架区置换和序列改变来进行改变。虽然CDR可衍生自与框架区衍生自其中的抗体相同类别或甚至子类别的抗体,但是应该设想到CDR将衍生自不同类别的抗体并且在某些实施方案中衍生自来自不同物种的抗体。可能不需要用来自供体可变区的完整CDR置换所有的CDR,以将一个可变结构域的抗原结合能力转移至另一个可变结构域的抗原结合能力。相反,可能仅需要转移对维持抗原结合位点的活性来说必要的那些残基。鉴于美国专利号5,585,089、5,693,761以及5,693,762中所提出的解释,通过进行常规实验或通过尝试与错误测试来获得具有减少的免疫原性的功能性抗体将很好在本领域技术人员的能力范围内。

[0255] 虽然对可变区进行改变,但本领域技术人员将会理解本发明的经修饰的抗体将包括以下抗体(例如,全长抗体或其免疫反应性片段),即,其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分缺失或以另外的方式改变以提供所需的生物化学特性,如当与包含天然或未改变的恒定区的具有大约相同免疫原性的抗体进行比较时增加的肿瘤定位或减少的血清半衰期。在一些实施方案中,将修饰的抗体的恒定区将包括人恒定区。符合本发明的恒定区的修饰包括一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。即,本文所公开的经修饰的抗体可包含对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)中的一个或多个和/或对轻链恒定结构域(CL)的改变或修饰。在一些实施方案中,预期其中一个或多个结构域被部分或全部缺失的经修饰的恒定区。在一些实施方案中,经修饰的抗体将包括结构域缺失的构建体或变体,其中整个CH2结构域已经被去除( $\Delta$ CH2构建体)。在一些实施方案中,省去的恒定区

结构域将被短氨基酸间隔区(例如,10个残基)置换,所述间隔区提供通常由缺乏的恒定区所赋予的一些分子柔性。

[0256] 应注意,在某些实施方案中,经修饰的抗体可被工程化改造以使CH3结构域直接对应的经修饰的抗体的铰链区融合。在其他构建体中,可能需要在铰链区与经修饰的CH2和/或CH3结构域之间提供肽间隔区。例如,可表达相容的构建体,其中CH2结构域已缺失并且剩下的CH3结构域(经修饰的或未经修饰的)通过5至20个氨基酸间隔区而连接至铰链区。可添加这种间隔区以便(例如)确保恒定结构域的调控元件保持自由和可及或使铰链区保持柔性。然而,应注意,在一些情况下,氨基酸间隔区可证明为免疫原性并且引发针对构建体的非需要的免疫反应。因此,在某些实施方案中,添加至构建体的任何间隔区将是相对非免疫原性的,或甚至完全地省去,以便保持所修饰的抗体的所需的生物化学性质。

[0257] 除整个恒定区结构域的缺失之外,将认识到本发明的抗体可以通过少数或甚至单个氨基酸的部分缺失或取代来提供。例如,在CH2结构域的选定区域中的单个氨基酸的突变可能足以基本上减少Fc结合并且因此增加肿瘤定位。类似地,可能需要仅仅缺失控制调节的效应子功能(例如,补体C1q结合)的一个或多个恒定区结构域的那一部分。恒定区的这类部分缺失可改进抗体的选定特征(血清半衰期),同时使与所述恒定区结构域相关联的其他所需的功能保持完整。此外,正如以上所提到的,所公开的抗体的恒定区可通过增强所得到的构建体的特性的一个或多个氨基酸的突变或取代来进行修饰。就此而言,破坏由保存性结合位点(例如Fc结合)提供的活性,同时基本上保持所修饰的抗体的构型和免疫原性特性可能是可能的。某些实施方案可包括将一个或多个氨基酸添加至恒定区以增强所需的特征,如减少或增加效应子功能或提供更多细胞毒素或碳水化合物附着。在这类实施方案中,可能希望插入或复制衍生自选定恒定区结构域的特异性序列。

[0258] 本发明进一步包括基本上与本文所提出的嵌合、人源化以及人抗体、或其抗体片段同源的变体和等效物。这些可以包括,例如,保守性取代突变,即,一个或多个氨基酸被相似的氨基酸取代。例如,保守性取代是指一种氨基酸被相同通用分类内的另一种氨基酸取代,例如像,一种酸性氨基酸被另一种酸性氨基酸取代、一种碱性氨基酸被另一种碱性氨基酸取代或一种中性氨基酸被另一种中性氨基酸取代。保守氨基酸取代的目的在本领域中是众所周知的。

[0259] 本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽,包括针对人FOLR1的抗体或其片段。本领域中将认识到可改变本发明的一些氨基酸序列,而不对蛋白质的结构或功能产生显著影响。因此,本发明进一步包括显示出实质性活性或包含针对人叶酸受体蛋白的抗体或其片段的区域的多肽的变型。这类突变体包括缺失、插入、翻转、重复以及类型取代。

[0260] 可进一步修饰多肽和类似物以便包含非蛋白质通常部分的另外化学部分。这些衍生的部分可改善蛋白质的溶解度、生物半衰期或吸收。所述部分还可减少或消除蛋白质的任何希望的副作用等。关于那些部分的综述可在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第20版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(2000)中找到。

[0261] 本文所描述的分离的多肽可通过本领域中已知的任何适合的方法来产生。这类方法的范围从直接蛋白质合成方法至构建编码分离的多肽序列的DNA序列并在适合的转化宿主中表达那些序列。在一些实施方案中,使用重组技术,通过分离或合成编码目标野生型蛋白的DNA序列来构建DNA序列。任选地,可通过位点特异性诱变对序列进行诱变以提供其功

能类似物。参见,例如,Zoeller等,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 81:5662-5066(1984)和美国专利号4,588,585。

[0262] 在一些实施方案中,编码目标多肽的DNA序列将使用寡核苷酸合成仪通过化学合成来进行构建。这类寡核苷酸可基于所需多肽的氨基酸序列并选择在宿主细胞中有利的那些密码子来进行设计,目标重组多肽将在所述宿主细胞中产生。标准方法可应用于合成编码目标分离的多肽的分离的多核苷酸序列。例如,完整的氨基酸序列可用于构建反向翻译的基因。此外,可合成含有编码特定分离多肽的核苷酸序列的DNA低聚物。例如,可合成编码所需多肽的部分的一些小寡核苷酸并且然后连接。各个寡核苷酸通常包含用于互补组装的5'或3'突出。

[0263] 一旦组装(通过合成、定点诱变或另外方法),编码特定的目标分离多肽的多核苷酸序列将被插入至表达载体中并且可操作地连接至适于蛋白质在所需宿主中的表达之用的表达控制序列。适当的组装可通过核苷酸测序、限制性酶切图谱以及生物活性多肽在适合的宿主中的表达得到证实。如本领域所熟知的,为了获得转染的基因在宿主中的高表达水平,所述基因必须可操作地连接至在选定的表达宿主中具有功能的转录和翻译表达控制序列。

[0264] 在某些实施方案中,重组表达载体用于扩增和表达编码针对人FOLR1的抗体或其片段的DNA。重组表达载体是可复制的DNA构建体,所述构建体具有编码抗FOLR1抗体或其片段的多肽链的合成或cDNA衍生的DNA片段,或可操作地连接至源自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的适合的转录或翻译调控元件的其片段。转录单位一般包含以下各项的组装:

- (1) 在基因表达中具有调控作用的一个或多个遗传元件,例如,转录启动子和/或增强子,
- (2) 转录成mRNA及翻译成蛋白质的结构或编码序列,以及
- (3) 适当的转录和翻译起始和终止序列。

这类调控元件可包括操纵基因序列以控制转录。可另外并入通常由复制起点赋予的在宿主中复制的能力和有助于转化体的识别的选择基因。当DNA区在功能上彼此相关时,它们被可操作地连接。例如,如果信号肽(分泌前导序列)的DNA表达为参与多肽的分泌的前体,那么它可操作地连接至所述多肽的DNA;如果启动子控制编码序列的转录,那么它可操作地连接至所述编码序列;或如果核糖体结合位点被定位以允许翻译,那么它可操作地连接至编码序列。意图在酵母表达系统中使用的结构元件包含使宿主细胞能够细胞外分泌翻译的蛋白质的前导序列。或者,当重组蛋白在无前导序列或转运序列的情况下表达时,它可包括N末端蛋氨酸残基。所述残基可任选地随后从所表达的重组蛋白裂解以提供最终产物。

[0265] 表达控制序列和表达载体的选择将取决于宿主的选择。可采用范围广泛的表达宿主/载体组合。用于真核宿主的有用的表达载体包括,例如,包含来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒以及巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用的表达载体包括已知的细菌质粒,如来自大肠杆菌的质粒(包括pCR 1、pBR322、pMB9及其衍生物)、广宿主范围质粒(如M13)和丝状单链DNA噬菌体。

[0266] 用于表达FOLR1结合多肽或抗体(或FOLR1蛋白以用作抗原)的适合的宿主细胞包括在适当启动子控制下的原核生物、酵母、昆虫或高等真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或杆菌。高等真核细胞包括哺乳动物来源的确立细胞系。还可采用无细胞翻译系统。用于细菌、真菌、酵母以及哺乳动物细胞宿主的适当的克隆和表达载体由Pouwels等(Cloning Vectors:A Laboratory Manual,Elsevier,N.Y.,1985)

进行描述,所述文献的相关公开内容特此以引用的方式并入。关于蛋白质产生(包括抗体产生)的方法的另外信息可在(例如)美国专利公布号2008/0187954、美国专利号6,413,746和6,660,501、以及国际专利公布号WO 04009823中找到,所述专利各自特此以引用的方式整体并入本文。

[0267] 还有利地采用不同哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组蛋白。可进行重组蛋白质在哺乳动物细胞中的表达,因为这类蛋白质通常正确折叠、适当修饰并且为完全功能性。适合的哺乳动物宿主细胞系的实例包括HEK-293和HEK-293T,由Gluzman(Cell 23:175, 1981)描述的猴肾细胞的COS-7系和其他细胞系,包括例如,L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa以及BHK细胞系。哺乳动物表达载体可包含非转录元件如复制起点、连接至待表达的基因的适合的启动子和增强子、和其他5'或3'侧接非转录序列、以及5'或3'非翻译序列,如必需核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。用于在昆虫细胞中产生异源蛋白的杆状病毒系统由Luckow和Summers,Bio/Technology 6:47 (1988)综述。

[0268] 由转化的宿主产生的蛋白质可根据任何适合的方法进行纯化。这类标准方法包括色谱法(例如,离子交换、亲和力以及定大小柱色谱法(sizing column chromatography))、离心、差别溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。亲和标签如六组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感外壳序列(influenza coat sequence)以及谷胱甘肽-S-转移酶可附接至蛋白质以允许通过适当的亲和柱来容易地纯化。分离的蛋白质还可使用如蛋白水解、核磁共振以及x射线晶体学的技术进行物理表征。

[0269] 例如,来自将重组蛋白分泌至培养基中的系统的上清液可首先使用商业上可获得的蛋白质浓缩过滤器(例如,Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)进行浓缩。在浓缩步骤之后,可将浓缩物施加至适合的纯化基质。或者,可采用阴离子交换树脂,例如,具有二乙基氨基乙基(DEAE)侧基的基质(matrix)或基材(substrate)。所述基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或蛋白质纯化中通常采用的其他类型。或者,可采用阳离子交换步骤。适合的阳离子交换剂包括含有磺丙基或羧甲基的各种不溶性基质。最后,采用疏水RP-HPLC介质(例如,具有甲基或其他脂肪族侧基的硅胶)的一种或多种反相高效液相色谱(RP-HPLC)步骤可用于进一步纯化FOLR1结合剂。呈各种组合的一些或全部前述纯化步骤还可用于提供均质重组蛋白。

[0270] 在细菌培养中产生的重组蛋白可通过(例如)初始从细胞团块提取、接着一次或多次浓缩、盐析、水离子交换或尺寸排阻色谱步骤来进行分离。高效液相色谱法(HPLC)可用于最终纯化步骤。在重组蛋白的表达中采用的微生物细胞可通过任何便利的方法进行破坏,包括冻融循环、超声处理、机械破碎或使用细胞溶解剂。

[0271] 本领域已知的用于纯化抗体和其他蛋白质的方法还包括,例如,美国专利公布号2008/0312425、2008/0177048以及2009/0187005中所描述的那些,所述专利各自特此以引用的方式整体并入本文。

[0272] III. 多核苷酸

[0273] 在某些实施方案中,本发明涵盖多核苷酸,所述多核苷酸包括编码特异性结合人FOLR1受体的多肽或这种多肽的片段的多核苷酸。例如,本发明提供包含编码人FOLR1的抗体或编码这种抗体的片段的核酸序列的多核苷酸。本发明的多核苷酸可呈RNA形式或呈DNA

形式。DNA包括cDNA、基因组DNA以及合成DNA；并且可为双链的或单链的，并且如果是单链，则可为编码链或非编码(反义)链。在一些实施方案中，所述多核苷酸是缺乏一个或多个内源性内含子的cDNA或DNA。

[0274] 在一些实施方案中，多核苷酸是非天然存在的多核苷酸。在一些实施方案中，多核苷酸是重组产生的。

[0275] 在某些实施方案中，多核苷酸是分离的。在某些实施方案中，多核苷酸是基本上纯的。在一些实施方案中，多核苷酸是从天然组分纯化的。

[0276] 本发明提供包括编码多肽的多核苷酸的多核苷酸，所述多肽包含选自SEQ ID NO:3-38和59-67组成的组的序列。还提供编码与SEQ ID NO:3-38和59-67具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性的多肽的多核苷酸。

[0277] 本发明还提供包含选自以下表7和8中所示的那些的序列的多核苷酸。

[0278] 表7:可变重链多核苷酸序列

[0279]

抗体	可变重链多核苷酸序列(SEQ ID NO)
muFRIHC2-1 ("2.1")	cagggtccaactgcagcagctctggacctgagctgggtgaagcctggggcttcagtgaggatatcctgcaagg cttctggctacaccttcacaaactctatattcactgggtgaaaaagaggcctggacagggacttgagtgga ttggatggattatcctgaaagtcttaatactcaatacaatgagaagttcaaggccaaggccacactgactgct gacaagtcctccagcacatcctacatgcagctcagcagctgacctctgaggactctgcggtctatttctgtg caagaaggggtatttattactactctccctatgctctggaccactgggggtcaaggagcctcagtcaccgtctc ctca (SEQ ID NO:39)
muFRIHC5-7 ("5.7")	cagggtccaactgcagcagctctggacctgaggtgggtgaagcctggggcttcagtgaggatatcctgcaagg cttctggctacaccttcacaaactactatatacactgggtgaagcagaggcctggacagggacttgagtgga ttggatggattatcctggaaagtttaattgttgagtacaatgagaagttcaaggccaaggccacactgactgc agacaaatcctccagcacagctctacatgcaactcagcagcctgacctctgaggactctgcggtctatttctgt gcaagaaggggtatttatttactctccctatgcttggactactgggggtcaaggagcctcagtcaccgtctc ctca (SEQ ID NO:41)
muFRIHC9-20 ("9.20")	cagggtccaactgcagcagctctggacctgacctgggtgaagcctggggcttcagtgaggatatcctgcaagg cttctggcttcaccttcacaaactactatatacactgggtgaagcagaggcctggacagggacttgagtgga ttggatggattatcctgaaaatgttaattgttaggtacaatgacaagttcaaggccaaggccacactgactgc agacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacctctgaggactctgcggtctatttctg tgcaagaaggggtatttattactactctccctatgctatggactactgggggtcaaggagcctcagtcaccgtct cctca (SEQ ID NO:43)



[0280]

huFRIHC2-1 (表面重构的)	aagcttgccaccATGGGTTGGAGCTGCATTATCCTTTTCCTTGTGGCTA CAGCTACTGGCGTTCACTCTCAGGTACAATTGGTTTCAGTCAGGA GCCGAGGTCGTAAAGCCCCGGTGCCAGTGTGAAGATCTCATGCAA GGCAAGCGGTTATACTTTTACAAACTCTTACATTTCATTGGGTGAA AAAGCGGCCCGGCCAGGGTCTCGAATGGATCGGCTGGATCTACC CAGAAAGTCTGAACACTCAATACAACCAGAAGTTTCAGGGTAAG GCAACTCTCACTGCCGACAAGAGCTCTAGCACAAAGCTATATGCA GTTGTCTAGTTTGACAAGCGAGGATAGCGCAGTTTACTTTTGTGC TCGGCGTGGTATTTATTACTACTCACCTTATGCTCTGGATCACTG GGGACAGGGTGCCTCTGTTACCGTTTCCAGTGCATCCACCaaaggcc c (SEQ ID NO:70)
huFRIHC2-1 (接枝的)	aagcttgccaccATGGGCTGGAGCTGCATAATCCTCTTCCTCGTAGC TACCGCCACTGGGGTGCATTCTCAAGTACAGTTGGTGCAGTC CGGAGCTGAAGTCAAGAAGCCAGGGGCTTCTGTAAAGGTGA GCTGTAAGGCTTCCGGATATACCTTCACAAACAGTTATATCC ATTGGGTGAGGCAAGCTCCAGGCCAGGGTCTCGAATGGATG GGATGGATCTACCCCGAGAGTCTGAACACCCAGTACAACGA GAAGTTCAAGGCACGTGTGACCATGACAAGAGACACCTCCA TCAGTACAGCCTATATGGAATTGAGCCGTCTCAGAAGTGATG ATACAGCAGTGTACTACTGCGCCAGGCGGGGCATCTACTACT ACAGCCCATACGCTCTCGACCACTGGGGACAAGGAACACTG GTAACCGTAAGCTCAGCTTCTACAaaggccc (SEQ ID NO:71)

[0281] 表8:可变轻链多核苷酸序列

[0282]

抗体	可变轻链多核苷酸序列(SEQ ID NO)
muFRIHC2-1 ("2.1")	agtgatgttctgacccaaactcactctctcctgtcaatttgagatcaagcctctatcttgaagt cttctaagagtcttgaatagtgtgattcacttatttgactggtacctgcagaagccaggccagtctcca cagctcctaataatatttggttctaatacttttctggagttccagacaggttcagtgccagtggtcaggaaca gatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggattgggagttattattgcttcagagtaactatctt cctctcacgttcggaggggggaccaagctggaataaaacgg (SEQ ID NO:40)
muFRIHC5-7 ("5.7")	agtgatgttctgacccaaactcactctctcctgtcaatttgagatcaagcctctatcttgaagt ctactgagagtcttgaatagtgtgattcacttatttgactggtacctgcagaagccaggccagtctcca cagctcctaataatatttggttctaatacttttctggagttccagacaggttcagtgccagtggtcaggaaca gatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggattgggagttattattgcttcagagtaactatctt cctctcacgttcggaggggggaccaagctggaagtaaaacgg (SEQ ID NO:42)
muFRIHC9-20 ("9.20")	agtgatgttctgacccaaactcactctctcctgtcaatttgagatcaagcctctatcttgaagt ctactaagagtcttgaatagtgtgattcacttatttgactggtacctgcagaagccaggccagtctcca cagctcctaataatatttggttctaatacttttctggagttccagacaggttcagtgccagtggtcaggaaca gatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggattgggagttattattgcttcagagtaactatctt cctctcacgttcggaggggggaccaagctggaataaaacgg (SEQ ID NO:44)

[0283]

huFRIHC2-1 v. 1.0(表面重构的)	gaattcgccaccATGGGTTGGTCATGTATAATACTTTTCCTGGTAGC TACTGCTACTGGTGTGCATTGAGATGTGGTGTGACTCAGTC ACCCTTGTCTCTCCCAGTCAATCTTGGGCAGCCAGCATCTATC AGCTGCCGAAGCAGCAGGTCTCTCCTGAACTCCGATGGCTTT ACTTATCTTGACTGGTATCTCCAGAAGCCAGGACAGTCCCCC CGGCTGCTCATCTACCTGGTTTCTAATCATTTTAGTGCGTCC CTGACCGCTTCTCTGGGAGTGGAAGTGGGACCGATTTTACAC TGAAGATCTCCAGGGTCGAAGCTGAGGACCTTGGGGTTTACT ACTGTTTCCAGAGCAACTACCTTCCCTTGACATTCGGCCAGG GAACCAAGCTGGAAATCAAAGcgtaag (SEQ ID NO:72)
huFRIHC2-1 v. 1.0l(表面重构的)	gaattcgccaccATGGGTTGGTCTTGTATCATTCTGTTCCCTGGTCGC CACTGCCACAGGAGTTCATCAGACGTGGTACTCACACAATC TCCCCTTTCCCTGCCTGTGAACCTGGGACAGCCAGCCTCAAT CAGTTGCAAGAGCTCTAAATCTCTGCTCAATAGCGATGGCTT TACCTACTTGGATTGGTACCTCCAGAAGCCCGGCCAGTCTCC TCGGCTCCTGATTTACCTTGTTCAAATCACTTTTCAGGCGTG CCTGACCGGTTCTCCGGATCTGGCTCAGGGACAGACTTCACC CTGAAGATCTCCCGCGTCGAGGCAGAGGATCTCGGCGTGTAT TACTGTTTCCAAAGTAACTACCTGCCATTGACTTTTGACAA GGAATAAACTGGAAATCAAAGcgtaag (SEQ ID NO:73)
huFRIHC2-1 v. 1.0(接枝的)	gaattcgccaccATGGGATGGAGTTGTATTATTCTGTTCTTGGTCGC TACTGCAACAGGCGTTCATTCTGACATCGTAATGACCCAGAC ACCTCTGAGTCTGAGTGTCACTCCCGGCCAGCCCGCCTCTATT TCATGTCGTAGCTCTCGCTCCCTGCTCAATTCCGACGGTTTTA CCTACTTGGACTGGTATCTTCAGAAACCTGGGCAGAGCCCTC AGCTTCTGATCTATCTGGTGTCCAATCACTTCAGTGGCGTCCC AGACCGATTTTCCGGAAGCGGAAGCGGAACCGACTTTACCCT GAAGATATCCCGCGTCGAAGCAGAGGACGTGGGCGTGTATT ATTGCTTTCAAAGCAATTACTTGCCATTGACTTTTCGGACAAG GCACAAAACCTGGAGATTAAAGcgtaag (SEQ ID NO:74)
huFRIHC2-1 v. 1.0l(接枝的)	gaattcgccaccATGGGCTGGTCATGCATCATACTGTTCTGGTGGC TACAGCAACCGGGGTGCACAGCGATATTGTTATGACACAGAC ACCACTGAGTTTGTGAGTGACCCCCGGCCAGCCAGCCTCTAT ATCCTGCAAGTCTCAAAAAGTCTCCTGAATAGCGATGGCTT TACCTACCTCGACTGGTATCTTCAGAAGCCCGGTCAAAGCCC TCAGCTGCTGATATATCTGGTGTCTAACCATTTTAGCGGAGTC CCCGACCGCTTTTCAGGCTCCGGCAGTGGCACCAGCTTCACC CTTAAGATTTCTCGCGTGGAGGCTGAAGATGTAGGGGTCTAC TACTGTTTCCAGTCAAACCTACCTGCCACTGACCTTTGGTCAAG GCACTAAGCTCGAAATTAAGcgtaag (SEQ ID NO:75)

[0284] 还提供与SEQ ID NO:39-44中任一者具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性的多核苷酸。

[0285] 还提供多核苷酸,所述多核苷酸编码与由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的可变轻链序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的可变轻链。

[0286] 还提供多核苷酸,所述多核苷酸包含与编码由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的可变轻链的可变轻链编码序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的可变轻链编码序列。

[0287] 还提供多核苷酸,所述多核苷酸编码与由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的可变重链序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的可变重链。



[0288] 还提供多核苷酸,所述多核苷酸包含与编码由具有ATCC寄存号PTA-120196或PTA-120197的鼠杂交瘤产生的抗体的可变重链的可变重链编码序列具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性或相同的可变重链编码序列。

[0289] 在某些实施方案中,多核苷酸包含用于在相同阅读框中与帮助(例如)多肽从宿主细胞表达和分泌的多核苷酸融合的成熟多肽的编码序列(例如,充当用于控制多肽从所述细胞的转运的分泌序列的前导序列)。具有前导序列的多肽是前蛋白并且可具有由宿主细胞裂解的前导序列以便形成所述多肽的成熟形式。多核苷酸还可编码蛋白原,所述蛋白原是成熟蛋白质加上另外5'氨基酸残基。具有原序列的成熟蛋白质是蛋白原并且是蛋白质的无活性形式。一旦原序列裂解,就保留活性成熟蛋白质。

[0290] 在某些实施方案中,多核苷酸包含用于在相同阅读框中与标记序列融合的成熟多肽的编码序列,所述标记序列允许(例如)所编码的多肽的纯化。例如,在细菌宿主的情况下,标记序列可以是由pQE-9载体供给的六组氨酸标签以提供与所述标记融合的成熟多肽的纯化,或当使用哺乳动物宿主(例如COS-7细胞)时,标记序列可以是源自流感血凝素蛋白的血凝素(HA)标签。

[0291] 本发明还涉及以上所描述的编码(例如)片段、类似物以及衍生物的多核苷酸的变体。

[0292] 多核苷酸变体可在编码区、非编码区或两者中含有改变。在一些实施方案中,多核苷酸变体包含产生沉默取代、添加或缺失但不会改变所编码多肽的特性或活性的改变。在一些实施方案中,核苷酸变体通过由于遗传密码的简并性而引起的沉默取代来产生。多核苷酸变体可出于多种原因产生,例如,用于优化具体宿主的密码子表达(将人mRNA中的密码子改变成被细菌宿主(如大肠杆菌)偏爱的那些)。

[0293] 还提供包含本文所描述的多核苷酸的载体和细胞。

[0294] IV. 生物样本

[0295] 生物样本常常用固定剂来固定。通常使用醛固定剂如福尔马林(甲醛)和戊二醛。使用其他固定技术如醇浸渍(Battifora和Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34: 1095)来固定的组织样本也是合适的所使用的样本还可包埋在石蜡中。在一个实施方案中,所述样本既用福尔马林固定,又用石蜡包埋(FFPE)。在另一个实施方案中,FFPE块在选择一个或多个部分用于分析之前用苏木精和伊红染色,以便为FFPE核心样本选择特定区域。从这些微粒标本制备组织块的方法已在以前的多种预后因子的IHC研究中使用、和/或对于本领域的技术人员是熟知的(参见,例如,Abbondanzo等, Am J Clin Pathol. 1909 May; 93 (5): 698-702; Allred等, Arch Surg. 1990 Jan; 125(1): 107-13)。

[0296] 简言之,可将任何完整的器官或组织切成相当小的片并在各种固定剂(例如,福尔马林、醇等)中孵育不同的时间段,直到所述组织被“固定”。样本实际上可为从身体中手术移除的任何完整组织。可将样本切成适合装在组织病理学实验室中常规使用的设备上的适度小的片。切割片的尺寸范围通常从几毫米到几厘米。生物样本还可以是流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液和或脾制剂。

[0297] V. FOLR1表达与治疗功效的相关性

[0298] 抗体美登木素偶联物(AMC) IMG853包含偶联至美登木素的结合FOLR1的单克隆抗体, huMov19 (M9346A); 所述美登木素是经由可裂解的磺基-SPDB(4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺

基丁酸N-琥珀酰亚胺酯)接头连接的DM4(N(2')-脱乙酰基-N2'-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素)。IMGN853(huMov19)的抗体序列在以下提供为SEQ ID NO:45和47,并且IMGN853和huMov19描述于美国申请公布号2012/0009181(显著8,557,966)中,其以引用的方式整体并入本文。

- [0299] SEQ ID NO:45-huMov19 vHC  
QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDG
- [0300] DTFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQG  
TTVTVSS
- [0301] SEQ ID NO:46-huMov19 vLCv1.00  
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNL
- [0302] EAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGG TKLEIKR
- [0303] SEQ ID NO:47-huMov19 vLCv1.60  
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNL
- [0304] EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGG TKLEIKR
- [0305] SEQ ID NO:48-huMov19 vLC CDR1
- [0306] KASQSVSFAGTSLMH
- [0307] SEQ ID NO:49-huMov19 vLC CDR2
- [0308] RASNLEA
- [0309] SEQ ID NO:50-huMov19 vLC CDR3
- [0310] QQSREYPYT
- [0311] SEQ ID NO:51-huMov19 vHC CDR1
- [0312] GYFMN
- [0313] SEQ ID NO:52-huMov19 vHC CDR2-Kabat定义的
- [0314] RIHPYDGDTFYNQKFQG
- [0315] SEQ ID NO:53-huMov19 vHC CDR2-Abm定义的
- [0316] RIHPYDGDTF
- [0317] SEQ ID NO:54-huMov19 vHC CDR3
- [0318] YDGS RAMDY
- [0319] SEQ ID NO:55-huMov19 HC氨基酸序列  
QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDG  
DTFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQG  
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTC  
[0320] PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0321] SEQ ID NO:56-huMov19 LCv1.00

[0322] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQPRLLIYRASNL  
EAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0323] SEQ ID NO:57-huMov19 LCv1.60

[0324] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQPRLLIYRASNL  
EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0325] SEQ ID NO:58-muMov19 vHC CDR2-Kabat定义的

[0326] RIHPYDGDTFYNQNFKD

[0327] IMGN853当前处于用于各种治疗适应症的临床开发中,所述适应症包括FOLR1阳性卵巢癌、非小细胞肺癌、子宫内膜样癌、肾癌以及其他上皮恶性肿瘤。卵巢癌表现出最大FOLR1外显率并且被认为是用IMGN853治疗的主要适应症 (Antony AC. Ann Rev Nutr 16: 501-21 (1996); Yuan Y等 Hum Pathol 40(10):1453-1460 (2009))。测量患者血浆样本中的FOLR1的水平可帮助鉴定更可能对AMC治疗有反应的患者群体。

[0328] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于鉴定由于在受试者中表达的升高的FOLR1表达水平而可能对FOLR1靶向性抗癌疗法有利地反应的受试者的方法,具体地使用本文提供的可例如在IHC中检测FOLR1表达水平的动态范围的抗体及其抗原结合片段。

[0329] 使用异种移植模型对患者样本和与体内功效的相关性进行的评价证明了表达分析用于选择更可能对治疗有反应的受试者的能力。IHC提供肿瘤细胞上的FOLR1表达的分数:0(无表达)至3(或3+)(非常高水平的表达)。使用异种移植模型的体内数据证明FOLR1表达评分为2或3(或3+)的样本在FOLR1免疫偶联物的临床相关剂量下对FOLR-1靶向性抗癌疗法具有增加的反应可能性(参见例如,美国临时申请号61/823,317和61/828,586以及国际申请号PCT/US2014/037911,其全部以引用的方式整体并入本文)。因此,鉴定具有升高的FOLR1分数的个体将帮助鉴定可能对临床相关剂量有反应的那些个体。此外,FOLR1的更均匀水平的表达提供与治疗益处的更好相关性。因此,均质染色均匀度或增加的染色与异质染色均匀度的组合可表明增加的FOLR1表达。例如,大于2异质的分数可用作用FOLR1治疗剂治疗的患者选择标准(参见例如,美国公布申请号2012/0282175,其以引用的方式整体并入本文)。

[0330] FOLR1表达分析还鉴定了其中降低水平的FOLR1靶向性抗癌疗法(“低剂量疗法”)可有效引起抗肿瘤反应的患者。如本领域已了解的,化合物通常以实现所需治疗反应的最小剂量来施用。这对于引起临床副作用的治疗剂是特别重要的。识别具有升高的FOLR1表达水平的那些受试者的能力允许FOLR-1靶向性治疗剂的剂量最小化,从而减少可能的副作用,同时维持治疗功效。

[0331] 因此,本文提供的抗体和抗原结合片段特别有利地用于这类方法中,因为它们能够例如在IHC中检测FOLR1表达水平的动态范围。

[0332] VI. 脱落抗原测定

[0333] 测量患者血浆样本中的循环抗原(脱落抗原)的水平可帮助鉴定更可能对治疗,例

如抗体美登木素偶联物 (AMC) 治疗有反应的患者群体。已报道高水平的脱落抗原显著影响治疗性抗体的药物代谢动力学 (Tolcher A. 等 20th Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics; 2008 年 10 月 21-24 日; Geneva, Switzerland: EORTC-NCI-AACR, p163, #514; Baselga J 等 J Clin Oncol 14:737-744 (1996))。可能来自患者血浆样本的脱落抗原水平将取决于因素如抗原靶标、疾病适应症和病程而是可变的。当前, 抗 FOLR1 免疫偶联物 IMG N853 的疾病适应症的脱落抗原水平未得到充分检查, 同时与实体肿瘤表达的相关性是有限的。虽然已报道了卵巢腺癌中 FOLR1 的升高, 但数据表明其未在其他 FOLR1+ 肿瘤适应症 (如小细胞肺癌) 中升高 (Mantovani LT, 等 Eur J Cancer 30A (3):363-9 (1994); Basal E, 等 PLoS ONE 4 (7):e6292 (2009))。本发明的方法允许使用本文提供的且能够检测脱落 FOLR1 的动态范围的抗体及其抗原结合片段在高叶酸存在下检测 FOLR1 受体。先前测定在测定的设计中使用了 Mov19。因为 IMG N853 包含 Mov19 并且在一个实施方案中是本发明的靶向疗法, 所以重要的是所述方法在 Mov19 存在或不存在下检测 FOLR1。使用 Mov19 的先前测定具有竞争性作用并且将检测到接受 IMG N853 治疗的患者中显著较少或无 FOLR1。

[0334] 在一个实施方案中, 用于检测人来源的流体样本中的 FOLR1 的本发明方法使用传统的夹心 ELISA 形式。在一个实施方案中, 所述方法使用附接至固体支持物的 FOLR1 的捕获试剂 (即, 抗体)。在一个实施方案中, 固体支持物是微量滴定板。对于此, 样本 (腹水、血浆等) 不经稀释而添加并且通过不同检测剂 (不同抗体) 检测, 所述检测剂不会干扰第一捕获剂的结合。然后通过使用第二检测剂 (生物素/抗生物素蛋白链菌素、抗人第二单克隆或多克隆抗体等) 检测所述检测剂, 所述第二检测剂可与第一检测剂结合多于一次, 从而放大检测信号。然后通过使用一些其他方式 (例如, TMB/过氧化物酶、闪烁计数、荧光探针等) 定量第二检测剂。另外, 所述测定检测 FOLR1 并且不受 Mov19、IMG N853、其他 FOLR1 家族成员或叶酸的存在不利地影响。

[0335] 本发明的测定包括用于选择有资格接受基于 FOLR1 的疗法的测定和用于监测患者反应的测定两者。用于反应预测的测定在治疗选择之前进行, 并且 FOLR1 的水平可影响治疗决策。对于监测患者反应, 所述测定在治疗开始时进行以确立样本中的 FOLR1 的基线 (或预定) 水平。然后测定同一样本并且将 FOLR1 的水平与基线或预定水平相比较。如本文所用, 术语“预定水平”一般是指通过将测定结果与预定水平比较而用于评定诊断结果的测定截断值, 并且其中预定水平已与各种临床参数相联系或相关联 (例如, 监测用药物治疗的受试者是否已实现所述药物的有效血液水平, 监测接受用抗癌药物治疗癌症的受试者的反应, 监测接受所述肿瘤的治疗的受试者中肿瘤的反应等)。预定水平可以是绝对值或通过减去在开始治疗之前从患者获得的值标准化的值。可使用的预定水平的实例是从可任选地正患有的一种或多种疾病或病状的一个或多个受试者获得的基线值。所测定的生物标志物的水平与基线或预定水平的比较 (或信息分析) 可通过自动系统来进行, 如为在其上进行测定的设备 (例如, 计算机平台) 的一部分或与所述设备相容的软件程序或智能系统。或者, 可由医师进行所述比较或信息分析。在其中水平保持相同或降低的一个实施方案中, 治疗可以是有效的且可继续。在发生相对于基线水平 (或预定水平) 的显著增加的情况下, 患者可能无反应。在另一个实施方案中, 脱落 FOLR1 水平的增加可指示增加的细胞死亡和增加的脱落 FOLR1 释放。在此实施方案中, 脱落 FOLR1 的增加指示治疗功效。

[0336] 本发明的测定可通过任何蛋白质测定方法来进行。适用于本发明的蛋白质测定方

法是本领域中熟知的并且包括涉及特异性未标记的或标记的抗体或蛋白质与所表达的FOLR1蛋白质或片段的结合的免疫测定方法。有用的免疫测定方法包括使用本领域中已知的任何形式进行的液相测定,如但不限于Biacore、时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)、ELISA形式(夹心、正向和反向竞争性抑制)或荧光偏振形式以及固相测定如免疫组织化学。本文提供的FOLR1抗体及其抗原结合片段特别适用于这些免疫测定方法,因为例如它们能够检测FOLR1的动态范围。

#### [0337] VII. 循环肿瘤细胞测定

[0338] 本文所述的抗FOLR1抗体还可用于检测循环肿瘤细胞测定中的FOLR1。循环肿瘤细胞(CTC)是从肿瘤脱落到血管中并且在血流中循环的细胞。CTC以极低的数目存在于循环中。一般来说,通过本领域中已知的各种技术从患者血液或血浆富集CTC。可使用本领域中已知的方法针对特异性标志物对CTC进行染色,所述方法包括但不限于基于流式细胞术的方法和基于IHC的方法。CTC可针对对肿瘤细胞来说独特的蛋白质标志物染色,这允许鉴定和区别CTC和正常血细胞。还可使用本文提供的抗体,包括但不限于2.1、5.7和9.20针对FOLR1对CTC进行染色。CTC分析还可包括CTC的数目和/或FOLR1阳性CTC的数目的定量分析。本文所述的FOLR1抗体可用于对从患有癌症的受试者分离的CTC染色以测量存在于CTC中的FOLR1。表达FOLR1的CTC的增加可帮助将所述受试者鉴定为患有可能对基于FOLR1的治疗有反应的癌症或允许优化使用FOLR1抗体或免疫偶联物的治疗方案。CTC FOLR1定量可提供关于肿瘤分期、对治疗的反应和/或疾病进展的信息。它可用作预后、预测或药效动力学生物标志物。此外,使用本文提供的抗体针对FOLR1对CTC染色可单独地或与固体活检样本的另外肿瘤标志物分析组合用作液体活检。

#### [0339] VIII. 检测

[0340] 本发明还提供通常是单克隆类型的针对FOLR1的抗体,其连接至至少一种试剂以形成检测抗体偶联物。为了增加抗体分子作为诊断剂的功效,常规的是连接或共价结合或复合至少一个所需的分子或部分。这种分子或部分可为但不限于至少一个报道分子。报道分子被定义为可使用测定来检测的任何部分。已经与抗体偶联的报道分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、光亲和分子、有色粒子和/或配体,如生物素。

[0341] 抗体偶联物的某些实例是其中本文提供的抗体或其抗原结合片段连接至可检测标记的那些偶联物。“可检测标记”是由于它们的特定功能特性和/或化学特征而可检测的化合物和/或元素,其使用允许与其连接的抗体或抗原结合片段被检测,和/或如果需要则进一步被定量。

[0342] 许多适当的成像剂是本领域中已知的,用于它们连接至抗体的方法也一样(参见,例如美国专利号5,021,236;4,938,948;和4,472,509,各自以引用方式并入本文)。所使用的成像部分可以是例如顺磁离子;放射性同位素;荧光染料;NMR可检测的物质;和/或X-射线成像。

[0343] 被涵盖来用作结合剂(例如,抗体)偶联物使用的示例性荧光标记包括例如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、异硫氰酸荧光素(FITC)、绿色荧光蛋白(GFP)、HEX、6-JOE、俄勒冈绿(Oregon Green) 488、俄勒冈绿500、俄

勒冈绿514、太平洋蓝(Pacific Blue)、藻红蛋白、REG、罗丹明绿、罗丹明红、四甲基罗丹明(TMR)肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明、德克萨斯红(Texas Red)以及这些标记的衍生物(即,用异硫氰酸酯修饰的卤化类似物或用于偶联的其他接头等)。示例性放射性标记是氚。

[0344] 涵盖在本发明中的抗体或抗原结合片段检测偶联物包括体外使用的那些,其中所述抗体或片段连接至第二结合配体和/或与显色底物接触时将产生有色产物的酶(酶标签)。本文提供的FOLR1抗体及其抗原结合片段特别适用于偶联物方法,因为例如它们能够检测FOLR1的动态范围。合适的酶的实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶和/或葡萄糖氧化酶。在一些实施方案中,第二结合配体是生物素和/或抗生物素蛋白以及抗生物素链菌素化合物。这类标记的使用对于本领域技术人员是熟知的并且被描述在例如美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149以及4,366,241中;各自以引用方式并入本文。

[0345] 含有叠氮基团的分子还可通过由低强度紫外线所产生的反应性氮宾中间体而用于与蛋白质形成共价键(Potter&Haley,1983)。具体来说,嘌呤核苷酸的2-和8-叠氮基类似物已用作定点光探针来识别在细胞粗提物中的核苷酸结合蛋白(Owens&Haley,1987;Atherton等,1985)。所述2-和8-叠氮基核苷酸还已用于绘制纯化蛋白的核苷酸结合结构域的图谱(Khatoun等,1989;King等,1989;以及Dholakia等,1989)并且可用作抗体结合剂。

[0346] 用于抗体连接或偶联至其偶联部分的若干方法在本领域是已知的。一些连接方法涉及金属螯合复合物的使用,例如采用连接至所述结合剂(例如抗体)的有机螯合剂,如二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA);亚乙基三胺四乙酸;N-氯-对-甲苯磺酰胺;和/或四氯-3 $\alpha$ -6 $\alpha$ -二苯基甘脲-3(美国专利号4,472,509和4,938,948,各自以引用方式并入本文)。单克隆抗体还可在偶联剂如戊二醛或高碘酸盐的存在下与酶反应。具有荧光素标记物的蛋白质结合(例如,抗体)偶联物在这些偶联剂存在下或通过与异硫氰酸酯反应来制备。在美国专利号4,938,948中,乳腺癌的成像例如使用单克隆抗体来实现,并且使用接头如对-羟基苯酰亚胺酸甲酯(methyl-p-hydroxybenzimidate)或3-(4-羟基苯基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯来将可检测的成像部分结合至所述抗体。

[0347] 在其他实施方案中,涵盖了通过使用不改变抗体结合位点的反应条件来选择性地在免疫球蛋白Fc区域内引入巯基而进行的免疫球蛋白的衍生化。公开根据此方法而产生的抗体偶联物显示改进的寿命、特异性和敏感性(美国专利号5,196,066,其以引用方式并入本文)。其中报道分子或效应分子与Fc区域内的碳水化合物残基偶联的所述效应分子或报道分子的位点特异性连接也已经公开在文献中(O'Shannessy等,1987)。

[0348] 在本发明的其他实施方案中,免疫球蛋白用核素如氚进行放射性标记。在另外的实施方案中,采用纳米金粒子(如约0.5nm至40nm的尺寸)和/或量子点(Hayward,Calif.)。

[0349] 当使用夹心测定形式时,捕获抗体将是未标记的。检测抗体将是直接标记的,或者通过添加(在洗掉过量检测抗体之后)摩尔过量的针对第一抗体的第二标记的抗体来间接地检测。

[0350] 用于检测抗体的标记是不会干扰FOLR1抗体的结合的任何可检测的官能团。适合的标记的实例是已知用于免疫测定的那些众多标记,包括可直接检测的部分,如荧光染料、化学发光标记和放射性标记;以及必须反应或衍生以被检测的部分,如酶。这类标记的实例

包括放射性同位素<sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H及<sup>131</sup>I、荧光团(如稀土螯合物或荧光素及其衍生物)、若丹明(rhodamine)及其衍生物、丹酰基、伞形酮(umbelliferone)、荧光素酶(例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号4,737,456))、荧光素(luciferin)、2,3-二氢酞嗪二酮、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、与采用过氧化氢以氧化染料前体的酶(如HRP、乳过氧化物酶(lactoperoxidase)或微过氧化物酶(microperoxidase))偶联的杂环氧化酶(如尿酸酶(uricase)和黄嘌呤氧化酶)、生物素/抗生物素蛋白、生物素/抗生物素蛋白链菌素、生物素/具有MUG的抗生物素蛋白链菌素- $\beta$ -半乳糖苷酶、自旋标记、噬菌体标记、稳定自由基等。如本文所指出,荧光检测是一个实例。

[0351] 常规方法可获得以将这些标记共价结合至蛋白质或多肽。例如,偶联剂如二醛、碳二亚胺、二马来酰亚胺、双亚胺酯、双重氮化联苯胺等可用于使用本文所述的荧光标记、化学发光标记和酶标记标记抗体。<参见例如,美国专利号3,940,475(荧光分析)和3,645,090(酶);Hunter等Nature 144:945(1962);David等Biochemistry 13:1014-1021(1974);Pain等J.Immunol.Methods 40:219-230(1981);以及Nygren J.Histochem.and Cytochem.30:407-412(1982)。在某些实施方案中,本文的标记是荧光的以增加放大和对8pg/ml的灵敏度,更优选地具有抗生物素蛋白链菌素- $\beta$ -半乳糖苷酶和MUG的生物素以用于放大信号。在某些实施方案中,使用比色标记,例如其中可检测的抗体被生物素化并且检测手段是抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素-过氧化物酶以及3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0352] 这种标记(包括酶)与抗体的偶联是在免疫测定技术中的普通技术人员的标准操作程序。参见例如,O'Sullivan等"Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay,"in Methods in Enzymology, J.J.Langone和H.Van Vunakis编辑,第73卷(Academic Press,New York,N.Y.,1981),第147-166页。

[0353] 在添加最终标记的抗体之后,通过经由洗涤除去过量未结合的标记的抗体,并且然后使用对所述标记来说适当的检测方法测量所连接的标记的量,并且使所测量的量与生物样本中的脱落FOLR1的量相关来测定结合的抗体的量。例如,在酶的情况下,所显影和测量的颜色的量将是存在的脱落FOLR1的量的直接度量。具体地,如果HRP是标记,则可使用底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺在450nm吸光度下检测颜色。

[0354] IX.底物和指示剂

[0355] 涵盖底物和指示剂的使用以用于检测FOLR1。

[0356] 辣根过氧化物酶(HRP)是首先与过氧化氢形成复合物并且然后引起其分解以生成水和原子氧的酶。像很多其他酶一样,HRP和一些HRP样活性可由过量底物抑制。在HRP与过量过氧化氢之间形成的复合物是无催化活性的并且在缺乏电子给体(例如,显色物质)的情况下被可逆地抑制。过量过氧化氢和电子给体的缺乏使内源性HRP活性淬灭。当在测定系统中使用时,HRP还可用于使限定的底物转变为其活化的发色团,从而引起颜色变化。所述HRP酶可通过本领域中已知的多种方法与抗体、肽、聚合物或其他分子偶联。将戊二醛添加至含有HRP与抗体的混合物的溶液中将导致同与所述酶偶联相比更多抗体分子彼此偶联。在两步骤的程序中,HRP首先与双功能试剂反应。在第二阶段,只将活化的HRP与所述抗体混合,从而引起更加有效的标记且没有聚合。还使用两步骤的戊二醛程序来将HRP与(链霉)抗生

物素蛋白偶联。这种形式用于例如LAB和LSAB是底物的程序中。与生物素的偶联也涉及两个步骤,因为生物素在可与HRP酶的 $\epsilon$ 氨基反应之前首先必须衍生化为生物素基-N-羟基琥珀酰亚胺酯或生物素酰肼。

[0357] 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)是对于如HRP的酶而言产生在醇和其他有机溶剂中高度不可溶的棕色最终产物的底物。DAB的氧化还引起聚合,从而引起与四氧化钼反应的能力并因此增加其染色强度和电子密度。在用于使聚合的DAB的光密度增强的若干金属和方法中,氯化金与硫化银组合似乎是最成功的。

[0358] 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)是如HRP的酶的底物,并且在氧化后形成可溶性的玫瑰红色最终产物。因此,用AEC处理的试样一定不能浸入醇或醇溶液中(例如,哈里斯氏(Harris)苏木精)。相反,应该使用水性复染剂和封固剂。

[0359] 4-氯-1-萘酚(CN)是如HRP的酶的底物并且作为蓝色最终产物而沉淀。因为CN在醇和其他有机溶剂中是可溶的,所以试样一定不能脱水、暴露在醇复染剂中或用含有有机溶剂的封固剂以载玻片覆盖。与DAB不同,CN倾向于从沉淀位点扩散。

[0360] 对-亚苯基二胺二盐酸盐/邻苯二酚(Hanker-Yates试剂)是如HRP的酶的底物,其得到在醇和其他有机溶剂中不可溶的蓝-黑色反应产物。与聚合的DAB一样,这种反应产物可以被钼酸着色(osmicated)。在免疫过氧化物酶技术中使用Hanker-Yates试剂已经实现了不同结果。

[0361] 牛小肠碱性磷酸酶(AP)(分子量100kD)通过破坏P-O键而从有机酯上移除(通过水解作用)并转移磷酸基;暂时形成中间的酶-底物键。用于AP的主要金属活化剂是 $Mg^{++}$ 、 $Mn^{++}$ 和 $Ca^{++}$ 。

[0362] 在免疫组织化学法中还未广泛使用AP,直到公布了未标记的碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶(APAAP)程序。在这个程序中利用的可溶性免疫复合物具有大约560kD的分子量。APAAP程序相较于过氧化物酶抗过氧化物酶(PAP)技术的主要优点是没有由内源性过氧化物酶活性所带来的干扰。可使用过氧化氢的稀释溶液阻断内源性过氧化物酶。由于内源性过氧化物酶活性对PAP染色的潜在干扰,推荐将所述APAAP技术用于血液涂片和骨髓涂片。来自骨骼、肾脏、肝脏和一些白细胞的内源性碱性磷酸酶活性可通过将1mM左旋咪唑(尽管已经发现5mM更有效)添加到底物溶液中来抑制。肠道碱性磷酸酶未通过左旋咪唑得到足够抑制。

[0363] 在免疫碱性磷酸酶染色方法中,所述酶将磷酸萘酯(底物)水解为酚类化合物和磷酸。所述酚与无色重氮盐(发色团)偶联以产生不可溶的有色偶氮染料。已经成功使用底物和发色团的若干不同组合。

[0364] AS-MX磷酸萘酯AP底物可按其酸形式或作为钠盐来使用。发色团底物固红TR和固蓝BB分别产生亮红色或亮蓝色最终产物。二者均可溶于醇和其他有机溶剂,因此必须使用水性封固剂。当染色细胞涂片时优选固红TR。

[0365] 另外的示例性底物包括AS-BI磷酸萘酯、AS-TR磷酸萘酯和磷酸5-溴-4-氯-3-吲哚酯(BCIP)。其他可能的发色团包括例如固红LB、固深红GBC、氮蓝四唑(NBT)以及碘硝基四唑紫(INT)。

[0366] X. 免疫检测方法

[0367] 在其他实施方案中,本发明涉及用于结合、纯化、移除、定量和/或通常另外检测如本发明所涵盖的生物组分如配体的免疫检测方法。可采用根据本发明制备的抗体。一些免



疫检测方法包括(举几个例子)免疫组织化学、流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)、免疫放射性测定、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定以及蛋白质印迹。各种适用的免疫检测方法的步骤已经描述在科学文献中,例如像Doolittle M H和Ben-Zeev O, *Methods Mol Biol.*1999;109:215-37; Gulbis B和Galand P, *Hum Pathol.*1993Dec;24(12):1271-85;以及De Jager R等, *Semin Nucl Med.*1993Apr;23(2):165-79,各自以引用方式并入本文。

[0368] 通常,免疫结合方法包括获得疑似包含配体蛋白、多肽和/或肽的样本,以及根据情况,在有效允许形成免疫复合物的条件下,使所述样本与根据本发明的第一配体结合剂(例如,抗配体抗体)相接触。

[0369] 在抗原检测方面,所分析的生物样本可以是其中希望检测FOLR1的任何样本,如流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、组织切片或试样、均化的组织提取物、活检吸取物、细胞、含FOLR1组合物的分离和/或纯化形式、或任何生物流体。在一些实施方案中,使用血液、血浆或淋巴样本或提取物。

[0370] 使所选择的生物样本与所述抗体在有效条件下接触足够允许免疫复合物(初次免疫复合物)形成的一段时间一般是这样一件事:简单地将抗体组合物添加到样本中,并且孵育所述混合物足够长的一段时间以便所述抗体与所存在的任何配体蛋白抗原形成(即与其结合)免疫复合物。这段时间之后,通常会洗涤样本-抗体组合物如组织切片、ELISA板、斑点印迹或蛋白质印迹,以除去任何非特异性结合的抗体种类,从而仅仅允许检测特异性结合在初次免疫复合物内的那些抗体。

[0371] 一般而言,免疫复合物形成的检测在本领域是众所周知的并且可通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于标记或标记物的检测,如那些放射性、荧光、生物和酶标签中的任一种。涉及这些标记的使用的美国专利包括美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149和4,366,241,各自以引用方式并入本文。当然,通过使用如本领域已知的第二结合配体如第二抗体和/或生物素/抗生物素蛋白配体结合安排,可以发现另外的优点。

[0372] 在所述检测中采用的抗配体抗体本身可以连接可检测的标记,其中然后会简单地检测这个标记,从而允许测定组合物中的初次免疫复合物的量。或者,变成结合在初次免疫复合物内的第一抗体可通过具有对所述抗体的结合亲和力的第二结合剂来检测。在这些情况下,所述第二结合剂可以连接可检测的标记。所述第二结合剂自身常常是抗体,因此它可以被称为“第二”抗体。使所述初次免疫复合物与标记的第二结合剂或抗体在有效条件下相接触且持续足够允许第二免疫复合物形成的一段时间。然后通常洗涤所述第二免疫复合物以除去任何非特异性结合的标记的第二抗体或配体,并且然后检测在第二免疫复合物中的余下标记。

[0373] 另外的方法包括通过两步方法检测初级免疫复合物。如本文所述,使用具有对所述抗体的结合亲和力的第二结合剂如抗体来形成第二免疫复合物。洗涤之后,使所述第二免疫复合物与具有对第二抗体的结合亲和力的第三结合剂或抗体再次在有效条件下接触足够允许免疫复合物(第三免疫复合物)形成的一段时间。使第三配体或抗体连接可检测的标记,从而允许检测因此形成的第三免疫复合物。如果需要,这个系统可提供信号放大。

[0374] 在另一个实施方案中,生物素化的单克隆或多克隆抗体用于检测靶抗原,并且然

后将第二步骤抗体用于检测连接至复合生物素的生物素。在所述方法中,待测试的样本首先在包含第一步骤抗体的溶液中孵育。如果存在靶抗原,则一部分所述抗体结合所述抗原以形成生物素化抗体/抗原复合物。然后通过抗生物素蛋白(或抗生物素蛋白)、生物素化DNA和/或互补的生物素化DNA的连续溶液中孵育来扩增抗体/抗原复合物,其中每个步骤将另外的生物素位点添加到抗体/抗原复合物中。重复扩增步骤直到实现合适水平的扩增,在此时,在包含抗生物素的第二步骤抗体的溶液中孵育所述样本。这个第二步骤抗体例如用一种酶来标记,所述酶可以通过使用发色团底物的组织酶学来用于检测抗体/抗原复合物的存在。在适合扩增的情况下,可产生肉眼可见的偶联物。

[0375] 在一个实施方案中,免疫组织化学(IHC)用于免疫检测。使用IHC,检测样本中的FOLR1可通过用探针(例如抗FOLR1抗体)靶向样本来实现。所述探针可直接或间接地连接至可检测的标记或可通过直接或间接地连接至可检测的标记的另一种探针来检测。

[0376] 在一些实施方案中,IHC可区分不同的蛋白质表达水平,例如,校准的IHC。在一些实施方案中,所述IHC可区分具有低FOLR1表达、中等FOLR1表达或高FOLR1表达的样本的染色强度。

[0377] 在一个实施方案中,针对强度和均匀度二者(染色细胞百分比-仅细胞膜)来对FOLR1的免疫学检测(通过免疫组织化学)评分。FOLR1表达强度的比较标尺的相关性为0-阴性、0-1-很弱、1-弱、1-2-弱至中等、2-中等、2-3-中等至强、3-强、3+-非常强。定量地,分数0代表未观察到膜染色。分数1代表检测到模糊/几乎不可察觉的膜染色。对于分数2,观察到弱至中等完全膜染色。最后,分数3(或3+)代表观察到中等至完全膜染色。具有0分或1分的FOLR1表达的那些样本可被表征为不具有升高的FOLR1表达,而具有2分或3分的那些样本可被表征为过度表达或具有升高的FOLR1。在另一个实施方案中,使用本文提供的抗体、其抗原结合片段或多肽,具有0分FOLR1表达的那些样本可被表征为不具有升高的FOLR1表达,具有1分的那些样本可被表征为具有增加的FOLR1表达,并且具有2或3分的那些样本可被表征为过度表达或具有升高的FOLR1。

[0378] 过度表达FOLR1的样本还可通过对应于每孔表达的FOLR1分子的拷贝数或每孔结合的抗体(ABC)的数目的免疫组织化学分数进行评定,并且可通过生物化学方法测定。FOLR1均匀度(细胞膜染色百分比)的比较标尺如下:阴性=0%;病灶性=<25%;异质性(异质)=25%-75%以及均质性(均质)=>75%。

[0379] 在一个实施方案中,FOLR1的免疫检测(通过免疫组织化学)是使用H分数计分的。H分数将染色强度分数(例如,0至3的分数,其中0代表无染色,并且3代表强染色)与针对膜染色为阳性的细胞的百分比(即均匀度)组合。可如下计算H分数:H分数=[0\*(强度0的细胞染色的百分比)]+[1\*(强度1的细胞染色的百分比)]+[2\*(强度2的细胞染色的百分比)]+[3\*(强度3的细胞染色的百分比)]。因此,H分数可在0(无细胞膜染色)至300(强度3的所有细胞膜染色)的范围内。

[0380] 在一个实施方案中,当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少50时,所述受试者被鉴定为用抗FOLR1治疗方案(例如,IMGN853)治疗的候选者。在一个实施方案中,当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少75时,所述受试者被鉴定为用抗FOLR1治疗方案(例如,IMGN853)治疗的候选者。在一个实施方案中,当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少100时,所述受试者被鉴

定为用抗FOLR1治疗方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在一个实施方案中, 当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少125时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1治疗方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在一个实施方案中, 当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少150时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1治疗方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在一个实施方案中, 当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少175时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1治疗方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在一个实施方案中, 当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少200时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1治疗方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少225时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少250时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少275时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有癌症的受试者的肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是300时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。

[0381] 在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是75至300时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少75时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少100时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少125时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少150时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少175时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少200时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少225时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少250时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少275时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的卵巢肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是300时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG N853)治疗的候选者。

[0382] 在另一个实施方案中, 当来自患有NSCLC的受试者的NSCLC肿瘤样本中的FOLR表达



如, IMG853) 治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有子宫内膜癌的受试者的子宫内膜肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少225时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG853) 治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有子宫内膜癌的受试者的子宫内膜肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少250时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG853) 治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有子宫内膜癌的受试者的子宫内膜肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是至少275时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG853) 治疗的候选者。在另一个实施方案中, 当来自患有子宫内膜癌的受试者的子宫内膜肿瘤样本中的FOLR表达的H分数是300时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG853) 治疗的候选者。

[0384] 作为举例, 患有卵巢癌的受试者的H分数可以是如下:

[0385]  $H\text{分数} = (75\% \text{强度}0) + (0\% \text{强度}1) + (0\% \text{强度}2) + (25\% \text{强度}3) = 75$ ; 或

[0386]  $H\text{分数} = (0\% \text{强度}0) + (75\% \text{强度}1) + (0\% \text{强度}2) + (25\% \text{强度}3) = 150$ 。

[0387] 在另一个实例中, 患有子宫内膜癌的受试者的H分数可以是如下:

[0388]  $H\text{分数} = (75\% \text{强度}0) + (0\% \text{强度}1) + (25\% \text{强度}2) + (0\% \text{强度}3) = 50$ ; 或

[0389]  $H\text{分数} = (0\% \text{强度}0) + (75\% \text{强度}1) + (25\% \text{强度}2) + (0\% \text{强度}3) = 125$ 。

[0390] 在以上所有四个实例中, 所述受试者可被鉴定为用抗FOLR1治疗方案(例如, IMG853) 治疗的候选者。

[0391] 在一个实施方案中, FOLR1的免疫检测(通过免疫组织化学) 是使用跨样本的阳性和强度百分比计分的。在此实施方案中, 用抗FOLR1治疗方案治疗的选择基于样本中被发现在反映染色强度(例如, 1、2或3) 和均匀度(例如, 异质或均质(参见表11)) 两者的指定水平下表达膜FOLR1的细胞的百分比。例如, 对于在3下具有至少25% (即, 25% - 75% 或 >75%) 的FOLR1阳性细胞染色的样本可被表征为“3异质”和“3均质”, 或一起为“在3下至少25% 阳性”。

[0392] 在一个实施方案中, 当来自患有卵巢癌的受试者的肿瘤样本中至少25% 的FOLR1膜表达通过IHC测定具有3的强度分数时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG853) 治疗的候选者。在一个实施方案中, 使用FOLR1-2.1抗体进行IHC。

[0393] 在另一个实施方案中, 当来自患有子宫内膜癌的受试者的肿瘤样本中至少25% 的FOLR膜表达通过IHC测定具有至少2的强度分数时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG853) 治疗的候选者。在一个实施方案中, 使用FOLR1-2.1抗体进行IHC。

[0394] 在另一个实施方案中, 当来自患有NSCLC的受试者的肿瘤样本中至少25% 的FOLR膜表达通过IHC测定具有至少2的强度分数时, 所述受试者被鉴定为用抗FOLR1方案(例如, IMG853) 治疗的候选者。在一个实例中, 使用同于IHC的FOLR1-2.1抗体进行IHC。

[0395] IHC可手动进行或使用自动系统(例如, 使用自动染色器) 进行。可对来自血液、血浆、血清或淋巴液等的细胞、细胞团块、组织、制剂进行IHC。在一些实施方案中, 样本是固定的样本。在一些实施方案中, 样本是石蜡包埋的样本。在一些实施方案中, 样本是福尔马林固定的且石蜡包埋的样本。

[0396] 在一个实施方案中, 流式细胞术用于免疫检测。因此, 例如, 可使用流式细胞术评定每细胞结合的抗体(ABC) 的数目。每细胞结合的抗FOLR1抗体的高数目可指示高FOLR1表达水平和易感于用抗FOLR1抗体或其免疫偶联物治疗的高可能性。

### [0397] XI. 组合物和试剂盒

[0398] 本发明还提供用于在如本文所公开的本发明的实践中使用的组合物和试剂盒。这类试剂盒可包括容器,每个容器具有在所述方法中使用的一种或多种不同试剂(通常呈浓缩形式),所述试剂包括例如一种或多种结合剂(抗体),其已连接至标记物,或者任选地具有用于将结合剂偶联至抗体(以及标记物自身)的试剂;缓冲液、和/或用于分离(任选地通过显微解剖)以支持本发明的实践的试剂和仪器。通常还将包括描述本发明的配体检测方法中的试剂盒组件的或关于其使用的一组说明的标签或指示物,其中所述说明可与包装说明书和/或试剂盒或其组件的包装关联。

[0399] 在其他实施方案中,本发明涉及用于与本文所述的免疫检测方法一起使用的免疫检测试剂盒。因为抗体通常用于检测FOLR1,所以抗体通常将包括于试剂盒中。免疫检测试剂盒因此将在适合的容器装置中包括结合FOLR1的第一抗体和/或任选地免疫检测试剂和/或进一步任选地FOLR1蛋白或含有FOLR1的细胞样本。

[0400] 试剂盒的免疫检测试剂可采取多种形式中的任一种,包括与给定抗体相关联和/或连接至给定抗体的那些可检测标记。还涵盖了与第二结合配体相关联和/或连接至第二结合配体的可检测标记。示例性第二配体是具有对第一抗体的结合亲和力的那些第二抗体。

[0401] 用于在本发明试剂盒中使用的其他合适的免疫检测试剂包括双组分试剂,其包含具有对第一抗体的结合亲和力的第二抗体、连同具有对第二抗体的结合亲和力的第三抗体,所述三抗连接连接至可检测标记。如上文所述,多种示例性标记是在本领域已知的和/或所有这类标记可适合与本发明一起使用。

[0402] 所述试剂盒还可包含用于治疗癌症的治疗剂,如抗FOLR1免疫偶联物。

[0403] 所述试剂盒还可包括用来测量受试者中的FOLR1表达的FOLR1检测试剂,所述试剂盒包括FOLR1检测试剂和使用说明书。在一个实施方案中,所述FOLR1检测试剂包含FOLR1结合肽或抗FOLR1抗体。在另一个实施方案中,试剂盒还包括结合抗FOLR1抗体的第二抗体。

[0404] 在一个实施方案中,包括以下浓度的FOLR1特异性抗体:约0.1至约20 $\mu$ g/mL、约0.1至约15 $\mu$ g/mL、约0.1至约10 $\mu$ g/mL、约0.5至约20 $\mu$ g/mL、约0.5至约15 $\mu$ g/mL、约0.5至约10 $\mu$ g/mL、约1至约20 $\mu$ g/mL、约1至约15 $\mu$ g/mL、约1至约10 $\mu$ g/mL、约2至约20 $\mu$ g/mL、约2至约15 $\mu$ g/mL或约2至约10 $\mu$ g/mL。在另一个实施方案中,包括以下浓度的FOLR1特异性抗体:约1.5 $\mu$ g/mL、约2 $\mu$ g/mL、约3 $\mu$ g/mL、约4 $\mu$ g/mL、约5 $\mu$ g/mL、约6 $\mu$ g/mL、约7 $\mu$ g/mL、约8 $\mu$ g/mL、约9 $\mu$ g/mL或约10 $\mu$ g/mL。在另一个实施方案中,包括约2 $\mu$ g/mL浓度的FOLR1特异性抗体。在另一个实施方案中,包括约10 $\mu$ g/mL浓度的FOLR1特异性抗体。

[0405] 在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体,具有稀释说明以实现约1至约20 $\mu$ g/mL、约1至约15 $\mu$ g/mL、约1至约10 $\mu$ g/mL、约2至约20 $\mu$ g/mL、约2至约15 $\mu$ g/mL或约2至约10 $\mu$ g/mL的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体,具有稀释说明以实现约1.5 $\mu$ g/mL、约2 $\mu$ g/mL、约3 $\mu$ g/mL、约4 $\mu$ g/mL、约5 $\mu$ g/mL、约6 $\mu$ g/mL、约7 $\mu$ g/mL、约8 $\mu$ g/mL、约9 $\mu$ g/mL或约10 $\mu$ g/mL的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体,具有稀释说明以实现约2 $\mu$ g/mL的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体,具有稀释说明以实现约10 $\mu$ g/mL的最终浓度。

[0406] 在另一个实施方案中,试剂盒还包括选自以下组成的组的检测试剂:酶、荧光

团、放射性标记以及发光团。在另一个实施方案中,所述检测试剂选自由以下组成的组:生物素、地高辛、荧光素、氘以及罗丹明。

[0407] 所述试剂盒还可包括用于FOLR1表达的检测和评分的说明书。试剂盒还可包括对照或参考样本。对照或参考样本的非限制性实例包括来源于正常(正常对照)样本或肿瘤(阳性对照)样本的细胞团块或组织培养细胞系。示例性细胞系包括用表达FOLR1的表达载体稳定或瞬时转染的细胞系。另外的实例包括在实施例中描述的细胞团块和组织样本。

[0408] 在一些实施方案中,试剂盒是包括以下基本要素的包装组合:(a)包含针对人FOLR1的单克隆抗体的捕获试剂;以及(b)检测试剂,其也可包含FOLR1单克隆抗体,但也可包含结合FOLR1的可检测的(标记的或未标记的)抗体。这些基本要素在本文定义。

[0409] 在一个实施方案中,所述试剂盒还包括用于捕获试剂的固体支持物,其可被提供为单独的要素或捕获试剂已固定于其上。因此,试剂盒中的捕获抗体可被固定在固体支持物上,或它们可被固定在与试剂盒一起包括或与试剂盒分开提供的这种支持物上。

[0410] 在一个实施方案中,所述捕获试剂涂覆在微量滴定板上。所述检测试剂可以是直接检测的标记的抗体或通过针对在不同物种中产生的未标记抗体的标记的抗体检测的未标记的抗体。在标记是酶的情况下,所述试剂盒将通常包括酶所需的底物和辅助因子,并且在标记是荧光团的情况下,所述试剂盒将通常包括提供可检测的发色团的染料前体。当检测试剂是未标记时,所述试剂盒还可包括用于可检测的抗体的检测方式,如针对未标记的抗体的标记的抗体,例如呈荧光检测形式。在标记是酶的情况下,所述试剂盒将通常包括酶所需的底物和辅助因子,在标记是荧光团的情况下,所述试剂盒将通常包括提供可检测的发色团的染料前体,并且在标记是生物素的情况下,所述试剂盒将通常包括抗生物素蛋白,如抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素或偶联至HRP或具有MUG的 $\beta$ -半乳糖苷酶的抗生蛋白链菌素。

[0411] 在一个实施方案中,捕获试剂是FOLR1抗体2.1、5.7或9.20,或包含抗体2.1、5.7或9.20的序列的抗体。在一个实施方案中,检测试剂是FOLR1抗体2.1、5.7或9.20,或包含抗体2.1、5.7或9.20的序列的抗体。在另一个实施方案中,检测试剂FOLR1抗体2.1、5.7或9.20或包含抗体2.1、5.7或9.20的序列的抗体被生物素化。

[0412] 所述试剂盒通常还含有用于进行测定的说明书,和/或作为抗原标准品的FOLR1蛋白或其片段(例如,FOLR1细胞外结构域或FOLR1细胞外结构域和GPI键联结构域的全部或一部分)以及其他添加剂,如稳定剂、洗涤和孵育缓冲剂等。在一个实施方案中,所述FOLR1抗原标准品是FOLR1-Fc免疫粘附素。所述试剂盒还可包括用于FOLR1表达的检测和评分的说明书。

[0413] 所述试剂盒的组件可以预定比率提供,其中各种试剂的相对量适合地改变以提供使测定的灵敏度基本上最大化的试剂的溶液的浓度。具体地说,所述试剂可提供为干燥粉末,通常是冻干的,包括赋形剂,其在溶解时将提供用于与待测试的样本组合的具有适当浓度的试剂溶液。

[0414] 还提供包含本文所述的抗体或抗原结合片段的组合物。在一个实施方案中,组合物包含本文所述的抗FOLR1抗体或抗原结合片段以及缓冲剂,例如可用于检测测定如FACS、IHC或ELISA中的缓冲剂。此类缓冲剂是本领域的普通技术人员已知的且包括稀释剂。作为举例,在本文(例如在工作实施例中)提供某些FACS缓冲剂。FACS缓冲剂还可包含例如血清

或白蛋白(如牛血清、山羊血清或BSA)和/或叠氮化钠。FACS缓冲剂还可包含PBS、EDTA和/或DNA酶或其任何组合。IHC缓冲剂也在本文中提供并且是本领域的普通技术人员已知的。IHC缓冲剂可包含例如酪蛋白血清或白蛋白(如牛血清、山羊血清或BSA)、Tween或Triton、PBS和/或叠氮化钠或其任何组合。ELISA缓冲剂也在本文中提供并且是本领域的普通技术人员已知的。ELISA缓冲剂可包含例如血清或白蛋白(如牛血清、山羊血清或BSA)、脱脂奶粉、酪蛋白和/或明胶或其任何组合。

[0415] 本公开的实施方案可进一步通过参考以下非限制性实施例来限定,所述实施例详细描述了本公开的某些抗体的制备和用于使用本公开的抗体的方法。对于本领域技术人员将清楚的是:可在不背离本公开的范围的情况下实践对材料与方法的许多修改。

## 实施例

[0416] 应理解,本文所描述的实施例和实施方案仅是出于说明的目的,并且根据其的各种修改或变化将建议给本领域技术人员并且包括在本申请的精神和范围内。

[0417] 实施例1:产生FOLR1杂交瘤

[0418] 适用于免疫组织化学(IHC)染色(本发明的抗体)的产生抗人FOLR1单克隆抗体的杂交瘤选自超过16,000个杂交瘤。所述杂交瘤通过用不同抗原免疫野生型Balb/c小鼠来产生,包括:已用人FOLR1、人FOLR1-鼠IgG2a Fc重组蛋白以及人FOLR1重组蛋白转染的福尔马林固定的300-19细胞。用固定的300-19细胞免疫通过不存在任何佐剂的情况下皮下注射PBS中的转染的300-19细胞(5E6细胞/小鼠/注射)来进行。用FOLR1重组蛋白免疫通过皮下注射在完全弗氏佐剂(CFA)或用于加强的不完全弗氏佐剂(Sigma)或Magic小鼠佐剂(Creative Diagnostics)中乳化的蛋白质来进行。通常,将小鼠在接受最终加强之前免疫五次(每次间隔两周),所述加强是在融合之前三天通过腹膜内注射免疫原进行的。

[0419] 使用来源于免疫的野生型Balb/c小鼠的脾细胞和鼠骨髓瘤P3X63Ag8.653细胞(P3细胞)进行了总计16次独立的融合(包括融合352、353和354)。使用ECM200电融合机器(BTX Harvard Apparatus)根据标准方案进行细胞融合。每次融合产生超过1,000个杂交瘤。将由这些杂交瘤产生的抗体通过基于FACS的方法使用变性的FOLR1阳性细胞和FOLR1阴性细胞进行筛选且确认。在所筛选的多于16,000个杂交瘤中,发现了通过FACS筛选为阳性的14个杂交瘤。所有阳性杂交瘤来源于用人FOLR1-鼠IgG2a Fc重组蛋白免疫的小鼠。

[0420] 在通过FACS筛选初始为阳性的14个杂交瘤中,仅十个显示用于进一步分析的足够IgG浓度。

[0421] 实施例2. 杂交瘤上清液的免疫组织化学评价

[0422] 通过IHC对初始14个杂交瘤中的十个进行分析。使用Leica Bond RX自动染色器以及表9中列出的试剂和条件进行分析。

[0423] 表9. IHC试剂和测定条件



[0424]	步骤	行为/试剂(供应商)	时间
	烘烤	温度: 60℃	30 分钟
	脱蜡	Bond 脱蜡溶液(Leica) 100%乙醇(Pharmco Aaper)	固定
	抗原修复	Bond 表位修复 2 (基于乙二胺四乙酸(pH 9.0)的溶液)	20 分钟
	内源性过氧化物酶阻断	过氧化物(Leica)	5 分钟
	测试品	通过在 Leica 抗体稀释剂中稀释制备的不同浓度的 ImmunoGen, Inc.生产的抗体	15 分钟
	检测	Post Primary Regent (Leica)	8 分钟
		聚合物(Leica)	8 分钟
		混合的 DAB (Leica)	10 分钟
	复染色	苏木精(Leica)	5 分钟

[0425] 将含有福尔马林固定石蜡包埋的 (FFPE) 细胞、正常组织、患者肺肿瘤活检以及患者卵巢肿瘤活检的载玻片在60℃下烘烤且使用Bond脱蜡溶液和100%乙醇进行脱蜡。使用Bond表位修复2 (基于乙二胺四乙酸 (pH 9.0) 的溶液) 进行热诱导的表位修复持续20分钟且用过氧化物阻断内源性过氧化物酶持续5分钟。将载玻片与不同浓度的ImmunoGen, Inc.产生的抗体或Leica/Novocastra muIgG1对照抗体一起孵育15分钟。通过用Leica Bond Refine检测系统孵育来检测结合的抗体。在施加抗体之后,将载玻片与Post Primary Reagent (兔抗小鼠IgG) 一起孵育8分钟,与聚合物 (山羊抗兔聚合物) 一起孵育8分钟并且与DAB (3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐) 一起孵育10分钟,其产生褐色颜色信号。将载玻片用苏木精复染色5分钟。

[0426] 如以下所概述,FFPE组织样本来源于从Proteogenex和Cooperative Human Tissue Network (CHTN) 获得的人组织块。FFPE细胞样本来源于由美国组织培养物保藏中心供应的KB细胞系。含有样本切片的载玻片使用设定在5μm的切片机从FFPE块制备并且固定在带正电荷的载玻片上。在染色之前,使这些载玻片空气干燥过夜。

[0427] 表10.FFPE测试样本

[0428]	人组织类型	商业来源
	正常肺	CHTN
	正常胰腺	CHTN
	正常唾液腺	CHTN
	卵巢乳头状浆液性腺癌	Proteogenex
	肺腺癌	CHTN

[0429] 相对于对照IgG染色 (非特异性),对FOLR1染色强度和分布模式进行评分。将强度在0至3的标尺上评分,其中0=无染色,1=弱染色,2=中等染色,以及3=强染色。将染色的均匀度评分为阴性 (无细胞展示阳性染色)、局灶性 (<25%的细胞染色)、异质 (25% -75%的细胞染色) 以及均质 (>75%的细胞染色)。在下文中描述了染色强度和评分标尺。由委员会认证的病理学家对所有染色进行评价。

[0430] 表11.染色强度和均匀度

[0431]	强度(膜染色的量)		均匀度(阳性细胞的百分比)	
	0	阴性	0	阴性
	1	弱	局灶性	<25%
	2	中等	异质(hetero)	25-75%
	3	强	均质(homo)	>75%

[0432] 用于鉴定FFPE FOLR1 IHC的杂交瘤的IHC选择方法

[0433] 将FOLR1阳性变性细胞上通过FACS测定为阳性的初级克隆(总计十个克隆)通过IHC进行评价。两个克隆从融合352(克隆352.1和352.2)获得。六个克隆从融合353(克隆353.1、353.2、353.3、353.5、353.9、353.15)获得,并且两个克隆从融合354(克隆354.1和354.2)获得。杂交瘤上清液收集自培养的杂交瘤细胞且用于分析。使用用于从上清液捕获鼠单克隆抗体的抗鼠L-链特异性多克隆抗体和用于检测捕获抗体的抗鼠Fc特异性多克隆抗体通过ELISA测定杂交瘤上清液中的抗体浓度;具有已知浓度的鼠单克隆IgG1样本用作标准品以计算IgG浓度。细胞培养基(未稀释的)显示不干扰IHC染色方法(当使用培养基替代第一抗体时注意到无背景/非特异性染色)。将在Leica抗体稀释剂中以达10 $\mu$ g/mL的不同浓度稀释的十种上清液(IMGN 352.1、352.2、353.1、353.2、353.3、353.5、353.9、353.15、354.1和354.2)使用FOLR1已知阳性对照样本(人正常肺细胞、患者来源的卵巢浆液性乳头状腺癌细胞和KB细胞)进行染色并且进行评价以鉴定阳性候选克隆(描绘FOLR1阳性样本中可接受的膜染色和特异性的克隆)。十个克隆中的五个展示在FOLR1阳性样本中可接受的膜染色和良好特异性。对于五个候选克隆中的每个如下通过实验测定适合的染色浓度:353.1(0.7 $\mu$ g/mL)、353.2(2.3g/mL)、353.3(2.3g/mL)、353.5(2 $\mu$ g/mL和10 $\mu$ g/mL)以及353.9(2 $\mu$ g/mL和10 $\mu$ g/mL)。在剩余的5个克隆中,克隆353.15(在2和10 $\mu$ g/mL下染色)展示在KB细胞和正常肺组织中可接受的膜染色;然而,细胞质染色仅在所测试的患者卵巢肿瘤组织中观察到。克隆352.1、352.2和354.1未在任何样本中展示可见染色并且克隆354.2仅展示明显的非特异性细胞质染色,全部被认为是不可接受的。

[0434] 将五个候选克隆进一步亚克隆。成功地鉴定了四个克隆(353.2、353.3、353.5和353.9)的亚克隆,未产生克隆353.1的亚克隆。对总计八个亚克隆进行纯化。两个亚克隆从克隆353.5(353.5-7和353.5-10)获得。两个亚克隆从克隆353.9(353.9-20和353.9-21)获得。两个亚克隆从克隆353.3(353.3-8和353.3-9)获得,并且两个亚克隆从克隆353.2(353.2-1和353.2-12)获得。(注意这些亚克隆还分别被称为5.7、5.10、9.20、9.21、3.8、3.9、2.1和2.12。)以2和10 $\mu$ g/mL的抗体浓度,使用以上所述的方法对这些亚克隆进行IHC表征(表9:IHC试剂和测定条件)还如以下实施例3中所描述对八个亚克隆进行了测序。对候选亚克隆进行进一步评价以鉴定最佳膜染色和特异性且将其如下排序:[353.2-1,353.2-12]、[353.9-20,353.9-21]、[353.5-7,353.5-10]以及[353.3-8,353.3-9]并且进行选择以用于进一步表征(根据序列同一性将亚克隆括在一起,如实施例3中所描述)。

[0435] 选择两个亚克隆以用于进一步IHC测定优化:353.2-1和353.9-20。两种抗体均用于染色人正常肺、人正常唾液腺、人正常胰腺、患者卵巢癌活检、患者非小细胞肺癌(NSCLC)活检以及患者透明细胞肾细胞癌活检。在最佳条件下(参见以下表12和图13),两种亚克隆均展示在人正常组织和患者肿瘤组织中的特异性和适当敏感的染色。胰腺的导管、正常肺

的呼吸上皮以及闰管展示阳性膜相关染色。预期为阴性的胰腺的腺泡细胞/胰岛、肺的肺泡间结缔组织以及唾液腺的腺泡细胞未展示用任一亚克隆阳性染色。预期为阳性的来自卵巢癌、NSCLC和透明细胞肾细胞癌样本的肿瘤细胞展示定位至肿瘤细胞的阳性膜相关染色。预期为阴性的肿瘤亚结构(间质、血管和淋巴细胞)未展示用353.2-1或353.9-20阳性染色。用353-2.1(FOLR1-2.1)另外染色正常组织总结于以下表13中且在图14中示出。总之,IHC表征数据表明353.2-1和353.9-20对FFPE组织中的FOLR1具有特异性(参见图1和图2)。

[0436] 表12. 优化的测定条件

步骤	行为/试剂(供应商)	时间
烘烤	温度: 60°C	30 分钟
脱蜡	Bond 脱蜡溶液(Leica) 100%乙醇(Pharmco Aaper)	固定
抗原修复	Bond 表位修复 2 (基于乙二胺四乙酸(pH 9.0)的溶液)	20 分钟
[0437] 内源性过氧化物酶阻断	过氧化物(Leica)	5 分钟
测试品	IMGN353.2-1 在 1.5 µg/mL 下 IMGN353.9-20 在 6.0 µg/mL 下	15 分钟
检测	Post Primary Regent (Leica)	8 分钟
	聚合物(Leica)	8 分钟
	混合的 DAB (Leica)	10 分钟
复染色	苏木精(Leica)	5 分钟

[0438] 表13. 优化的测定条件

[0439]	表 13.优化的测定条件	2.1 染色
	肾上腺	+
	乳腺小叶	+
	输卵管, 表面上皮	+
	肾, 小管	+
	胰腺, 导管	+
	垂体, 垂体细胞	+
	唾液腺, 闰管	+
	唾液腺, 结缔组织	-
	食管粘膜下层和肌层	-
	眼睛, 角膜	-
	眼睛, 角膜	-
肺, 肺泡间结缔组织	-	
[0440]	肝, 肝细胞	-
	胰腺, 腺泡细胞	-
	肺, 上皮	-/+
	胃, 表面上皮, 窝	-

[0441] 实施例3. 选定抗FOLR1抗体的表征

[0442] 如以上在实施例2中所述, 在基于初级和确认FACS筛选选择的十四个杂交瘤克隆

中,将十个初级克隆通过免疫组织化学(IHC)分析进行分析。在十个初级克隆(即,352.1、352.2、353.1、353.2、353.3、353.5、353.9、353.15、354.1以及354.2)中,五个通过IHC为阳性(即,353.1、353.2和353.3、353.5以及353.9),并且所有五个来源于同一融合(融合353)。成功地亚克隆五个中的四个。选择初级克隆353.2的一个亚克隆且命名为353.2-1(“2.1”)。选择初级克隆353.3的一个亚克隆且命名为353.3-8(“3.8”)。选择初级克隆353.5的一个亚克隆且命名为353.5-7(“5.7”),并且选择初级克隆353.9的两个亚克隆且命名为353.9-20(“9.20”)和353.9-21(“9.21”)。对亚克隆9.20和9.21进行测序,并且如所预期,两个克隆均具有同一序列。此外,将所述克隆中的两个,2.1和9.20在2013年4月16日分别在ATCC寄存为PTA-120197和PTA-120196。

[0443] 通过蛋白质印迹测定的抗FOLR1抗体的特异性

[0444] 通过用从FOLR1阳性(Igrov-1、Ovcar-3、Caov-3、Wish以及Skov-3)和FOLR1阴性(BxPC3、Panc-1和ASPC1)细胞系制备的一组细胞溶解产物的蛋白质印迹对所产生的抗体的特异性进行分析。对于所述测定,将溶解产物在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳中跑电泳且通过标准程序转移至硝酸纤维素膜。将所述膜与本发明的抗FOLR1抗体一起孵育,并且用与辣根过氧化物酶(hrp)偶联的第二抗鼠抗体检测所形成的抗原-抗体复合物(图3)。所有测试的抗FOLR1抗体都以高FOLR1表达水平识别细胞系中的FOLR1(即,Igrov-1和Wish)。低表达细胞系Ovcar-3、Caov-3和Skov-3中的FOLR1仅通过抗FOLR1克隆2.1和9.21检测到;克隆3.8和5.7可能由于不充分的抗体敏感性而未染色这些细胞溶解产物。通过所述克隆未在FOLR1阳性细胞系中检测到另外的非特异性条带;未观察到FOLR1阴性细胞系的染色。

[0445] 抗FOLR1抗体与变性的和未变性的细胞的结合

[0446] 使用FOLR1阳性细胞KB和T47D通过间接FACS测定抗FOLR1抗体结合变性的和未变性的(天然构象)FOLR1的能力。通过Versine收获细胞且用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。通过在含有10%甲醛的PBS中在4℃下孵育细胞过夜、接着用PBS洗涤且在95℃下孵育30分钟来制备变性的细胞。然后将变性的和未变性的细胞与在FACS缓冲液(补充有2%正常山羊血清的RPMI-1640培养基)中稀释的抗FOLR1抗体一起在冰上孵育2小时。将细胞离心,用PBS洗涤并且与FITC偶联的山羊抗小鼠IgG抗体孵育40分钟。将细胞再次离心,用PBS洗涤且用含有1%甲醛的0.2ml的PBS重新悬浮。使用FACSCalibur流式细胞仪与HTS多孔(HTS multiwell)测量细胞相关荧光并且使用CellQuest Pro(BD Biosciences, San Diego, US)进行分析。如图4上所示,所有抗FOLR1抗体结合至变性的细胞和未变性的细胞两者。

[0447] 通过ELISA测定的抗FOLR1抗体的亲和力

[0448] 通过ELISA检查抗FOLR1抗体的结合亲和力,其中重组人FOLR1-鼠Fc2a蛋白用作抗原。将重组蛋白固定在微量滴定板上,并且将抗体以一系列浓度添加至所述板。将板在室温下孵育两小时,用补充有0.05%Tween-20的PBS洗涤,并且与hrp-标记的山羊抗鼠第二抗体一起在室温下孵育一小时。将板再次用PBS/Tween-20洗涤,并且通过添加hrp-底物TMB(Bio-FX)检测结合的hrp-偶联抗体。代表性结果在图5中示出。抗FOLR1抗体在0.5至0.9nM的半最大有效浓度(EC50)下对人FOLR1具有类似的亲和力。

[0449] 无抗FOLR1抗体与FOLR2和FOLR3的交叉反应性

[0450] FOLR1是叶酸受体家族的成员。通过ELISA测定抗FOLR1抗体与家族FOLR2和FOLR3的其他成员的交叉反应性。将重组蛋白FOLR2-His或FOLR3-His(R&D Systems)固定至Ni-

NTA板(QIAGEN)并且将抗FOLR1抗体添加至所述板且在室温下孵育2小时。作为FOLR2和FOLR3的阳性对照,分别使用ELISA多克隆抗FOLR2和FOLR3抗体(R&D systems)。用hrp-标记的山羊抗鼠第二抗体检测所形成的抗体-抗原复合物。如图6中所示,本发明的抗FOLR1抗体未结合FOLR2或FOLR3;仅对照抗体检测到相应抗原。

#### [0451] 实施例4. 抗原表位表征

[0452] 人FOLR1在位置69、161和201(UniProt)处具有N-糖基化的三个潜在位点,并且如在文献中所报道,所有三个位点被糖基化。为了表征由本文所述的抗FOLR1抗体识别的表位的性质,用去糖基化的和未处理的受体进行结合实验。在所产生的抗FOLR1克隆中,仅克隆2.1用于研究中,因为基于测序数据,所述克隆是相关的且可能结合相同表位。除克隆2.1外,包括两种其他抗FOLR1抗体:huMov19(WO 2011/106528)和克隆BN3.2(Leica)。为了使FOLR1去糖基化,根据制造商的方案将重组人FOLR1或FOLR1阳性KB或Igrov-1细胞的溶解产物用去糖基化酶的混合物进行处理(Enzymatic DeGlycoMX试剂盒,QA-bio)。然后,处理的和未处理的FOLR1的样本用于ELISA和蛋白质印迹分析中。对于ELISA,将去糖基化的和未处理的FOLR1固定至ELISA板(Immulon),并且添加抗FOLR1抗体FRIHC2-1(“2.1”)或huMov19。在2小时孵育之后,用hrp标记的山羊抗人(对于huMov19)或抗鼠(对于2.1)第二抗体检测抗体-抗原复合物(图7)。对于蛋白质印迹分析,将去糖基化的和未处理的溶解产物的样本或huFOLR1重组蛋白通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离且通过标准程序转移至硝酸纤维素膜。将所述膜与抗FOLR1抗体2.1、huMov19或BN3.2一起孵育,并且用与辣根过氧化物酶偶联的适当第二抗鼠或抗人抗体检测抗原-抗体复合物(图8)。如图7和8所示,抗体2.1与去糖基化的FOLR1的结合相对于未处理的FOLR1显著减少,表明抗体结合糖基依赖性表位(glycodependent epitope)。相比之下,其他两种抗FOLR1抗体huMov19和BN3.2类似的结合去糖基化的和未处理的受体,从而指示(i) FOLR1蛋白未在去糖基化程序期间受损,且(ii) huMov19和BN3.2识别FOLR1的蛋白质表位。

#### [0453] 实施例5. 抗人FOLR1抗体的VL和VH区的克隆和测序

[0454] 使用RNeasy试剂盒(QIAgen)根据制造商的方案从实施例1中描述的FOLR1杂交瘤的 $5 \times 10^6$ 个细胞制备总细胞RNA。随后使用SuperScript II cDNA合成试剂盒(Invitrogen)从总RNA合成八个亚克隆克隆(2.1、2.12、3.8、3.9、5.7、5.10、9.20和9.21)的cDNA。

[0455] 用于扩增源自杂交瘤细胞的抗体可变区cDNA的PCR程序是基于Wang等((2000) J Immunol Methods. 233:167-77)和Co等((1992) J Immunol. 148:1149-54)中所描述的方法。分别在5'端上通过简并引物并且在3'端上通过鼠 $\kappa$ 或IgG1恒定区特异性引物扩增可变轻链(VL)和可变重链(VH)序列。然后在1%低熔点琼脂糖凝胶上运行PCR反应,接着切除300至400bp扩增子条带,随后使用Zymo DNA微型柱纯化所述扩增子条带。将纯化的扩增子送至Beckman Coulter Genomics以用于利用PCR反应的相同5'和3'引物进行测序以便产生来自两个方向的可变区cDNA序列。

[0456] 因为用于克隆VL和VH cDNA序列的简并引物改变5'端,所以需要另外的测序努力来验证完整cDNA序列。使初步序列进入NCBI IgBlast网站([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/))的搜索查询以鉴定抗体序列所源自的鼠种系序列。然后设计PCR引物以与鼠抗体的种系连接的前导序列退火,以使得这一新的PCR反应将产生未由PCR引物改变的完整可变区cDNA序列。所述PCR反应、条带纯化和测序如上所述进行。

[0457] 用于序列确认的质量测定

[0458] 将针对抗FOLR1抗体中的每种获得的可变区cDNA序列与种系恒定区序列组合以获得全长抗体cDNA序列。然后从cDNA序列的翻译计算重链和轻链的分子量并且将其与通过纯化的鼠抗FOLR1抗体的LC/MS分析获得的分子量进行比较。LC/MS通过去糖基化且减少抗体以分离全链轻链和重链肽来进行。重链中的每个的所观察到的分子量匹配所预期的分子量,但轻链中的每个相差大约85Da。通过轻链片段的LC/MS进行的随后肽片段化分析指示轻链前导肽的最终丝氨酸事实上保留在成熟轻链上,从而添加约87Da至预期MW,从而确认FOLR1抗体中的每个的cDNA序列。

[0459] 抗FOLR1抗体的复合CDR序列

[0460] 8个亚克隆的抗体序列的比对揭示4个原始杂交瘤中的3个产生了紧密相关的但独特的抗体。如所预期,4个姐妹亚克隆对中的每个是相同的。此外,两组亚克隆也是相同的,从而产生3个独特的抗体序列(SEQ ID NO:27-32)(2.1、5.7和9.20)。这3种独特抗体的轻链可变框架序列和重链可变框架序列是紧密相关的,但是每种抗体包含独特的CDR,这可能是由于体细胞氨基酸取代(参见以下表14)。因为鼠抗FOLR1抗体的这些CDR变体据发现是功能上相同的,所以它们提供对本发明的抗FOLR1抗体的CDR的序列灵活性的一些结构深入了解。轻链CDR 2和3在所述抗体中的每个中是相同的,从而表明这些严格保守的CDR可提供FOLR1结合的一致结构基础。另一方面,剩余CDR中的氨基酸取代(尤其是重链CDR 2和3中的那些)表明这些位置对于这些抗体的亲和力和特异性的改进来说是关键的。这些CDR位置中的特定残基取代还提供可并入这些抗体的工程化型式内的残基的实例。表14提供从本发明的抗FOLR1抗体编译的复合CDR序列列表。本文鉴定的复合CDR可用于设计将预期保留本发明的抗FOLR1抗体的功能属性的重组抗体。

[0461] 表14复合CDR

[0462]	抗 FOLR1 复合 CDR	
	轻链	
	CDR1: KS[T/S][K/E]SLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:24)	
	CDR2: LVSNHFS (SEQ ID NO:25)	
	CDR3: FQSNYLPLT (SEQ ID NO:26)	
	重链	
	CDR1: N[Y/S]YIH (SEQ ID NO:21)	
	CDR2	:
	WIYP[G/E][S/N][F/V/L]N[V/T][E/R/Q]YN[E/D]KFKA (SEQ ID NO:22)	
	CDR3: RGIY[F/Y]YSPYA[L/M]D[Y/H](SEQ ID NO:23)	

[0463] 抗体人源化

[0464] 按照先前描述的表面重构方法对FRIHC2-1抗体进行人源化,例如像Roguska等, Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,91(3):969-973(1994)以及Roguska等,Protein Eng.9(10):895-904(1996)中所描述,所述文献以引用的方式整体并入本文。表面重构涉及鉴定轻链和重链两者中的可变区框架表面残基并且用人等效物置换所述残基。鼠CDR保留在表面重构

的抗体中。FRIHC2-1抗体的示例性CDR是如表14中指示所定义。为了最小化关于落入CDR中的偶联赖氨酸的影响的考虑,将鼠FRIHC2-1抗体轻链CDR1中的赖氨酸24和赖氨酸27用精氨酸置换以获得人源化型式1.0(以斜体示出),因此给出LC CDR1的两种型式。除用于表面重构的AbM重链CDR2定义之外,所述表提供FRIHC2-1抗体的鼠和人型式的示例性Kabat定义的重链CDR2。加下划线的序列标记Kabat重链CDR2的不被认为是用于表面重构的CDR的部分。

[0465] 表面残基位置被定义为具有30%或更大的相对可及性的任何位置(Pedersen J.T.等,J.Mol.Biol.1994;235:959-973)。然后将所计算的表面残基与人种系表面序列进行比对以鉴定最同源的人表面序列。用作FRIHC2-1抗体的VL结构域的置换表面的人种系序列是IGKV2-30\*01,而IGHV1-69\*10用作FRIHC2-1抗体VH的置换表面。FRIHC2-1抗体的特异性框架表面残基变化在图9中给出。因为表面重构的轻链包括优选形式的CDR1赖氨酸取代,还产生了鼠赖氨酸保留在CDR-L1中的表面重构的型式(v1.01)。图10示出具有其鼠对应物的轻链和重链两者的FRIHC2-1可变结构域的表面重构的序列的比对。

[0466] 除通过可变结构域表面重构进行人源化外,还根据互补决定区(CDR)接枝技术(Jones等,Nature 321:604-608(1986)和Verhoeyen等,Science 239:1534-1536(1988))对FRIHC2-1抗体进行人源化。CDR接枝方法包括将来自自然进化的鼠抗体的CDR接枝到人抗体的Fv框架区(FR)上。Kabat编号方案和Kabat CDR定义用于FRIHC2-1抗体的的CDR接枝。用于CDR接枝的FRIHC2-1的示例性CDR在表14中给出。与鼠FRIHC2-1抗体具有最高同源性的人免疫球蛋白种系序列通过International ImMunoGeneTics information **system**® (IMGT (<http://imgt.cines.fr/>))的交互工具V-QUEST来鉴定,如Lefranc,Nucleic Acids Res.29:207-209(2001)中所描述。用作FRIHC2-1抗体的VL和VH结构域的受体框架的人种系序列分别是IGKV2D-29\*02和IGHV1-2\*02。为了最小化关于落入CDR中的偶联赖氨酸的影响的考虑,将鼠FRIHC2-1抗体轻链CDR1中的赖氨酸24和赖氨酸27在CDR接枝的构建体中用精氨酸置换(表15)。FRIHC2-1抗体的CDR接枝中的CDR-L1中的特定框架残基变化和取代在图11中给出,并且具有其鼠对应物的FRIHC2-1抗体可变结构域的CDR接枝的序列的比对在图12中示出。

[0467] 表15



[0468]

<b>FRIHC2-1 CDR's (表面重构)</b>	<b>FRIHC2-1 CDR's (CDR 接枝)</b>
<b>轻链</b>	<b>轻链</b>
鼠和表面重构的 v1.01 CDR1: KSSKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:6)	鼠和 CDR 接枝的 v1.01 CDR1: KSSKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:6)
表面重构的 v1.0 CDR1: RSSRSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:59)	表面重构的 v1.0 CDR1: RSSRSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:59)
CDR2: LVSNHFS (SEQ ID NO:7)	CDR2: LVSNHFS (SEQ ID NO:7)
CDR3: FQSNYLPLT (SEQ ID NO:8)	CDR3: FQSNYLPLT (SEQ ID NO:8)
<b>重链</b>	<b>重链</b>
CDR1: NSYIH (SEQ ID NO:3)	CDR1: NSYIH (SEQ ID NO:3)
CDR2: WIYPESLNTQ (SEQ ID NO:60)	CDR2: WIYPESLNTQYNEKFKA (SEQ ID NO:4)
CDR3: RGIYYYSPLYALDH (SEQ ID NO:5)	CDR3: RGIYYYSPLYALDH (SEQ ID NO:5)
Kabat FRIHC2-1 HC CDR2	
鼠 HC CDR2: <u>WIYPESLNTQYNEKFKA</u> (SEQ ID NO:4)	
表面重构的 HC CDR2: <u>WIYPESLNTQYNQKFQG</u> (SEQ ID NO:61)	

[0469] 实施例6. 使用人肿瘤样本进行的353-2.1 (FOLR1-2.1) 抗体的IHC评价

[0470] 将代表卵巢癌 (n=63)、肺腺癌 (n=104) 以及子宫内膜样腺癌 (n=58) 的人肿瘤样本针对FOLR1表达使用353-2.1抗体通过IHC进行评价。FOLR1染色的强度和分数分布总结在以下表16中。图15示出用353-2.1抗体染色卵巢癌和肺腺癌组织的一个实例。这些结果证明353-2.1作为用于IHC测定以将患者鉴定为使用FOLR1靶向剂 (例如, IMG853) 的疗法的潜在候选者的效用。

[0471] 表16: 分数分布 (阳性%)

[0472]

<b>肿瘤类型:</b>	<b>卵巢癌 n=63</b>	<b>肺腺癌 n=104</b>	<b>子宫内膜样腺癌 n=58</b>
阳性 (任何强度):	65%	70%	64%
≥ 2 级强度, 其	59%	47%	33%

[0473]	中至少 25%肿瘤细胞染色:			
	≥ 3 级强度, 其中至少 25%肿瘤细胞染色:	51%	19%	14%

[0474] 使用另外的IHC测定进一步证明FOLR1-2.1 (FOLR1 353-2.1) 抗体的独特抗原特异性和高结合亲和力。所述IHC测定在Ventana BenchMark XT自动载玻片染色器上利用OptiView DAB检测试剂盒以用于福尔马林固定的石蜡包埋的组织样本中的FOLR1蛋白质表达的半定量测定。已使用正常和肿瘤组织对照关于特异性、灵敏度和精确度对所述测定进行了优化和验证。在优化的条件下,在肿瘤细胞中清楚地观察到显著膜染色,而正常基质组织是完全阴性的。(图16)。此外,所述测定还实现了更广泛的动态范围,从而允许区分中等染色强度(2级,中等褐色染色,图17)与最强染色强度(3级,深褐色染色,图17)。增强的动态范围改进基于染色强度对FOLR1阳性样本排序的能力并且使能够进一步鉴定具有最高FOLR1表达水平的患者的子群体。

[0475] 使用卵巢癌组织微阵列(TMA)对BN3.2(Leica)抗体和FOLR1-2.1 (FOLR1353-2.1)抗体进行比较。在IHC测定(BN3.2测定)中使用BN3.2(Leica)抗体,接近50%的样本(35种中的16种)被评分在最高类别(在至少25%肿瘤细胞上3级染色强度)。相比之下,在以上所述的在Ventana BenchMark XT自动载玻片染色器上利用OptiView DAB检测试剂盒的IHC测定(FOLR1-2.1测定)中使用FOLR1-2.1 (FOLR1 353-2.1)抗体允许将这16种样本进一步分成2种不同的类别:6种在最高类别(在至少25%肿瘤细胞上3级染色强度,表17),并且其他10种在第二最高类别(在至少25%肿瘤细胞上2级染色强度,表17)。因此,在FOLR1-2.1测定中用FOLR1-2.1抗体获得的更谨慎的染色允许在BN3.2测定中使用BN3.2抗体在样本中区分全部一起分组为具有3级表达的样本。

[0476] 表17:卵巢癌TMA中的FOLR1流行率比较(n=35)

[0477]	分数	FOLR1-2.1 测定	BN3.2 测定
	阳性(任何强度)	24 (69%)	28 (80%)
[0478]	≥ 1 级强度, 其中至少 25%肿瘤细胞染色:	21 (60%)	27 (77%)
	≥ 2 级强度, 其中至少 25%肿瘤细胞染色:	17 (49%)	25 (71%)
	≥ 3 级强度, 其中至少 25%肿瘤细胞染色:	6 (17%)	16 (46%)

[0479] 出于所有的目的,本文所引用的所有出版物、专利、专利申请、互联网网站以及登录号/数据库序列(包括多核苷酸与多肽序列二者)以引用的方式在此整体并入本文,其引用的程度犹如每个单个出版物、专利、专利申请、互联网网站或登录号/数据库序列被明确地和单独地指出以引用的方式如此并入。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 伊缪诺金公司  
 [0003] <120> 用于检测叶酸受体1的抗体和测定  
 [0004] <130> 2921.044PC03/EKS/CLD  
 [0005] <150> 61/940,184  
 [0006] <151> 2014-02-14  
 [0007] <150> 61/875,475  
 [0008] <151> 2013-09-09  
 [0009] <150> 61/872,407  
 [0010] <151> 2013-08-30  
 [0011] <160> 75  
 [0012] <170> PatentIn version 3.5  
 [0013] <210> 1  
 [0014] <211> 257  
 [0015] <212> PRT  
 [0016] <213> 智人  
 [0017] <400> 1  
 [0018] Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val  
 [0019] 1 5 10 15  
 [0020] Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu  
 [0021] 20 25 30  
 [0022] Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly  
 [0023] 35 40 45  
 [0024] Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala  
 [0025] 50 55 60  
 [0026] Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr  
 [0027] 65 70 75 80  
 [0028] Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys  
 [0029] 85 90 95  
 [0030] Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn  
 [0031] 100 105 110  
 [0032] Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg  
 [0033] 115 120 125  
 [0034] Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu  
 [0035] 130 135 140  
 [0036] Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp  
 [0037] 145 150 155 160  
 [0038] Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln

[0039]	165	170	175
[0040]	Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile		
[0041]	180	185	190
[0042]	Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg		
[0043]	195	200	205
[0044]	Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu		
[0045]	210	215	220
[0046]	Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala		
[0047]	225	230	235
[0048]	Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu		
[0049]	245	250	255
[0050]	Ser		
[0051]	<210> 2		
[0052]	<211> 771		
[0053]	<212> DNA		
[0054]	<213> 智人		
[0055]	<400> 2		
[0056]	atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctccttctag tgtgggtggc tgtagtaggg	60	
[0057]	gaggctcaga caaggattgc atgggccagg actgagcttc tcaatgtctg catgaacgcc	120	
[0058]	aagcaccaca aggaaaagcc aggccccgag gacaagttgc atgagcagtg tcgaccctgg	180	
[0059]	aggaagaatg cctgctgttc taccaacacc agccaggaag cccataagga tgtttcctac	240	
[0060]	ctatatagat tcaactggaa ccaactgtga gagatggcac ctgcctgcaa acggcatttc	300	
[0061]	atccaggaca cctgcctcta cgagtgtcc cccaacttgg ggccctggat ccagcaggtg	360	
[0062]	gatcagagct ggcgcaaaga gcgggtactg aacgtgcccc tgtgcaaaga ggactgtgag	420	
[0063]	caatggtggg aagattgtcg cacctcctac acctgcaaga gcaactggca caagggctgg	480	
[0064]	aactggactt cagggtttta caagtgcga gtgggagctg cctgccaacc tttccatttc	540	
[0065]	tacttcccca caccactgt tctgtgcaat gaaatctgga ctcaactccta caaggtcagc	600	
[0066]	aactacagcc gagggagtgg ccgctgcata cagatgtggt tcgaccagc ccagggcaac	660	
[0067]	cccaatgagg aggtggcgag gttctatgct gcagccatga gtggggctgg gccctgggca	720	
[0068]	gcctggcctt tcctgcttag cctggcccta atgtgtgtgt ggctgctcag c	771	
[0069]	<210> 3		
[0070]	<211> 5		
[0071]	<212> PRT		
[0072]	<213> 人工序列		
[0073]	<220>		
[0074]	<223> muFRIHC2-1 VH-CDR1		
[0075]	<400> 3		
[0076]	Asn Ser Tyr Ile His		
[0077]	1	5	

[0078]	<210>	4
[0079]	<211>	17
[0080]	<212>	PRT
[0081]	<213>	人工序列
[0082]	<220>	
[0083]	<223>	muFRIHC2-1 VH-CDR2
[0084]	<400>	4
[0085]		Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0086]		1                    5                        10                              15
[0087]		Ala
[0088]	<210>	5
[0089]	<211>	13
[0090]	<212>	PRT
[0091]	<213>	人工序列
[0092]	<220>	
[0093]	<223>	muFRIHC2-1 VH-CDR3
[0094]	<400>	5
[0095]		Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His
[0096]		1                    5                        10
[0097]	<210>	6
[0098]	<211>	16
[0099]	<212>	PRT
[0100]	<213>	人工序列
[0101]	<220>	
[0102]	<223>	muFRIHC2-1 VL-CDR1
[0103]	<400>	6
[0104]		Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp
[0105]		1                    5                        10                              15
[0106]	<210>	7
[0107]	<211>	7
[0108]	<212>	PRT
[0109]	<213>	人工序列
[0110]	<220>	
[0111]	<223>	muFRIHC2-1 VL-CDR2
[0112]	<400>	7
[0113]		Leu Val Ser Asn His Phe Ser
[0114]		1                    5
[0115]	<210>	8
[0116]	<211>	9

[0117] <212> PRT  
[0118] <213> 人工序列  
[0119] <220>  
[0120] <223> muFRIHC2-1 VL-CDR3  
[0121] <400> 8  
[0122] Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr  
[0123] 1 5  
[0124] <210> 9  
[0125] <211> 5  
[0126] <212> PRT  
[0127] <213> 人工序列  
[0128] <220>  
[0129] <223> muFRIHC5-7 VH-CDR1  
[0130] <400> 9  
[0131] Asn Tyr Tyr Ile His  
[0132] 1 5  
[0133] <210> 10  
[0134] <211> 17  
[0135] <212> PRT  
[0136] <213> 人工序列  
[0137] <220>  
[0138] <223> muFRIHC5-7 VH-CDR2  
[0139] <400> 10  
[0140] Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
[0141] 1 5 10 15  
[0142] Ala  
[0143] <210> 11  
[0144] <211> 13  
[0145] <212> PRT  
[0146] <213> 人工序列  
[0147] <220>  
[0148] <223> muFRIHC5-7 VH-CDR3  
[0149] <400> 11  
[0150] Arg Gly Ile Tyr Phe Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr  
[0151] 1 5 10  
[0152] <210> 12  
[0153] <211> 16  
[0154] <212> PRT  
[0155] <213> 人工序列



[0156] <220>  
[0157] <223> muFRIHC5-7 VL-CDR1  
[0158] <400> 12  
[0159] Lys Ser Thr Glu Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp  
[0160] 1 5 10 15  
[0161] <210> 13  
[0162] <211> 7  
[0163] <212> PRT  
[0164] <213> 人工序列  
[0165] <220>  
[0166] <223> muFRIHC5-7 VL-CDR2  
[0167] <400> 13  
[0168] Leu Val Ser Asn His Phe Ser  
[0169] 1 5  
[0170] <210> 14  
[0171] <211> 9  
[0172] <212> PRT  
[0173] <213> 人工序列  
[0174] <220>  
[0175] <223> muFRIHC5-7 VL-CDR3  
[0176] <400> 14  
[0177] Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr  
[0178] 1 5  
[0179] <210> 15  
[0180] <211> 5  
[0181] <212> PRT  
[0182] <213> 人工序列  
[0183] <220>  
[0184] <223> muFRIHC9-20 VH-CDR1  
[0185] <400> 15  
[0186] Asn Tyr Tyr Ile His  
[0187] 1 5  
[0188] <210> 16  
[0189] <211> 17  
[0190] <212> PRT  
[0191] <213> 人工序列  
[0192] <220>  
[0193] <223> muFRIHC9-20 VH-CDR2  
[0194] <400> 16

[0195]	Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Val Asn Val Arg Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
[0196]	1 5 10 15
[0197]	Ala
[0198]	<210> 17
[0199]	<211> 13
[0200]	<212> PRT
[0201]	<213> 人工序列
[0202]	<220>
[0203]	<223> muFRIHC9-20 VH-CDR3
[0204]	<400> 17
[0205]	Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
[0206]	1 5 10
[0207]	<210> 18
[0208]	<211> 16
[0209]	<212> PRT
[0210]	<213> 人工序列
[0211]	<220>
[0212]	<223> muFRIHC9-20 VL-CDR1
[0213]	<400> 18
[0214]	Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp
[0215]	1 5 10 15
[0216]	<210> 19
[0217]	<211> 7
[0218]	<212> PRT
[0219]	<213> 人工序列
[0220]	<220>
[0221]	<223> muFRIHC9-20 VL-CDR2
[0222]	<400> 19
[0223]	Leu Val Ser Asn His Phe Ser
[0224]	1 5
[0225]	<210> 20
[0226]	<211> 9
[0227]	<212> PRT
[0228]	<213> 人工序列
[0229]	<220>
[0230]	<223> muFRIHC9-20 VL-CDR3
[0231]	<400> 20
[0232]	Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr
[0233]	1 5

[0234] <210> 21  
[0235] <211> 5  
[0236] <212> PRT  
[0237] <213> 人工序列  
[0238] <220>  
[0239] <223> 复合VH-CDR1  
[0240] <220>  
[0241] <221> misc\_feature  
[0242] <222> (2) .. (2)  
[0243] <223> Xaa可以是酪氨酸或丝氨酸  
[0244] <400> 21  
[0245] Asn Xaa Tyr Ile His  
[0246] 1 5  
[0247] <210> 22  
[0248] <211> 17  
[0249] <212> PRT  
[0250] <213> 人工序列  
[0251] <220>  
[0252] <223> 复合VH-CDR2  
[0253] <220>  
[0254] <221> misc\_feature  
[0255] <222> (5) .. (5)  
[0256] <223> Xaa可以是甘氨酸或谷氨酸  
[0257] <220>  
[0258] <221> misc\_feature  
[0259] <222> (6) .. (6)  
[0260] <223> Xaa可以是丝氨酸或天冬酰胺  
[0261] <220>  
[0262] <221> misc\_feature  
[0263] <222> (7) .. (7)  
[0264] <223> Xaa可以是苯丙氨酸或缬氨酸和亮氨酸  
[0265] <220>  
[0266] <221> misc\_feature  
[0267] <222> (9) .. (9)  
[0268] <223> Xaa可以是缬氨酸和苏氨酸  
[0269] <220>  
[0270] <221> misc\_feature  
[0271] <222> (10) .. (10)  
[0272] <223> Xaa可以是谷氨酸或精氨酸或谷氨酰胺

[0273] <220>  
 [0274] <221> misc\_feature  
 [0275] <222> (13) .. (13)  
 [0276] <223> Xaa可以是谷氨酸或天冬氨酸  
 [0277] <400> 22  
 [0278] Trp Ile Tyr Pro Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Asn Xaa Lys Phe Lys  
 [0279] 1 5 10 15  
 [0280] Ala  
 [0281] <210> 23  
 [0282] <211> 13  
 [0283] <212> PRT  
 [0284] <213> 人工序列  
 [0285] <220>  
 [0286] <223> 复合VH-CDR3  
 [0287] <220>  
 [0288] <221> misc\_feature  
 [0289] <222> (5) .. (5)  
 [0290] <223> Xaa可以是苯丙氨酸或酪氨酸  
 [0291] <220>  
 [0292] <221> misc\_feature  
 [0293] <222> (11) .. (11)  
 [0294] <223> Xaa可以是亮氨酸或蛋氨酸  
 [0295] <220>  
 [0296] <221> misc\_feature  
 [0297] <222> (13) .. (13)  
 [0298] <223> Xaa可以是酪氨酸或组氨酸  
 [0299] <400> 23  
 [0300] Arg Gly Ile Tyr Xaa Tyr Ser Pro Tyr Ala Xaa Asp Xaa  
 [0301] 1 5 10  
 [0302] <210> 24  
 [0303] <211> 16  
 [0304] <212> PRT  
 [0305] <213> 人工序列  
 [0306] <220>  
 [0307] <223> 复合VL-CDR1  
 [0308] <220>  
 [0309] <221> misc\_feature  
 [0310] <222> (3) .. (3)  
 [0311] <223> Xaa可以是苏氨酸或丝氨酸

[0312] <220>  
 [0313] <221> misc\_feature  
 [0314] <222> (4) .. (4)  
 [0315] <223> Xaa可以是赖氨酸或谷氨酸  
 [0316] <400> 24  
 [0317] Lys Ser Xaa Xaa Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp  
 [0318] 1 5 10 15  
 [0319] <210> 25  
 [0320] <211> 7  
 [0321] <212> PRT  
 [0322] <213> 人工序列  
 [0323] <220>  
 [0324] <223> 复合VL-CDR2  
 [0325] <400> 25  
 [0326] Leu Val Ser Asn His Phe Ser  
 [0327] 1 5  
 [0328] <210> 26  
 [0329] <211> 9  
 [0330] <212> PRT  
 [0331] <213> 人工序列  
 [0332] <220>  
 [0333] <223> 复合VL-CDR3  
 [0334] <400> 26  
 [0335] Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr  
 [0336] 1 5  
 [0337] <210> 27  
 [0338] <211> 122  
 [0339] <212> PRT  
 [0340] <213> 人工序列  
 [0341] <220>  
 [0342] <223> muFRIHC2-1 VH链  
 [0343] <400> 27  
 [0344] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0345] 1 5 10 15  
 [0346] Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser  
 [0347] 20 25 30  
 [0348] Tyr Ile His Trp Val Lys Lys Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0349] 35 40 45  
 [0350] Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe

[0351]	50	55	60
[0352]	Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr		
[0353]	65	70	75
[0354]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		80
[0355]	85	90	95
[0356]	Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp		
[0357]	100	105	110
[0358]	Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser		
[0359]	115	120	
[0360]	<210> 28		
[0361]	<211> 114		
[0362]	<212> PRT		
[0363]	<213> 人工序列		
[0364]	<220>		
[0365]	<223> muFRIHC2-1 VL链		
[0366]	<400> 28		
[0367]	Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile		
[0368]	1	5	10
[0369]	Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn		15
[0370]	20	25	30
[0371]	Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
[0372]	35	40	45
[0373]	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val		
[0374]	50	55	60
[0375]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
[0376]	65	70	75
[0377]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln		80
[0378]	85	90	95
[0379]	Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
[0380]	100	105	110
[0381]	Lys Arg		
[0382]	<210> 29		
[0383]	<211> 122		
[0384]	<212> PRT		
[0385]	<213> 人工序列		
[0386]	<220>		
[0387]	<223> muFRIHC5-7 VH链		
[0388]	<400> 29		
[0389]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala		



[0390]	1	5	10	15
[0391]	Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr			
[0392]	20	25	30	
[0393]	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0394]	35	40	45	
[0395]	Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe			
[0396]	50	55	60	
[0397]	Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr			
[0398]	65	70	75	80
[0399]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
[0400]	85	90	95	
[0401]	Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Phe Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp			
[0402]	100	105	110	
[0403]	Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser			
[0404]	115	120		
[0405]	<210> 30			
[0406]	<211> 114			
[0407]	<212> PRT			
[0408]	<213> 人工序列			
[0409]	<220>			
[0410]	<223> muFRIHC5-7 VL链			
[0411]	<400> 30			
[0412]	Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile			
[0413]	1	5	10	15
[0414]	Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Glu Ser Leu Leu Asn			
[0415]	20	25	30	
[0416]	Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln			
[0417]	35	40	45	
[0418]	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val			
[0419]	50	55	60	
[0420]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys			
[0421]	65	70	75	80
[0422]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln			
[0423]	85	90	95	
[0424]	Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val			
[0425]	100	105	110	
[0426]	Lys Arg			
[0427]	<210> 31			
[0428]	<211> 122			

[0429]	<212>	PRT
[0430]	<213>	人工序列
[0431]	<220>	
[0432]	<223>	muFRIHC9-20 VH链
[0433]	<400>	31
[0434]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[0435]	1 5 10 15	
[0436]	Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr	
[0437]	20 25 30	
[0438]	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0439]	35 40 45	
[0440]	Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Val Asn Val Arg Tyr Asn Asp Lys Phe	
[0441]	50 55 60	
[0442]	Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[0443]	65 70 75 80	
[0444]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
[0445]	85 90 95	
[0446]	Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp	
[0447]	100 105 110	
[0448]	Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser	
[0449]	115 120	
[0450]	<210>	32
[0451]	<211>	114
[0452]	<212>	PRT
[0453]	<213>	人工序列
[0454]	<220>	
[0455]	<223>	muFRIHC9-20 VL链
[0456]	<400>	32
[0457]	Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu	
[0458]	1 5 10 15	
[0459]	Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn	
[0460]	20 25 30	
[0461]	Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln	
[0462]	35 40 45	
[0463]	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val	
[0464]	50 55 60	
[0465]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys	
[0466]	65 70 75 80	
[0467]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln	

[0468]		85		90		95
[0469]	Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile					
[0470]		100		105		110
[0471]	Lys Arg					
[0472]	<210> 33					
[0473]	<211> 446					
[0474]	<212> PRT					
[0475]	<213> 人工序列					
[0476]	<220>					
[0477]	<223> muFRIHC2-1全长重链					
[0478]	<400> 33					
[0479]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala					
[0480]	1	5		10		15
[0481]	Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser					
[0482]		20		25		30
[0483]	Tyr Ile His Trp Val Lys Lys Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
[0484]		35		40		45
[0485]	Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe					
[0486]		50		55		60
[0487]	Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr					
[0488]	65	70		75		80
[0489]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys					
[0490]		85		90		95
[0491]	Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp					
[0492]		100		105		110
[0493]	Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro					
[0494]		115		120		125
[0495]	Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met					
[0496]		130		135		140
[0497]	Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr					
[0498]	145	150		155		160
[0499]	Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro					
[0500]		165		170		175
[0501]	Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val					
[0502]		180		185		190
[0503]	Pro Ser Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His					
[0504]		195		200		205
[0505]	Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys					
[0506]		210		215		220

[0507]	Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe																		
[0508]	225					230					235								240
[0509]	Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro																		
[0510]					245						250								255
[0511]	Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val																		
[0512]					260						265								270
[0513]	Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr																		
[0514]					275						280								285
[0515]	Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu																		
[0516]					290						295								300
[0517]	Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys																		
[0518]	305																		320
[0519]	Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser																		
[0520]					325						330								335
[0521]	Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro																		
[0522]					340						345								350
[0523]	Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile																		
[0524]					355						360								365
[0525]	Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly																		
[0526]					370						375								380
[0527]	Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn																		
[0528]	385																		400
[0529]	Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp																		
[0530]					405						410								415
[0531]	Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His																		
[0532]					420						425								430
[0533]	Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys																		
[0534]					435						440								445
[0535]	<210>	34																	
[0536]	<211>	220																	
[0537]	<212>	PRT																	
[0538]	<213>	人工序列																	
[0539]	<220>																		
[0540]	<223>	muFRIHC2-1全长轻链																	
[0541]	<400>	34																	
[0542]	Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile																		
[0543]	1				5						10								15
[0544]	Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn																		
[0545]					20						25								30

[0546]	Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
[0547]	35 40 45
[0548]	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val
[0549]	50 55 60
[0550]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
[0551]	65 70 75 80
[0552]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln
[0553]	85 90 95
[0554]	Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0555]	100 105 110
[0556]	Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
[0557]	115 120 125
[0558]	Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
[0559]	130 135 140
[0560]	Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
[0561]	145 150 155 160
[0562]	Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
[0563]	165 170 175
[0564]	Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
[0565]	180 185 190
[0566]	Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
[0567]	195 200 205
[0568]	Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
[0569]	210 215 220
[0570]	<210> 35
[0571]	<211> 446
[0572]	<212> PRT
[0573]	<213> 人工序列
[0574]	<220>
[0575]	<223> muFRIHC5-7全长重链
[0576]	<400> 35
[0577]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
[0578]	1 5 10 15
[0579]	Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0580]	20 25 30
[0581]	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0582]	35 40 45
[0583]	Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
[0584]	50 55 60

[0585]	Lys	Ala	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr
[0586]	65					70				75						80
[0587]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
[0588]					85					90						95
[0589]	Ala	Arg	Arg	Gly	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Ser	Pro	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp
[0590]					100					105						110
[0591]	Gly	Gln	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
[0592]					115					120						125
[0593]	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met
[0594]					130					135						140
[0595]	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
[0596]	145					150					155					160
[0597]	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
[0598]					165						170					175
[0599]	Ala	Val	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val
[0600]					180						185					190
[0601]	Pro	Ser	Ser	Met	Arg	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His
[0602]					195						200					205
[0603]	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys
[0604]					210						215					220
[0605]	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe
[0606]	225					230					235					240
[0607]	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro
[0608]					245						250					255
[0609]	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val
[0610]					260						265					270
[0611]	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr
[0612]					275											285
[0613]	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu
[0614]					290						295					300
[0615]	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys
[0616]	305					310					315					320
[0617]	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
[0618]					325						330					335
[0619]	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro
[0620]					340						345					350
[0621]	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile
[0622]					355						360					365
[0623]	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly



[0624]	370	375	380
[0625]	Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn		
[0626]	385	390	395
[0627]	Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp		400
[0628]	405	410	415
[0629]	Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His		
[0630]	420	425	430
[0631]	Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
[0632]	435	440	445
[0633]	<210> 36		
[0634]	<211> 220		
[0635]	<212> PRT		
[0636]	<213> 人工序列		
[0637]	<220>		
[0638]	<223> muFRIHC5-7全长轻链		
[0639]	<400> 36		
[0640]	Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile		
[0641]	1	5	10
[0642]	Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Glu Ser Leu Leu Asn		15
[0643]	20	25	30
[0644]	Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
[0645]	35	40	45
[0646]	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val		
[0647]	50	55	60
[0648]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
[0649]	65	70	75
[0650]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln		80
[0651]	85	90	95
[0652]	Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val		
[0653]	100	105	110
[0654]	Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser		
[0655]	115	120	125
[0656]	Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn		
[0657]	130	135	140
[0658]	Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu		
[0659]	145	150	155
[0660]	Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp		160
[0661]	165	170	175
[0662]	Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr		

[0663]	180	185	190
[0664]	Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr		
[0665]	195	200	205
[0666]	Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
[0667]	210	215	220
[0668]	<210> 37		
[0669]	<211> 446		
[0670]	<212> PRT		
[0671]	<213> 人工序列		
[0672]	<220>		
[0673]	<223> muFRIHC9-20全长重链		
[0674]	<400> 37		
[0675]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0676]	1 5 10 15		
[0677]	Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr		
[0678]	20 25 30		
[0679]	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0680]	35 40 45		
[0681]	Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Val Asn Val Arg Tyr Asn Asp Lys Phe		
[0682]	50 55 60		
[0683]	Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0684]	65 70 75 80		
[0685]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0686]	85 90 95		
[0687]	Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp		
[0688]	100 105 110		
[0689]	Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro		
[0690]	115 120 125		
[0691]	Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met		
[0692]	130 135 140		
[0693]	Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[0694]	145 150 155 160		
[0695]	Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[0696]	165 170 175		
[0697]	Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val		
[0698]	180 185 190		
[0699]	Pro Ser Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His		
[0700]	195 200 205		
[0701]	Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys		

[0702]	210	215	220
[0703]	Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe		
[0704]	225	230	235 240
[0705]	Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro		
[0706]	245	250	255
[0707]	Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val		
[0708]	260	265	270
[0709]	Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr		
[0710]	275	280	285
[0711]	Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu		
[0712]	290	295	300
[0713]	Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys		
[0714]	305	310	315 320
[0715]	Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
[0716]	325	330	335
[0717]	Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro		
[0718]	340	345	350
[0719]	Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile		
[0720]	355	360	365
[0721]	Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly		
[0722]	370	375	380
[0723]	Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn		
[0724]	385	390	395 400
[0725]	Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp		
[0726]	405	410	415
[0727]	Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His		
[0728]	420	425	430
[0729]	Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
[0730]	435	440	445
[0731]	<210> 38		
[0732]	<211> 220		
[0733]	<212> PRT		
[0734]	<213> 人工序列		
[0735]	<220>		
[0736]	<223> muFRIHC9-20全长轻链		
[0737]	<400> 38		
[0738]	Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu		
[0739]	1	5	10 15
[0740]	Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn		

[0741]	20	25	30
[0742]	Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
[0743]	35	40	45
[0744]	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val		
[0745]	50	55	60
[0746]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
[0747]	65	70	75
[0748]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln		
[0749]	85	90	95
[0750]	Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
[0751]	100	105	110
[0752]	Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser		
[0753]	115	120	125
[0754]	Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn		
[0755]	130	135	140
[0756]	Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu		
[0757]	145	150	155
[0758]	Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp		
[0759]	165	170	175
[0760]	Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr		
[0761]	180	185	190
[0762]	Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr		
[0763]	195	200	205
[0764]	Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
[0765]	210	215	220
[0766]	<210> 39		
[0767]	<211> 366		
[0768]	<212> DNA		
[0769]	<213> 人工序列		
[0770]	<220>		
[0771]	<223> muFRIHC2-1 VH链		
[0772]	<400> 39		
[0773]	caggtccaac tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaggata 60		
[0774]	tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca aactcctata ttactgggt gaaaaagagg 120		
[0775]	cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg aaagtcttaa tactcaatac 180		
[0776]	aatgagaagt tcaaggccaa ggccacactg actgctgaca agtcctccag cacatcctac 240		
[0777]	atgcagctca gcagtctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaggggt 300		
[0778]	atttattact actctcccta tgctctggac cactggggtc aaggagcctc agtcaccgtc 360		
[0779]	tcctca 366		

[0780]	<210> 40
[0781]	<211> 342
[0782]	<212> DNA
[0783]	<213> 人工序列
[0784]	<220>
[0785]	<223> muFRIHC2-1 VL链
[0786]	<400> 40
[0787]	agtgatgttg ttctgaccca aactccactc tctctgcctg tcaatattgg agatcaagcc 60
[0788]	tctatctctt gcaagtcttc taagagtctt ctgaatagtg atggattcac ttatttggac 120
[0789]	tggtacctgc agaagccagg ccagtctcca cagctcctaa tatatttggg ttctaatacat 180
[0790]	ttttctggag ttccagacag gttcagtggc agtgggtcag gaacagattt cacactcaag 240
[0791]	atcagcagag tggaggctga ggatttggga gtttattatt gcttccagag taactatctt 300
[0792]	cctctcacgt teggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gg 342
[0793]	<210> 41
[0794]	<211> 366
[0795]	<212> DNA
[0796]	<213> 人工序列
[0797]	<220>
[0798]	<223> muFRIHC5-7 VH链
[0799]	<400> 41
[0800]	caggtccaac tgcagcagtc tggacctgag gtggtgaagc ctggggcttc agtgaggata 60
[0801]	tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg 120
[0802]	cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg gaagttttaa tgttgagtac 180
[0803]	aatgagaagt tcaaggccaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagtctac 240
[0804]	atgcaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaggggt 300
[0805]	atttatttct actctcccta tgctttggac tactggggtc aaggagcctc agtcaccgtc 360
[0806]	tcctca 366
[0807]	<210> 42
[0808]	<211> 342
[0809]	<212> DNA
[0810]	<213> 人工序列
[0811]	<220>
[0812]	<223> muFRIHC5-7 VL链
[0813]	<400> 42
[0814]	agtgatgttg ttctgaccca aactccactc tctctgcctg tcaatattgg agatcaagcc 60
[0815]	tctatctctt gcaagtctac tgagagtctt ctgaatagtg atggattcac ttatttggac 120
[0816]	tggtacctgc agaagccagg ccagtctcca cagctcctaa tatatttggg ttctaatacat 180
[0817]	ttttctggag ttccagacag gttcagtggc agtgggtcag gaacagattt cacactcaag 240
[0818]	atcagcagag tggaggctga ggatttggga gtttattatt gcttccagag taactatctt 300

[0819]	cctctcacgt tcggaggggg gaccaagctg gaagtaaac gg 342
[0820]	<210> 43
[0821]	<211> 366
[0822]	<212> DNA
[0823]	<213> 人工序列
[0824]	<220>
[0825]	<223> muFRIHC9-20 VH链
[0826]	<400> 43
[0827]	caggtccaac tgcagcagtc tggacctgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaggata 60
[0828]	tcctgcaagg cttctggctt caccttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg 120
[0829]	cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg aaaatgttaa tgtaggtac 180
[0830]	aatgacaagt tcaaggccaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
[0831]	atgcagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaggggt 300
[0832]	atttattact actctcccta tgctatggac tactggggtc aaggagcctc agtcaccgtc 360
[0833]	tcctca 366
[0834]	<210> 44
[0835]	<211> 342
[0836]	<212> DNA
[0837]	<213> 人工序列
[0838]	<220>
[0839]	<223> muFRIHC9-20 VL链
[0840]	<400> 44
[0841]	agtgatgttg ttctgacca aactccactc tctctgcctg tcaatcttgg agatcaagcc 60
[0842]	tctatctctt gcaagtctac taagagtctt ctgaatagtg atggattcac ttatttggac 120
[0843]	tggtacctgc agaagccagg ccagtctcca cagctcctaa tatatttgggt ttctaatacat 180
[0844]	ttttctggag ttccagacag gttcagtggc agtgggtcag gaacagattt caccctcaag 240
[0845]	atcagcagag tggaggctga ggatttggga gtttattatt gcttcagag taactatctt 300
[0846]	cctctcacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaac gg 342
[0847]	<210> 45
[0848]	<211> 118
[0849]	<212> PRT
[0850]	<213> 人工序列
[0851]	<220>
[0852]	<223> huMov19 vHC
[0853]	<400> 45
[0854]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
[0855]	1 5 10 15
[0856]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
[0857]	20 25 30

[0858]	Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
[0859]	35 40 45
[0860]	Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
[0861]	50 55 60
[0862]	Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
[0863]	65 70 75 80
[0864]	Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
[0865]	85 90 95
[0866]	Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0867]	100 105 110
[0868]	Thr Val Thr Val Ser Ser
[0869]	115
[0870]	<210> 46
[0871]	<211> 112
[0872]	<212> PRT
[0873]	<213> 人工序列
[0874]	<220>
[0875]	<223> huMov19 vLCv1.00
[0876]	<400> 46
[0877]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0878]	1 5 10 15
[0879]	Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
[0880]	20 25 30
[0881]	Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
[0882]	35 40 45
[0883]	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
[0884]	50 55 60
[0885]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
[0886]	65 70 75 80
[0887]	Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
[0888]	85 90 95
[0889]	Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[0890]	100 105 110
[0891]	<210> 47
[0892]	<211> 112
[0893]	<212> PRT
[0894]	<213> 人工序列
[0895]	<220>
[0896]	<223> huMov19 vLCv1.60



[0897]	<400> 47
[0898]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0899]	1 5 10 15
[0900]	Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
[0901]	20 25 30
[0902]	Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
[0903]	35 40 45
[0904]	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
[0905]	50 55 60
[0906]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0907]	65 70 75 80
[0908]	Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
[0909]	85 90 95
[0910]	Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[0911]	100 105 110
[0912]	<210> 48
[0913]	<211> 15
[0914]	<212> PRT
[0915]	<213> 人工序列
[0916]	<220>
[0917]	<223> huMov19 vLC CDR1
[0918]	<400> 48
[0919]	Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
[0920]	1 5 10 15
[0921]	<210> 49
[0922]	<211> 7
[0923]	<212> PRT
[0924]	<213> 人工序列
[0925]	<220>
[0926]	<223> huMov19 vLC CDR2
[0927]	<400> 49
[0928]	Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
[0929]	1 5
[0930]	<210> 50
[0931]	<211> 9
[0932]	<212> PRT
[0933]	<213> 人工序列
[0934]	<220>
[0935]	<223> huMov19 vLC CDR3

[0936] <400> 50  
 [0937] Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr  
 [0938] 1 5  
 [0939] <210> 51  
 [0940] <211> 5  
 [0941] <212> PRT  
 [0942] <213> 人工序列  
 [0943] <220>  
 [0944] <223> huMov19 vHC CDR1  
 [0945] <400> 51  
 [0946] Gly Tyr Phe Met Asn  
 [0947] 1 5  
 [0948] <210> 52  
 [0949] <211> 17  
 [0950] <212> PRT  
 [0951] <213> 人工序列  
 [0952] <220>  
 [0953] <223> huMov19 vHC CDR2 - Kabat定义的  
 [0954] <400> 52  
 [0955] Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln  
 [0956] 1 5 10 15  
 [0957] Gly  
 [0958] <210> 53  
 [0959] <211> 10  
 [0960] <212> PRT  
 [0961] <213> 人工序列  
 [0962] <220>  
 [0963] <223> huMov19 vHC CDR2 - Abm定义的  
 [0964] <400> 53  
 [0965] Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe  
 [0966] 1 5 10  
 [0967] <210> 54  
 [0968] <211> 9  
 [0969] <212> PRT  
 [0970] <213> 人工序列  
 [0971] <220>  
 [0972] <223> huMov19 vHC CDR3  
 [0973] <400> 54  
 [0974] Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

[0975]	1															5
[0976]	<210> 55															
[0977]	<211> 448															
[0978]	<212> PRT															
[0979]	<213> 人工序列															
[0980]	<220>															
[0981]	<223> huMov19 HC氨基酸序列															
[0982]	<400> 55															
[0983]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
[0984]	1					5					10					15
[0985]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
[0986]					20					25					30	
[0987]	Phe	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
[0988]					35					40					45	
[0989]	Gly	Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[0990]					50					55					60	
[0991]	Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	His
[0992]	65					70					75					80
[0993]	Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0994]					85					90					95	
[0995]	Thr	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[0996]					100					105					110	
[0997]	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
[0998]					115					120					125	
[0999]	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
[1000]					130					135					140	
[1001]	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
[1002]	145					150					155					160
[1003]	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
[1004]					165					170					175	
[1005]	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
[1006]					180					185					190	
[1007]	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
[1008]					195					200					205	
[1009]	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
[1010]					210					215					220	
[1011]	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
[1012]	225					230					235					240
[1013]	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg

[1014]		245		250		255
[1015]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro					
[1016]		260		265		270
[1017]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala					
[1018]		275		280		285
[1019]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val					
[1020]		290		295		300
[1021]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr					
[1022]	305		310		315	320
[1023]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr					
[1024]		325		330		335
[1025]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu					
[1026]		340		345		350
[1027]	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys					
[1028]		355		360		365
[1029]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser					
[1030]		370		375		380
[1031]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp					
[1032]	385		390		395	400
[1033]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser					
[1034]		405		410		415
[1035]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala					
[1036]		420		425		430
[1037]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
[1038]		435		440		445
[1039]	<210> 56					
[1040]	<211> 218					
[1041]	<212> PRT					
[1042]	<213> 人工序列					
[1043]	<220>					
[1044]	<223> huMov19 LCv1.00					
[1045]	<400> 56					
[1046]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly					
[1047]	1	5		10		15
[1048]	Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala					
[1049]		20		25		30
[1050]	Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro					
[1051]		35		40		45
[1052]	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp					

[1053]	50	55	60
[1054]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser		
[1055]	65	70	75
[1056]	Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg		
[1057]	85	90	95
[1058]	Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
[1059]	100	105	110
[1060]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
[1061]	115	120	125
[1062]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
[1063]	130	135	140
[1064]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
[1065]	145	150	155
[1066]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
[1067]	165	170	175
[1068]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
[1069]	180	185	190
[1070]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
[1071]	195	200	205
[1072]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[1073]	210	215	
[1074]	<210> 57		
[1075]	<211> 218		
[1076]	<212> PRT		
[1077]	<213> 人工序列		
[1078]	<220>		
[1079]	<223> huMov19 LCv1.60		
[1080]	<400> 57		
[1081]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[1082]	1	5	10
[1083]	Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala		
[1084]	20	25	30
[1085]	Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro		
[1086]	35	40	45
[1087]	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp		
[1088]	50	55	60
[1089]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[1090]	65	70	75
[1091]	Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg		



[1131]	<213>	人工序列
[1132]	<220>	
[1133]	<223>	FRIHC2-1表面重构的重链CDR2
[1134]	<400>	60
[1135]	Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln	
[1136]	1	5 10
[1137]	<210>	61
[1138]	<211>	17
[1139]	<212>	PRT
[1140]	<213>	人工序列
[1141]	<220>	
[1142]	<223>	FRIHC2-1表面重构的HC CDR2
[1143]	<400>	61
[1144]	Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Gln Lys Phe Gln	
[1145]	1	5 10 15
[1146]	Gly	
[1147]	<210>	62
[1148]	<211>	122
[1149]	<212>	PRT
[1150]	<213>	人工序列
[1151]	<220>	
[1152]	<223>	huFRIHC2-1 (表面重构的) VH链
[1153]	<400>	62
[1154]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	
[1155]	1	5 10 15
[1156]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser	
[1157]	20	25 30
[1158]	Tyr Ile His Trp Val Lys Lys Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[1159]	35	40 45
[1160]	Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Gln Lys Phe	
[1161]	50	55 60
[1162]	Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr	
[1163]	65	70 75 80
[1164]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
[1165]	85	90 95
[1166]	Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp	
[1167]	100	105 110
[1168]	Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser	
[1169]	115	120



[1170]	<210>	63
[1171]	<211>	113
[1172]	<212>	PRT
[1173]	<213>	人工序列
[1174]	<220>	
[1175]	<223>	huFRIHC2-1 v. 1.0 (表面重构的) VL链
[1176]	<400>	63
[1177]	Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly	
[1178]	1 5 10 15	
[1179]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser	
[1180]	20 25 30	
[1181]	Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[1182]	35 40 45	
[1183]	Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val Pro	
[1184]	50 55 60	
[1185]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1186]	65 70 75 80	
[1187]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser	
[1188]	85 90 95	
[1189]	Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[1190]	100 105 110	
[1191]	Arg	
[1192]	<210>	64
[1193]	<211>	113
[1194]	<212>	PRT
[1195]	<213>	人工序列
[1196]	<220>	
[1197]	<223>	huFRIHC2-1 v. 1.01 (表面重构的) VL链
[1198]	<400>	64
[1199]	Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly	
[1200]	1 5 10 15	
[1201]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser	
[1202]	20 25 30	
[1203]	Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[1204]	35 40 45	
[1205]	Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val Pro	
[1206]	50 55 60	
[1207]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1208]	65 70 75 80	

[1209]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
[1210]	85 90 95
[1211]	Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1212]	100 105 110
[1213]	Arg
[1214]	<210> 65
[1215]	<211> 125
[1216]	<212> PRT
[1217]	<213> 人工序列
[1218]	<220>
[1219]	<223> huFRIHC2-1 (接枝的) VH链
[1220]	<400> 65
[1221]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1222]	1 5 10 15
[1223]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser
[1224]	20 25 30
[1225]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1226]	35 40 45
[1227]	Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
[1228]	50 55 60
[1229]	Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[1230]	65 70 75 80
[1231]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1232]	85 90 95
[1233]	Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp
[1234]	100 105 110
[1235]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
[1236]	115 120 125
[1237]	<210> 66
[1238]	<211> 112
[1239]	<212> PRT
[1240]	<213> 人工序列
[1241]	<220>
[1242]	<223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (接枝的) VL链
[1243]	<400> 66
[1244]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[1245]	1 5 10 15
[1246]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser
[1247]	20 25 30

[1248]	Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1249]	35 40 45
[1250]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val Pro
[1251]	50 55 60
[1252]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1253]	65 70 75 80
[1254]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
[1255]	85 90 95
[1256]	Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1257]	100 105 110
[1258]	<210> 67
[1259]	<211> 112
[1260]	<212> PRT
[1261]	<213> 人工序列
[1262]	<220>
[1263]	<223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (接枝的) VL链
[1264]	<400> 67
[1265]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[1266]	1 5 10 15
[1267]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
[1268]	20 25 30
[1269]	Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1270]	35 40 45
[1271]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val Pro
[1272]	50 55 60
[1273]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1274]	65 70 75 80
[1275]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
[1276]	85 90 95
[1277]	Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1278]	100 105 110
[1279]	<210> 68
[1280]	<211> 442
[1281]	<212> PRT
[1282]	<213> 人工序列
[1283]	<220>
[1284]	<223> muhuMov19全长重链
[1285]	<400> 68
[1286]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

[1287]	1	5	10	15
[1288]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
[1289]	20	25	30	
[1290]	Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile			
[1291]	35	40	45	
[1292]	Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe			
[1293]	50	55	60	
[1294]	Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His			
[1295]	65	70	75	80
[1296]	Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1297]	85	90	95	
[1298]	Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
[1299]	100	105	110	
[1300]	Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro			
[1301]	115	120	125	
[1302]	Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly			
[1303]	130	135	140	
[1304]	Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn			
[1305]	145	150	155	160
[1306]	Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu			
[1307]	165	170	175	
[1308]	Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Met			
[1309]	180	185	190	
[1310]	Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser			
[1311]	195	200	205	
[1312]	Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro			
[1313]	210	215	220	
[1314]	Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro			
[1315]	225	230	235	240
[1316]	Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys			
[1317]	245	250	255	
[1318]	Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp			
[1319]	260	265	270	
[1320]	Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu			
[1321]	275	280	285	
[1322]	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met			
[1323]	290	295	300	
[1324]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser			
[1325]	305	310	315	320

[1326]	Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
[1327]	325 330 335
[1328]	Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
[1329]	340 345 350
[1330]	Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
[1331]	355 360 365
[1332]	Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
[1333]	370 375 380
[1334]	Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe
[1335]	385 390 395 400
[1336]	Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
[1337]	405 410 415
[1338]	Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
[1339]	420 425 430
[1340]	Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
[1341]	435 440
[1342]	<210> 69
[1343]	<211> 218
[1344]	<212> PRT
[1345]	<213> 人工序列
[1346]	<220>
[1347]	<223> muhuMov19全长轻链
[1348]	<400> 69
[1349]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[1350]	1 5 10 15
[1351]	Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
[1352]	20 25 30
[1353]	Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
[1354]	35 40 45
[1355]	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
[1356]	50 55 60
[1357]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1358]	65 70 75 80
[1359]	Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
[1360]	85 90 95
[1361]	Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[1362]	100 105 110
[1363]	Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
[1364]	115 120 125

[1365]	Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
[1366]	130 135 140
[1367]	Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
[1368]	145 150 155 160
[1369]	Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[1370]	165 170 175
[1371]	Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
[1372]	180 185 190
[1373]	His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
[1374]	195 200 205
[1375]	Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
[1376]	210 215
[1377]	<210> 70
[1378]	<211> 452
[1379]	<212> DNA
[1380]	<213> 人工序列
[1381]	<220>
[1382]	<223> huFRIHC2-1 (表面重构的) VH链
[1383]	<400> 70
[1384]	aagcttgcca ccatgggttg gagctgcatt atccttttcc ttgtggctac agctactggc 60
[1385]	gttcactctc aggtacaatt ggttcagtca ggagccgagg tcgtaaagcc cggtgccagt 120
[1386]	gtgaagatct catgcaaggc aagcggttat actttttacaa actctttacat tcattgggtg 180
[1387]	aaaaagcggc cgggccaggg tctcgaatgg atcggttgga tctaccaga aagtctgaac 240
[1388]	actcaatata accagaagtt tcagggtaag gcaactctca ctgccgacaa gagctctagc 300
[1389]	acaagctata tgcagttgtc tagtttgaca agcgaggata gcgcagttta cttttgtgct 360
[1390]	cggcgtggta tttattacta ctcaccttat gctctggatc actggggaca gggtgcctct 420
[1391]	gttaccgttt ccagtgcac caccaagggc cc 452
[1392]	<210> 71
[1393]	<211> 452
[1394]	<212> DNA
[1395]	<213> 人工序列
[1396]	<220>
[1397]	<223> huFRIHC2-1 (接枝的) VH链
[1398]	<400> 71
[1399]	aagcttgcca ccatgggctg gagctgcata atcctcttcc tcgtagctac cgccactggg 60
[1400]	gtgcattctc aagtacagtt ggtgcagtc ggagctgaag tcaagaagcc aggggcttct 120
[1401]	gttaaggtga gctgtaaggc ttccggatat accttcacaa acagttatat ccattgggtg 180
[1402]	aggcaagctc caggccaggg tctcgaatgg atgggatgga tctacccga gagtctgaac 240
[1403]	accagttaca acgagaagtt caaggcacgt gtgaccatga caagagacac ctccatcagt 300

- [1404] acagcctata tggaattgag ccgtctcaga agtgatgata cagcagtgtg ctactgcgcc 360
- [1405] aggcggggca tctactacta cagcccatac gctctcgacc actggggaca aggaacactg 420
- [1406] gtaaccgtaa gctcagcttc tacaaagggc cc 452
- [1407] <210> 72
- [1408] <211> 411
- [1409] <212> DNA
- [1410] <213> 人工序列
- [1411] <220>
- [1412] <223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (表面重构的) VL链
- [1413] <400> 72
- [1414] gaattcgcca ccatgggttg gtcattgtata atacttttcc tggtagctac tgctactggt 60
- [1415] gtgcattcag atgtggtgct gactcagtca cccttgtctc tcccagtcaa tcttgggcag 120
- [1416] ccagcatcta tcagctgccg aagcagcagg tctctcctga actccgatgg ctttacttat 180
- [1417] cttgactggt atctccagaa gccaggacag tccccccggc tgctcatcta cctggtttct 240
- [1418] aatcatttta gtggcgctcc tgaccgcttc tctgggagtg gaagtgggac cgattttaca 300
- [1419] ctgaagatct ccagggtcga agctgaggac cttgggggtt actactgttt ccagagcaac 360
- [1420] taccttcctt tgacattcgg ccagggaacc aagctggaaa tcaagcgtac g 411
- [1421] <210> 73
- [1422] <211> 411
- [1423] <212> DNA
- [1424] <213> 人工序列
- [1425] <220>
- [1426] <223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (表面重构的) VL链
- [1427] <400> 73
- [1428] gaattcgcca ccatgggttg gtcttgtatc attctgttcc tggtcgccac tgccacagga 60
- [1429] gttcactcag acgtggtact cacacaatct cccctttccc tgccgttgaa cctgggacag 120
- [1430] ccagcctcaa tcagttgcaa gagctctaaa tctctgctca atagcgatgg ctttacctac 180
- [1431] ttggattggt acctccagaa gcccgccag tctcctcggc tctgattta ccttgtttca 240
- [1432] aatcactttt caggcgctgc tgaccggctc tccgatctg gctcagggac agacttcacc 300
- [1433] ctgaagatct cccgcgtcga ggcagaggat ctcgcgctgt attactgttt ccaaagtaac 360
- [1434] tacctgccat tgacttttgg acaaggaact aaactggaaa tcaaacgtac g 411
- [1435] <210> 74
- [1436] <211> 411
- [1437] <212> DNA
- [1438] <213> 人工序列
- [1439] <220>
- [1440] <223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (接枝的) VL链
- [1441] <400> 74
- [1442] gaattcgcca ccatgggatg gagttgtatt attctgttct tggtcgctac tgcaacaggc 60

[1443] gttcattctg acatcgtaat gacccagaca cctctgagtc tgagtgtcac tcccggccag 120  
 [1444] cccgcctcta tttcatgtcg tagctctcgc tccctgctca attccgacgg ttttacctac 180  
 [1445] ttggactggg atcttcagaa acctgggcag agccctcagc ttctgatcta tctgggtgtcc 240  
 [1446] aatcacttca gtggcgtccc agaccgattt tccggaagcg gaagcggaac cgactttacc 300  
 [1447] ctgaagatat cccgcgtcga agcagaggac gtgggcgtgt attattgctt tcaaagcaat 360  
 [1448] tacttgccat tgactttcgg acaaggcaca aaactggaga ttaagcgtac g 411  
 [1449] <210> 75  
 [1450] <211> 411  
 [1451] <212> DNA  
 [1452] <213> 人工序列  
 [1453] <220>  
 [1454] <223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (接枝的) VL链  
 [1455] <400> 75  
 [1456] gaattcgcca ccatgggctg gtcatgcac atactgttcc tgggtggctac agcaaccggg 60  
 [1457] gtgcacagcg atattgttat gacacagaca ccactgagtt tgtcagtgac ccccggccag 120  
 [1458] ccagcctcta tctctgcaa gtctcctga atagcgatgg ctttacctac 180  
 [1459] ctcgactggg atcttcagaa gcccggtcaa agccctcagc tgctgatata tctgggtgtct 240  
 [1460] aaccatttta gcggagtccc cgaccgcttt tcaggctccg gcagtggcac cgacttcacc 300  
 [1461] cttaagattt ctgcgtgga ggctgaagat gtaggggtct actactgttt ccagtcaaac 360  
 [1462] tacctgccac tgaccttgg tcaaggcact aagctcgaaa ttaagcgtac g 411



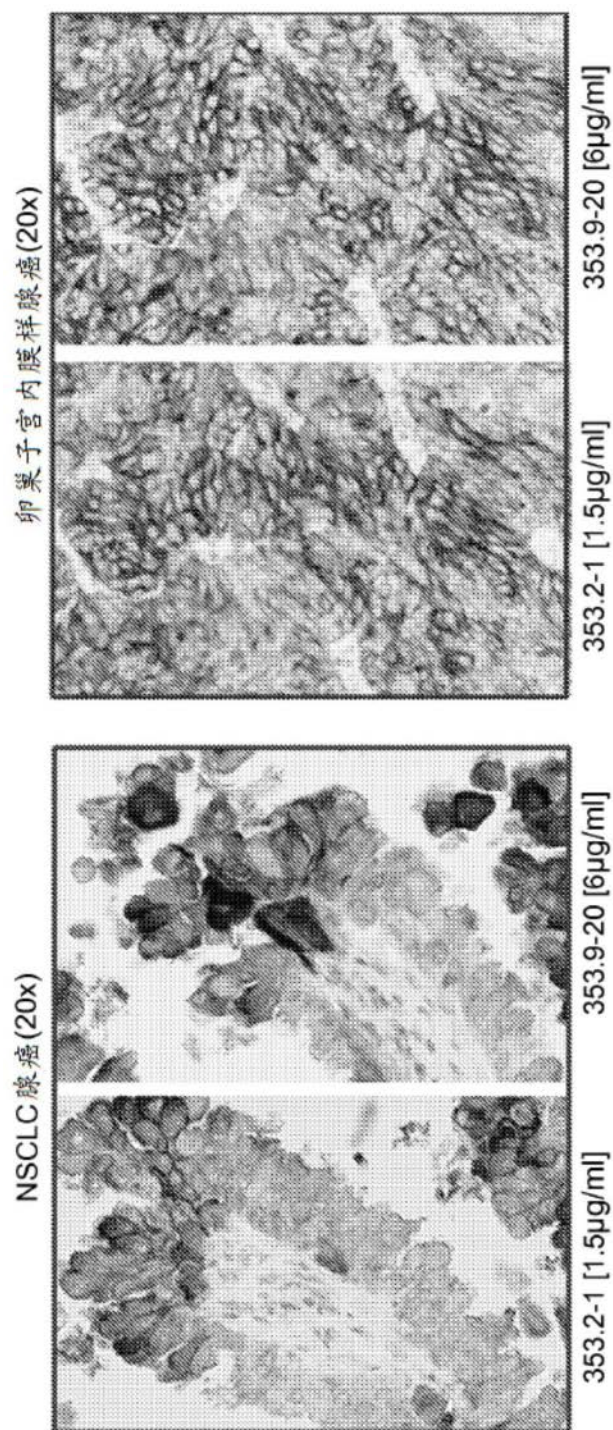


图1

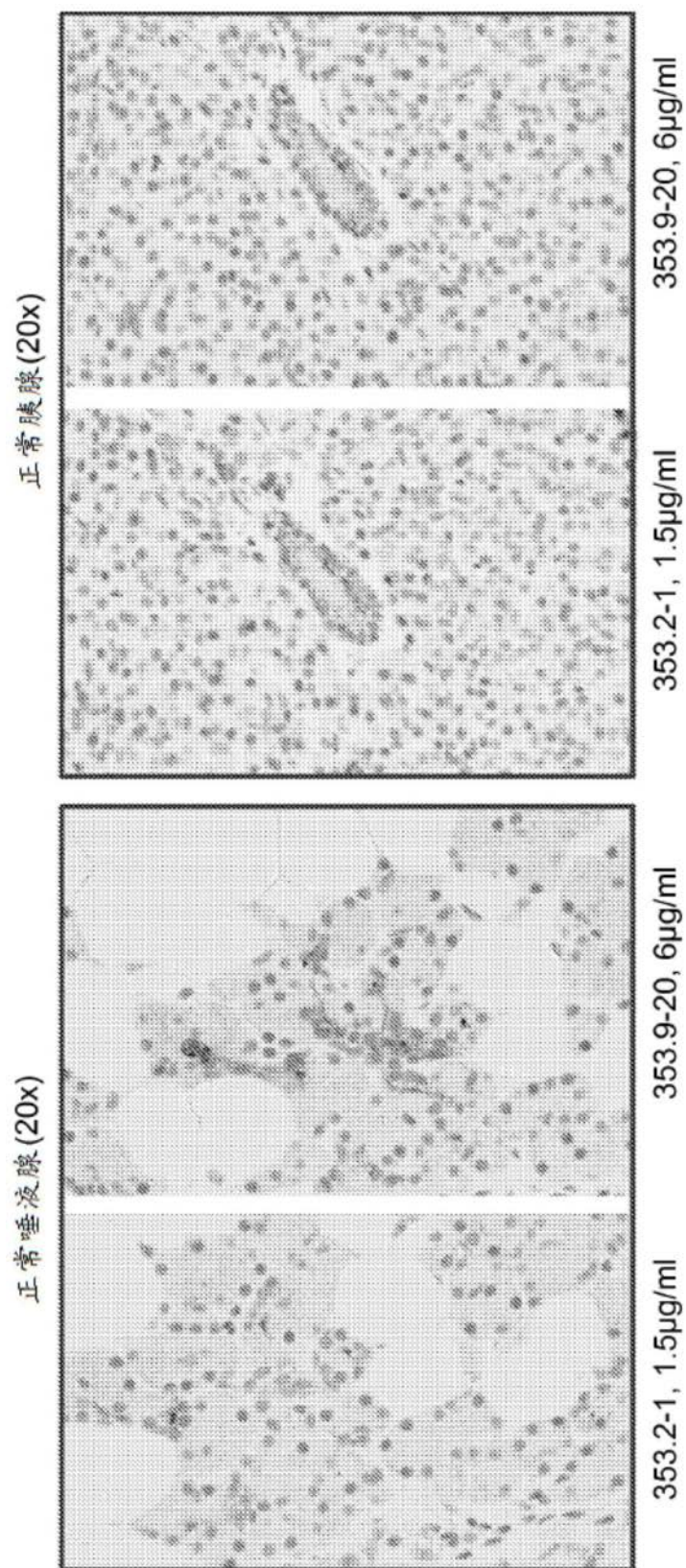


图2



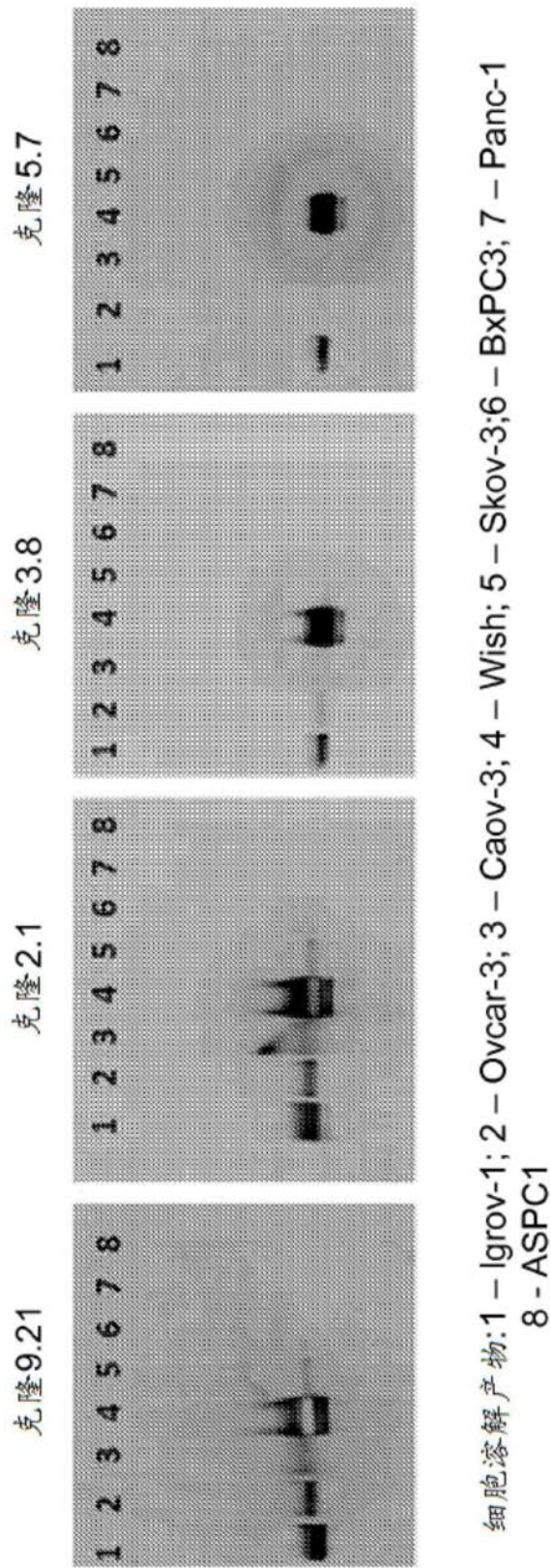


图3

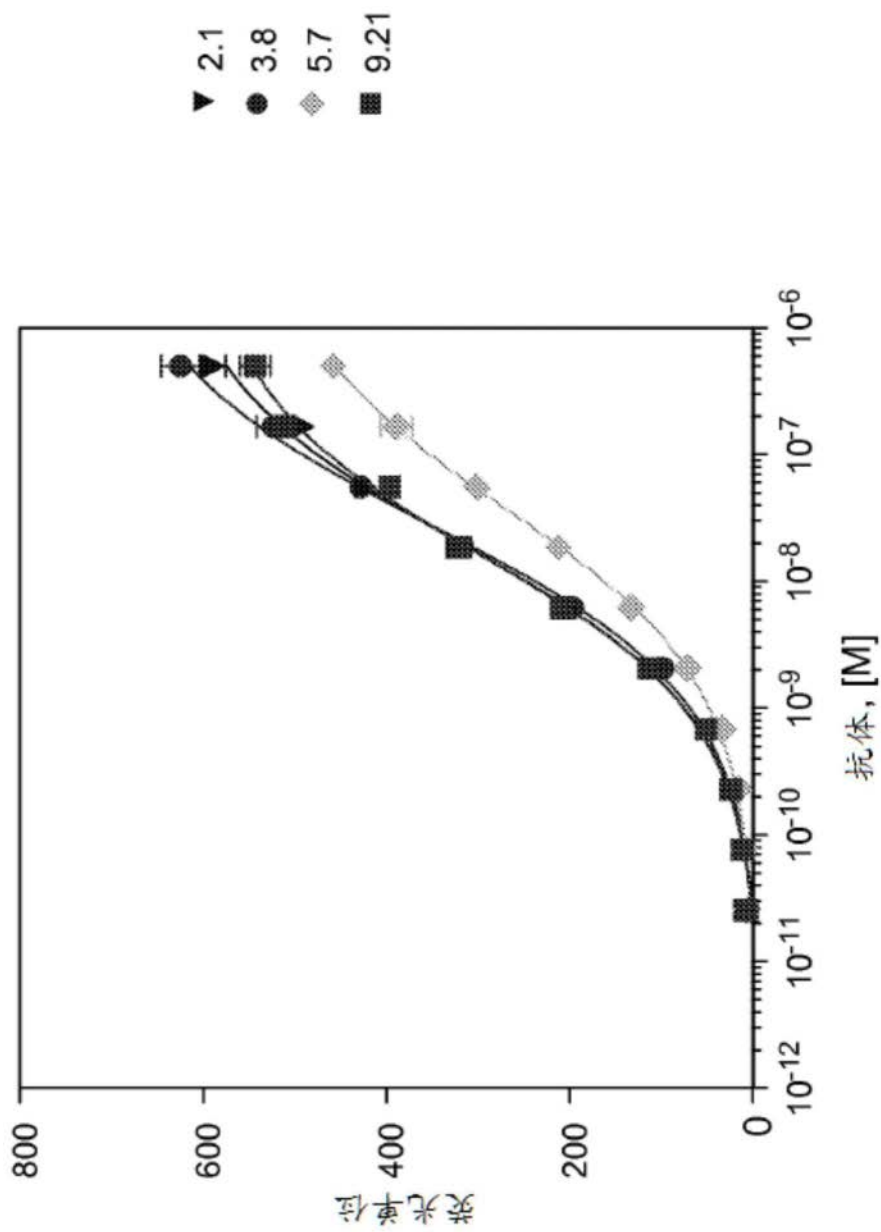


图4A

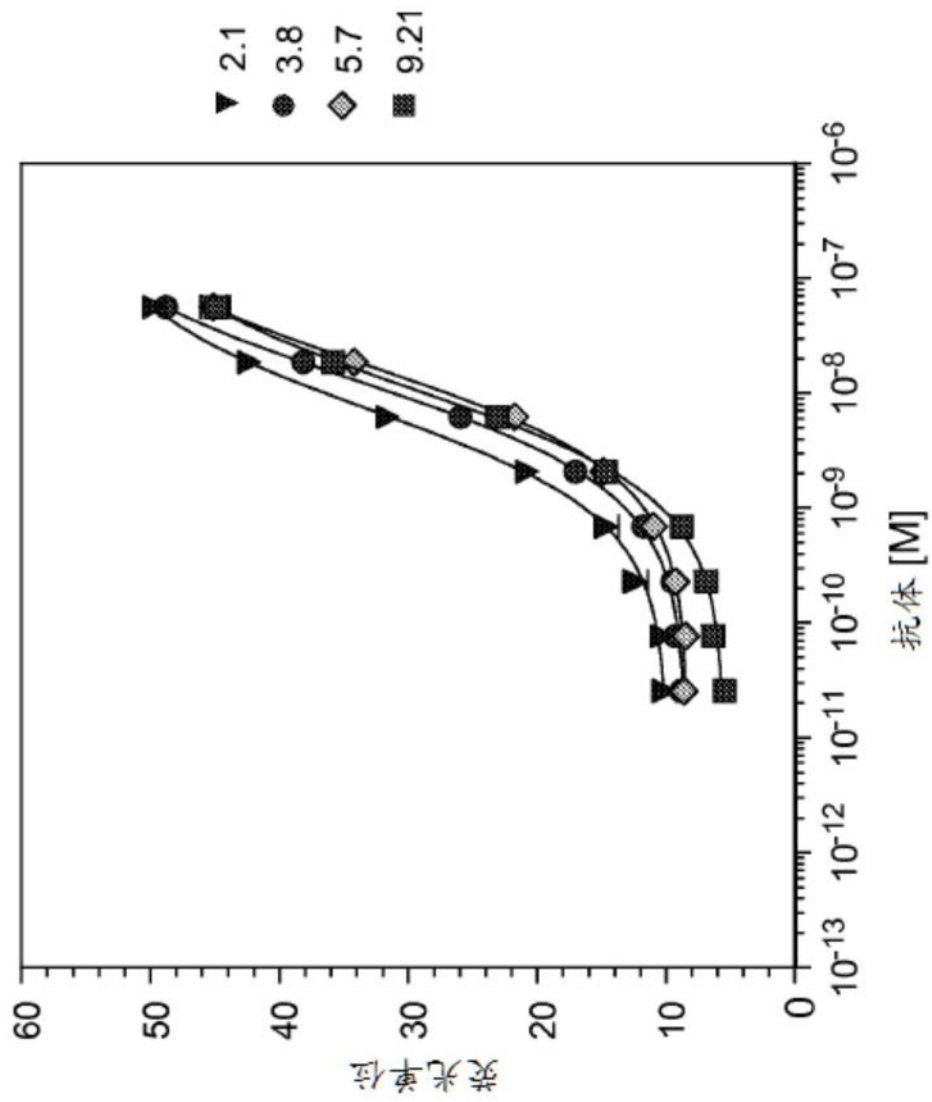
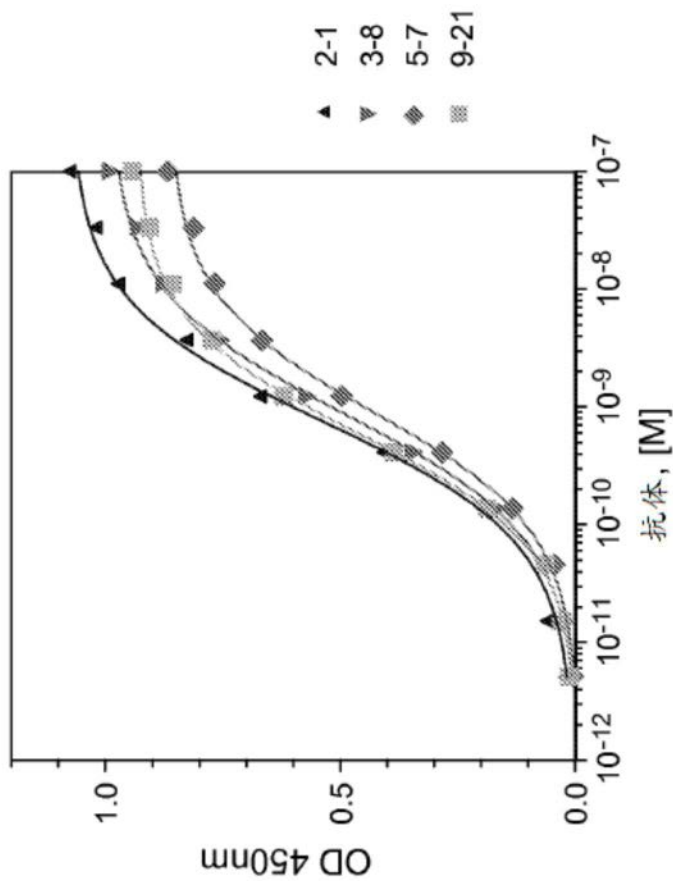


图4B



克隆	EC50, nM
2.1	0.5
3.8	0.7
5.7	0.9
9.21	0.7

图5

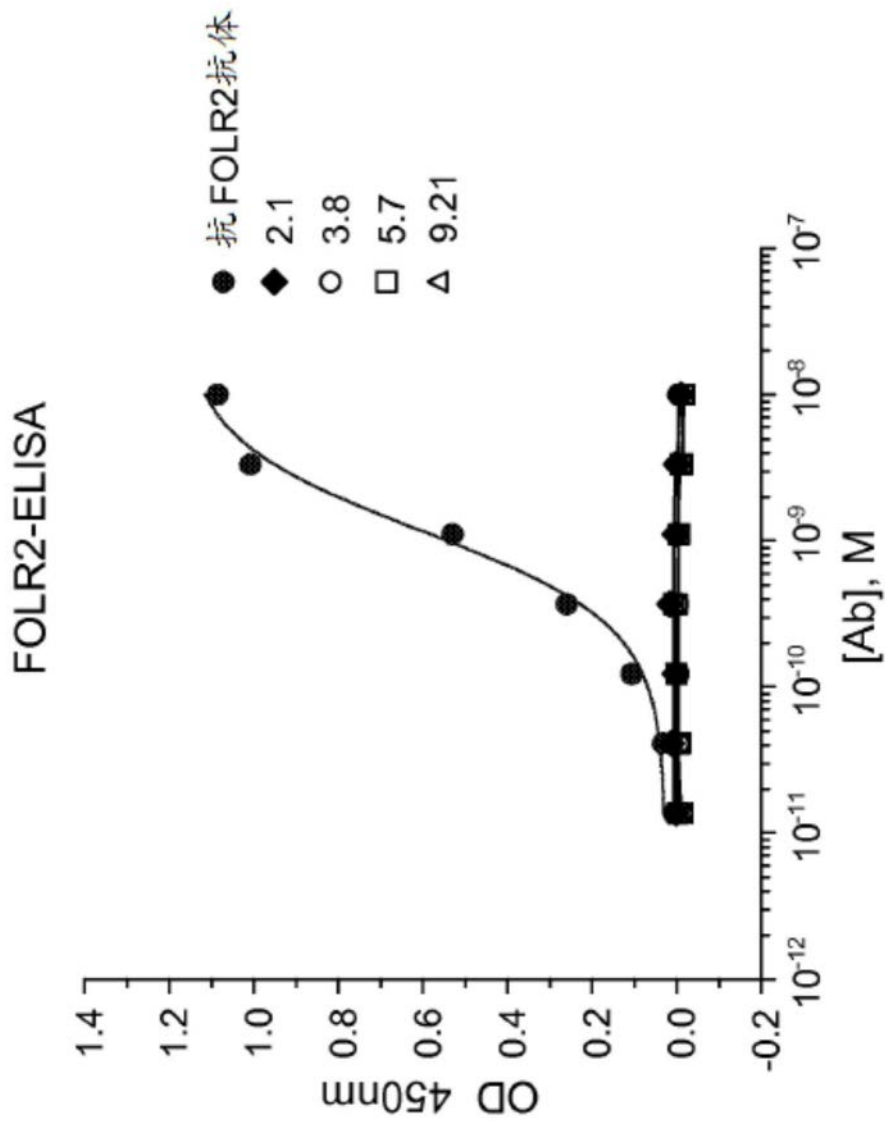


图6A

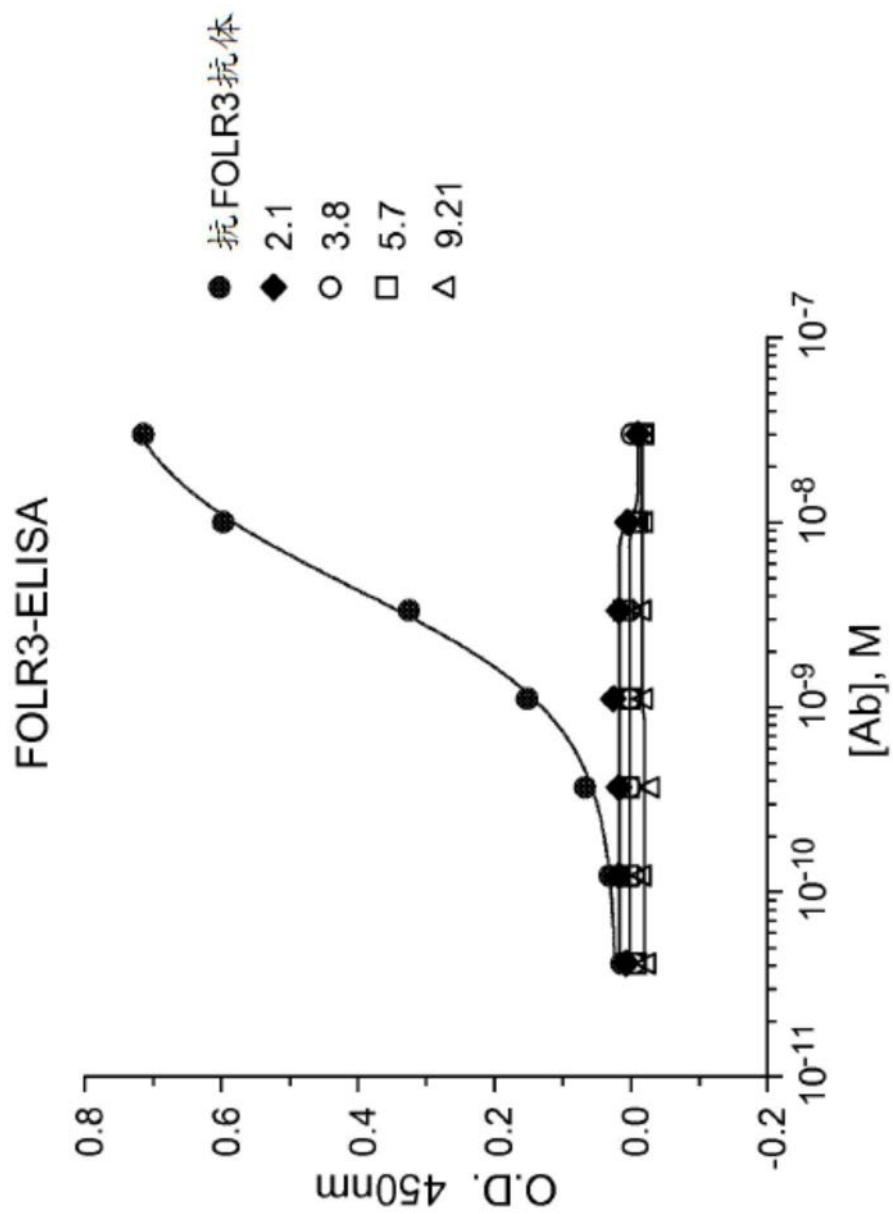
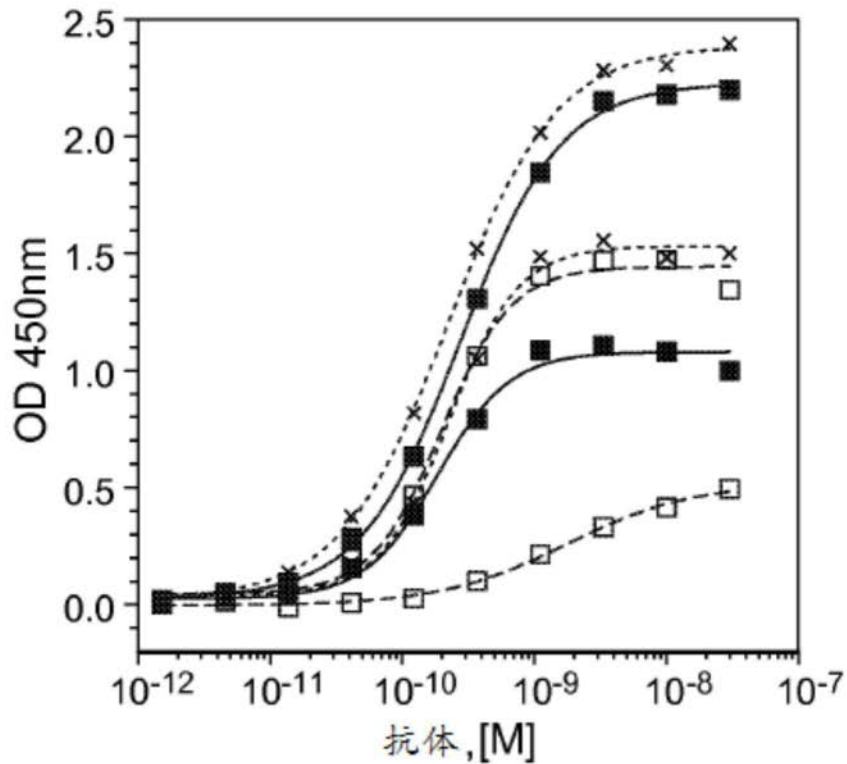


图6B





- huMov19, 结合至未处理的 FOLR1
- × huMov19, 结合至在去糖基化缓冲液中孵育的未处理的 FOLR1 (未添加去糖基化酶)
- huMov19, 结合至去糖基化缓冲液中的去糖基化的 FOLR1
- 2.1, 结合至未处理的 FOLR1
- × 2.1, 结合至在去糖基化缓冲液中孵育的未处理的 FOLR1 (未添加去糖基化酶)
- 2.1, 结合至去糖基化缓冲液中的去糖基化的 FOLR1

图7

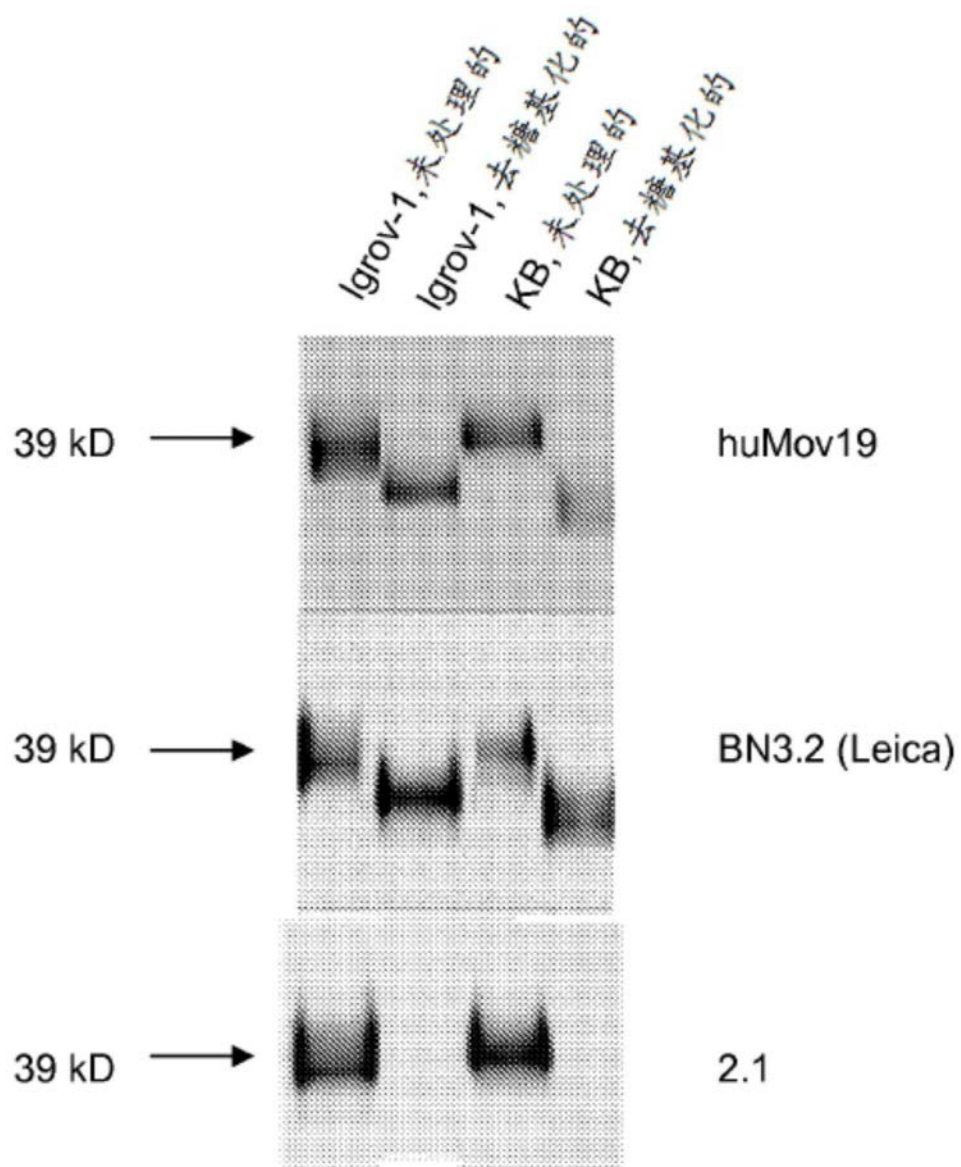


图8

FRIHC2-1的表面重构

A				B		
FRIHC2-1- V <sub>L</sub>				FRIHC2-1- V <sub>H</sub>		
Kabat 位置	鼠残基	人 v1.0 残基	人 v1.01 残基	Kabat 位置	鼠残基	人残基
1	D	D	D	1	Q	Q
3	V	V	V	3	Q	Q
7	T	<u>S</u>	<u>S</u>	5	Q	<u>V</u>
9	L	L	L	9	P	<u>A</u>
15	I	<u>L</u>	<u>L</u>	11	L	<u>V</u>
17	D	<u>Q</u>	<u>Q</u>	13	K	K
18	Q	<u>P</u>	<u>P</u>	14	P	P
40	P	P	P	19	R	<u>K</u>
41	G	G	G	23	K	K
42	K	K	K	28	T	T
45	Q	<u>R</u>	<u>R</u>	41	P	P
57	G	G	G	42	G	G
60	D	D	D	43	Q	Q
67	S	S	S	61	E	<u>Q</u>
77	R	R	R	62	K	K
81	E	E	E	64	K	<u>Q</u>
100	G	<u>Q</u>	<u>Q</u>	65	A	<u>G</u>
103	K	K	K	73	K	K
107	K	K	K	74	S	S
108	R	R	R	82b	S	S
24	K	<u>R</u>	K	84	S	S
27	K	<u>R</u>	K	85	E	E
				105	Q	Q
				112	S	S

图9

表面重构比对

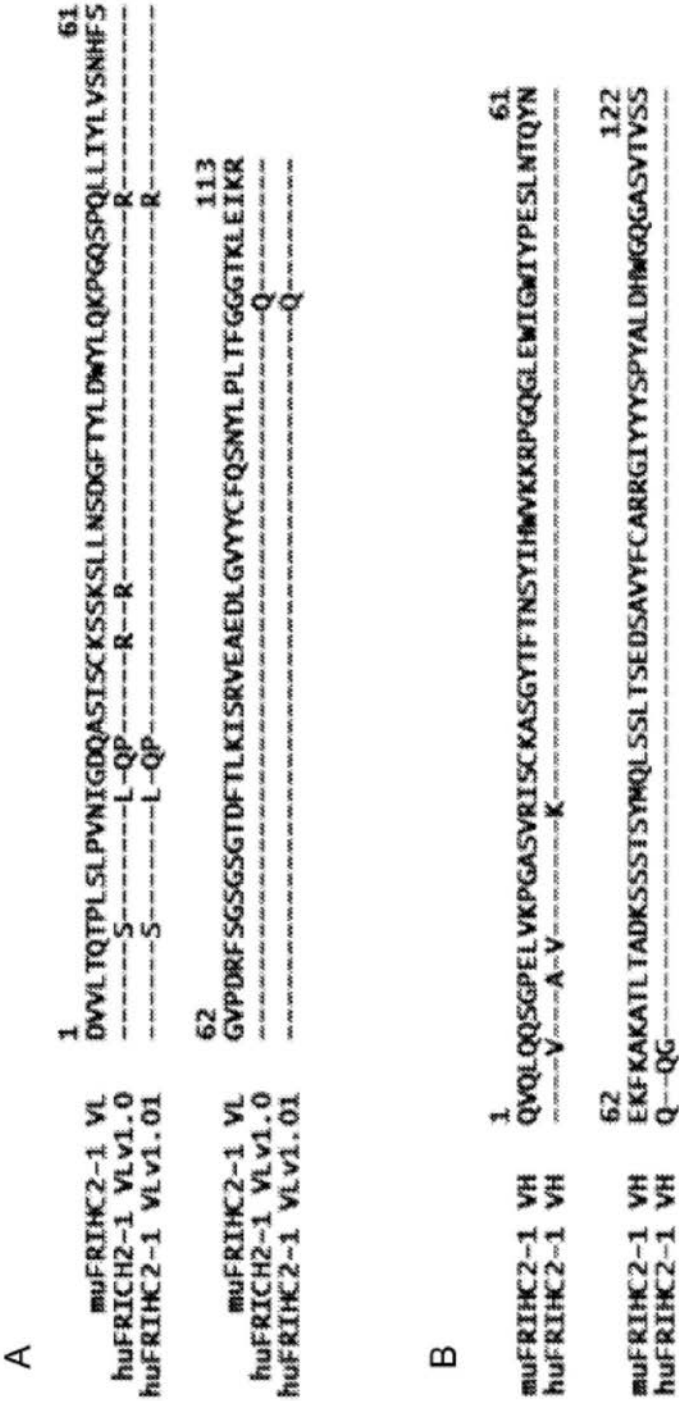


图10

## FRIHC2-1的 CDR 接枝

FRIHC2-1- V <sub>L</sub>			
Kabat 位置	鼠残基	人 (CDR- 接枝) v1.0 残基	人 (CDR- 接枝) v1.01 残基
2	V	I	I
4	L	M	M
12	P	S	S
14	N	T	T
15	I	P	P
17	D	Q	Q
18	Q	P	P
83	L	V	V
100	G	Q	Q
24	K	R	K
27	K	R	K

FRIHC2-1- V <sub>H</sub>		
Kabat 位置	鼠残基	人 (CDR- 接枝) 残基
5	Q	V
9	P	A
11	L	V
12	V	K
19	R	K
20	I	V
38	K	R
39	K	Q
40	R	A
48	I	M
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

图11

CDR 接枝比对

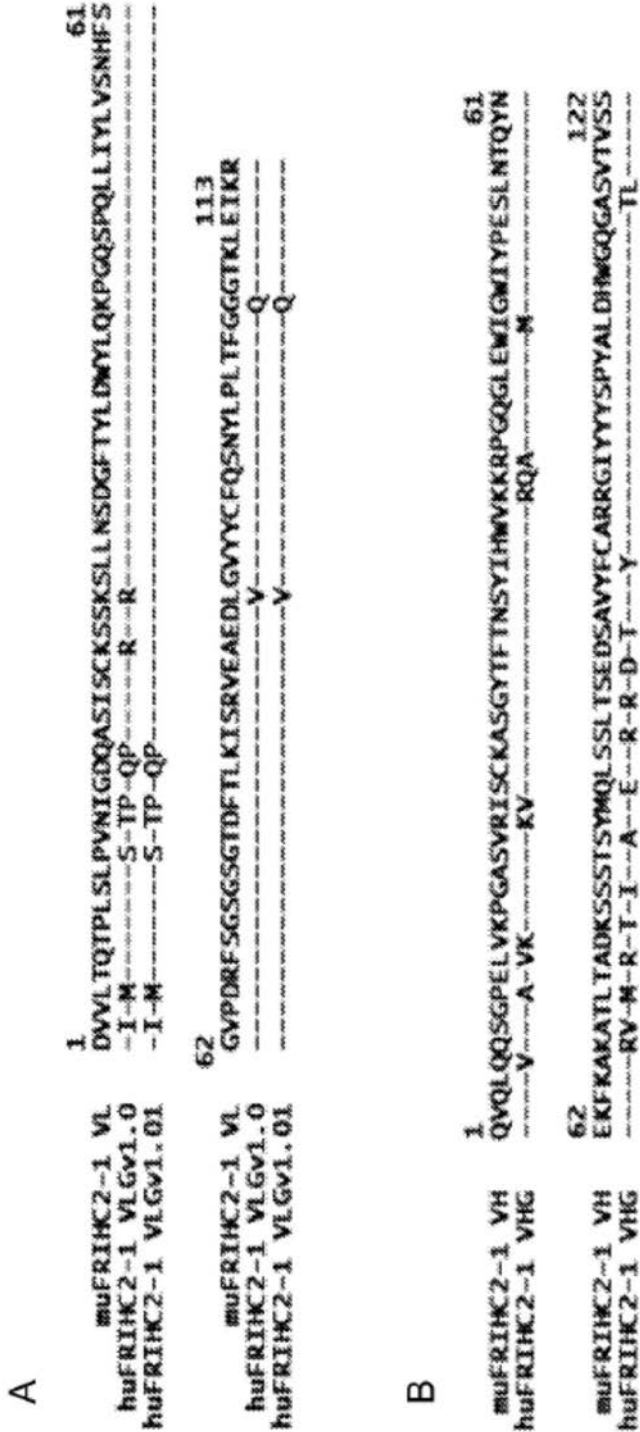


图12



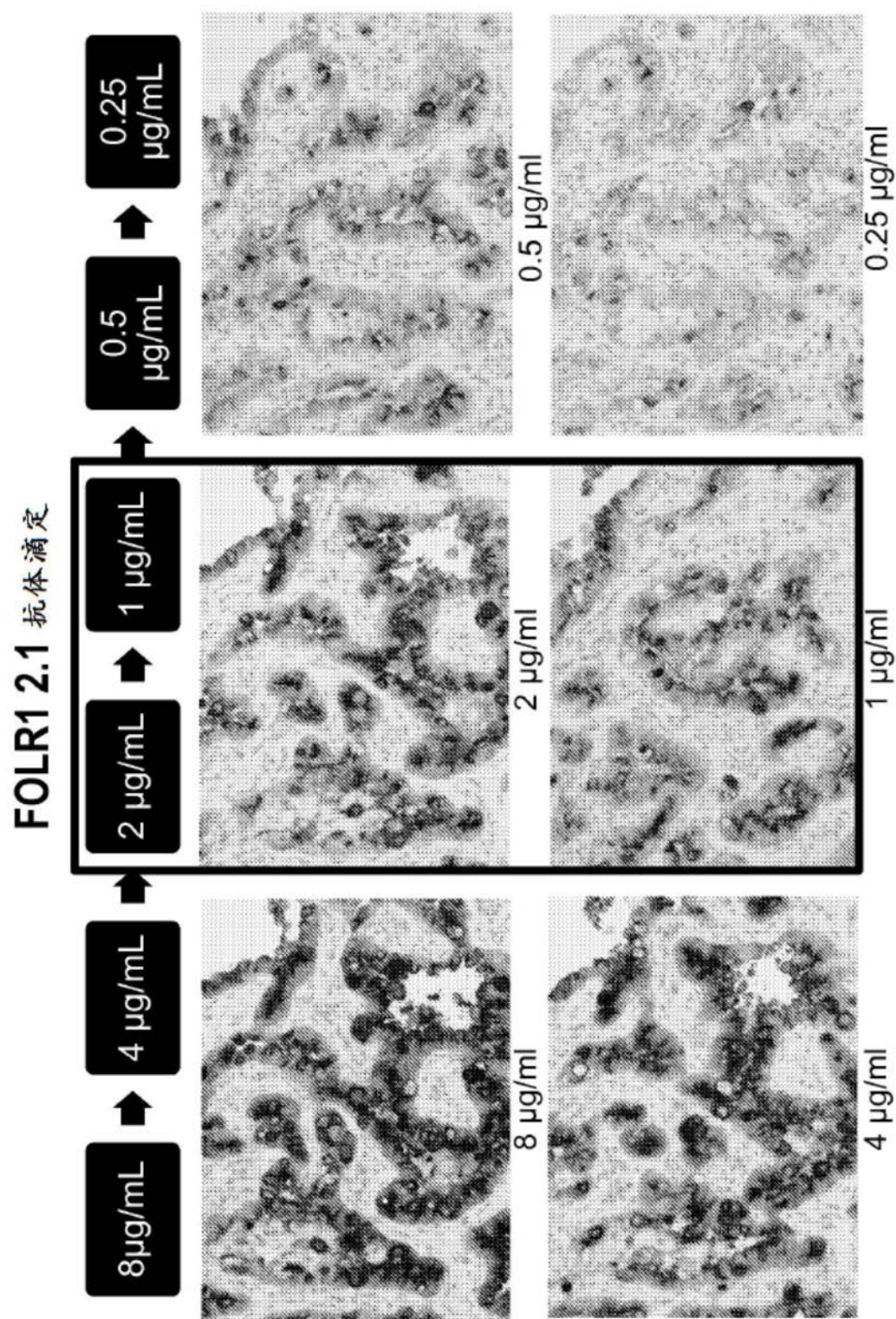


图13

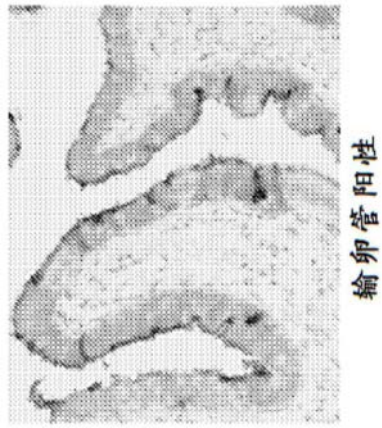


图14A

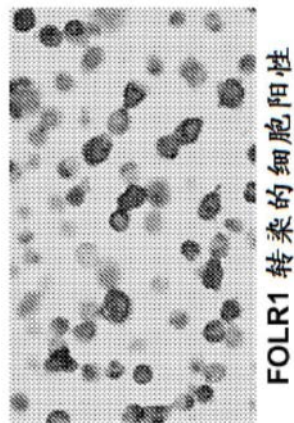


图14B

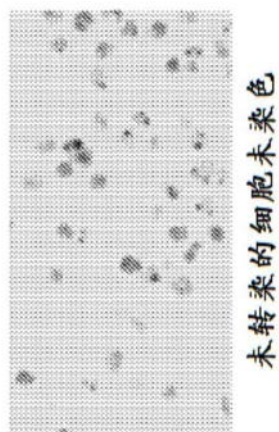
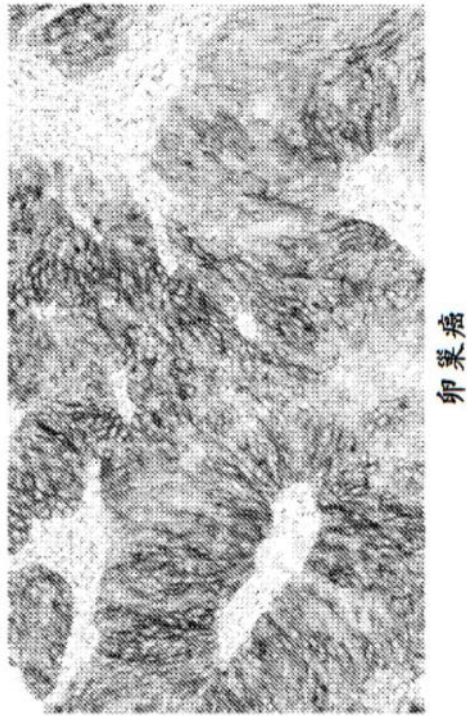


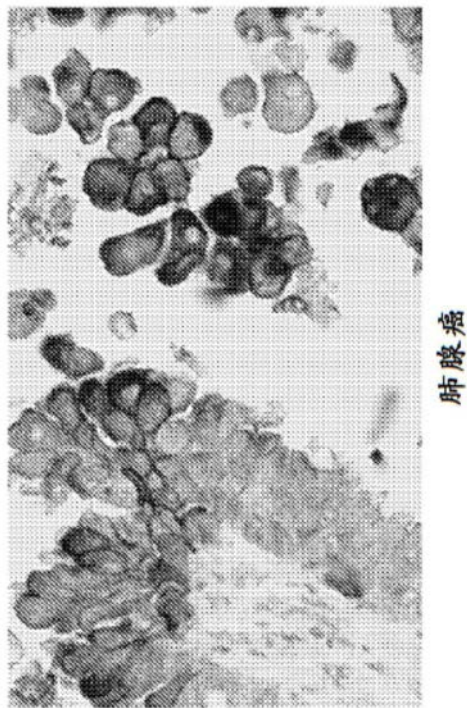
图14C





卵巢癌

图15A



肺腺癌

图15B

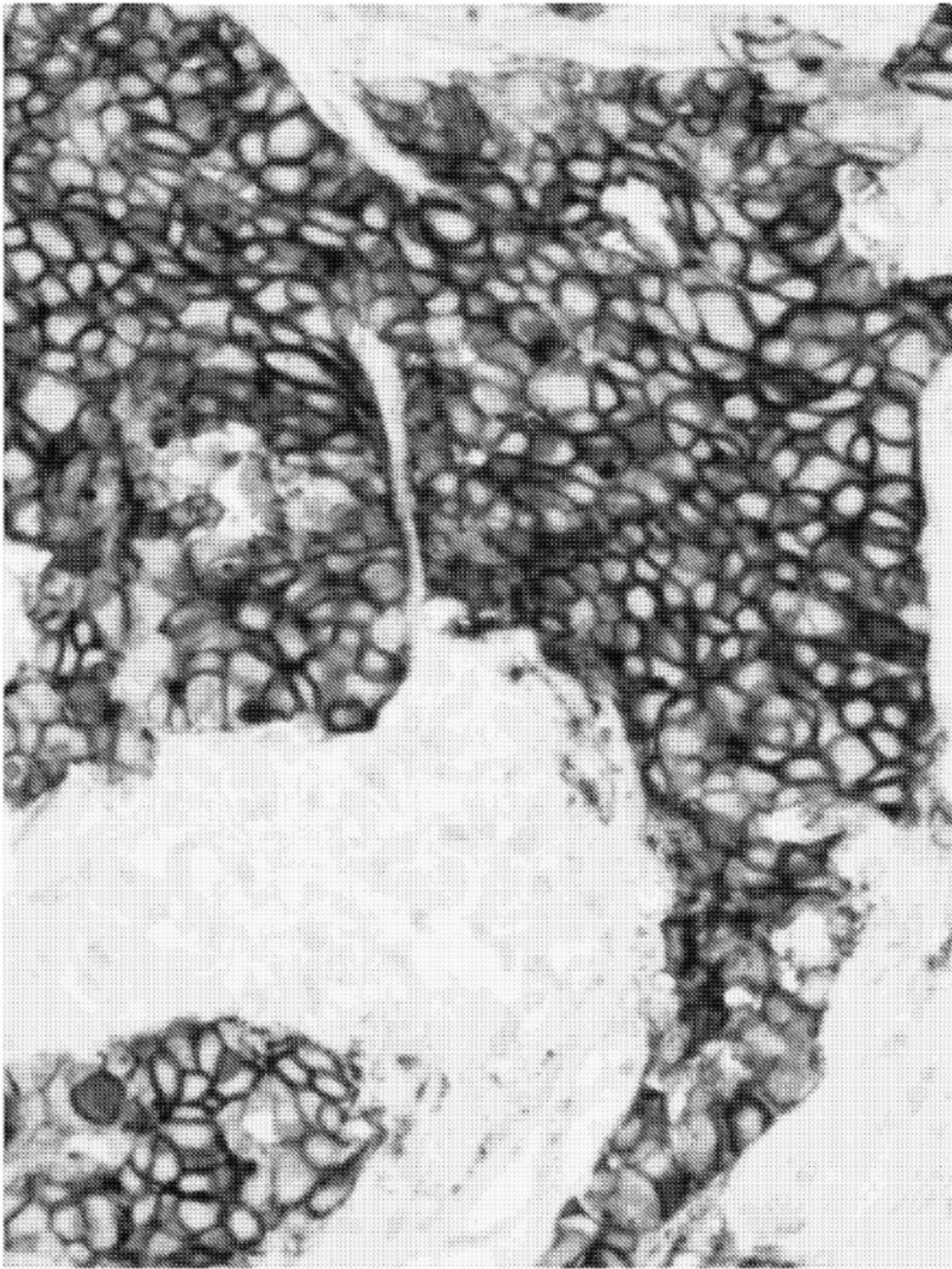


图16

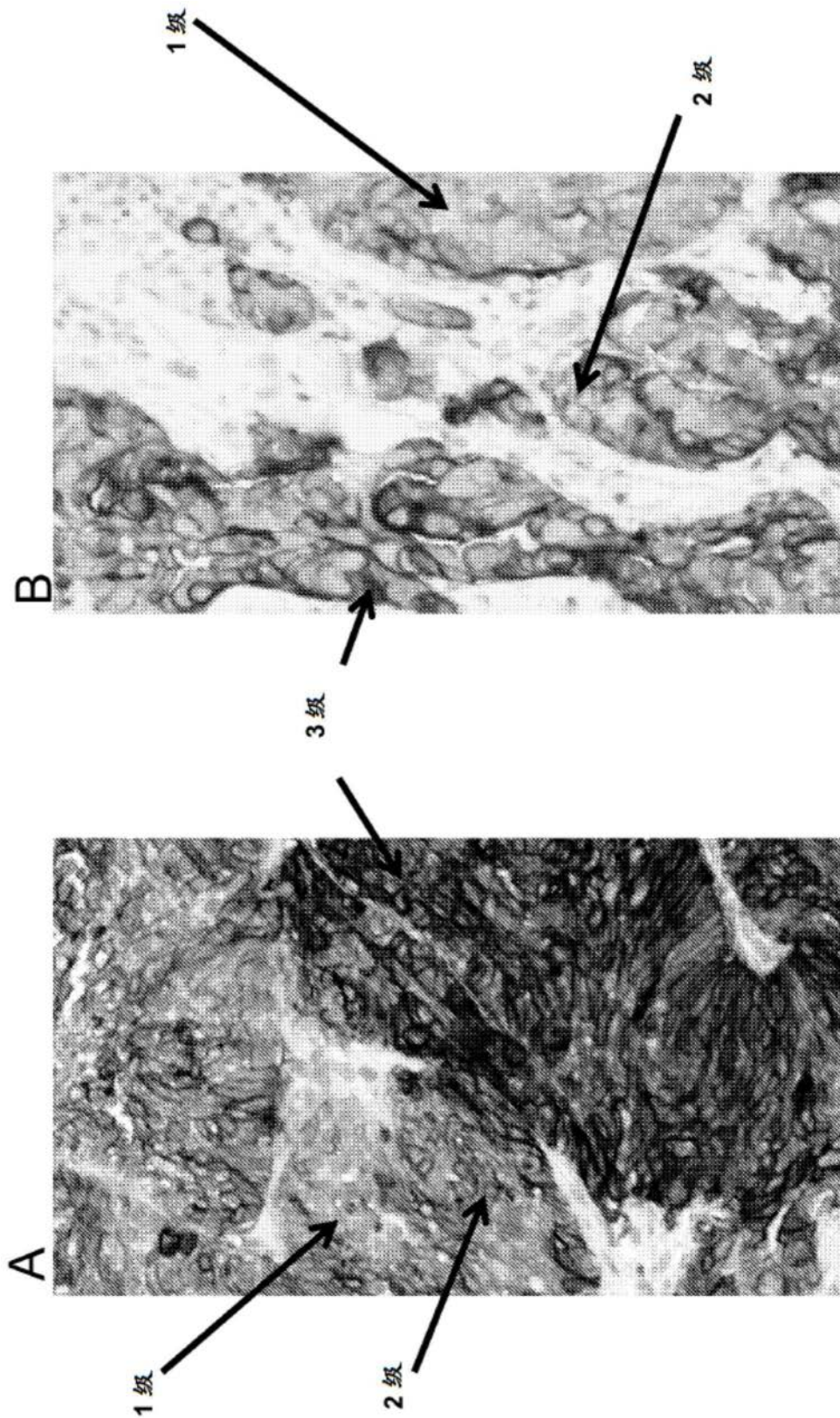


图17