



등록특허 10-2428492



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월03일

(11) 등록번호 10-2428492

(24) 등록일자 2022년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/30 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/30 (2013.01)

A61K 47/6803 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2016-7008349

(22) 출원일자(국제) 2014년08월29일

심사청구일자 2019년08월28일

(85) 번역문제출일자 2016년03월29일

(65) 공개번호 10-2016-0055831

(43) 공개일자 2016년05월18일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/053512

(87) 국제공개번호 WO 2015/031815

국제공개일자 2015년03월05일

(30) 우선권주장

61/872,407 2013년08월30일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

JP2013524773 A

KR1020130012117 A

WO2012135675 A2

(73) 특허권자

이뮤노젠 아이엔씨

미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 원터 스트리트 830

(72) 발명자

아브 울가

미국 02054-1607 매사추세츠주 밀리스 베이베리 서클 26

타바레스 다니엘

미국 01760 매사추세츠주 네이티 실베스터 로드 27

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 55 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 엽산 수용체 1의 검출을 위한 항체 및 분석

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 인간 엽산 수용체에 결합하는 항체 및 엽산 수용체 1-기반 요법을 위한 진단 분석에 관한 것이다. 상기 요법을 모니터링하기 위해 상기 항체를 사용하는 방법이 추가로 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)

C07K 16/28 (2013.01)

G01N 33/57411 (2013.01)

G01N 33/57415 (2019.01)

G01N 33/57449 (2013.01)

G01N 33/57492 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자

세티아디 줄리안토

미국 02452 매사추세츠주 월섬 클락타워 드라이브
132 넘버410

레드 샤론

미국 01803 매사추세츠주 벌링턴 세븐 스프링스 레
인 18에이

캐리건 크리스티나 엔

미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 닥터미스 스트리
트 53에이

뤼 렁윤

미국 02493 매사추세츠주 웨스턴 애로우헤드 로드
11

(30) 우선권주장

61/875,475 2013년09월09일 미국(US)

61/940,184 2014년02월14일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그것의 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 VH CDR1-3 및 VL CDR1-3 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편:

- (a) 서열식별번호:3-8, 각각;
- (b) 서열식별번호:9-14, 각각;
- (c) 서열식별번호:15-20, 각각;
- (d) 서열식별번호:21-26, 각각;
- (e) 서열식별번호: 3-5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각;
- (f) 서열식별번호: 3, 60, 및 5 및 서열식별번호: 6-8, 각각;
- (g) 서열식별번호: 3, 61, 및 5 및 서열식별번호: 6-8, 각각;
- (h) 서열식별번호: 3, 60, 및 5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; 및
- (i) 서열식별번호: 3, 61, 및 5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편:

- (a) 서열식별번호:27 및 서열식별번호:28;
- (b) 서열식별번호:29 및 서열식별번호:30;
- (c) 서열식별번호:31 및 서열식별번호:32;
- (d) 서열식별번호:62 및 서열식별번호:63 또는 서열식별번호:64;
- (e) 서열식별번호:65 및 서열식별번호:66 또는 서열식별번호:67;
- (f) 서열식별번호:68 및 서열식별번호:69.

청구항 3

청구항 1에 있어서, VH CDR1-3 및 VL CDR1-3 폴리펩타이드 서열은 각각 서열식별번호:3-8 의 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은, 서열식별번호:27 및 서열식별번호:28 의 아미노산 서열을 각각 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 5

청구항 2에 있어서, 상기 항체는 재조합으로 생산되는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 6

청구항 2에 있어서, 상기 항체는 인간 FOLR1에 결합하지만 FOLR2 또는 FOLR3에는 결합하지 않는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 7

청구항 2에 있어서, 전장 항체인, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 8

청구항 2에 있어서, 항원-결합 단편인, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 9

청구항 2에 있어서, 0.5 내지 10 nM의 Kd를 갖는 인간 엽산 수용체 1에 결합하는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 10

청구항 2에 있어서, 1.0 nM 이상의 Kd를 갖는 인간 엽산 수용체 1에 결합하는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 11

청구항 2에 있어서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지되는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 생산하는 세포.

청구항 13

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 만드는 방법으로서, (a) 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 생산하는 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 상기 배양 세포로부터 단리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 및 FACS 버퍼, IHC 버퍼 및 ELISA 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된 버퍼를 포함하는, FOLR1 발현을 검출하기 위한 조성물.

청구항 15

샘플에서 FOLR1 발현을 검출하는 방법으로서, 상기 샘플을 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지되고, 상기 표지는 면역형광성 표지, 화학발광 표지, 인광 표지, 효소 표지, 방사선표지, 아비딘/바이오틴, 콜로이드 금 입자, 착색된 입자 및 자성 입자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, FOLR1 발현은 방사선험법, 웨스턴 븍릿 분석, 세포측정, 면역형광성 분석, 효소 면역 분석, 면역침강 분석, 화학발광 분석, 또는 면역조직화학 분석에 의해 결정되는, 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, FOLR1 발현은 IHC에 의해 결정되는, 방법.

청구항 19

대상체에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제로서,

증가된 발현의 FOLR1이 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 사용하여 상기 대상체로부터의 암성 샘플에서 검출되었던, 활성제.

청구항 20

하기의 단계들을 포함하는, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하는 방법:

- (a) 상기 암으로부터의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계;
- (b) (a)의 상기 생물학적 샘플에서 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 FOLR1에의 결합을 검출하는 단계;
- (c) 점수를 상기 단계 (b)의 결합에 배정하는 단계로서, 상기 점수는 하나 이상의 참조 샘플과의 비교를 기반으로 배정되는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (c)에서의 점수를 참조 조직 또는 세포의 점수와 비교하는 단계로서, 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 더 큰 상기 암 FOLR1 수준의 점수 또는 높은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수 이상의 상기 암 FOLR1 수준의 점수는 항-FOLR1 항체에 반응할 가능성이 있는 것으로서 상기 암을 확인하는 단계.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 상기 샘플은 체액, 세포, 또는 조직 샘플인, 활성제.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 체액은 혈액, 복수, 소변, 혈장, 혈청, 또는 말초 혈액인, 활성제.

청구항 23

청구항 19에 있어서, 상기 FOLR1은 막 FOLR1인, 활성제.

청구항 24

청구항 19에 있어서, 상기 검출은 면역조직화학 (IHC)에 의한 것인, 활성제.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 IHC는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있는 보정된 IHC인, 활성제.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 IHC는 낮은 세포 표면 FOLR1 발현, 중간 FOLR1 세포 표면 발현, 또는 높은 FOLR1 세포 표면 발현을 갖는 샘플의 염색 세기의 범위를 생성하는, 활성제.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 IHC는 참조 샘플과 비교하여 FOLR1 발현 암성 샘플 또는 생물학적 샘플에서 염색 세기 및 염색 균일성을 구별하는, 활성제.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 IHC는 수작업으로 수행되는, 활성제.

청구항 29

청구항 27에 있어서, 상기 IHC는 자동화된 시스템을 사용하여 수행되는, 활성제.

청구항 30

청구항 24에 있어서, FOLR1 점수는 IHC로부터 결정되는, 활성제.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 적어도 2의 점수는 상기 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하거나 환자가 상기 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타내는, 활성제.

청구항 32

청구항 30에 있어서, 적어도 2개의 호모의 점수는 상기 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하거나 환자가 상기 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타내는, 활성제.

청구항 33

청구항 30에 있어서, 적어도 2개의 헤테로의 점수는 상기 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하거나 환자가 상기 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타내는, 활성제.

청구항 34

청구항 30에 있어서, 적어도 3의 점수는 상기 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하거나 환자가 상기 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타내는, 활성제.

청구항 35

청구항 30에 있어서, 샘플 중 세포의 25% 이상에서 적어도 2의 점수는 상기 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하거나 환자가 상기 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타내는, 활성제.

청구항 36

청구항 30에 있어서, 샘플 중 세포의 75% 초과에서 적어도 2의 점수는 상기 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하거나 환자가 상기 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타내는, 활성제.

청구항 37

청구항 30에 있어서, 샘플 중 세포의 25% 이상에서 적어도 3의 점수는 상기 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하거나 환자가 상기 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타내는, 활성제.

청구항 38

청구항 30에 있어서, 샘플 중 세포의 75% 초과에서 적어도 3의 점수는 상기 활성제에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하거나 환자가 상기 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타내는, 활성제.

청구항 39

청구항 30에 있어서, 상기 암은 난소, 뇌, 유방, 자궁, 췌장, 신장, 복막 및 폐 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 활성제.

청구항 40

청구항 30에 있어서, 상기 암은 자궁내막암인, 활성제.

청구항 41

청구항 39에 있어서, 상기 난소암은 상피성 난소암인, 활성제.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 암은 백금 내성있고, 재발되거나, 또는 난치성인, 활성제.

청구항 43

청구항 19에 있어서, 상기 FOLR1 발현은 적어도 하나의 추가의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 사용하여 검출되는, 활성제.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 적어도 하나의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 고형 지지체에 결합되는, 활성제.

청구항 45

청구항 19에 있어서, 상기 활성제는, 서열식별번호:45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별 번호:47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 FOLR1 항체를 포함하는, 활성제.

청구항 46

청구항 19에 있어서, 상기 활성제는, 서열식별번호:45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별 번호:47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 FOLR1 항체, 메이탄시노이드 DM4, 및 절단가능 설포-SPDB 링커를 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주게이트인, 활성제.

청구항 47

청구항 36에 있어서, 상기 활성제는, 서열식별번호:45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별 번호:47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 FOLR1 항체, 메이탄시노이드 DM4, 및 절단가능 설포-SPDB 링커를 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주게이트인, 활성제.

청구항 48

서열식별번호:45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호:47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 FOLR1 항체, 메이탄시노이드 DM4 및 설포-SPDB 링커를 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주게이트에 의한 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하는 방법으로서, 상기 방법은 IHC 분석에서 서열식별번호:27의 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호:28의 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 사용하여 암으로부터 수득한 샘플 중 FOLR1을 측정하는 것을 포함하고, 여기서 샘플 중 세포의 25% 이상에서 적어도 2의 IHC 점수는 암이 치료에 반응할 가능성이 있다는 것을 나타내는, 방법.

청구항 49

서열식별번호:45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호:47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 FOLR1 항체, 메이탄시노이드 DM4 및 설포-SPDB 링커를 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주게이트에 의한 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하는 방법으로서, 상기 방법은 IHC 분석에서 서열식별번호:27의 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호:28의 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 사용하여 암으로부터 수득한 샘플 중 FOLR1을 측정하는 것을 포함하고, 여기서 샘플 중 세포의 75% 초과에서 적어도 2의 IHC 점수는 암이 치료에 반응할 가능성이 있다는 것을 나타내는, 방법.

청구항 50

서열식별번호:45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호:47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 FOLR1 항체, 메이탄시노이드 DM4 및 설포-SPDB 링커를 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주게이트에 의한 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로서 암을 확인하는 방법으로서, 상기 방법은 IHC 분석에서 서열식별번호:27의 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호:28의 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 사용하여 암으로부터 수득한 샘플 중 FOLR1을 측정하는 것을 포함하고, 여기서 샘플 중 세포의 25% 이상에서 적어도 3의 IHC 점수는 암이 치료에 반응할 가능성이 있다는 것을 나타내는, 방법.

청구항 51

청구항 48 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 난소, 뇌, 유방, 자궁, 췌장, 신장, 복막 및 폐 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 52

청구항 48 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 자궁내막암인, 방법.

청구항 53

청구항 51에 있어서, 상기 난소암은 상피성 난소암인, 방법.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 상기 암은 백금 내성있고, 재발되거나, 또는 난치성인, 방법.

청구항 55

FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 하기를 포함하고:

서열식별번호:51, 서열식별번호:52 또는 53, 및 서열식별번호:54, 각각의 아미노산을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 인간화된 중쇄 가변 영역,

서열식별번호:48, 서열식별번호:49, 및 서열식별번호:50, 각각의 아미노산을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 인간화된 경쇄 가변 영역, 및

젖과 불변 영역,

여기서, 상기 인간화된 중쇄 가변 영역은 서열식별번호:45의 아미노산을 포함하고 상기 인간화된 경쇄 가변 영역은 서열식별번호:47의 아미노산을 포함하는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명의 분야는 일반적으로 엽산 수용체 1-기반 요법용 진단 분석 및 키트 그리고 인간 엽산 수용체 1에 결합하는 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

암은 선진국에서의 주요 사망 원인 중 하나로, 미국에서만 매년 백만 명을 넘는 개인이 암으로 진단되며 500,000 명이 사망한다. 전반적으로, 3 명 중 1 명을 넘는 개인에서 그 수명 동안 일부 암 형태가 발생할 것으로 추정된다. 200 개를 초과하는 상이한 암 유형이 존재하며, 그 중 4 개-유방, 폐, 결장직장 및 전립선-가 모든 신규 사례의 절반을 넘게 차지한다(Jemal 등, 2003, *Cancer J. Clin.* 53:5-26).

[0003]

엽산 수용체-알파 또는 폴레이트 결합 단백질로도 공지된 엽산 수용체 1(FOLR1)은 세포의 원형질막 상에 발현된 N-당화된 단백질이다. FOLR1은 엽산 및 몇몇 환원된 엽산 유도체에 대해 높은 친화도를 갖는다. FOLR1은 세포 내부로의 생리적 폴레이트, 5-메틸테트라하이드로폴레이트의 전달을 매개한다.

[0004]

FOLR1은 대다수의 난소암뿐만 아니라 많은 자궁암, 자궁내막암, 췌장암, 신장암, 폐암, 및 유방암에서 과발현되는 반면, 정상 조직에서 FOLR1의 발현은 신장 근위 세관 내 상피 세포의 정단막, 폐의 폐포 폐 세포, 방광, 고환, 맥락막총, 및 갑상샘으로 제한된다(Weitman SD 등, *Cancer Res* 52: 3396-3401(1992); Antony AC, *Annu Rev Nutr* 16: 501-521(1996); Kalli KR 등, *Gynecol Oncol* 108: 619-626(2008)). FOLR1의 상기 발현 패턴은 이것이 FOLR1-향 암 요법에 대해 바람직한 표적이 되도록 한다.

[0005]

난소암은 진행된 상태 전까지는 전형적으로 무증상이므로, 종종 후기 단계에 진단되며 현재 이용 가능한 시술, 전형적으로 수술적 감량 후 화학치료 약물을 이용하여 치료되는 경우 불량한 예후를 갖는다(von Gruenigen V 등, *Cancer* 112: 2221-2227(2008); Ayhan A 등, *Am J Obstet Gynecol* 196: 81 e81-86(2007); Harry VN 등, *Obstet Gynecol Surv* 64: 548-560(2009)). 따라서, 난소암에 대해 더 유효한 진단을 위해 충족되지 않은 의학적 요구가 명확히 존재한다.

[0006]

흘린(shed) FOLR1을 검출하기 위해 사용된 일부 이전 분석은 FOLR1에 충분히 특이적이지 않다. 예를 들면, 일부 분석은 FOLR1 및 다른 엽산 수용체 패밀리 멤버(FOLR2, 3, & 4)를 구별하지 못하거나, 전체 FBP(폴레이트 결합

단백질)에 대한 값을 보고한다. 추가로, 일부 분석은 인간 샘플(예를 들면, 혈장)이 염산을 수용체로부터 해리시키기 위해 가벼운 산 세척 단계로 전처리될 것을 필요로 한다. 일부 분석 결과는 또한 항체 요법 및 진단 항체 간의 경쟁적 효과로 인해 부정확성을 가질 수 있다. 추가로, 많은 상업적으로 이용가능한 키트는 이들의 시약 및 이들의 로트 별 안정성 모두에서 전통적으로 신뢰할 수 없다. 이들 키트의 평가는 매우 혼합된 결과를 제공하였고, 단지 연구 용도로만 의도된다. 많은 것들이 "매트릭스 효과"로 인한 위 양성 가능성을 감소시키기 위해 인간 샘플이 분석 전에 사전-회석될 것을 필요로 한다. 따라서, FOLR1-기반 요법에 대해 동반하여, FOLR1의 임상적으로 관련된 동적 범위를 검출할 수 있는 고도로 민감하고 정확한 진단 분석에 대한 필요성이 명확히 존재한다.

발명의 내용

[0007]

발명의 요약

[0008]

항-FOLR1 항체 및 그것의 항원-결합 단편뿐만 아니라 FOLR1을 검출하고, FOLR1-매개된 질환 및 장애 (예컨대 암)를 진단하고, 항-FOLR1 요법의 효능을 모니터링하고, 항-FOLR1 요법을 최적화하고, 그리고 환자를 계층화하는 방법 모두가 본원에서 제공된다.

[0009]

본원에서 제공된 항-FOLR1 항체는 진단 역할을 가질 수 있다. 예를 들면, 종양 및 비-종양 세포 또는 조직을 구별하거나 또는 종양 유형, 하위유형, 또는 등급을 확인하는 항-FOLR1 항체가 본원에서 제공된다. 일구현예에서, 본원에서 제공된 항-FOLR1 항체 및/또는 본원에서 제공된 FOLR1-검출 분석은 본원에 기재된 바와 같은 선암종 및 편평상피 세포 암종을 포함하는 비-소세포 폐암 (NSCLC)의 하위유형을 구별하기 위해 사용될 수 있다. 또 하나의 구현예에서, 본원에서 제공된 항-FOLR1 항체 및/또는 본원에서 제공된 FOLR1-검출 분석은 암, 예를 들면, 육종의 유형을 제외하기 위해 (예를 들면, 세포 또는 조직이 암의 유형이 아니라는 것을 결정하기 위해) 사용될 수 있다.

[0010]

일부 구현예에서, 본원에서 제공된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 FOLR1의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 에피토프는 적어도 하나, 적어도 2, 또는 3개의 N-당화된 아미노산을 포함한다. 당화은 막 국제화에 대해 중요할 수 있다. 참고 예를 들면, Yan 등, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 1385-1389 (2002). 유익하게는, 본원의 항체 및 항원-결합 단편은 세포막 상의 FOLR1 발현을 검출할 수 있고 FOLR1의 임상적으로 관련된 동적 범위를 검출할 수 있다. 본원에서 제공된 항체 및 항원-결합 단편으로 수득한 더 신중한 염색은 상이한 FOLR1 에피토프에 결합하고, 충분한 특이성이 없고/거나 충분한 민감성이 없는 항체를 사용하여 (3의 점수를 갖는) 높은 발현 수준으로서 함께 그룹화된 샘플 모두 중에서 식별력을 허용한다.

[0011]

일부 구현예에서, 본원에서 제공된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 항체와 동일한 FOLR1 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다: (a) 서열식별번호:27의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:28의 폴리펩타이드를 포함하는 항체; (b) 서열식별번호:29의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:30의 폴리펩타이드를 포함하는 항체; (c) 서열식별번호:31의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:32의 폴리펩타이드를 포함하는 항체; (d) 서열식별번호:62의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:63 또는 서열식별번호:64의 폴리펩타이드를 포함하는 항체; 및 (e) 서열식별번호:65의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:66 또는 서열식별번호:67의 폴리펩타이드를 포함하는 항체. 일부 구현예에서, 상기 에피토프는 N-당화된 아미노산을 포함한다.

[0012]

일부 구현예에서, 본원에서 제공된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 FOLR1에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 항체 또는 그것의 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 FOLR1에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제한다: (a) 서열식별번호:27의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:28의 폴리펩타이드를 포함하는 항체; (b) 서열식별번호:29의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:30의 폴리펩타이드를 포함하는 항체; (c) 서열식별번호:31의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:32의 폴리펩타이드를 포함하는 항체; (d) 서열식별번호:62의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:63 또는 서열식별번호:64의 폴리펩타이드를 포함하는 항체; 및 (e) 서열식별번호:65의 폴리펩타이드 및 서열식별번호:66 또는 서열식별번호:67의 폴리펩타이드를 포함하는 항체.

[0013]

일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 VH CDR1-3 및 VL CDR1-3 폴리펩타이드 서열을 포함한다: (a) 서열식별번호:3-8, 각각; (b) 서열식별번호:9-14, 각각; (c) 서열식별번호:15-20, 각각; (d) 서열식별번호:21-26, 각각; (e) 서열식별번호: 3-5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; (f) 서열식별번호: 3, 60, 및 5 및 서열식별번호: 6-8, 각각; (g) 서열식별번호: 3, 61, 및 5 및 서열식별번호: 6-8, 각각; (h) 서열식별번호: 3, 60, 및 5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; 및 (i) 서열식별번호: 3, 61, 및 5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각.

[0014]

일부 구현예에서, 본원에서 제공된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 FOLR1에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 항체 또는 그것의 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 VH CDR1-3 및 VL CDR1-3 폴리펩타이드 서열을 포함한다: (a) 서열식별번호:3-8, 각각; (b) 서열식별번호:9-14, 각각; (c) 서열식별번호:15-20, 각각; (d) 서열식별번호:21-26, 각각; (e) 서열식별번호: 3-5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; (f) 서열식별번호: 3, 60, 및 5 및 서열식별번호: 6-8, 각각; (g) 서열식별번호: 3, 61, 및 5 및 서열식별번호: 6-8, 각각; (h) 서열식별번호: 3, 60, 및 5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; (i) 서열식별번호: 3, 61, 및 5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; 및 (j) 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 (a) 내지 (i)의 변이체.

[0015]

일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 포함한다: (a) 서열식별번호:27 및 서열식별번호:28; (b) 서열식별번호:29 및 서열식별번호:30; (c) 서열식별번호:31 및 서열식별번호:32; (d) 서열식별번호:62 및 서열식별번호:63 또는 서열식별번호:64; (e) 서열식별번호:65 및 서열식별번호:66 또는 서열식별번호:67; (f) 서열식별번호:68 및 서열식별번호:69. 일부 구현예에서, 상기 폴리펩타이드 서열은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 서열의 아미노산을 포함하고, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 이루어진다: (a) 서열식별번호:27 및 서열식별번호:28; (b) 서열식별번호:29 및 서열식별번호:30; (c) 서열식별번호:31 및 서열식별번호:32; (d) 서열식별번호:62 및 서열식별번호:63 또는 서열식별번호:64; (e) 서열식별번호:65 및 서열식별번호:66 또는 서열식별번호:67; (f) 서열식별번호:68 및 서열식별번호:69.

[0016]

일부 구현예에서, 본원에서 제공된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 FOLR1에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 항체 또는 그것의 단편은 하기를 포함한다: 서열식별번호:51, 서열식별번호:52 또는 53, 및 서열식별번호:54, 각각의 아미노산을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 인간화된 중쇄 가변 영역, 서열식별번호:48, 서열식별번호:49, 및 서열식별번호:50, 각각의 아미노산을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 인간화된 경쇄 가변 영역, 및 젖과 불변 영역. 일부 구현예에서, 상기 인간화된 중쇄 가변 영역은 서열식별번호:45의 아미노산을 포함하고 상기 인간화된 경쇄 가변 영역은 서열식별번호:47의 아미노산을 포함한다.

[0017]

일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 재조합으로 생산된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 젖과, 비-인간, 인간화된, 키메라성, 재표현화된, 또는 인간. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 인간 FOLR1에 결합하지만, FOLR2 또는 FOLR3에는 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 전장 항체이다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 하기를 포함하고, 그것으로 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다: Fab, Fab', F(ab')2, Fd, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 디설파이드 연결된 Fv, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgG Δ CH2, 미니바디, F(ab')3, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb2, (scFv)2, 또는 scFv-Fc.

[0018]

일부 구현예에서, 본원에서 제공된 폴리펩타이드는 FOLR1에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다: (a) 서열식별번호:3-8, 각각; (b) 서열식별번호:9-14, 각각; (c) 서열식별번호:15-20, 각각; (d) 서열식별번호:21-26, 각각; (e) 서열식별번호: 3-5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; (f) 서열식별번호: 3, 60, 및 5 및 서열식별번호: 6-8, 각각; (g) 서열식별번호: 3, 61, 및 5 및 서열식별번호: 6-8, 각각 (h) 서열식별번호: 3, 60, 및 5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; (i) 서열식별번호: 3, 61, 및 5 및 서열식별번호: 59, 7, 및 8, 각각; 및 (j) 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 (a) 내지 (i)의 변이체. 일부 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다: (a) 서열식별번호:27 및 서열식별번호:28; (b) 서열식별번호:29 및 서열식별번호:30; (c) 서열식별번호:31 및 서열식별번호:32; (d) 서열식별번호:62 및 서열식별번호:63 또는 서열식별번호:64; (e) 서열식별번호:65 및 서열식별번호:66 또는 서열식별번호:67; 및 (f) 서열식별번호:68 및 서열식별번호:69. 일부 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 하기의 아미노산을 포함한다: (a) 서열식별번호:27 및 서열식별번호:28; (b) 서열식별번호:29 및 서열식별번호:30; (c) 서열식별번호:31 및 서열식별번호:32; (d) 서열식별번호:62 및 서열식별번호:63 또는 서열식별번호:64; (e) 서열식별번호:65 및 서열식별번호:66 또는 서열식별번호:67; 또는 (f) 서열식별번호:68 및 서열식별번호:69.

[0019]

일부 구현예에서, 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드는 약 0.5 내지 약 10 nM의 Kd를 갖는 FOLR1에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드는 약 1.0 nM 이상의 Kd를 갖는 인간 FOLR1에 결합한다. 일부 구현예에서, 결합 친화도는 유세포측정, Biacore, ELISA, 또는 방사선면역분석

에 의해 측정된다.

- [0020] 일부 구현예에서, 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드는 N-당화된 아미노산을 포함하는 FOLR1의 에피토프에 결합한다.
- [0021] 일부 구현예에서, 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드는 검출가능하게 표지된다.
- [0022] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 세포는 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드를 생산한다. 일부 구현예에서, 세포는 단리된다.
- [0023] 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드를 제조하는 방법이 또한 제공된다. 본 방법은 (a) 본원에서 제공된 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드를 상기 배양 세포로부터 단리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0024] 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드 및 FACS 버퍼, IHC 버퍼, 및 ELISA 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된 버퍼를 포함한다.
- [0025] 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드를 사용하는 방법이 또한 제공된다.
- [0026] 일부 구현예에서, 샘플에서 FOLR1 발현을 검출하는 방법은 상기 샘플을 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지된다. 일부 구현예에서, 표지는 면역형광성 표지, 화학발광 표지, 인광 표지, 효소 표지, 방사선표지, 아비딘/바이오틴, 콜로이드 금 입자, 착색된 입자 및 자성 입자로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, FOLR1 발현은 방사선면역분석, 웨스턴 블랏 분석, 세포측정, 면역형광성 분석, 효소 면역분석, 면역침강 분석, 화학발광 분석, 또는 면역조직화학 분석에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 세포측정은 유세포측정이다. 일부 구현예에서, FOLR1 발현은 IHC에 의해 결정된다.
- [0027] 일부 구현예에서, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의해 암 요법의 효능을 증가시키는 방법은, 상기 활성제를 암이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 증가된 발현의 FOLR1은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드 또는 조성물을 사용하여 상기 대상체로부터 암성 샘플에서 검출되었다.
- [0028] 일부 구현예에서, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 암을 확인하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 암으로부터의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드 또는 조성물과 접촉시키는 단계; (b) (a)의 생물학적 샘플에서 상기 항체, 항체-단편, 또는 폴리펩타이드의 FOLR1에의 결합을 검출하는 단계; (c) 점수를 단계 (b)의 결합에 배정하는 단계로서, 상기 점수는 하나 이상의 참조 샘플과의 비교를 기반으로 배정되는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서의 점수를 참조 조직 또는 세포의 점수와 비교하는 단계로서, 여기서 정상 또는 낫은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 더 큰 암 FOLR1 수준의 점수 또는 높은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 이상의 암 FOLR1 수준의 점수는 항-FOLR1 항체에 반응하는 것처럼 상기 암을 확인하는 단계.
- [0029] 일부 구현예에서, 암이 있는 환자를 치료하는 방법은 하기를 포함한다: (a) 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 검출로부터 FOLR1 발현 점수를 결정하는 단계로서, 상기 검출은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; 및 (b) 상기 점수가, 환자가 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다면, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 환자에게 투여하는 단계.
- [0030] 일부 구현예에서, 암이 있는 환자를 치료하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 검출로부터 FOLR1 발현 점수를 결정하는 단계로서, 상기 검출은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; 및 (b) 상기 점수가, 환자가 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다면, 건강관리 제공자에게 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 환자에게 투여하도록 지시하는 단계.
- [0031] 일부 구현예에서, 암이 있는 환자를 치료하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 FOLR1 발현의 검출로부터 FOLR1 발현 점수를 결정하기 위해 암이 있는 환자로부터 취한 암성 샘플을 제출하는 단계; 및 (b) 상기 점수가, 환자가 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다면, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상

기 환자에게 투여하는 단계.

[0032] 일부 구현예에서, 암이 있는 환자를 치료하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플에서 FOLR1 발현을 검출하는 단계로서, 상기 검출이 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; (b) 상기 암성 샘플의 FOLR1 발현 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 점수가, 환자가 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다면, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 환자에게 투여하는 단계.

[0033] 일부 구현예에서, 암이 있는 환자를 치료하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 환자에게 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정 용량을 투여하는 단계; (b) 참조 샘플에서 FOLR1 수준에 대한 환자의 FOLR1을 검출하는 단계로서, 상기 검출이 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; 및 (c) 상기 환자의 FOLR1 수준이 상승된다면, 차후의 고정 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 단계.

[0034] 일부 구현예에서, 암이 있는 대상체를 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료적 레지멘을 최적화하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 증가된 용량의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제 암이 있는 대상체에게 투여하는 단계로서, 상기 대상체 중 증가된 발현의 FOLR1은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 검출되었던 단계; 또는 (b) 감소된 용량의 활성제를 암이 있는 대상체에게 투여하는 단계로서, 상기 대상체 중 감소된 발현의 FOLR1은 검출되었던 단계.

[0035] 일부 구현예에서, 암이 있는 대상체를 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료적 레지멘을 최적화하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 상기 대상체로부터의 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 검출하는 단계; (b) 상기 암성 샘플의 FOLR1 발현 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 점수가 낮다면, 증가된 용량의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 대상체에게 투여하거나 상기 점수가 높다면, 감소된 용량의 활성제를 상기 대상체에게 투여하는 단계.

[0036] 일부 구현예에서, 암 환자에서의 FOLR1-발현 암 세포를 감소시키는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 참조 샘플에서의 FOLR1 수준과 비교된, 환자로부터 취한 암성 샘플에서의 FOLR1 수준을 검출하는 단계; 및 (b) 상기 환자의 FOLR1 수준이 참조 샘플과 비교하여 상승된다면, 상기 환자에게 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정 용량을 투여하는 단계; 상기 활성제의 투여는 상기 환자에서 FOLR1-발현 암 세포의 수를 감소시킨다. 일부 구현예에서, 환자에서 암을 치료하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 참조 샘플에서의 FOLR1 수준과 비교된, 환자로부터 취한 암성 샘플에서의 FOLR1 수준을 검출하는 단계; 및 (b) 상기 환자의 FOLR1 수준이 참조 샘플과 비교하여 상승된다면, 상기 환자에게 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정 용량을 투여하는 단계; 상기 활성제의 투여는 FOLR1-발현 종양의 크기를 감소시키거나 CA125 수준을 감소시킨다.

[0037] 일부 구현예에서, 암 환자에서의 FOLR1-발현 암 세포를 감소시키는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 암이 있는 환자에게 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정 용량을 투여하는 단계; (b) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 참조 샘플에서 FOLR1 수준에 대한 환자의 FOLR1 수준을 검출하는 단계; 및 (c) 상기 환자의 FOLR1 수준이 참조 샘플과 비교하여 상승된다면, 차후의 고정 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 단계; 상기 활성제의 투여는 상기 환자에서 FOLR1-발현 암 세포의 수를 감소시킨다. 일부 구현예에서, 환자에서 암을 치료하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 암이 있는 환자에게 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정 용량을 투여하는 단계; (b) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 참조 샘플에서 FOLR1 수준에 대한 환자의 FOLR1 수준을 검출하는 단계; 및 (c) 상기 환자의 FOLR1 수준이 참조 샘플과 비교하여 상승된다면, 차후의 고정 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 단계; 상기 활성제의 투여는 FOLR1-발현 종양의 크기를 감소시키거나 CA125 수준을 감소시킨다.

[0038] 일부 구현예에서, 환자에서 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 고정 용량의 활성제의 치료적 효능을 모니터링하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 암이 있는 환자로부터의 생물학적 샘플에서 제1 FOLR1 수준을 검출하는 단계; (b) 상기 환자에게 항-FOLR1 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정 용량을 투여하는 단계;

(c) 활성제의 투여 다음에 환자로부터의 생물학적 샘플에서 제2 FOLR1 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; 및 (d) 상기 제2 FOLR1 수준을 상기 제1 FOLR1 수준과 비교하는 단계; 상기 제1 및 제2 FOLR1 수준의 감소는 치료적 효능을 나타낸다.

[0039]

일부 구현예에서, 낮은 용량 항-FOLR1 치료 레지멘에 반응할 것처럼 암이 있는 대상체를 확인하는 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 암으로부터의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물과 접촉시키는 단계; (b) 항체, 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드의 (a)의 생물학적 샘플에의 결합을 검출하는 단계; (c) 점수를 단계 (b)의 결합에 배정하는 단계로서, 상기 점수는 하나 이상의 참조 샘플과의 비교를 기반으로 배정되는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서의 점수를 참조 조직 또는 세포의 점수와 비교하는 단계로서, 여기서 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 더 큰 암 FOLR1 수준의 점수 또는 높은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 이상의 암 FOLR1 수준의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것으로서 암을 확인하는 단계.

[0040]

일부 구현예에서, 항-FOLR1 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 암을 확인하는 방법은, 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 상기 암으로부터의 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 하나 이상의 참조 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여, FOLR1 발현 암성 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 방법의 사용을 포함하는 단계; (b) 상기 암성 세포의 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 결정된 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성 점수를 적어도 하나의 참조 샘플에서 FOLR1 단백질 발현을 측정하여 결정된 상대적인 값과 비교하는 단계로서, 상기 적어도 하나의 참조 샘플은 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감하지 않는 조직, 세포, 또는 세포 펠렛 샘플이고 그리고 상기 상대적인 값보다 더 높은, 단계 (b)에서 결정된 암성 샘플의 FOLR1 염색 세기 점수는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 암을 확인하는 단계.

[0041]

일부 구현예에서, 항-FOLR1 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 암을 확인하는 방법은, 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 상기 암으로부터의 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 하나 이상의 참조 샘플에서의 막 FOLR1과 비교하여 FOLR1 발현 암성 샘플에서의 막 FOLR1을 특이적으로 오염시키는 방법의 사용을 포함하는 단계; (b) 암성 샘플의 FOLR1 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서 결정된 FOLR1 점수를 적어도 하나의 참조 샘플에서 FOLR1을 측정하여 결정된 상대적인 값과 비교하는 단계로서, 상기 적어도 하나의 참조 샘플은 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감하지 않는 조직, 세포, 또는 세포 펠렛 샘플이고 그리고 여기서 상대적인 값보다 더 높은, 단계 (b)에서 결정된 암성 샘플의 FOLR1 점수는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 암을 확인하는 단계.

[0042]

일부 구현예에서, 항-FOLR1 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 암을 확인하는 방법은, 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 상기 암으로부터의 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 하나 이상의 참조 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여, FOLR1 발현 암성 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 방법의 사용을 포함하는 단계; (b) 상기 암성 세포의 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 결정된 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성 점수를 적어도 하나의 참조 샘플에서 FOLR1 단백질 발현을 측정하여 결정된 상대적인 값과 비교하는 단계로서, 상기 적어도 하나의 참조 샘플은 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 조직, 세포, 또는 세포 펠렛 샘플이고 여기서 상대적인 값 이상인, 단계 (b)에서 결정된 암성 샘플의 FOLR1 염색 세기 점수는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 암을 확인하는 단계.

[0043]

일부 구현예에서, 항-FOLR1 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 암을 확인하는 방법은, 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 상기 암으로부터의 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 하나 이상의 참조 샘플에서의 막 FOLR1과 비교하여 FOLR1 발현 암성 샘플에서의 막 FOLR1을 특이적으로 오염시키는 방법의 사용을 포함하는 단계; (b) 암성 샘플의 FOLR1 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서 결정된 FOLR1 점수를 적어도 하나의 참조 샘플에서 FOLR1을 측정하여 결정된 상대적인 값과 비교하는 단계로서, 상기 적어도 하나의 참조 샘플은 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 조직, 세포, 또는 세포 펠렛 샘플이고 여기서 상대적인 값 이상인, (b)에서 결정된 암성 샘플의 FOLR1 점수는 활성제에 의한 치료에 민

감한 것으로서 암을 확인하는 단계.

- [0044] 일부 구현예에서, 본 방법은 추가로, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 암성 샘플 또는 생물학적 샘플이 수득된 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0045] 일부 구현예에서, 환자의 FOLR1 수준은 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플 또는 생물학적 샘플에서 검출된다. 일부 구현예에서, 상기 암성 샘플 또는 생물학적 샘플은 체액, 세포, 또는 조직 샘플이다. 일부 구현예에서, 세포는 순환 종양 세포이다. 일부 구현예에서, 체액은 혈액, 복수, 소변, 혈장, 혈청, 또는 말초 혈액이다.
- [0046] 일부 구현예에서, FOLR1은 막 국제화된 FOLR1 (즉, 막 FOLR1)이다.
- [0047] 일부 구현예에서, FOLR1은 분비된 FOLR1이다.
- [0048] 일부 구현예에서, 검출은 효소 연결된 면역흡착 분석 (ELISA)에 의한 것이다.
- [0049] 일부 구현예에서, 검출은 면역조직화학 (IHC)에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 IHC는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있는 보정된 IHC이다. 일부 구현예에서, IHC는 낮은 세포 표면 FOLR1 발현, 중간 FOLR1 세포 표면 발현, 또는 높은 FOLR1 세포 표면 발현을 갖는 샘플의 염색 세기의 범위를 생성한다. 일부 구현예에서, IHC는 참조 샘플과 비교된 FOLR1 발현 암성 샘플 또는 생물학적 샘플에서 염색 세기 및 염색 균일성을 구별한다. 일부 구현예에서, IHC는 막 FOLR1을 검출한다. 일부 구현예에서, 상기 IHC는 수작업으로 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 IHC는 자동화된 시스템을 사용하여 수행된다.
- [0050] 일부 구현예에서, FOLR1 점수는 IHC로부터 결정된다.
- [0051] 일부 구현예에서, 적어도 1의 점수는 증가된 발현의 FOLR1을 나타내고, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 암을 확인한다.
- [0052] 일부 구현예에서, 적어도 2개, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암 또는 자궁내막암이다. 일부 구현예에서, 적어도 3개, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 3개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응된다. 일부 구현예에서, 상기 IHC는 수작업으로 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 IHC는 자동화된 시스템을 사용하여 수행된다.
- [0053] 일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 75의 H-점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 난소암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 NSCLC를 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 자궁내막암을 확인한다. 일부 구현예에서, H-점수는 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 결정된다.
- [0054] 일부 구현예에서, 적어도 3의 세기를 갖는 난소 종양 샘플에서 FOLR1 막 발현의 적어도 25%는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 대해 반응할 것처럼 난소암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 2의 세기를 갖는 NSCLC 샘플 중 FOLR1 막 발현의 적어도 25%는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 NSCLC를 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 2의 세기를 갖는 자궁내막 종양 샘플에서 FOLR1 막 발현의 적어도 25%는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 반응할 것처럼 자궁내막암을 확인한다. 일부 구현예에서, 발현 점수는 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 결정된다.
- [0055] 일부 구현예에서, 적어도 1의 점수는 증가된 발현의 FOLR1을 나타내고, 환자는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암 또는 자궁내막암이다. 일부 구현예에서, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 3개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.
- [0056] 일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는, 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 75의 H-점수는 난소암이 있는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다.

일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는, NSCLC가 있는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는, 자궁내막암이 있는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, H-점수는 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 결정된다.

[0057] 일부 구현예에서, 적어도 3의 세기를 갖는 난소 종양 샘플 중 FOLR1 막 발현의 적어도 25%는, 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 2의 세기를 갖는 NSCLC 샘플 중 FOLR1 막 발현의 적어도 25%는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 2의 세기를 갖는 자궁내막 종양 샘플에서 FOLR1 막 발현의 적어도 25% 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 발현 점수는 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 결정된다.

[0058] 일부 구현예에서, 적어도 1의 점수는 증가된 발현의 FOLR1을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는, 감소된 용량의 활성제가 투여되어야 된다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암 또는 자궁내막암이다. 일부 구현예에서, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 3개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는, 감소된 용량의 활성제가 투여되어야 된다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.

[0059] 일부 구현예에서, 적어도 1의 점수는 증가된 발현의 FOLR1을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것처럼 상기 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암 또는 자궁내막암이다. 일부 구현예에서, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 3개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것처럼 상기 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.

[0060] 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암 또는 자궁내막암이다. 일부 구현예에서, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 3개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.

[0061] 일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 대해 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 75의 H-점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 대해 민감한 것으로 난소암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 대해 민감한 것으로 NSCLC 을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 50의 H-점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 대해 민감한 것으로 자궁내막암을 확인한다. 일부 구현예에서, H-점수는 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 결정된다.

[0062] 일부 구현예에서, 적어도 3의 세기를 갖는 난소 종양 샘플 중 FOLR1 막 발현의 적어도 25%는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 2의 세기를 갖는 NSCLC 샘플 중 FOLR1 막 발현의 적어도 25%는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 2의 세기를 갖는 자궁내막 종양 샘플에서 FOLR1 막 발현의 적어도 25% 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 발현 점수는 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 결정된다.

[0063] 일부 구현예에서, 참조 샘플은 양성 참조 샘플 또는 음성 참조 샘플이다. 일부 구현예에서, 참조 샘플은 세포, 세포 펠렛, 또는 조직을 포함한다.

[0064] 일부 구현예에서, 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드 of 호소, 형광단, 방사성 표지, 및 발광단으로 이루어진 군으로부터 선택된 검출 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 시약은 바이오틴, 디옥시제닌, 플루오레신, 삼중수소, 및 로다민으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0065] 일부 구현예에서, 상기 암은 FOLR1 양성 암이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 난소, 뇌, 유방, 자궁, 자궁내막,

췌장, 신장, 및 폐 암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 폐암은 비소세포 폐암 또는 세기관지폐포 암종이다. 일부 구현예에서, 상기 난소암은 상피성 난소암이다. 일부 구현예에서, 상기 난소암은 백금 내성있고, 재발되거나, 또는 난치성이다.

[0066] 일부 구현예에서, FOLR1 발현은 적어도 하나의 추가의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, FOLR1 발현은 2개의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 사용하여 측정된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 고형 지지체에 결합된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 미세적정 플레이트에 결합된다.

[0067] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 검출제를 포함한다. 일부 구현예에서, 검출제는 발색 검출제, 플루오로제닉 검출제, 효소에 의한 검출제, 또는 전기화학발광 검출제이다. 일부 구현예에서, 검출제는 헐스래디쉬 폐록시다아제 (HRP)이다.

[0068] 일부 구현예에서, 상기 ELISA는 샌드위치 ELISA이다.

[0069] 일부 구현예에서, 상기 활성제는 FOLR1 항체 huMov19를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 활성제는 FOLR1 항체 huMov19 (서열식별번호:45의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호:47의 경쇄 가변 영역을 포함함), 메이탄시노이드 DM4, 및 절단가능 설포-SPDB 링커 (IMGN853)을 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주케이트이다.

[0070] 일부 구현예에서, FOLR1 항체 huMov19, 메이탄시노이드 DM4 및 설포-SPDB 링커 (IMGN853)을 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주케이트에 의한 치료에 반응할 것처럼 암을 확인하는 방법은, IHC 분석에서 서열식별번호:27의 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호:28의 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 사용하여 FOLR1을 측정하는 것을 포함하고, 여기서 적어도 2개의 혜테로의 점수는, 암이 치료에 대한 반응할 것 같다는 것을 나타낸다.

[0071] 일부 구현예에서, FOLR1 항체 huMov19, 메이탄시노이드 DM4 및 설포-SPDB 링커 (IMGN853)을 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주케이트에 의한 치료에 반응할 것처럼 암을 확인하는 방법은, IHC 분석에서 서열식별번호:27의 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호:28의 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 사용하여 FOLR1을 측정하는 것을 포함하고, 여기서 적어도 1개의 혜테로의 점수는, 암이 치료에 대한 반응할 것 같다는 것을 나타낸다.

[0072] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 제조 물품은 하기를 포함한다: 본원에서 기재된 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 치료적 활성제, 용기, 및 상기 활성제가 증가된 발현의 FOLR1을 특징으로 하는 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다는 것을 나타내는 포장내 삽입물 또는 표지. 일부 구현예에서 본원에서 제공된 제조 물품은 하기를 포함한다: 본원에서 기재된 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 치료적 활성제, 용기, 및 활성제가 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 측정된 2, 또는 3의 수준에서 FOLR1의 발현을 특징으로 하는 암의 발현을 치료하기 위해 사용될 수 있는 것을 나타내는 포장내 삽입물 또는 표지. 일부 구현예에서, 상기 활성제의 항-FOLR1 항체는 세포독소에 접합된다. 일부 구현예에서, 포장내 삽입물 또는 표지는, 적어도 1의 점수가 증가된 발현의 FOLR1을 나타낸다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 포장내 삽입물 또는 표지는, 상기 활성제가 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 수준에서 FOLR1의 발현을 특징으로 하는 암의 발현을 치료하기 위해 사용될 수 있는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암 또는 자궁내막암이다. 일부 구현예에서, 포장내 삽입물 또는 표지는, 상기 활성제가 적어도 3, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성), 또는 적어도 3개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 수준에서 FOLR1의 발현을 특징으로 하는 암의 발현을 치료하기 위해 사용될 수 있는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.

[0073] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 조합 진단 및 약제학적 키트는 하기를 포함한다: 진단에서 사용하는 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물 및 요법에서 사용하는, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제. 일부 구현예에서, 검출 항체는 IHC에 의해 FOLR1 발현을 검출할 수 있다. 일부 구현예에서, 검출 항체는 ELISA에 의해 FOLR1 발현을 검출할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 활성제 중 항-FOLR1 항체는 세포독소에 접합된다.

[0074] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 진단 키트는 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편 또는 폴리펩타이드, 면역조직화학 (IHC)용 시약, 및 하나 이상의 표준화된 참조 샘플을 포함하고, 상기 표준화된 참조 샘플은 세포, 세포 펠렛, 또는 포르말린 고정 파라핀 포매된 조직 샘플을 포함하고, 상기 하나 이상의 표준화된 참조된 샘플은 비-FOLR1 발현, 저-FOLR1 발현, 또는 높은 FOLR1 발현 세포, 세포 펠렛, 또는 조직으로부터 유래한다.

- [0075] 일부 구현예에서, 샘플에서 분비된 FOLR1을 검출하는 면역분석 키트는 하기를 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물, 및 (b) 검출 시약. 일부 구현예에서, 본 키트는 추가로, 포착 시약용 고형 지지체를 포함한다. 일부 구현예에서, 포착 시약은 고형 지지체 상에 고정된다. 일부 구현예에서, 포착 시약은 미세적정 플레이트 상에 코팅된다. 일부 구현예에서, 검출 시약은 제2 FOLR1 항체이다. 일부 구현예에서, 검출 시약은 종 특이적 항체를 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 본 키트는 추가로, 검출 시약용 검출 수단을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 수단은 비색제이다. 일부 구현예에서, 본 키트는 추가로, 항원 표준으로서 FOLR1 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, FOLR1 폴리펩타이드는 FOLR1-Fc이다.
- [0076] 활성제가 또한 본원에서 제공된다. 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 활성제는 암이 있는 대상체에게 투여되고, 여기서 증가된 발현의 FOLR1은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드 또는 조성물을 사용하여 상기 대상체로부터 수득된 암성 샘플에서 검출되었다.
- [0077] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 방법을 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 검출로부터 FOLR1 발현 점수를 결정하는 단계로서, 상기 검출이 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; 및 (b) 상기 점수가, 환자가 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다면, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 환자에게 투여하는 단계.
- [0078] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 방법을 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 검출로부터 FOLR1 발현 점수를 결정하는 단계로서, 상기 검출이 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; 및 (b) 상기 점수가, 환자가 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다면, 건강관리 제공자에게 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 환자에게 투여하도록 지시하는 단계.
- [0079] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 방법을 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 FOLR1 발현의 검출로부터의 FOLR1 발현 점수를 결정하기 위해 암이 있는 환자로부터 수득된 암성 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 상기 점수가, 환자가 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다면, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 환자에게 투여하는 단계.
- [0080] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 방법을 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플에서 FOLR1 발현을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; (b) 상기 암성 샘플에 대한 FOLR1 발현 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 점수가, 환자가 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다면 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 환자에게 투여하는 단계.
- [0081] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 방법을 하기의 단계들을 포함한다: (a) 환자에게, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정 용량을 투여하는 단계; (b) 참조 샘플에서의 FOLR1 수준에 대해 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플에서의 FOLR1 발현 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출이 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; 및 (c) 상기 환자의 FOLR1 수준이 상승된다면, 차후의 고정 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 단계.
- [0082] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 방법은 하기를 포함하여 상기 활성제의 치료적 레지멘을 최적화하는 단계를 포함한다: (a) 증가된 용량의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제 암이 있는 대상체에게 투여하는 단계로서, 상기 대상체로부터의 암성 샘플에서의 증가된 발현의 FOLR1이 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 검출되었던 단계; 또는 (b) 감소된 용량의 활성제를 암이 있는

대상체에게 투여하는 단계로서, 상기 대상체로부터의 암성 샘플에서의 감소된 발현의 FOLR1이 검출되었던 단계.

[0083] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 방법은 하기를 포함하여 상기 활성제의 치료적 레지멘을 최적화하는 단계를 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 상기 대상체로부터의 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 검출하는 단계; (b) 상기 암성 샘플에 대한 FOLR1 발현 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 점수가 낮다면, 증가된 용량의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 상기 대상체에게 투여하거나 상기 점수가 높다면, 감소된 용량의 활성제를 상기 대상체에게 투여하는 단계.

[0084] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 여기서 암 환자에서의 FOLR1-발현 암 세포는 감소되고, 여기서: (a) 환자로부터 수득된 암성 샘플에서의 FOLR1 수준은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 참조 샘플에서의 FOLR1 수준과 비교하여 검출되고; 그리고 (b) 고정 용량의 활성제는, 상기 환자의 FOLR1 수준이 상승된다면 환자에게 투여되고; 상기 활성제의 투여는 상기 환자에서 FOLR1-발현 암 세포의 수를 감소시킨다.

[0085] 일부 구현예에서, 활성제는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위해 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 여기서 암 환자에서의 FOLR1-발현 암 세포는 감소되고, 여기서: (a) 고정 용량의 활성제는 암이 있는 환자에게 투여되고; (b) 상기 환자로부터 수득된 암성 샘플에서의 FOLR1 수준은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 참조 샘플에서의 FOLR1 수준에 대해 검출되고; 그리고 (c) 차후의 고정 용량의 양 또는 빈도는, 상기 환자의 FOLR1 수준이 참조 샘플과 비교하여 상승된다면 증가되고; 상기 활성제의 투여는 상기 환자에서 FOLR1-발현 암 세포의 수를 감소시킨다.

[0086] 사용되는 항-FOLR1 항체 및 그것의 항원-결합 단편은 모니터링 방법이고 진단 방법이 본원에서 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 환자에서 고정 용량의 활성제의 치료적 효능을 모니터링하는 방법에서 사용되는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 제공되고, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 암이 있는 환자로부터의 생물학적 샘플에서 제1 FOLR1 수준을 검출하는 단계; (b) 상기 환자에게 고정 용량의 활성제를 투여하는 단계; (c) 활성제의 투여 다음에 환자로부터의 생물학적 샘플에서 제2 FOLR1 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 수행되는 단계; 및 (d) 상기 제2 FOLR1 수준을 상기 제1 FOLR1 수준과 비교하는 단계; 상기 제1 및 제2 FOLR1 수준의 감소는 치료적 효능을 나타낸다.

[0087] 일부 구현예에서, 암이 있는 대상체는 낮은 용량 항-FOLR1 치료 레지멘에 반응하는지를 진단하는 방법에 사용되는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 제공되고, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 상기 암으로부터의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물과 접촉시키는 단계; (b) 상기 항체, 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드의 상기 (a)의 생물학적 샘플에의 결합을 검출하는 단계; (c) 점수를 상기 단계 (b)의 결합에 배정하는 단계로서, 상기 점수는 하나 이상의 참조 샘플과의 비교를 기반으로 배정되는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)에서의 점수를 참조 조직 또는 세포의 점수와 비교하는 단계로서, 상기 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 더 큰 암 FOLR1 수준의 점수 또는 높은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수 이상의 상기 암 FOLR1 수준의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 낮은 용량의 활성제에 반응하는 것처럼 상기 암을 확인하는 단계.

[0088] 일부 구현예에서, 암이 항-FOLR1 치료에 의한 치료에 민감한지를 진달하는 방법에 사용되는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 제공되고, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 상기 암으로부터의 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 하나 이상의 참조 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여, FOLR1 발현 암성 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 방법의 사용을 포함하는 단계; (b) 상기 암성 샘플에 대한 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 결정된 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성 점수를 적어도 하나의 참조 샘플에서 FOLR1 단백질 발현을 측정하여 결정된 상대적인 값과 비교하는 단계로서, 상기 적어도 하나의 참조 샘플은 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감하지 않는 조직, 세포, 또는 세포 펠렛 샘플이고 그리고 상기 상대적인 값보다 더 높은, 단계 (b)에서 결정된 상기 암성 샘플의 FOLR1 염색 세기 점수는 상기 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 상기 암을 확인하는 단계.

[0089] 일부 구현예에서, 암이 항-FOLR1 치료에 의한 치료에 대해 민감한지를 진단하는 방법에서 사용하는 항-FOLR1

항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 제공되고, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함한다: (a) 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물을 사용하여 상기 암으로부터의 암성 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 검출하는 단계로서, 상기 검출은 하나 이상의 참조 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여, FOLR1 발현 암성 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 방법의 사용을 포함하는 단계; (b) 상기 암성 샘플에 대한 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 결정된 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성 점수를 적어도 하나의 참조 샘플에서 FOLR1 단백질 발현을 측정하여 결정된 상대적인 값과 비교하는 단계로서, 상기 적어도 하나의 참조 샘플은 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 조직, 세포, 또는 세포 펠렛 샘플이고 상기 상대적인 값보다 더 높은, 단계 (b)에서 결정된 상기 암성 샘플의 FOLR1 염색 세기 점수는 상기 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로서 상기 암을 확인하는 단계.

- [0090] 일부 구현예에서, 상기 활성제 또는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 사용은 추가로, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-단편을 포함하는 활성제를 암성 샘플 또는 생물학적 샘플이 수득된 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0091] 일부 구현예에서, 상기 암성 샘플 또는 생물학적 샘플은 체액, 세포, 또는 조직 샘플이다. 일부 구현예에서, 세포는 순환 종양 세포이다. 일부 구현예에서, 체액은 혈액, 복수, 소변, 혈장, 혈청, 또는 말초 혈액이다.
- [0092] 상기 활성제 또는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 일부 구현예에서, 검출은 효소 연결된 면역흡착 분석 (ELISA) 및/또는 by 면역조직화학 (IHC)에 의한다. 일부 구현예에서, 상기 IHC는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있는 보정된 IHC이다. 일부 구현예에서, IHC는 낮은 세포 표면 FOLR1 발현, 중간 FOLR1 세포 표면 발현, 또는 높은 FOLR1 세포 표면 발현을 갖는 샘플의 염색 세기의 범위를 생성한다. 일부 구현예에서, IHC는 참조 샘플과 비교된 FOLR1 발현 암성 샘플 또는 생물학적 샘플에서 염색 세기 및 염색 균일성을 구별한다. 일부 구현예에서, IHC는 수작업으로 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 IHC는 자동화된 시스템을 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, FOLR1 점수는 IHC로부터 결정된다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 항체 또는 항원-결합 단편에 의한 IHC는 증가된 FOLR1 발현을 갖는 세포에 대한 염색 범위, 특히 2 이상의 염색 범위 내의 것을 생성한다.
- [0093] 일부 구현예에서, 적어도 2의 점수는, 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암 또는 자궁내막암이다.
- [0094] 일부 구현예에서, 적어도 3의 점수는, 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다 일부 구현예에서, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 3개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.
- [0095] 일부 구현예에서, 적어도 2의 점수는, 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 환자가 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 투여로부터 유익할 것이라는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.
- [0096] 일부 구현예에서, 적어도 2의 점수는, 감소된 용량의 활성제가 투여되어야 한다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 2개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는, 감소된 용량의 활성제가 투여되어야 한다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.
- [0097] 일부 구현예에서, 적어도 2의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것으로서 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성) 또는 2 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것으로서 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.
- [0098] 일부 구현예에서, 적어도 3의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것으로서 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 3개의 혜테로 (25-75% 균일성)의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것으로서 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.
- [0099] 일부 구현예에서, 적어도 2의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것으로서 암을 확인한다. 일부 구현

예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 2개의 헤테로 (25-75% 균일성)의 점수는 낮은 용량 항-FOLR1 치료에 반응하는 것으로서 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.

[0100] 일부 구현예에서, 적어도 2의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 2개의 헤테로 (25-75% 균일성)의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암 또는 자궁내막암이다.

[0101] 일부 구현예에서, 적어도 3의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 3개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 3개의 헤테로 (25-75% 균일성)의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.

[0102] 일부 구현예에서, 적어도 2의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 호모 (>75% 균일성) 또는 적어도 2개의 헤테로 (25-75% 균일성)의 점수는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제에 의한 치료에 민감한 것으로 암을 확인한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 자궁내막암, 또는 난소암이다.

[0103] 일부 구현예에서, 참조 샘플은 양성 참조 샘플 또는 음성 참조 샘플이다. 일부 구현예에서, 참조 샘플은 세포, 세포 펠렛, 또는 조직을 포함한다.

[0104] 본원에서 제공된 사용을 위한 활성제 또는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 일부 구현예에서, 항체, 항원-결합 단편, 또는 본원에서 제공된 폴리펩타이드는 추가로, 효소, 형광단, 방사성 표지, 및 발광단으로 이루어진 군으로부터 선택된 검출 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 시약은 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레신, 삼중수소, 및 로다민으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0105] 본원에서 제공된 사용을 위한 활성제 또는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 일부 구현예에서, 상기 암은 FOLR1 양성 암이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 난소, 뇌, 유방, 자궁, 자궁내막, 췌장, 신장, 및 폐 암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 폐암은 비소세포 폐암 또는 세기관지폐포 암종이다. 일부 구현예에서, 상기 난소암은 상피성 난소암이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 백금 내성있고, 재발되거나, 또는 난치성이다.

[0106] 본원에서 제공된 사용을 위한 활성제 또는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 일부 구현예에서, FOLR1 발현은 적어도 하나의 추가의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, FOLR1 발현은 2개의 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 사용하여 측정된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 고형 지지체에 결합된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 미세적정 플레이트에 결합된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 검출제를 포함한다. 일부 구현예에서, 검출제는 발색 검출제, 플루오로제닉 검출제, 효소에 의한 검출제, 또는 전기화학발광 검출제이다. 일부 구현예에서, 검출제는 홀스래디쉬 폐록시다아제 (HRP)이다. 일부 구현예에서, 상기 ELISA는 샌드위치 ELISA이다.

[0107] 본원에서 제공된 사용을 위한 활성제 또는 항-FOLR1 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 일부 구현예에서, 상기 활성제는 FOLR1 항체 huMov19을 포함하거나 FOLR1 항체 huMov19이다. 일부 구현예에서, 상기 활성제는 메이탄시노이드 DM4 및 절단가능 설포-SPDB 링커 (IMGN853)을 추가로 포함하는 항체 메이탄시노이드 콘주케이트로서 투여된다.

[0108] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 항체, 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물은 진단으로서 사용하기 위한 것이다.

[0109] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 항체, 항원-결합 단편, 폴리펩타이드, 또는 조성물은 암이 있는 환자에서 암을 진단하는 방법에서 사용하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 상승된 수준의 FOLR1와 관련되어 있다.

[0110] 일부 구현예에서, 상기 항체, 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드의 결합 친화도는 실시예 3에서 수득되고/거나 도 4, 5, 및/또는 6에서 보여진 결합 친화도이다.

도면의 간단한 설명

[0111]

도 1은 353.2-1 및 353.9-20 항체를 이용한 NSCLC 및 난소 자궁내막모양 선암종 샘플의 IHC 염색 이미지를 제공한다.

도 2는 353.2-1 및 353.9-20 항체를 이용한 정상 침샘 및 췌장 샘플의 IHC 염색 이미지를 제공한다.

도 3은 353.9-21, 353.2-1, 353.3-8, 및 353.5-7 항체를 이용한 세포 용해액의 웨스턴 블랏 이미지를 제공한다.

도 4는 형광 활성화된 세포 정렬기(FACS)를 이용한 변성된 KB 세포(A) 및 변성되지 않은 T47D 세포(B)에 대한 353.2-1, 353.3-1, 353.5-7, 및 353.9-21 항체의 결합을 나타낸다.

도 5는 ELISA를 이용한 재조합 인간 FOLR1에 대한 353.2-1, 353.3-1, 353.5-7, 및 353.9-21 항체의 결합을 나타낸다.

도 6은 ELISA에 의한 항-FOLR2 항체 및 353.2-1, 353.3-1, 353.5-7, 및 353.9-21 항체의 FOLR2에 대한 결합(A) 및 항-FOLR3 항체 및 353.2-1, 353.3-1, 353.5-7, 및 353.9-21 항체의 FOLR3에 대한 결합(B)을 나타낸다.

도 7은 ELISA에 의한 탈당화 및 미처리 재조합 인간 FOLR1에 대한 항-FOLR1 항체 2.1 및 huMov19의 결합을 나타낸다.

도 8은 웨스턴 블랏 분석에 의한 KB 및 Igrov-1 세포의 탈당화 및 미처리 용해액에 대한 항-FOLR1 항체 2.1, huMov19, 및 BN3.2의 결합을 나타낸다.

도 9는 항-FOLR1 FRIHC2-1 항체의 재표면화에 대한 관련 아미노산 및 각각의 잔기에 대응하는 카밧 위치를 나타낸다.

도 10은 재표면화를 위한 쥐과 및 인간화 FRIHC2-1 항체 서열의 정렬을 나타낸다. 쥐과 중쇄 및 경쇄 서열은 각각 서열식별번호: 27 및 서열식별번호: 28에 대응한다. 재표면화된 인간화 중쇄 서열은 서열식별번호: 62에 대응하며, 재표면화된 인간 경쇄 버전 1.0 및 버전 1.1 서열은 각각 서열식별번호: 63 및 서열식별번호: 64에 대응한다. 경쇄 서열에서의 리더 "S"(프레임워크 위치-1)는 인간화를 위해 고려되지 않으며 인간화 항체 서열에서 사용되지 않으므로, 도면에 도시되지 않는다.

도 11은 항-FOLR1 FRIHC2-1 항체의 CDR 그라프팅에 대한 관련 아미노산 및 각각의 잔기에 대응하는 카밧 위치를 나타낸다.

도 12는 CDR 그라프팅을 위한 쥐과 및 인간화 FRIHC2-1 서열의 정렬을 나타낸다. 쥐과 중쇄 및 경쇄 서열은 각각 서열식별번호: 27 및 서열식별번호: 28에 대응한다. 그라프팅된 인간화 중쇄 서열은 서열식별번호: 65에 대응하며, 그라프팅된 인간 경쇄 버전 1.0 및 버전 1.1 서열은 각각 서열식별번호: 66 및 서열식별번호: 67에 대응한다. 경쇄 서열에서의 리더 "S"(프레임워크 위치-1)는 인간화를 위해 고려되지 않으며 인간화 항체 서열에서 사용되지 않으므로, 도면에 도시되지 않는다.

도 13은 다양한 희석도로 FOLR1-2.1(353-2.1) 항체를 사용한 폐 선암종 조직의 IHC 염색 이미지를 제공한다.

도 14는 FOLR1-2.1(353-2.1) 항체를 이용한 양성 정상 조직(나팔관)(A) 및 세포(FOLR1 전달감염된 세포(B)) 및 음성 세포(전달감염되지 않은 세포(C))의 IHC 염색 이미지를 제공한다.

도 15는 FOLR1-2.1(353-2.1) 항체를 이용한 난소암 조직(A) 및 폐 선암종 조직(B)의 IHC 염색 이미지를 제공한다.

도 16은 FOLR1-2.1 분석을 이용한 자궁내막암 샘플에서 종양 세포의 막 염색을 나타낸다. 기질 세포는 염색되지 않는다.

도 17은 (A) FOLR1-2.1 분석 및 (B) BN3.2 분석 간 염색 및 스코어링 차이의 비교를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0112]

발명의 상세한 설명

[0113]

본 개시내용은 막 FOLR1, 훌린 FOLR1, 및 순환 종양 세포 상 FOLR1을 포함하는 인간 엽산 수용체 1(FOLR1)을 검

출하고, FOLR1의 과발현을 특징으로 하는 암 치료의 효능 또는 이에 대한 반응 가능성을 개선하는 방법을 제공한다. 검출 방법은 FOLR1의 임상적으로 관련된 동적 범위를 검출할 수 있고, 이에 따라 환자 계층화를 위해, FOLR1의 과발현을 특징으로 하는 암 치료의 치료적 효능 또는 이에 대한 반응 가능성을 모니터링하거나 결정하기 위해 사용될 수 있다. 신규한 FOLR1-결합 폴리펩타이드, 예컨대 FOLR1 검출 방법(예를 들면, 막 결합된 및 세포 관련된 FOLR1에 대한 IHC)에서 유용한 항체가 또한 개시된다. 관련된 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드, FOLR1-결합체를 포함하는 조성물, 및 FOLR1-결합체의 제조 방법이 또한 제공된다.

[0114] I. 정의

본 발명의 이해를 촉진하기 위해, 여러 용어 및 어구가 아래에서 정의된다.

[0116] 용어들 "인간 엽산 수용체 1", "FOLR1", 또는 "엽산 수용체 알파(FR-α)"는 본원에서 사용된 바와 같이, 다르게 지적되지 않으면 임의의 원상태 인간 FOLR1을 나타낸다. 따라서, 이들 용어들은 모두 본원에 명시된 단백질 또는 핵산 서열을 나타낼 수 있다. 용어 "FOLR1"은 "전장", 가공되지 않은 FOLR1뿐만 아니라 세포 내 가공에서 야기되는 임의 형태의 FOLR1을 포괄한다. 용어는 또한 FOLR1 단백질 또는 핵산의 천연 발생 변이체, 예를 들면, 스플라이스 변이체, 대립유전자 변이체 및 아이소형을 포괄한다. 본원에 기재된 FOLR1 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 다양한 공급원, 예컨대 인간 조직 유형 또는 또 다른 공급원으로부터 단리되거나, 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. FOLR1 서열의 예에는 비제한적으로 NCBI 참조 번호 P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1, 및 NP_057936.1이 포함된다.

[0117] 용어들 "흘린 항원" 및 "흘린 FOLR1"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어들은 가용성이고 세포에 관련되지 않은 FOLR1 단백질을 나타낸다. 일부 구현예에서, 여기에는 세포의 도메인(ECD) 및 글리코실포스파티딜 이노시톨(GPI) 링커가 포함된다. 일부 구현예에서, 흘린 FOLR1에는 ECD만 포함된다. FOLR1 단백질에는 신호 펩타이드(아미노산 1-24), FOLR1 단백질 사슬(아미노산 25-233 또는 234), 및 절단될 수 있는 프로펩타이드(아미노산 235 내지 257)가 포함된다. 성숙 FOLR1 단백질에는 신호 펩타이드가 없다. 흘린 FOLR1에는 아미노산 1 내지 257, 1 내지 233, 1 내지 234, 25 내지 233, 25 내지 234 또는 그것의 임의의 다른 단편이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 서열은 절단된다. 다른 구현예에서, ECD 및 GPI 부분은 막(예를 들면, 가용성 지질 래프팅부)에 임베딩될 수 있다. 일부 구현예에서, 흘린 FOLR1에는 아미노산 1-233 또는 그것의 단편이 포함될 수 있다.

[0118] 용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내에서 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 단백질, 폴리펩타이드, 웨타이드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 또는 상기의 조합을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 온전한 다클론성 항체, 온전한 단클론성 항체, 항체 단편(예컨대 Fab, Fab', F(ab')2, 및 Fv 단편), 단일 사슬 Fv(scFv) 변종, 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체, 키메라성 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정부를 포함하는 융합 단백질 및 항체가 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 개질된 면역글로불린 분자를 포괄한다. 항체는 각각 알파, 엘타, 엡실론, 감마, 및 뮤로 불리는 이들의 종쇄 불변 도메인의 동일성에 기반하여, 면역글로불린의 5 가지 주 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 또는 이들의 서브클래스(아이소타입) (예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 중 임의의 것일 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린은 상이하고 잘 알려진 서브유닛 구조 및 3차원 입체배치를 갖는다. 항체는 네이키드 항체이거나 다른 분자, 예컨대 독소, 방사선동위원소 등에 접합될 수 있다.

[0119] 일부 구현예에서, 항체는 비-천연 발생 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 천연 성분으로부터 정제된다. 일부 구현예에서, 항체는 재조합적으로 생산된다. 일부 구현예에서, 항체는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0120] "차단" 항체 또는 "길항체" 항체는 이것에 결합하는 항원, 예컨대 FOLR1의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 것이다. 어떤 구현예에서, 차단 항체 또는 길항체 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 바람직하게는, 생물학적 활성은 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 100% 감소된다.

[0121] 용어 "항-FOLR1 항체" 또는 "FOLR1에 결합하는 항체"는 항체가 FOLR1의 표적화에서 진단제 및/또는 치료제로 유용하도록 충분한 친화도로 FOLR1에 결합할 수 있는 항체를 나타낸다. 다르게 구체화되지 않으면, 관련없는, 비-FOLR1 단백질에 대한 항-FOLR1 항체의 결합 정도는, 예를 들면 방사선면역분석(RIA)에 의해 측정되는 항체의 FOLR1에 대한 결합의 약 10% 미만이다. 어떤 구현예에서, FOLR1에 결합하는 항체의 해리 상수(K_d)는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$, 또는 $\leq 0.1 nM$ 이다. 일부 구현예에서, 항-FOLR1 항체는 FOLR2, FOLR3, FOLR4, 또

는 업산에 결합하지 않는다. FOLR1 항체의 예는 당해기술에 공지되어 있고 미국 공개 출원 번호 2012/0009181 및 2012/0282175 및 미국 출원 번호 61/695,791 및 61/756,254, 및 PCT 공개 WO2011/106528에 개시되며, 이들 각각은 본원에 참조로 편입된다. 항-FOLR1 항체 및 그것의 항원-결합 단편의 서열은 표 1-8에 제공된다.

[0122]

용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부를 나타내며, 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 나타낸다. 항체 단편의 예에는 비제한적으로, Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 선형 항체, 단일 사슬 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다. 용어 항체의 "항원-결합 단편"에는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편이 포함된다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 특정 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 용어 항체의 "항원-결합 단편" 내에 포함된 결합 단편의 예에는 (비제한적으로): (i) Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH1 도메인의 1가 단편(예를 들면, 과파인에 의해 소화된 항체는 3 개 단편: 2 개의 항원-결합 Fab 단편, 및 항원에 결합하지 않는 1 개의 Fc 단편을 산출함); (ii) F(ab')₂ 단편, 헌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편(예를 들면, 웨신에 의해 소화된 항체는 2 개의 단편: 2가 항원-결합 F(ab')₂ 단편, 및 항원에 결합하지 않는 pFc' 단편을 산출함) 및 그것의 관련된 F(ab') 1가 단위; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편(즉, Fab에 포함되는 중쇄의 일부); (iv) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, 및 관련된 디설파이드 연결된 Fv; (v) VH 도메인으로 구성된 dAb(도메인 항체) 또는 sdAb(단일 도메인 항체) 단편(Ward 등, *Nature* 341:544-546, 1989); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)이 포함된다.

[0123]

"단클론성 항체"는 단일 항원 결정기, 또는 에피토프의 매우 특이적인 인식 및 결합에 관여된 동종성 항체 집단을 나타낸다. 이것은 전형적으로 상이한 항원 결정기에 대해 유도된 상이한 항체가 포함되는 다클론성 항체와 대비된다. 용어 "단클론성 항체"는 온전한 및 전장 단클론성 항체 둘 다 뿐만 아니라 항체 단편(예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬(scFv) 변종, 항체부를 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 개질된 면역글로불린 분자를 포함한다. 더욱이, "단클론성 항체"는 비제한적으로 하이브리도마, 파아지 선택, 재조합 발현, 및 트랜스체닉 동물에 의한 것을 포함하는 임의의 수의 방식으로 제조된 그와 같은 항체를 나타낸다.

[0124]

용어 "인간화 항체"는 특이적 면역글로불린 사슬, 키메라성 면역글로불린, 또는 최소 비-인간(예를 들면, 쥐과) 서열을 함유하는 그것의 단편인 비-인간(예를 들면, 쥐과) 항체 형태를 나타낸다. 전형적으로, 인간화 항체는 상보적 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 비-인간 종(예를 들면, 마우스, 랫트, 토끼, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체되는 인간 면역글로불린이다(Jones 등, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann 등, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen 등, 1988, *Science*, 239:1534-1536). 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 원하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 비-인간 종으로부터의 항체에서 대응하는 잔기로 대체된다. 인간화 항체는 항체 특이성, 친화도, 및 능력을 정령하고 최적화하기 위해 Fv 프레임워크 영역에서 및/또는 대체된 비-인간 잔기 내에서 추가 잔기의 치환에 의해 추가 개질될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 면역글로불린에 대응하는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역, 반면에 인간 면역글로불린 공통 서열의 것인 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역을 함유하는 적어도 1 개, 전형적으로 2 개 또는 3 개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것이다. 인간화 항체는 또한 전형적으로 인간 면역글로불린의 것인 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 인간화 항체를 산출하기 위해 사용된 방법의 예는 [미국 특허 5,225,539 및 5,639,641, Roguska 등, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973(1994), 및 Roguska 등, Protein Eng. 9(10):895-904(1996)]에 기재된다. 일부 구현예에서, "인간화 항체"는 재표면화된 항체이다. 일부 구현예에서, "인간화 항체"는 CDR-그라프팅된 항체이다.

[0125]

항체의 "가변 영역"은 단독으로 또는 조합되어 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 나타낸다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 초가변성 영역으로도 공지된 3 개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된 4 개의 프레임워크 영역(FR)으로 구성된다. 각 사슬 내의 CDR은 FR에 의해 가까운 인근에 함께 보유되며, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위해 적어도 2 개의 기술이 존재한다: (1) 교차종 서열 가변성에 기반한 접근법(즉, 카밧 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기반한 접근법(Al-lazikani 등(1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). 또한, 이들 두 접근법의 조합은 때때로 CDR을 결정하기 위해 당해기술에서 사용된다.

[0126]

카밧 넘버링 시스템은 가변 도메인 내 잔기(대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)에 대해 언급할 때

일반적으로 사용된다(예를 들면, 카밧 등, Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)).

[0127] 카밧에서와 같은 아미노산 위치 넘버링은 [카밧 등, Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)]에서의 항체 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 상기 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 내로의 삽입에 대응하는 더 적거나 더 많은 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들면, 중쇄 가변 도메인에는 H2의 잔기 52 뒤에 단일 아미노산 삽입(카밧에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 뒤에 삽입된 잔기(예를 들면, 카밧에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)가 포함될 수 있다. 잔기의 카밧 넘버링은 "표준" 카밧 넘버링된 서열과 항체 서열의 상동성 서열에서의 정렬에 의해 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다. 코티아는 대신에 구조적 루프의 위치를 나타낸다(Cooley and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)). 코티아 CDR-H1 루프의 말단은 카밧 넘버링 관례를 이용해서 넘버링되는 경우, 루프의 길이에 따라 H32 및 H34 사이에서 변한다(이것은 카밧 넘버링 방식이 H35A 및 H35B에 삽입을 배치하기 때문이다; 35A도 35B도 존재하지 않는 경우, 루프는 32에서 끝난다; 35A만 존재하는 경우, 루프는 33에서 끝난다; 35A 및 35B가 둘 다 존재하는 경우, 루프는 34에서 끝난다). AbM 초가변성 영역은 카밧 CDR 및 코티아 구조적 루프 간 절충을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다.

루프	카밧	AbM	코티아
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 (카밧 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0128]

[0129] 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생산된 항체 또는 당해기술에 공지된 임의의 기술을 이용해서 제조된 인간에 의해 생산된 항체에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체의 상기 정의에는 온전한 또는 전장 항체, 그것의 단편, 및/또는 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체, 예컨대 쥐과 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 포함된다.

[0130]

용어 "키메라성 항체"는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 2 이상의 종으로부터 유도되는 항체를 나타낸다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변 영역이 원하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 포유동물의 한 종(예를 들면, 마우스, 랫트, 토끼 등)으로부터 유도된 항체의 가변 영역에 대응하는 반면, 불변 영역은 그 종에서 면역 반응의 생성을 배제하기 위해 또 다른 종(보통 인간)으로부터 유도된 항체 내 서열과 상동성이다.

[0131]

용어들 "에피토프" 또는 "항원 결합기"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 특정한 항체에 의해 인식되고 특이적으로 결합될 수 있는 항원 부분을 나타낸다. 항원이 폴리펩타이드인 경우, 에피토프는 단백질의 3 차 폴딩에 의해 나란히 놓인 인접 아미노산 및 비인접 아미노산 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성 시 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성 시 소실된다. 에피토프에는 전형적으로 독특한 공간 입체형태 내에 적어도 3 개, 보다 일반적으로는 적어도 5 개 또는 8-10 개 아미노산이 포함된다.

[0132]

"결합 친화도"는 일반적으로 분자(예를 들면, 항체)의 단일 결합 부위 및 그것의 결합 파트너(예를 들면, 항원) 간 비공유 상호작용의 총합 강도를 나타낸다. 다르게 지시되지 않으면, 본원에서 사용된 바와 같이 "결합 친화도"는 결합 쌍 멤버(예를 들면, 항체 및 항원) 간 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 나타낸다. 분자 X의 그 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(Kd) 또는 최대-절반 유효 농도(EC50)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본 명세서에서 기재된 것을 포함하는 당해분야에서 공지된 일반적인 방법에 의해 측정될 수 있

다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원에 서서히 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로 항원에 더 빨리 결합하고 더 오래 결합된 채 유지되는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법은 당해기술에 공지되어 있고, 이들 중 임의의 것이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 구현예가 본원에 기재되어 있다.

[0133] 결합 친화도를 나타내기 위해 본원에서 사용되는 "또는 그보다 우수한"은 문자 및 그것의 결합 파트너 간에 더 강한 결합을 나타낸다. 본원에서 사용되는 "또는 그보다 우수한"은 더 작은 수치적 Kd 값으로 나타내는, 더 강한 결합을 나타낸다. 예를 들면, "0.6 nM 또는 그보다 우수한" 항원 친화도를 갖는 항체에 있어서, 항원에 대한 항체의 친화도는 0.6 nM 미만, 즉, 0.59 nM, 0.58 nM, 0.57 nM 등이거나 0.6 nM 미만의 임의의 값이다. 일 구현예에서, Kd로 결정되는 항체의 친화도는 약 10^{-3} 내지 약 10^{-12} M, 약 10^{-6} 내지 약 10^{-11} M, 약 10^{-6} 내지 약 10^{-10} M, 약 10^{-6} 내지 약 10^{-9} M, 약 10^{-6} 내지 약 10^{-8} M, 또는 약 10^{-6} 내지 약 10^{-7} M일 것이다.

[0134] 어구 "실질적으로 유사한", 또는 "실질적으로 동일한"은 본원에서 사용된 바와 같이, 당해분야의 숙련가가 두 값 간 차이를 상기 값(예를 들면, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락에서 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 고려하도록 하는, 두 수치값(일반적으로 본 발명의 항체와 관련된 것 및 참조/대조 항체와 관련된 다른 것) 간 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 상기 두 값 간 차이는 참조/대조 항체에 대한 값의 함수로서 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 또는 약 10% 미만이다.

[0135] 용어 "면역접합체" 또는 "접합체"는 본원에서 사용된 바와 같이 세포 결합제(즉, 항-FOLR1 항체 또는 그것의 단편)에 연결되는 화합물 또는 그것의 유도체를 나타내며, 일반식: A-L-C에 의해 정의된다(여기서, C = 세포독소, L = 링커, 및 A = 세포 결합제 또는 항-FOLR1 항체 또는 항체 단편임). 면역접합체는 또한 역순의 일반식: C-L-A에 의해서도 정의될 수 있다.

[0136] "링커"는 화합물, 보통 약물, 예컨대 메이탄시노이드를 안정한 공유 방식으로 세포-결합제, 예컨대 항-FOLR1 항체 또는 그것의 단편에 연결할 수 있는 임의의 화학적 모이어티이다. 링커는 화합물 또는 항체가 활성을 유지하는 조건 하에 산-유도된 절단, 광-유도된 절단, 펩티다제-유도된 절단, 에스테라제-유도된 절단, 및 디설파이드 결합 절단에 민감할 수도 있고 실질적으로 내성이 있을 수도 있다. 적합한 링커는 당해기술에서 잘 알려져 있고, 예를 들면, 디설파이드 그룹, 티오에테르 그룹, 산 불안정한 그룹, 광불안정한 그룹, 펩티다제 불안정한 그룹 및 에스테라제 불안정한 그룹이 포함된다. 링커에는 또한 본원에 기재되고 당해기술에 공지된 하전된 링커, 및 그의 친수성 형태가 포함된다.

[0137] "단리된" 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 자연에서 발견되지 않는 형태의 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물이다. 단리된 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포 또는 조성물에는 더 이상 자연에서 발견되는 형태가 아닌 정도로 정제된 것들이 포함된다. 일부 구현예에서, 단리된 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 실질적으로 순수하다.

[0138] 본원에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 순수한"은 적어도 50% 순수한(즉, 오염물질이 없는), 적어도 90% 순수한, 적어도 95% 순수한, 적어도 98% 순수한, 또는 적어도 99% 순수한 물질을 나타낸다.

[0139] 용어들 "상승된" FOLR1, FOLR1의 "증가된 발현" 및 FOLR1의 "과발현"은 상승된 수준의 FOLR1 발현을 포함하는 샘플을 나타낸다. FOLR1은 대조군 값(예를 들면, 암이 없는 대상체로부터의 생물학적 샘플, 조직, 또는 세포, FOLR1을 발현하지 않거나 낮게 발현하는 것으로 공지된 샘플 또는 암, 정상 샘플, 또는 상승된 FOLR1 값을 갖지 않는 암에서의 발현 수준)에 비해 상승되거나, 증가되거나, 과발현될 수 있다. 예를 들면, 증가된 발현을 갖는 샘플은 대조군 값에 비해 적어도 2-배, 적어도 3-배, 또는 적어도 5-배 증가를 포함할 수 있다.

[0140] FOLR1 발현은 면역조직화학에 의해 측정되고, 정의된 스코어를 나타내는 보정된 대조군에 대한 비교에 의해 염색 세기 스코어 또는 염색 균일성 스코어로 주어질 수 있다(예를 들면, 세기가 수준 3으로 보정된 대조군에 필적하는 경우, 시험 샘플에 세기 3의 스코어가 주어지거나, 세기가 수준 2로 보정된 대조군에 필적하는 경우, 시험 샘플에 세기 2의 스코어가 주어짐). 예를 들면, 면역조직화학에 의한 스코어 1, 2, 또는 3(3+), 바람직하게는 스코어 2, 또는 3(3+)은 FOLR1의 증가된 발현을 시사한다. 이종성 또는 동종성인 염색 균일성도 FOLR1 발현을 시사한다. 염색 세기 및 염색 균일성 스코어는 단독으로 또는 조합되어(예를 들면, 2 호모, 2 혜테로, 3 호모, 3 혜테로 등) 사용될 수 있다. 표 11을 참고하라. 또 다른 예에서, FOLR1 발현 증가는 대조군 값(예를 들면, 암이 없거나 상승된 FOLR1 값을 갖지 않는 암을 갖는 대상체로부터의 조직 또는 세포 내 발현 수준) 대비 적어도 2-배, 적어도 3-배, 또는 적어도 5-배 증가의 겹출에 의해 결정될 수 있다.

[0141]

"참조 샘플"은 시험 샘플로부터 본 발명의 방법에서 수득된 결과를 연관시키고 비교하기 위해 사용될 수 있다. 참조 샘플은 세포(예로, 세포주, 세포 펠렛) 또는 조직일 수 있다. "참조 샘플"에서의 FOLR1 수준은 FOLR1의 절대적인 또는 상대적인 양, 양의 범위, 최소 및/또는 최대 양, 평균 양, 및/또는 중위 양일 수 있다. "참조 샘플"은 또한 시험 샘플이 비교되는 FOLR1 발현의 기준선으로 작용할 수 있다. "참조 샘플"에는 동일한 환자로부터의 이전 샘플 또는 기준선 샘플, 공지된 FOLR1 발현의 수준을 갖는 정상 참조, 또는 공지된 FOLR1 발현의 수준을 갖는 관련 환자 집단으로부터의 참조가 포함될 수 있다. FOLR1 수준은 또한 표준 곡선에서의 값으로 표현될 수 있다. 표준 곡선은 샘플 내 FOLR1 농도를 결정하기 위한 분석 데이터의 정량적 플롯팅 방법이다. 일부 구현예에서, 참조 샘플은 정제된 FOLR1 또는 FOLR1-Fc를 포함하는 항원 표준이다. 본 발명의 진단 방법에는 시험 샘플에서의 FOLR1의 발현 수준 및 "참조 값" 간 비교가 관여될 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 값은 참조 샘플에서의 FOLR1의 발현 수준이다. 참조 값은 소정 값일 수 있고, 또한 시험 샘플과 병렬적으로 시험된 참조 샘플(예를 들면, 대조군 생물학적 샘플 또는 참조 샘플)로부터 결정될 수 있다. 참조 값은 단일 컷오프 값, 예컨대 값의 중위 또는 평균 또는 범위, 예컨대 신뢰도 구간일 수 있다. 참조 값은 다양한 하위그룹의 개인, 예컨대 암에 취약한 개인, 초기 또는 후기 단계 암을 가진 개인, 남성 및/또는 여성 개인, 또는 암 요법을 받고 있는 개인에 대해 구축될 수 있다. 정상 참조 샘플 또는 값 및 양성 참조 샘플 또는 값의 예가 본원에 기재되며, 또한 본원에 참조로 편입된 WO 2012/135675의 실시예 1 및 실시예 8-10에 기재된다.

[0142]

일부 구현예에서, 참조 샘플은 건강한 조직, 특히 암에 의해 영향 받지 않은 대응하는 조직 또는 FOLR1을 과발현하는 암에 의해 영향 받지 않은 대응하는 조직 또는 검출가능한 수준의 FOLR을 발현하지 않는 것으로 공지된 대응하는 건강한 조직으로부터의 샘플이다. 이들 유형의 참조 샘플은 음성 대조군 샘플 또는 "정상" 참조 샘플로 불린다. 다른 구현예에서, 참조 샘플은 검출가능한 FOLR1을 발현하는 건강한 조직 또는 종양으로부터의 샘플이다. 이들 유형의 참조 샘플은 양성 대조군 또는 양성 참조 샘플로 불린다. 양성 대조군 샘플은 또한 염색 세기의 유형(혜테로 대 호모) 및/또는 정도(0, 1, 2, 3)에 대한 대조 지표로서 사용될 수 있고, 이는 FOLR1 발현 수준과 연관된다. 양성 대조군 대조 샘플은 또한 보정된 참조 샘플로 불린다. 저- 또는 비-FOLR1 발현 참조가 본원에서 실시예에 기재되며, 또한 모든 구조의 식도, 췌장의 샘파리 세포/소도, 폐의 폐포간 결합 조직, 및 침샘의 샘파리 세포가 포함된다. 세포주에 있어서, 예시적인 비-발현자에는 BxPC3, Panc-1, 및 ASPC1이 포함된다. 양성 FOLR1 참조는 본원에서, 예를 들면 실시예에 기재되며, 또한 췌장 관, 정상 폐의 호흡기 상피, 및 침샘의 사이관이 포함된다. 일부 구현예에서, 양성 FOLR1 참조에는 췌장 관 및 침샘의 사이관이 포함된다. 세포주에 있어서, 예시적인 높은 FOLR1 발현자가 본원에, 예를 들면 실시예에 기재되며, 또한 FOLR1, Igrov-1, 및 Wish로 전달감염된 KB, HeLa, 300.19 세포가 포함되고, 예시적인 낮은 FOLR1 발현자에는 Ovcar-3, Caov-3, SW620, T47D, 및 Skov-3이 포함된다. 또 다른 높은 양성 FOLR1 참조는 FOLR1로 안정적으로 또는 일시적으로 전달감염된 세포주이다. FOLR1에 대한 추가의 양성 및 음성 샘플이 표 13에 기재된다. 특정 암에 대한 FOLR1의 적절한 양성 및 음성 참조 수준은 하나 이상의 적절한 대상체에서 FOLR1의 수준을 측정하여 결정될 수 있고, 그와 같은 참조 수준은 특정 집단의 대상체에 맞춤화될 수 있다(예를 들면, 특정 연령의 대상체로부터의 샘플 내 FOLR1 수준 및 특정 연령 그룹 내에서 특정한 질환 상태, 표현형, 또는 이들의 부재에 대한 참조 수준 간 비교가 수행될 수 있도록 참조 수준이 연령-매칭될 수 있음). 그와 같은 참조 수준은 또한 생물학적 샘플에서 FOLR1의 수준을 측정하기 위해 사용되는 특정 기술(예를 들면, 면역분석 등)에 맞춤화될 수 있다.

[0143]

본원에서 사용된 바와 같이, "면역조직화학"은, 예를 들면 세포 또는 조직을 분석하기 위해 사용된 조직화학 및 면역학 방법을 나타낸다. 따라서, 용어들 "면역조직화학", "면역세포화학", 및 "면역화학"은 상호교환적으로 사용된다.

[0144]

본원에서 용어 "일차 항체"는 샘플 내에서 표적 단백질 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 나타낸다. 일차 항체는 일반적으로 ELISA 분석 또는 IHC 절차에서 사용된 제1 항체이다. 일부 구현예에서, 일차 항체는 IHC 절차에서 사용된 유일한 항체이다. 본원에서 용어 "2차 항체"는 일차 항체에 특이적으로 결합함으로써 일차 항체, 및 존재하는 경우 후속 시약 간에 가교 또는 연결을 형성하는 항체를 나타낸다. 2차 항체는 일반적으로 면역조직화학 절차에서 사용된 제2 항체이다.

[0145]

본 발명의 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 생물학적 기원이며, 특정한 구현예에서, 예컨대 진핵 유기체에서 유래된다. 일부 구현예에서, 샘플은 인간 샘플이지만, 동물 샘플도 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 샘플의 비제한적 공급원에는, 예를 들면 고형 조직, 생검 흡인물, 복수, 유체 추출물, 혈액, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부, 호흡기, 창자, 및 비뇨생식기의 외부 섹션, 누액, 타액, 모유, 종양, 기관, 세포 배양물 및/또는 세포 배양 구성요소가 포함된다. "암성 샘플"은 암성 세포를 함유하는 샘플이다. 본 방법은 비제한적으로 상이한 유형의 세포 또는 조직을 비교하는 단계, 상이한 발달 단계를 비교하는 단계, 및 질환 또는 이상의 존재

및/또는 유형을 검출하거나 결정하는 단계가 포함되는, 샘플의 상태 또는 FOLR1의 발현 측면을 조사하기 위해 사용될 수 있다.

[0146] 본원에서의 목적을 위해, 조직 샘플 "섹션"은 조직 샘플의 단일 부분 또는 조각, 예를 들면 조직 샘플에서 절단된 세포 또는 조직의 얇은 슬라이스에 관한 것이다. 조직 샘플의 다중 섹션이 채취되어 본 발명에 따라 분석될 수 있음이 이해된다. 일부 경우에서, 조직의 선택된 부분 또는 섹션은 동종성 세포 집단을 포함한다. 다른 사례에서, 선택된 부분은 조직 영역, 예를 들면 비제한적인 예로서 내강을 포함한다. 선택된 부분은 하나의 세포 또는 2 개의 세포만큼 작을 수도 있지만, 예를 들면 수 천 개의 세포만큼을 나타낼 수도 있다. 대개의 경우, 세포 수집이 중요하며, 본 발명은 세포 성분의 검출에서의 사용에 대해 기재되었지만, 상기 방법이 유기체의 비-세포 성분(예를 들면 비제한적인 예로서 혈액 중의 가용성 성분)을 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.

[0147] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "포착 시약"은 적당한 조건 하에 포착 시약-표적 분자 복합체가 나머지 샘플로부터 분리될 수 있도록 하는, 샘플 내에서 표적 분자에 결합하고 이를 포착할 수 있는 시약을 나타낸다. 일 구현예에서, 포착 시약은 고정된다. 일 구현예에서, 샌드위치 면역분석에서의 포착 시약은 항체 또는 표적 항원에 대한 상이한 항체의 혼합물이다.

[0148] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "검출가능한 항체"는 검출 수단에 의해 증폭된 표지를 통해 직접적으로, 또는 예를 들면 표지된 또 다른 항체를 통해 간접적으로 검출될 수 있는 항체를 나타낸다. 직접적인 표지화에 있어서, 항체는 전형적으로 일부 수단에 의해 검출가능한 모이어티에 접합된다. 일 구현예에서, 검출가능한 항체는 바이오티널화된 항체이다.

[0149] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "검출 수단"은 검출가능한 항체의 존재를 검출하기 위해 사용된 모이어티 또는 기술을 나타내며, 고정된 표지, 예컨대 미세적정 플레이트 상으로 포착된 표지를 증폭하는 검출 제제가 포함된다. 일 구현예에서, 검출 수단은 형광측정 검출제, 예컨대 아비딘 또는 스트렙타비딘이다.

[0150] 통상적으로 "샌드위치 ELISA"는 하기 단계를 채용한다: (1) 미세적정 플레이트가 포착 항체로 코팅되는 단계; (2) 샘플이 첨가되고, 존재하는 임의의 항원에 포착 항체에 결합하는 단계; (3) 검출 항체가 첨가되고 항원에 결합하는 단계; (4) 효소-결합 2차 항체가 첨가되고 검출 항체에 결합하는 단계; 및 (5) 기질이 첨가되고, 효소에 의해 검출가능한 형태로 전환되는 단계.

[0151] 단어 "표지"는 본원에서 사용되는 경우 "표지된" 항체를 산출하기 위해 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 접합되는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 표지는 자체가 검출가능할 수도 있고(예를 들면 방사선동위원소 표지 또는 형광성 표지), 또는 효소적 표지인 경우, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변경을 촉매할 수 있다.

[0152] "연관시키다" 또는 "연관시키는"이란 어떤 식으로든, 제1 분석의 수행 및/또는 결과를 제2 분석의 수행 및/또는 결과와 비교하는 것을 의미한다. 예를 들면, 제2 분석의 수행에서 제1 분석의 결과를 이용할 수 있고/있거나 제1 분석의 결과를 이용해서 제2 분석이 수행되어야 하는지를 결정할 수 있고/있거나 제1 분석의 결과를 제2 분석의 결과와 비교할 수 있다. 일 구현예에서, FOLR1의 증가된 발현은 FOLR1-표적화 항암 요법의 유효성 증가 가능성과 연관된다.

[0153] 용어들 "암" 및 "암성"은 세포 집단이 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예에는 비제한적으로, 암종, 램프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병이 포함된다. 그와 같은 암의 보다 구체적인 예에는 내피, 간엽, 또는 상피 기원의 암, 예컨대 폐암(예를 들면, 편평상피세포 암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 중피종, 및 폐의 편평상피 암종), 복막(예를 들면, 일차 복막) 암, 간세포 암, 위장관 암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암(장액 또는 자궁내막모양), 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장 암, 자궁내막모양(예를 들면, 자궁내막 선암종) 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부 암, 갑상샘암, 간 암종, 뇌암(예를 들면 교모세포종, 맥락막종의 종양) 및 다양한 유형의 두경부암, 또한 혈관 및 나팔관 종양이 포함된다. 암은 또한 상승된 FOLR1 발현 수준을 갖는 세포를 함유하는 암을 포괄한다. 그와 같은 FOLR1-상승된 암에는 비제한적으로, 난소, 비-소세포 폐암(선암종), 자궁암, 자궁내막암, 췌장암, 신장암, 폐암, 및 유방암이 포함된다.

[0154] "종양" 및 "신생물"은 양성(비암성) 또는 전암성 병변을 포함하는 악성(암성)의 과도한 세포 성장 또는 증식으로 생성되는 임의의 조직 물질을 나타낸다.

[0155] 용어들 "암 세포", "종양 세포", 및 문법적 동등물은 다양한 종양 세포 집단을 포함하는 비-종양유발성 세포 및 종양유발성 줄기 세포(암 줄기 세포)를 둘 다 포함하는 전암성 병변 또는 종양에서 유도된 전체 세포 집단을 나

타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "종양 세포"는 종양 세포를 암 줄기 세포로부터 구별하기 위해 재생하고 분화하는 능력이 없는 종양 세포만을 나타내는 경우, 용어 "비-종양유발성"으로 수식될 것이다.

[0156] 용어 "대상체"는 비제한적으로 인간, 비-인간 영장류, 설치류 등이 포함되는, 특정 치료의 수령체가 될 임의의 동물(예를 들면, 포유동물)을 나타낸다. 전형적으로, 용어들 "대상체" 및 "환자"는 인간 대상체에 대해 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0157] 용어 "약제학적 제형"은 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 허용하는 형태이고, 제형이 투여될 대상체에 허용 불가능하게 독성이 있는 추가 성분을 함유하지 않는 작제물을 나타낸다. 그와 같은 제형은 멸균성일 수 있다.

[0158] "유효량"의 항체 또는 면역접합체는 본원에서 개시된 바와 같이 구체적으로 언급된 목적을 수행하기 충분한 양이다. "유효량"은 언급된 목적에 관해 일상적인 방식으로 그리고 실험적으로 결정될 수 있다.

[0159] 용어 "치료적 유효량"은 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애를 "치료"하기 위해 유효한 항체 또는 다른 약물의 양을 나타낸다. 암의 경우, 약물의 치료적 유효량은 암 세포의 수를 감소시키고; 종양 크기를 감소시키고; 말초 기관 내로의 암 세포 침윤은 억제하고(즉 얼마간 완화시키고, 어떤 구현예에서는 중지시키고); 종양 전이를 억제하고(즉 얼마간 완화시키고, 어떤 구현예에서는 중지시키고); 얼마간 종양 성장을 억제하고; 암과 관련된 하나 이상의 증상을 얼마간 경감시키고; 및/또는 호의적인 반응, 예컨대 증가된 무진행 생존(PFS), 무질환 생존(DFS), 또는 전체 생존(OS), 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), 또는 일부 경우에서, 안정한 질환(SD), 진행성 질환 감소(PD), 감소된 진행까지의 시간(TTP), 난소암의 경우 CA125의 감소, 또는 그의 임의의 조합을 일으킬 수 있다. 본원에서 "치료"의 정의를 참고하라. 약물이 현준하는 암 세포의 성장을 예방하고/하거나 사멸시킬 수 있는 범위까지, 이는 세포증식억제성 및/또는 세포독성을 수 있다. 어떤 구현예에서, 증가된 FOLR1 수준의 확인은 더 높은 투여량으로 보여지는 것과 동일한 치료 효과를 달성하기 위해, 감소된 양의 FOLR1-표적화 치료제의 투여를 허용한다. "예방적 유효량"은 원하는 예방 결과를 달성하기 위해 필요한 기간 동안 투여량에서, 유효한 양을 나타낸다. 반드시는 아니지만 전형적으로, 질환 전 또는 초기 단계에 대상체에서 예방적 용량이 사용되므로, 예방적 유효량은 치료적 유효량 미만일 것이다.

[0160] 용어 "유리하게 반응한다"는 일반적으로 대상체에서 유익한 상태를 유도하는 것을 나타낸다. 암 치료에 관해, 상기 용어는 대상체에서 치료 효과를 제공하는 것을 나타낸다. 암에서의 양의 치료 효과는 수많은 방식으로 측정될 수 있다(W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S(2009) 참고). 예를 들면, 종양 성장 억제, 문자 마커 발현, 혈청 마커 발현, 및 문자 조영 기술은 모두 항암 치료제의 치료적 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 종양 성장 억제에 관해, NCI 표준에 따르면 $T/C \leq 42\%$ 이 항종양 활성의 최소 수준이다. $T/C < 10\%$ 는 높은 항종양 활성 수준으로 간주되며, $T/C(\%) = \text{치료된 중위 종양 부피} / \text{대조군의 중위 종양 부피} \times 100$ 이다. 유리한 반응은, 예를 들면 증가된 무진행 생존(PFS), 무질환 생존(DFS), 또는 전체 생존(OS), 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), 또는 일부 경우에서, 안정한 질환(SD), 진행성 질환(PD) 감소, 감소된 진행까지의 시간(TTP), 난소암의 경우 CA125의 감소 또는 이들의 임의의 조합에 의해 평가될 수 있다.

[0161] PFS, DFS, 및 OS는 신규 약물의 승인에 대한 국립 암 협회 및 미국 식품의약품안전청에서 설정한 표준에 의해 측정될 수 있다. [Johnson 등, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411]을 참고하라.

[0162] "무진행 생존"(PFS)은 등록부터 질환 진행 또는 사망까지의 시간을 나타낸다. PFS는 일반적으로 고형 종양 (RECIST) 1.1 표준의 카플란-마이어 방법 및 반응 평가 기준을 이용하여 측정된다. 일반적으로, 무진행 생존은 상기 암이 악화되지 않고 환자가 생존을 유지하는 상황을 나타낸다.

[0163] "종양 진행까지의 시간"(TTP)은 등록부터 질환 진행까지의 시간으로 정의된다. TTP는 일반적으로 RECIST 1.1 기준을 이용하여 측정된다.

[0164] "완전 반응" 또는 "완전 차도" 또는 "CR"은 치료에 반응하는 종양 또는 암의 모든 징후 소실을 시사한다. 이것이 항상 암이 치유되었음을 의미하지는 않는다.

[0165] "부분 반응" 또는 "PR"은 치료에 반응하여, 하나 이상의 종양 또는 병변의 크기 또는 용적 또는 체내에서의 암 범위의 감소를 나타낸다.

[0166] "안정한 질환"은 진행 또는 재발이 없는 질환을 나타낸다. 안정한 질환에서는 부분 반응으로 평가하기 위한 충분한 종양 수축도 진행성 질환으로 평가하기 충분한 종양 증가도 없다.

[0167] "진행성 질환"은 하나 이상의 신규 병변 또는 종양의 출현 및/또는 현준하는 비-표적 병변의 명백한 진행을 나

타낸다. 진행성 질환은 또한 질량 증가 또는 종양 확산으로 인한 치료 시작 후 20 퍼센트를 초과하는 종양 성장을 나타낼 수 있다.

[0168] "무질환 생존"(DFS)은 환자가 질환 없이 유지되는 치료 동안 및 후의 시간의 길이를 나타낸다.

[0169] "전체 생존"(OS)은 환자 등록부터 사망까지 또는 생존한 것으로 알려진 마지막 검열 받은 날까지의 나타낸다. OS에는 나이브(naive) 또는 미치료 개인 또는 환자 대비 기대 수명의 연장이 포함된다. 전체 생존은 환자가 규정된 시기 동안, 예컨대 진단 또는 치료 시부터 1년, 5년 등, 생존을 유지하는 상황을 나타낸다.

[0170] "CA125 수준 감소"는 부인과 암 인터그룹(GCIG) 지침에 따라 평가될 수 있다. 예를 들면, CA125 수준은 기준선 CA125 수준을 구축하기 위해 치료 전에 측정될 수 있다. CA125 수준은 치료 동안 또는 후에 1회 이상 측정될 수 있고, 기준선 수준 대비 경시적인 CA125 수준 감소는 CA125 수준 감소로 간주된다.

[0171] 용어들, 예컨대 "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하기 위한" 또는 "경감하는" 또는 "경감하기 위한"은 진단된 병리적 병태 또는 장애의 증상을 치유하고, 완화시키고, 줄이고 및/또는 진행을 정지시키는 치료 조치를 나타낸다. 따라서, 치료를 필요로 하는 대상에는 장애를 갖는 것으로 이미 진단되거나 의심되는 대상이 포함된다. 어떤 구현예에서, 대상체는 환자가 하기 중 하나 이상을 나타내는 경우, 본 발명의 방법에 따라 암에 대해 성공적으로 "치료된다": 암 세포의 수 감소 또는 완전 부재; 종양 크기 감소; 예를 들면 연조직 및 골 내로의 암 확산을 포함하는, 말초 기관 내로의 암 세포 침윤의 억제 또는 부재; 종양 전이의 억제 또는 부재; 종양 성장의 억제 또는 부재; 특정 암에 관련된 하나 이상의 증상 완화; 감소된 이환율 및 사망률; 삶의 질 향상; 종양의 종양 유발성, 종양유발 빈도, 또는 종양유발능 감소; 종양 내 암 줄기 세포의 수 또는 빈도 감소; 종양유발성 세포의 비-종양유발성 상태로의 분화; 증가된 무진행 생존(PFS), 무질환 생존(DFS), 또는 전체 생존(OS), 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), 안정한 질환(SD), 진행성 질환(PD) 감소, 감소된 진행까지의 시간(TTP), 난소암의 경우 CA125 감소, 또는 이들의 임의의 조합.

[0172] 예방 또는 방지 조치는 표적화된 병리적 병태 또는 장애의 발생을 예방하고/하거나 완화시키는 치료 조치를 나타낸다. 따라서, 예방 또는 방지 조치를 필요로 하는 대상에는 장애를 갖기 쉬운 대상 및 장애가 예방되어야 하는 대상이 포함된다.

[0173] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "건강관리 제공자"는 살아있는 대상체, 예를 들면, 인간 환자와 직접 상호작용하고 투여하는 개인 또는 기관을 나타낸다. 건강관리 제공자의 비-제한적인 예에는 의사, 간호사, 기술자, 테라피스트, 약사, 카운셀러, 대체 의학 시술자, 의료 설비, 의사 진료실, 병원, 응급실, 클리닉, 응급 관리 센터, 대체 의학 클리닉/설비, 및 비제한적으로 일반 의학, 특수 의학, 수술, 및/또는 임의의 다른 유형의 치료, 평가, 유지, 요법, 약물치료 및/또는 조언을 포함하는 환자의 건강 상태의 전부 또는 임의의 부분에 관해 일반적인 및/또는 특수한 치료, 평가, 유지, 요법, 약물치료, 및/또는 조언을 제공하는 임의의 다른 단위가 포함된다.

[0174] 일부 측면에서, 건강관리 제공자는 암을 치료하기 위해 요법을 투여하거나 또 다른 건강관리 제공자에게 암을 치료하기 위해 요법을 투여하도록 지시할 수 있다. 요법의 "투여"에는, 본원에서 사용된 바와 같이 대상체에 요법을 처방하는 단계뿐만 아니라 대상체에 요법을 전달, 적용 또는 제공하는 단계가 포함된다. 건강관리 제공자는 하기 행동을 실시하거나 또 다른 건강관리 제공자 또는 환자에게 하기 행동을 실시하도록 지시할 수 있다: 샘플을 수득함, 샘플을 처리함, 샘플을 제출함, 샘플을 수령함, 샘플을 전달함, 샘플을 분석하거나 측정함, 샘플을 정량함, 샘플의 분석/측정/정량 후 수득된 결과를 제공함, 샘플의 분석/측정/정량 후 수득된 결과를 수령함, 하나 이상의 샘플의 분석/측정/정량 후 수득된 결과를 비교/스코어링함, 하나 이상의 샘플로부터 비교/스코어링을 제공함, 하나 이상의 샘플로부터 비교/스코어링을 수득함, 요법 또는 치료제(예를 들면, FOLR1 결합제)를 투여함, 요법 투여를 개시함, 요법 투여를 중지함, 요법 투여를 계속함, 요법 투여를 일시적으로 중단함, 투여된 치료제의 양을 증가시킴, 투여된 치료제의 양을 감소시킴, 치료제의 양 투여를 계속함, 치료제의 투여 빈도를 증가시킴, 치료제의 투여 빈도를 감소시킴, 치료제에 대해 동일한 투여 빈도를 유지함, 적어도 또 다른 요법 또는 치료제에 의해 요법 또는 치료제를 대체함, 적어도 또 다른 요법 또는 추가 치료제와 요법 또는 치료제를 조합함. 이들 행동은 컴퓨터-시행된 방법을 이용해서(예를 들면, 웹 서비스 또는 독립형 컴퓨터 시스템을 통해) 자동으로 건강관리 제공자에 의해 수행될 수 있다.

[0175] "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, 임의 길이의 뉴클레오타이드 폴리머를 나타내며, DNA 및 RNA가 포함된다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 개질된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 그것의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 폴리미

내로 편입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 개질된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오타이드 및 그것의 유사체를 포함할 수 있다. 존재한다면, 뉴클레오타이드 구조에 대한 개질은 폴리머의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 방해될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 중합 후, 예컨대 표지 성분을 이용한 접합에 의해 추가로 개질될 수 있다. 다른 개질 유형에는, 예를 들면 "캡", 유사체를 이용한 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오타이드의 치환, 뉴클레오타이드간 개질, 예컨대 하전되지 않은 연결기(예를 들면, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등)를 갖는 것 및 하전된 연결기(예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)를 갖는 것, 돌출 모이어터를 포함하는 것, 예컨대 단백질(예를 들면, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 웨타이드, 폴리-L-라이신 등), 삽입제를 갖는 것(예를 들면, 아크리딘, 소랄렌 등), 칼레이터를 함유하는 것(예를 들면, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등), 알킬화제를 함유하는 것, 개질된 연결기를 갖는 것(예를 들면, 알파 아노머 핵산 등)뿐만 아니라 개질되지 않은 형태의 폴리뉴클레오타이드(들)가 포함된다. 게다가, 대개 당류에 존재하는 임의의 하이드록실 그룹은, 예를 들면 포스포네이트 그룹, 포스페이트 그룹에 의해 대체되거나, 표준 보호 그룹에 의해 보호되거나, 추가의 뉴클레오타이드에 대한 추가의 연결기를 제조하기 위해 활성화되거나, 고형 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 1 내지 20개 탄소 원자의 아민 또는 유기 캡핑 그룹 모이어터로 인산화되거나 치환될 수 있다. 다른 하이드록실도 표준 보호 그룹으로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한, 예를 들면 2'-0-메틸-, 2'-0-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보오스, 카보사이클릭 당 유사체, 알파-아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 자일로스 또는 릭소스, 파이라노스 당, 푸라노스 당, 세도헵톨로스, 비환식 유사체 및 무염기성 뉴클레오사이드 유사체, 예컨대 메틸 리보사이드를 포함하는, 당해기술에서 일반적으로 공지된 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당을 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결기는 대안적인 연결 그룹에 의해 대체될 수 있다. 이를 대안적인 연결 그룹에는 비제한적으로 포스페이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("디티오에이트"), (O)NR₂("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂("포름아세탈")에 의해 대체되는 구현예가 포함되며, 식 중 각각의 R 또는 R'은 임의로 에테르(--O--) 연결부, 아릴, 알케닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐 또는 아랄딜을 함유하는 독립적으로 H 또는 치환된 또는 비치환된 알킬(1-20 C)이다. 폴리뉴클레오타이드에서의 모든 연결기가 동일할 필요는 없다. 이전의 설명은 RNA 및 DNA를 포함하는 본원에서 나타내는 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0176]

용어 "벡터"는 숙주 세포에서 하나 이상의 관심 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달하고 발현할 수 있는 작제물을 의미한다. 벡터의 예에는 비제한적으로 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파아지 벡터, 양이온성 축합제에 관련된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포좀, 및 어떤 진핵 세포, 예컨대 생산자 세포에서 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터가 포함된다.

[0177]

용어들 "폴리펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 임의 길이의 아미노산 폴리머를 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 폴리머는 선형 또는 분지형일 수 있고, 개질된 아미노산을 포함할 수 있고, 비-아미노산에 의해 방해될 수 있다. 용어들은 또한 천연 또는 중재; 예를 들면, 디설파이드 결합 형성, 당화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 개질, 예컨대 표지 성분을 이용한 접합에 의해 개질된 아미노산 폴리머를 포함한다. 또한 정의 내에는, 예를 들면 아미노산의 하나 이상의 유사체(예를 들면, 비천연 아미노산 등 포함)뿐만 아니라 당해기술에서 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩타이드가 포함된다. 본 발명의 폴리펩타이드는 항체에 기반하므로, 어떤 구현예에서, 폴리펩타이드는 단일 사슬 또는 관련된 사슬로 발생할 수 있음이 이해된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드, 웨타이드, 또는 단백질은 비-천연 발생된 것이다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드, 웨타이드, 또는 단백질은 다른 천연 발생 성분으로부터 정제된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드, 웨타이드, 또는 단백질은 재조합적으로 생산된다.

[0178]

용어들 "동일한" 또는 "동일성" 퍼센트는 2 개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드의 맥락에서, 서열 동일성의 일환으로 임의의 보존적 아미노산 치환을 고려하지 않고, 최대 관련성에 대해 비교되고 정렬되는 경우(필요하면 캡을 도입), 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 명시된 백분율을 갖거나 동일한 2 개 이상의 서열 또는 하위서열을 나타낸다. 동일성 퍼센트는 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 이용하거나 시각 검사에 의해 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 정렬을 수득하기 위해 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어는 당해기술에 공지되어 있다. 서열 정렬 알고리즘의 그와 같은 비-제한적인 하나의 예는 [Karlin 등, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268]에 기재되고, [Karlin 등, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877]에서 변경되고, NBLAST 및 XBLAST 프로그램(Altschul 등, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402) 내로 편입된 알고리즘이다. 어떤 구현예에서, 캡핑된 BLAST는 [Altschul 등, 1997, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402]에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. BLAST-2, WU-BLAST-2(Altschul 등, 1996, *Methods in*

Enzymology, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2(Genentech, South San Francisco, California) 또는 Megalign(DNASTAR)은 서열을 정렬하기 위해 사용될 수 있는 공개적으로 이용가능한 추가 소프트웨어 프로그램이다. 어떤 구현예에서, 두 뉴클레오타이드 서열 간 동일성 퍼센트는 GCG 소프트웨어에서 GAP 프로그램을 이용해서 결정된다(예를 들면, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 갭 가중치 40, 50, 60, 70, 또는 90 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 이용). 어떤 대안적인 구현예에서, Needleman 및 Wunsch의 알고리즘(*J. Mol. Biol.*(48):444-453(1970))을 편입하는 GCG 소프트웨어 패키지 내의 GAP 프로그램이 두 아미노산 서열 간 동일성 퍼센트를 결정하기 위해 사용될 수 있다(예를 들면, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 이용). 대안적으로, 어떤 구현예에서, 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간의 동일성 퍼센트는 Myers 및 Miller의 알고리즘(CABIOS, 4:11-17(1989))을 이용해서 결정된다. 예를 들면, 동일성 퍼센트는 ALIGN 프로그램(버전 2.0)을 이용하고, 잔기 표, 갭 길이 폐널티 12 및 갭 폐널티 4로 PAM120을 이용하여 결정될 수 있다. 특정한 정렬 소프트웨어에 의해 최대 정렬을 위해 적절한 파라미터는 당해분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 어떤 구현예에서, 정렬 소프트웨어의 디폴트 파라미터가 사용된다. 어떤 구현예에서, 제1 아미노산 서열의 제2 서열 아미노산에 대한 동일성 백분율 "X"는 $100 \times (Y/Z)$ 로 계산되며, 식 중 Y는 제1 및 제2 서열의 정렬에서(시각 검사 또는 특정한 서열 정렬 프로그램에 의해 정렬됨) 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이며, Z는 제2 서열에서 잔기의 총 수이다. 제1 서열의 길이가 제2 서열보다 긴 경우, 제1 서열의 제2 서열에 대한 동일성 퍼센트는 제2 서열의 제1 서열에 대한 동일성 퍼센트보다 더 길 것이다.

[0179] 비제한적인 예로서, 임의의 특정한 폴리뉴클레오타이드가 참조 서열에 대해 어떤 서열 동일성(예를 들면, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 그리고 일부 구현예에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한) 백분율을 갖는지 여부는, 어떤 구현예에서 Bestfit 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)을 이용해서 결정될 수 있다. Bestfit은 두 서열 간 최고 상동성 세그먼트를 찾기 위해, [Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489(1981)]의 국소 상동성 알고리즘을 이용한다. 특정한 서열이, 예를 들면 본 발명에 따른 참조 서열과 95% 동일한지 여부를 결정하기 위해 Bestfit 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 이용하는 경우, 파라미터는 동일성 백분율이 전장 참조 뉴클레오타이드 서열에 걸쳐 계산되고 참조 서열 내 뉴클레오타이드 총 수의 최대 5%의 상동성 내 갭이 허용되도록 설정된다.

[0180] 일부 구현예에서, 본 발명의 2 개의 핵산 또는 폴리펩타이드는 실질적으로 동일하다, 즉 이들은 서열 비교 알고리즘 또는 시각 검사를 이용해서 측정되는 최대 관련성에 대해 비교되고 정렬되는 경우, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 그리고 일부 구현예에서 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 가짐을 의미한다. 어떤 구현예에서, 동일성은 적어도 약 10 개, 약 20 개, 약 40-60 개 잔기 길이 또는 이들 사이의 임의 적분 값인 서열 영역에 걸쳐 또는 60-80 개 잔기, 적어도 약 90-100 개 잔기보다 긴 영역에 걸쳐 존재하거나, 또는 서열은 비교되는 전장 서열, 예컨대 뉴클레오타이드 서열의 코딩 영역에 걸쳐 실질적으로 동일하다.

[0181] "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 염기성 측쇄(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들면, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들면, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들면, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들면, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들면, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하는 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리는 당해기술에 정의되어 있다. 예를 들면, 페닐알라닌의 티로신에 대한 치환은 보존적 치환이다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드 및 항체 서열 내의 보존적 치환은 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩타이드 또는 항체의 항원(들), 즉 폴리펩타이드 또는 항체가 결합하는 FOLR1에 대한 결합을 폐지하지 않는다. 항원-결합을 제거하지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 보존적 치환의 확인 방법은 당해기술에 잘 공지되어 있다(예를 들면, Brummell 등, *Biochem.* 32: 1180-1 187(1993); Kobayashi 등, *Protein Eng.* 12(10):879-884(1999); 및 Burks 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417(1997) 참고).

[0182] 본 개시내용 및 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태에는 맥락 상 명확히 다르게 나타내지 않는 한 복수 형태가 포함된다.

[0183] 구현예가 본원에서 언어 "포함하는"과 함께 기재되는 곳에서는 "구성된" 및/또는 "본질적으로 구성된"의 측면에

서 기재된 다르게 유사한 구현예가 또한 제공됨이 이해된다.

- [0184] 본원에서 문구, 예컨대 "A 및/또는 B"에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A", 및 "B"를 모두 포함하려는 것이다. 마찬가지로, 문구, 예컨대 "A, B, 및/또는 C"에서 사용되는 용어 "및/또는"은 각각의 하기 구현예를 포함하려는 것이다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

II. FOLR1-결합제

- [0186] 본 발명은 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 제제를 제공한다. 이들 제제들은 본원에서 일명 "FOLR1-결합제"이다. 어떤 구현예에서, FOLR1 결합제는 항체, 면역접합체 또는 폴리펩타이드이다. 인간 FOLR1에 대한 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열은 당해기술에 공지되어 있고 서열식별번호:1 및 서열식별번호:2로 나타낸 바와 같이 본원에서 또한 제공된다.

인간 협산 수용체 1:

MAQRMTTQLLLLWVVAVGAEQTRIAWARTELLNCVMNAKHHKEPGPEDKLHQCRCPRWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCJGEMAPACKRHF IQ
DTCLYECSNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSR
GSGRCIQMWFDPQAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAWPFLSSLALMLLWLLS (서열식별번호: 1)

인간 협동 수용체 1 핵산 서열:

atggctcagcgatgacaacacagctgtccttctagtgtggtggtgttagtaggggaggctcagacaaggattcatgggcaggactgagttctcaatgtctgtcatgaacgcAACGCAAGCACCACAAAGGAAAGGCCAGGGCCCGAGGACAAGTGTGATGAGCAGTGTGACCTGGAGGAAGAATGCCTGTTCTAACAACACCAGGAGGCCATAAGGATGTTCTACCTATATAGATTCAACTGGAACCACTGTGGAGAGATGGCACCTGCCTGCACACGGCATTCATCCAGGACACCTGCCTACGAGTGTCCCCAACTTGGGGCCCTGGATCCAGCAGGTGGATCAGAGCTGGCGCAAAGAGCGGGTACTGAACGTGCCCTGTGCAAAGAGGACTGTGAGCAATGGTGGGAAGATGTGTCACCTCTACACCTGAAGAGCAACTGGCACAAGGGCTGGAACTGGACTTCAGGGTTAACAGTGCCTGTGGAGACTGCCTGCCAACCTTCCATTCTACTTCCCCACACCCACTTCTGTGCAATGAAATCTGGACTCACTCTACAAGGTGAGCAACTACAGCGAGGGAGTGGCCGCTGATCCAGATGTGGTTCGACCCAGGCCAGGGCAACCCCAATGAGGAGTGGCGAGGTCTATGCTGCAGCCATGAGTGGGCTGGGCCCTGGGCAGCCTGGCCTTCCTGCTTAGCCTGGCCTAATGCTGTCAGCTGAGC (서열식별번호:2)

따라서, 일부 구현예에서, FOLR1 결합체는 서열식별번호:1의 에피토프에 결합할 수 있다.

일부 구현예에서, 항-FOLR1 항체는 FOLR1의 에피토프 (서열식별번호:1)에 특이적으로 결합할 수 있고, 여기서 에피토프는 N-당화된 아미노산을 포함한다. 따라서 그와 같은 항체는 당화될 때 FOLR1에 결합할 것이고 당화되지 않으면 FOLR1에 결합하지 않을 것이다. 확인하면, 이들 항체의 결합은 글리콜-의존적이다. 이들 항체는, 당화된 및 비-당화된 형태 FOLR1을 구별하기 위해 사용될 수 있다는 점에서 유리하다. 당화가 막 국재화에 필요할 수 있다면, 항체는 유익하게는 막 특정 염색을 위해 사용될 수 있다.

일부 구현예에서, 항-FOLR1 항체는 FOLR1의 N-당화된 아미노산 69를 포함하는 FOLR1의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-FOLR1 항체는 FOLR1의 N-당화된 아미노산 161을 포함하는 FOLR1의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-FOLR1 항체는 FOLR1의 N-당화된 아미노산 201을 포함하는 FOLR1의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

어떤 구현예에서, 항-FOLR1 항체는 부다페스트 조약의 조건 하에서 미국 종균 협회 (ATCC) (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110에 위치함, 2013년 4월 16일)에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-120196 ("FOLR1-9.20", 또한 일명 "IMGN 353.9-20", "353.9-20", 또는 "9.20")을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체이다. 어떤 구현예에서, 항-FOLR1 항체는 ATCC(2013년 4월 16일)에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-120197 ("FOLR1-2.1", 또한 일명 "IMGN 353.2-1", "353.2-1", "2.1", 또는 "muFRICH2-1")을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체이다.

FOLR1-결합체는 하기의 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 포함하는 FOLR1-결합체를 포함한다: (i) muFR1HC2-1("FOLR1-2.1", "IMGN 353.2-1", "353.2-1", 또는 "2.1"로도 공지됨), (ii) muFR1HC5-7("IMGN 353.5-7", "353.5-7" 또는

는 "5.7"로도 공지됨) (iii) "muFRIHC9-20"("FOLR1-9.20", "IMGN 353.9-20", "353.9-20", 또는 "9.20"로도 공지됨) (iv) 재표현화된 huFRIHC2-1 버전 1.0 또는 1.01, 또는 (v) CDR 그라프팅된 huFRIHC2-1 버전 1.0 또는 1.01 (아래의 표 1 및 2에서 제공됨). FOLR1-결합체는 아래의 표 1 및 2에서 제공된 복합 CDR의 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 포함하는 FOLR1-결합체를 또한 포함한다.

[0196] 표 1: 가변 중쇄 CDR 아미노산 서열

항체	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
muFRIHC2-1 ("2.1")	NSYIH (서열식별번호:3)	WIYPESLNTQYNEKFKA (서열식별번호:4)	RGIYYYSPYALDH (서열식별번호:5)
muFRIHC5-7 ("5.7")	NYYIH (서열식별번호:9)	WIYPGSFNVEYNEKFKA (서열식별번호:10)	RGIYFYSPYALDY (서열식별번호:11)
muFRIHC9-20 ("9.20")	NYYIH (서열식별번호:15)	WIYPENVNVRYNDFKKA (서열식별번호:16)	RGIYYYSPYAMDY (서열식별번호:17)
복합체	N(Y/S)YIH (서열식별번호:21)	WIYP(G/E)(S/N)(F/V/L)N(V/T)(E/R/Q)YN(E/D)KFKA (서열식별번호:22)	RGIY(F/Y)YSPYA(L/M)D(Y/H) (서열식별번호:23)

[0197]

[0198] 표 2: 가변 경쇄 CDR 아미노산 서열

항체	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
muFRIHC2-1 ("2.1")	KSSKSLLNSDGFTYLD (서열식별번호:6)	LVSNHFS (서열식별번호:7)	FQSNYLPLT (서열식별번호:8)
muFRIHC5-7 ("5.7")	KSTESLLNSDGFTYLD (서열식별번호:12)	LVSNHFS (서열식별번호:13)	FQSNYLPLT (서열식별번호:14)
muFRIHC9-20 ("9.20")	KSTKSLLNSDGFTYLD (서열식별번호:18)	LVSNHFS (서열식별번호:19)	FQSNYLPLT (서열식별번호:20)
복합체	KS(T/S)(K/E)SLLNSDGFTY LD (서열식별번호:24)	LVSNHFS (서열식별번호:25)	FQSNYLPLT (서열식별번호:26)

[0199]

FOLR1 결합 분자는 CDR 당 최대 4 (즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4)개의 보존적 아미노산 치환과 함께 항체 2.1 (즉, 서열식별번호: 3-8), 5.7 (즉, 서열식별번호: 9-14), 또는 9.20 (즉, 서열식별번호: 15-20)의 CDR을 포함하는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편일 수 있다. FOLR1 결합 분자는 CDR 당 최대 4 (즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4)개의 보존적 아미노산 치환과 함께 상기에서 보여진 복합 서열의 CDR (즉, 서열식별번호: 21-26)을 포함하는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편일 수 있다.

[0200]

FOLR1 결합 분자는 ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197의 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 CDR을 포함하는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편일 수 있다.

[0201]

폴리펩타이드는 본원에서 기재된 개개의 가변 경쇄 또는 가변 중쇄 중 하나를 포함할 수 있다. 항체 및 폴리펩타이드는 또한, 가변 경쇄 및 가변 중쇄 둘 모두를 포함할 수 있다. 젖과 항체 2.1, 5.7, 및 9.20 및 인간화된 2.1의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 서열은 아래의 표 3 및 4에서 제공된다.

[0203]

표 3: 가변 중쇄 아미노산 서열

항체	VH 아미노산 서열 (서열식별번호)
muFRIHC2-1 ("2.1")	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYIHWVKKRPGQGL EWIGWIYPESLNTQYNEKFKAATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDS AVYFCARRGIYYYSPYALDHWGQGASVTVSS (서열식별번호:27)
muFRIHC5-7 ("5.7")	QVQLQQSGPEVVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGL EWIGWIYPGSFNVEYNEKFKAATLTADKSSSTVYMQLSSLTSEDS AVYFCARRGIYFYSPYALDYWGQGASVTVSS (서열식별번호:29)
muFRIHC9-20 ("9.20")	QVQLQQSGPDLVKPGASVRISCKASGFTFTNYYIHWVKQRPGQGL EWIGWIYPENVNVRYNDFKAKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCARRGIYYYSPYAMDYWGQGASVTVSS (서열식별번호:31)
huFRIHC2-1 (재표면화됨)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTNSYIHWVKKRPGQGL EWIGWIYPESLNTQYNQKFQGKATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDS AVYFCARRGIYYYSPYALDHWGQGASVTVSS (서열식별번호:62)
huFRIHC2-1 (이식됨)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSYIHWVRQAPGQG LEWMGWIYPESLNTQYNEKFKARVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARRGIYYYSPYALDHWGQGTLVTVSSAST (서열식별번호:65)

[0204]

표 4: 가변 경쇄 아미노산 서열

항체	VL 아미노산 서열 (서열식별번호)
muFRIHC2-1 ("2.1")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSSKSLLNSDGFTYLDWYLQKPG QSPQLLIYLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPLTFGGGTKEIKR (서열식별번호:28)
muFRIHC5-7 ("5.7")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTESLLNSDGFTYLDWYLQKPG QSPQLLIYLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPLTFGGGTKEVKR (서열식별번호:30)
muFRIHC9-20 ("9.20")	SDVVLQTPLSLPVNLGDQASISCKSTKSLLNSDGFTYLDWYLQKP GQSPQLLIYLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY CFQSNYLPLTFGGGTKEIKR (서열식별번호:32)
huFRIHC2-1 v. 1.0 (재표면화됨)	DVVLTQSPLSLPVNLGQPASISCRSSRSLLNSDGFTYLDWYLQKPGQ SPRLLIYLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF QSNYLPLTFGQGTKEIKR (서열식별번호:63)
huFRIHC2-1 v. 1.01 (재표면화됨)	DVVLTQSPLSLPVNLGQPASISCKSSKSLLNSDGFTYLDWYLQKPG QSPRLLIYLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPLTFGQGTKEIKR (서열식별번호:64)
huFRIHC2-1 v. 1.0 (이식됨)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLNSDGFTYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QSNYLPLTFGQGTKEIK (서열식별번호:66)
huFRIHC2-1 v. 1.01 (이식됨)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSKSLLNSDGFTYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLVSNHFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QSNYLPLTFGQGTKEIK (서열식별번호:67)

[0206]

하기를 포함하는 폴리펩타이드가 또한 제공된다: (a) 서열식별번호:27, 29, 31, 62, 또는 65에 대해 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드; 및/또는 (b) 서열식별번호:28, 30, 32, 63, 64, 66, 또는 67에 대해 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드. 어떤 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열식별번호:27-32

[0207]

또는 62-67에 대해 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 따라서, 어떤 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 하기를 포함한다: (a) 서열식별번호:27, 29, 31, 62, 또는 65에 대해 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 및/또는 (b) 서열식별번호:28, 30, 32, 63, 64, 66, 또는 67에 대해 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드. 어떤 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 하기를 포함한다: (a) 서열식별번호:27, 29, 31, 62, 또는 65의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드; 및/또는 (b) 서열식별번호:28, 30, 32, 63, 64, 66, 또는 67의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드. 어떤 구현예에서, 폴리펩타이드는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 폴리펩타이드이다. 어떤 구현예에서, 서열식별번호:27-32 또는 62-67에 대한 서열 동일성의 어떤 백분율을 갖는 폴리펩타이드는 보존적 아미노산 치환 단독에 의한 서열식별번호:27-32 또는 62-67와 상이하다.

- [0208] 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 가변 경쇄 서열과 동일한 가변 경쇄를 포함하는 폴리펩타이드가 또한 제공된다.
- [0209] 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 가변 중쇄 서열과 동일한 가변 중쇄를 포함하는 폴리펩타이드가 또한 제공된다.
- [0210] 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열과 동일한 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 포함하는 항체 및 그것의 항원-결합 단편이 또한 제공된다.
- [0211] 어떤 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 ATCC 수탁 번호 PTA-120196을 갖는 하이브리도마 또는 그것의 항원-결합 단편에 의해 생산된 항체이다.
- [0212] 어떤 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 ATCC 수탁 번호 PTA-120197을 갖는 하이브리도마 또는 그것의 항원-결합 단편에 의해 생산된 항체이다.
- [0213] 폴리펩타이드는 본원에서 기재된 개개의 경쇄 또는 중쇄 중 하나를 포함할 수 있다. 항체 및 폴리펩타이드는 경쇄 및 중쇄 둘 모두를 또한 포함할 수 있다. 항체 2.1, 5.7, 및 9.20의 경쇄 및 중쇄 서열은 아래의 표 5 및 6에서 제공된다.

[0214]

표 5: 전장 중쇄 아미노산 서열

항체	전장 중쇄 아미노산 서열 (서열식별번호)
muFRIHC2-1 ("2.1")	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYIHWWKKRPGQQGLE WIGWIYPESLNTQYNEKFKAATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDSAYFCARRGIYYYSPYALDHWGQGASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAA QTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLYTLSSVTVPSSMRPSETTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTV PEVSSVFIFPPKPKDVLTTLPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDD EVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFP APIEKTIKTKGRPAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDIT VEWQWNGQPAENYKNTQPIMTNGSYFVYSKLNQKSNWEAGNT FTCSVHLHGNHTEKSLSHSPGK (서열식별번호:33)
muFRIHC5-7 ("5.7")	QVQLQQSGPEVVKPGASVRISCKASGYTFTNSYIHWWKQRPGQQGLE WIGWIYPGSFNVEYNEKFKAATLTADKSSSTVYMQLSSLTSEDSA VYFCARRGIYFSPYALDYWGQGASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAA AQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLY TLSSVTVPSSMRPSETTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICT VPEVSSVFIFPPKPKDVLTTLPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDD EVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA FPAPIEKTIKTKGRPAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPE DITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMTNGSYFVYSKLNQKSNWEAG NTFTCSVHLHGNHTEKSLSHSPGK (서열식별번호:35)
muFRIHC9-20 ("9.20")	QVQLQQSGPDLVKPGASVRISCKASGFTFTNSYIHWWKQRPGQQGLE WIGWIYPENVNVRYNDKFKAATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYFCARRGIYYYSPYAMDYWGQGASVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAA AQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLY TLSSVTVPSSMRPSETTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICT VPEVSSVFIFPPKPKDVLTTLPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDD EVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA FPAPIEKTIKTKGRPAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPE DITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMTNGSYFVYSKLNQKSNWEAG NTFTCSVHLHGNHTEKSLSHSPGK (서열식별번호:37)
muHuMov19	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSL EWIGRIHPYDGDTFYQNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDF AVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLYTLS SSVTVPSSMRPSETTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPE VSSVFIFPPKPKDVLTTLPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE HTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAP IEKTIKTKGRPAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVE WQWNGQPAENYKNTQPIMTNGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFT CSVHLHGNHTEKSLSHSPGK (서열식별번호:68)

[0215]

[0216]

표 6: 전장 경쇄 아미노산 서열

항체	전장 경쇄 아미노산 서열 (서열식별번호)
muFRIHC2-1 ("2.1")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSSKSLNSDGFTYLDWYLQKPG QSPQLLIYLVSNHFSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPLTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL NNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTQDSKDSTYSMSSTLTL TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열식별번호:34)
muFRIHC5-7 ("5.7")	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTESLLSDGFTYLDWYLQKPG QSPQLLIYLVSNHFSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQSNYLPLTFGGGTKLEVKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL LNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTQDSKDSTYSMSSTLTL LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열식별번호:36)
muFRIHC9-20 ("9.20")	SDVVLQTPLSLPVNLGDQASISCKSTSLLNSDGFTYLDWYLQKPG GQSPQLLIYLVSNHFSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY CFQSNYLPLTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL LNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTQDSKDSTYSMSSTLTL LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열식별번호:38)
muHuMov19	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQ PRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQ SREYPYTFGGGTKLEIKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTQDSKDSTYSMSSTLTLK DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열식별번호:69)

[0217]

[0218]

하기를 포함하는 폴리펩타이드가 또한 제공된다: (a) 서열식별번호:33, 35, 또는 37에 대해 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드; 및/또는 (b) 서열식별번호:34, 36, 또는 38에 대해 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드. 어떤 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열식별번호:33-38에 대해 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 따라서, 어떤 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 하기를 포함한다: (a) 서열식별번호:33, 35, 또는 37에 대해 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드, 및/또는 (b) 서열식별번호:34, 36, 또는 38에 대해 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드. 어떤 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 하기를 포함한다: (a) 서열식별번호:33, 35, 또는 37의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드; 및/또는 (b) 서열식별번호:34, 36, 또는 38의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드. 어떤 구현예에서, 폴리펩타이드는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 폴리펩타이드이다. 어떤 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 젖과, 키메라성, 또는 인간화된 항체이다. 어떤 구현예에서, 서열식별번호:33-38에 대한 서열 동일성의 어떤 백분율을 갖는 상기 폴리펩타이드는 보존적 아미노산 치환 단독에 의해 서열식별번호:33-38과 상이하다.

[0219]

적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 경쇄 서열과 동일한 경쇄를 포함하는 폴리펩타이드가 또한 제공된다.

[0220]

적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 중쇄 서열과 동일한 중쇄를 포함하는 폴리펩타이드가 또한 제공된다.

[0221]

적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 중쇄 및 경쇄 서열과 동일한 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 항체 및 그것의 항원-결합 단편이 또한 제공된다.

[0222]

항원에 대한 항체의 친화도 또는 결합능은 임의의 적합한 당해기술에 잘 공지된 방법, 예를 들면, 유세포측정, 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), 또는 방사선면역분석(RIA), 또는 동력학(예를 들면, BIACORE™ 분석)을 이용해서 실험적으로 결정될 수 있다. 직접적인 결합 분석뿐만 아니라 경쟁적 결합 분석 포맷이 쉽게 이용될 수 있

다(예를 들면, [Berzofsky 등, "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y.(1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y.(1992)]; 및 본원에서 기재된 방법을 참고하라. 특정한 항체-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건(예를 들면, 염 농도, pH, 온도) 하에 측정되는 경우 변할 수 있다. 따라서, 친화도 및 다른 항원-결합 파라미터(예를 들면, KD 또는 Kd, K_{on}, K_{off})의 측정은 항체 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 버퍼로, 당해기술에서 공지된 바와 같이, 예컨대 본원에서 기재된 버퍼로 수행된다.

[0223] 일 측면에서, 결합 분석은 표면 상에 FOLR1 항원을 발현하는 세포 상에서 유세포측정을 이용해서 수행될 수 있다. 예를 들면, FOLR1-양성 세포, 예컨대 SKOV3은 100 μl FACS 버퍼(2% 정상 염소 혈청으로 보충된 RPMI-1640 배지) 중 샘플 당 1×10^5 세포를 이용해서 가변 농도의 항-FOLR1 항체와 인큐베이션될 수 있다. 이어서, 세포가 펠렛화되고, 세척되고, 1 시간 동안 100 μl 의 FITC-접합된 염소-항-마우스 또는 염소-항-인간 IgG-항체(예컨대 Jackson Laboratory로부터 입수 가능, FACS 버퍼 중 6 $\mu\text{g/mL}$)와 인큐ベ이션될 수 있다. 그 뒤, 세포는 다시 펠렛화되고, FACS 버퍼로 세척되고, 1% 포름알데하이드를 함유하는 200 μl PBS 중에 재현탁된다. 샘플은, 예를 들면 HTS 다중웰 샘플러를 구비한 FACSCalibur 유세포 측정기를 이용해서 회득되고, CellQuest Pro(모두 BD Biosciences, San Diego, US)를 이용해서 분석될 수 있다. 각각의 샘플에 있어서, FL1에 대한 평균 형광 세기(MFI)가 내보내지고, 세미-로그 그래프에서 항체 농도에 대해 도식화되어 결합 곡선을 산출할 수 있다. 에스자형 용량-반응 곡선은 결합 곡선에 대해 피팅되며, EC50 값은 프로그램, 예컨대 디폴트 파라미터로 GraphPad Prism v4(GraphPad software, San Diego, CA)를 이용해서 계산된다. EC50 값은 각각의 항체에 대해 겉보기 해리 상수 "Kd" 또는 "KD"에 대한 척도로 사용될 수 있다.

[0224] 단클론성 항체는 하이브리도마 방법, 예컨대 [Kohler and Milstein(1975) Nature 256:495]에 기재된 것을 이용해서 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법을 이용하여, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적절한 숙주 동물은 면역화 항원에 특이적으로 결합할 항체의 립프구에 의한 생산을 유발하기 위해 면역화된다. 립프구는 또한 시험관내 면역화될 수 있다. 면역화 후, 립프구가 단리되고, 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜을 이용해서 적합한 골수종 세포주와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한 뒤 비융합된 립프구 및 골수종 세포로부터 선택될 수 있다. 이어서 면역침강, 면역블로팅, 또는 시험관내 결합 분석(예를 들면, 방사선면역분석(RIA); 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA))에 의해 결정되는 선택된 항원에 대해 특이적으로 유도된 단클론성 항체를 생산하는 하이브리도마가 표준 방법(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)을 이용하여 시험관내 또는 동물에서 복수 종양으로 생체내 증식될 수 있다. 그 뒤, 단클론성 항체는 다클론성 항체에 대해 기재된 바와 같이 배양 배지 또는 복수액으로부터 정제될 수 있다.

[0225] 대안적으로 단클론성 항체는 또한 미국 특허 4,816,567에 기재된 바와 같이 재조합 DNA 방법을 이용해서 제조될 수 있다. 단클론성 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, 예컨대 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자를 특이적으로 증폭하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 RT-PCR에 의해, 성숙 B-세포 또는 하이브리도마 세포로부터 단리되고, 그것의 서열은 종래의 절차를 이용해서 결정된다. 그 뒤, 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 적합한 발현 벡터 내로 클로닝되고, 숙주 세포, 예컨대 *E. coli* 세포, 유인원 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 달리 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포 내로 전달감염된 경우, 단클론성 항체가 숙주 세포에 의해 산출된다. 또한, 원하는 종의 재조합 단클론성 항체 또는 그것의 단편이 기재된 바와 같이 원하는 종의 CDR을 발현하는 과아지 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다(McCafferty 등, 1990, Nature, 348:552-554; Clackson 등, 1991, Nature, 352:624-628; 및 Marks 등, 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[0226] 단클론성 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드(들)는 대안적인 항체를 산출하기 위해 재조합 DNA 기술을 이용하는 여러 상이한 방식으로 추가 개질될 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들면 마우스 단클론성 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인은 하기로 치환될 수 있다: 1) 예를 들면 키메라성 항체를 산출하기 위한 인간 항체 영역, 또는 2) 융합 항체를 산출하기 위한 비-면역글로불린 폴리펩타이드. 일부 구현예에서, 불변 영역은 단클론성 항체의 원하는 항체 단편을 산출하기 위해 끝이 잘리거나 제거된다. 가변 영역의 부위 지향적 또는 고-밀도 돌연변이유발이 단클론성 항체의 특이성, 친화도 등을 최적화하기 위해 사용될 수 있다.

[0227] 일부 구현예에서, 인간 FOLR1에 대한 단클론성 항체는 인간화 항체이다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 항체는 인간 대상체에게 투여된 경우, 항원성 및 HAMA(인간 항-마우스 항체) 반응을 감소시키기 위해 치료적으로 사용된다.

[0228] 비-인간 또는 인간 항체의 조작, 인간화 또는 재표면화 방법이 또한 사용될 수 있고 당해기술에 잘 공지되어 있

다. 인간화, 재표면화 또는 유사하게 조작된 항체는 비-인간, 예를 들면 비제한적으로 마우스, 랫트, 토끼, 비-인간 영장류 또는 다른 포유동물인 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "도입" 잔기로 불리는 잔기에 의해 대체되며, 이는 전형적으로 공지된 인간 서열의 "도입" 가변, 불변 또는 다른 도메인으로부터 취해진다.

[0229] 그와 같은 도입된 서열은 당해기술에서 공지된 바와 같이 면역원성을 감소시키거나, 결합, 친화도, 온-율, 오프-율, 결합능, 특이성, 반감기, 또는 임의의 다른 적합한 특징을 감소시키거나, 증강시키거나, 개질하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 FOLR1 결합에 영향을 미치는데 직접적으로 그리고 가장 실질적으로 관여된다. 따라서, 비-인간 또는 인간 CDR 서열의 일부 또는 전부는 유지되지만, 가변 및 불변 영역의 비-인간 서열은 인간 또는 다른 아미노산으로 대체될 수 있다.

[0230] 항체는 또한 임의로 인간화, 재표면화, 조작될 수 있거나 인간 항체는 항원 FOLR1에 대한 높은 친화도 보유 및 다른 유리한 생물학적 특성으로 조작된다. 상기 목표를 달성하기 위해, 인간화(또는 인간) 또는 조작된 항-FOLR1 항체 및 재표면화 항체는 임의로 모계, 조작된, 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모계 서열 및 다양한 개념적 인간화 및 조작 산물의 분석 방법에 의해 제조될 수 있다. 3차원 면역글로불린 모델이 통상적으로 이용가능하며, 당해분야의 숙련가에게 익숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이의 점검은 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할 분석, 즉 그 항원, 예컨대 FOLR1에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기 분석을 허용한다. 이런 식으로, 원하는 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성되도록, 프레임워크(FR) 잔기가 공통 및 도입 서열로부터 선택되고 조합될 수 있다.

[0231] 본 발명의 항체의 인간화, 재표면화 또는 조작은 임의의 공지된 방법, 예컨대 비제한적으로 [Winter(Jones 등, Nature 321:522(1986); Riechmann 등, Nature 332:323(1988); Verhoeven 등, Science 239:1534(1988)), Sims 등, J. Immunol. 151: 2296(1993); 코티아 and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901(1987), Carter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285(1992); Presta 등, J. Immunol. 151:2623(1993), 미국 특허 번호 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; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; EP 229246; 7,557,189; 7,538,195; 및 7,342,110]에 기재된 것들을 이용해서 수행될 수 있고, 본원에서 인용된 참조문헌을 포함하는 이들 각각은 전문이 본원에 참조로 편입된다.

[0232] 어떤 대안적인 구현예에서, FOLR1에 대한 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당해기술에서 공지된 다양한 기술을 이용해서 직접적으로 제조될 수 있다. 표적 항원에 대해 유도된 항체를 생산하는 면역화된 개체로부터 단리되거나 시험관내 면역화된 불멸화된 인간 B 림프구가 산출될 수 있다(예를 들면, [Cole 등, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boemer 등, 1991, J. Immunol., 147(1):86-95; 및 미국 특허 5,750,373] 참고). 또한, 인간 항체는 파아지 라이브러리로부터 선택될 수 있고, 그 파아지 라이브러리는, 예를 들면 ([Vaughan 등, 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets 등, 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, 및 Marks 등, 1991, J. Mol. Biol., 222:581]에 기재된 바와 같이 인간 항체를 발현한다. 항체 파아지 라이브러리의 산출 및 사용 기술은 또한 [미국 특허 번호 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; 및 7,264,963; 및 Rothe 등, 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018]에 기재된다(그 각각은 그 전문이 참조로 편입됨). 친화도 성숙 전략 및 사슬셔플링 전략(Marks 등, 1992, Bio/Technology 10:779-783, 그 전문이 참조로 편입됨)은 당해기술에 공지되어 있고 높은 친화도의 인간 항체를 산출하기 위해 이용될 수 있다.

[0233] 인간화 항체는 또한 면역화 시 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 인간 면역글로불린 유전자위를 함유하는 트랜스제닉 마우스에서 제조될 수 있다. 상기 접근법은 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016에 기재된다.

[0234] 어떤 구현예에서, 예를 들면 종양 침투를 증가시키기 위해 항체 단편이 제공된다. 항체 단편의 생산을 위해 다양한 기술이 공지되어 있다. 전통적으로, 이들 단편은 온전한 항체의 단백분해 소화를 통해 유도된다(예를 들면 Morimoto 등, 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan 등, 1985, Science, 229:81). 어떤 구현예에서, 항체 단편은 재조합적으로 생산된다. Fab, Fv, 및 scFv 항체 단편은 모두 *E. coli* 또는 다른 숙주 세포에서 발현되고 분비될 수 있어서, 이들 단편의 다양 생산을 허용할 수 있다. 그

와 같은 항체 단편은 또한 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 항체 단편은 또한, 예를 들면 미국 특허 5,641,870에 기재된 바와 같은 선형 항체일 수 있고, 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 숙련된 당업자에게 자명할 것이다.

[0235] 본 발명의 목적을 위해, 개질된 항체가 인간 FOLR1의 폴리펩타이드와 항체의 회합을 제공하는 임의의 유형의 가변 영역을 포함할 수 있음이 이해되어야 한다. 이와 관련하여, 가변 영역은 체액성 반응을 일으키고 원하는 종양 관련된 항원에 대해 면역글로불린을 산출하도록 유도될 수 있는 임의의 유형의 포유동물을 포함하거나 이로부터 유도될 수 있다. 이와 같이, 개질된 항체의 가변 영역은, 예를 들면 인간, 쥐과, 비-인간 영장류(예를 들면, 사이노몰구스 원숭이, 마카크 등) 또는 이리 기원일 수 있다. 일부 구현예에서, 개질된 면역글로불린의 가변 및 불변 영역은 둘 다 인간 기원이다. 다른 구현예에서, 양립가능한 항체(보통 비-인간 공급원으로부터 유도됨)의 가변 영역은 결합 특성을 개선하거나 분자의 면역원성을 감소시키기 위해 조작되거나 구체적으로 맞춤화될 수 있다. 이런 점에서, 본 발명에서 유용한 가변 영역은 도입된 아미노산 서열의 포함을 통해 인간화되거나 달리 변경될 수 있다.

[0236] 어떤 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 둘 다에서의 가변 도메인은 하나 이상의 CDR의 적어도 부분적 대체에 의해, 그리고 필요하면 부분 프레임워크 영역 대체 및 서열 변화에 의해 변경된다. CDR은 프레임워크 영역이 유도되는 항체와 동일한 클래스 또는 심지어 서브클래스의 항체로부터 유도될 수 있지만, CDR이 상이한 클래스의 항체로부터, 그리고 어떤 구현예에서는 상이한 종의 항체로부터 유도될 것임이 예상된다. 하나의 가변 도메인의 항원-결합능을 또 다른 것으로 전달하기 위해, 공여체 가변 영역으로부터의 전체 CDR로 모든 CDR을 대체하는 것은 필요하지 않을 수 있다. 오히려, 항원-결합 부위의 활성을 유지하기 위해 필요한 잔기를 전달하는 것만 필요할 수 있다. 미국 특허 번호 5,585,089, 5,693,761 및 5,693,762에 나타낸 설명에 따라, 일상적인 실험과정의 수행에 의해 또는 감소된 면역원성을 갖는 기능적 항체를 수득하기 위한 시행 착오 평가에 의해, 당해분야의 숙련가의 숙련도 범위 내에 잘 있을 것이다.

[0237] 그럼에도 불구하고 가변 영역에 대한 변경으로, 당해분야의 숙련가는 본 발명의 개질된 항체가 원상태 또는 변경되지 않은 불변 영역을 포함하는 대략 동일한 면역원성의 항체와 비교된 경우, 원하는 생화학적 특성, 예컨대 증가된 종양 국재화 또는 감소된 혈청 반감기를 제공하기 위해 하나 이상의 불변 영역 도메인의 적어도 일부가 결실되거나 달리 변경된 항체(예를 들면, 전장 항체 또는 그것의 면역반응성 단편)를 포함할 것임을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 개질된 항체의 불변 영역은 인간 불변 영역을 포함할 것이다. 본 발명과 양립가능한 불변 영역에 대한 개질은 하나 이상의 도메인에서 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다. 즉, 본원에 개시된 개질된 항체는 3 개의 중쇄 불변 도메인(CH1, CH2 또는 CH3)의 하나 이상 및/또는 경쇄 불변 도메인(CL)에 대한 변경 또는 개질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 도메인이 부분적으로 또는 완전히 결실된 개질된 불변 영역이 고려된다. 일부 구현예에서, 개질된 항체는 전체 CH2 도메인이 제거된 도메인 결실된 작제물 또는 변이체(Δ CH2 작제물)를 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 생략된 불변 영역 도메인은 불변 영역의 부재에 의해 전형적으로 부여되는 일부 분자 유연성을 제공하는 짧은 아미노산 스페이서(예를 들면, 10 개 잔기)에 의해 대체될 것이다.

[0238] 어떤 구현예에서, 개질된 항체는 각각의 개질된 항체의 힌지 영역에 직접적으로 CH3 도메인을 융합하기 위해 조작될 수 있음이 주지될 것이다. 다른 작제물에서, 힌지 영역 및 개질된 CH2 및/또는 CH3 도메인 간에 펩타이드 스페이서를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, CH2 도메인이 결실되고 나머지 CH3 도메인(개질된 또는 개질되지 않은)이 5-20 개 아미노산 스페이서로 힌지 영역에 연결되는 양립가능한 작제물이 발현될 수 있다. 그와 같은 스페이서는, 예를 들면 불변 도메인의 조절 요소가 자유롭게 유지되고 접근 가능하거나 힌지 영역이 가요성으로 유지되는 것을 보장하기 위해 부가될 수 있다. 그러나, 아미노산 스페이서는, 일부 경우에서 면역원성으로 입증되며 작제물에 대해 원치 않는 면역 반응을 일으킬 수 있음이 주지되어야 한다. 따라서 어떤 구현예에서, 작제물에 부가된 임의의 스페이서는 개질된 항체의 원하는 생화학적 품질을 유지하기 위해 상대적으로 비-면역원성이거나 심지어 함께 생략될 것이다.

[0239] 전체 불변 영역 도메인의 결실에 더하여, 본 발명의 항체가 소수 또는 심지어 단일 아미노산의 부분 결실 또는 치환에 의해 제공될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들면, CH2 도메인의 선택된 영역에서 단일 아미노산의 돌연변이가 Fc 결합을 실질적으로 감소시키고 그렇게 함으로써 종양 국재화를 증가시키기 충분할 수 있다. 유사하게, 조절될 효과기 기능(예를 들면, 보체 C1Q 결합)을 제어하는 하나 이상의 불변 영역 도메인의 일부를 단순히 결실시키는 것이 바람직할 수 있다. 불변 영역의 그와 같은 부분 결실은 대상체 불변 영역 도메인과 관련된 다른 바람직한 기능은 온전히 놔두면서 항체의 선택된 특성(혈청 반감기)을 향상시킬 수 있다. 게다가 상기 암시된 바와 같이, 개시된 항체의 불변 영역은 수득된 작제물의 프로파일을 증강시키는 하나 이상의 아미노

산의 돌연변이 또는 치환을 통해 개질될 수 있다. 이에 관해, 개질된 항체의 입체배치 및 면역원성 프로파일을 실질적으로 유지하면서 보존된 결합 부위에 의해 제공된 활성(예를 들면, Fc 결합)을 손상시키는 것이 가능할 수 있다. 어떤 구현예는 바람직한 특성, 예컨대 효과기 기능의 감소 또는 증가를 증강시키기 위해 또는 더 많은 세포독소 또는 탄수화물 부착을 제공하기 위해 불변 영역으로의 하나 이상의 아미노산 부가를 포함할 수 있다. 그와 같은 구현예에서, 선택된 불변 영역 도메인으로부터 유도된 특정 서열을 삽입하거나 복제하는 것이 바람직 할 수 있다.

[0240] 본 발명은 본원에 나타낸 키메라성, 인간화 및 인간 항체, 또는 이들의 항체 단편에 실질적으로 상동성인 변이체 및 동등물을 추가로 포함한다. 이들은, 예를 들면 보존적 치환 돌연변이, 즉 유사한 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 예를 들면, 보존적 치환은 아미노산의 동일한 일반 클래스 내의 또 다른 아미노산을 이용한, 예컨대 산성 아미노산의 또 다른 산성 아미노산을 이용한, 하나의 염기성 아미노산의 또 다른 염기성 아미노산에 의한 또는 하나의 중성 아미노산의 또 다른 중성 아미노산에 의한 치환을 나타낸다. 보존적 아미노산 치환에 의해 의도되는 것은 당해기술에 잘 공지되어 있다.

[0241] 본 발명의 폴리펩타이드는 인간 FOLR1에 대한 항체, 또는 그것의 단편을 포함하는 재조합 폴리펩타이드, 천연 폴리펩타이드, 또는 합성 폴리펩타이드일 수 있다. 본 발명의 일부 아미노산 서열은 단백질의 구조 또는 기능의 유의미한 효과 없이 변화될 수 있음이 당해기술에서 인식될 것이다. 따라서, 본 발명에는 인간 엽산 수용체 단백질에 대해 실질적인 활성을 나타내거나 항체, 또는 그것의 단편의 영역을 포함하는 폴리펩타이드의 변이가 추가로 포함된다. 그와 같은 변종에는 결실, 삽입, 역전, 반복, 및 유형 치환이 포함된다.

[0242] 폴리펩타이드 및 유사체는 정상적으로 단백질의 일부가 아닌 추가의 화학적 모이어티를 함유하도록 추가 개질될 수 있다. 이를 유도체화된 모이어티는 단백질의 용해도, 생물학적 반감기 또는 흡수를 향상시킬 수 있다. 모이어티는 또한 단백질 등의 임의의 바람직한 부작용을 감소시키거나 제거할 수 있다. 이를 모이어티에 대한 개요는 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(2000)]에서 찾아볼 수 있다.

[0243] 본원에 기재된 단리된 폴리펩타이드는 당해기술에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 생산될 수 있다. 그와 같은 방법은 직접적인 단백질 합성 방법부터 적합한 형질전환된 숙주에서 단리된 폴리펩타이드 서열을 인코딩하고 이를 서열을 발현하는 DNA 서열을 구축하는 것까지의 범위이다. 일부 구현예에서, DNA 서열은 관심 야생형 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 단리하거나 합성하여 재조합 기술을 이용해서 구축된다. 임의로, 서열은 부위-특이적인 돌연변이유발에 의해 돌연변이유발되어 이들의 기능적 유사체를 제공할 수 있다. 예를 들면, [Zoeller 등, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066(1984) 및 미국 특허 번호 4,588,585]를 참고하라.

[0244] 일부 구현예에서, 관심 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기를 이용한 화학적 합성에 의해 구축될 것이다. 그와 같은 올리고뉴클레오타이드는 원하는 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 기반하여, 관심 재조합 폴리펩타이드가 생산될 숙주 세포에서 선호되는 코돈을 선택하여 설계될 수 있다. 단리된 관심 폴리펩타이드를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 서열을 합성하기 위해 표준 방법이 적용될 수 있다. 예를 들면, 전체 아미노산 서열이 역번역된 유전자를 구축하기 위해 사용될 수 있다. 게다가, 특정한 단리된 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 DNA 올리고머가 합성될 수 있다. 예를 들면, 원하는 폴리펩타이드 부분을 코딩하는 몇몇 작은 올리고뉴클레오타이드가 합성된 다음 결합될 수 있다. 개별 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 상보적 어셈블리를 위한 5' 또는 3' 오버행을 함유한다.

[0245] 일단 어셈블리되면(합성, 부위 지향적 돌연변이유발 또는 또 다른 방법에 의해), 특정한 단리된 관심 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 발현 벡터 내로 삽입되고 원하는 숙주에서 단백질 발현에 적절한 발현 조절 서열로 작동가능하게 연결될 것이다. 적절한 어셈블리는 적합한 숙주에서 생물학적 활성 폴리펩타이드의 뉴클레오타이드 시퀀싱, 제한 맵핑, 및 발현에 의해 확인될 수 있다. 당해기술에서 잘 공지되어 있는 바와 같이, 숙주에서 전달감염된 유전자의 높은 발현 수준을 수득하기 위해, 유전자는 선택된 발현 숙주에서 기능적인 전사 및 번역 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어야 한다.

[0246] 어떤 구현예에서, 재조합 발현 벡터가 인간 FOLR1에 대한 항체, 또는 그것의 단편을 인코딩하는 DNA를 증폭하고 발현하기 위해 사용된다. 재조합 발현 벡터는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유도된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동가능하게 연결된, 항-FOLR1 항체의 폴리펩타이드 사슬, 또는 그것의 단편을 인코딩하는 합성 또는 cDNA-유도된 DNA 단편을 갖는 복제가능한 DNA 작제물이다. 전사 단위는 일반적으로 하기의 어셈블리를 포함한다: (1) 유전자 발현에서 조절 역할을 갖는 유전 요소 또는 요소들, 예를 들면 전사 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조 또는 코딩 서열, 및 (3) 적절한 전사 및 번역

개시 및 종결 서열. 그와 같은 조절 요소에는 전사를 조절하기 위한 오퍼레이터 서열이 포함될 수 있다. 보통 복제 기점에 의해 부여되는 숙주에서 복제하는 능력 및 형질전환체의 인식을 촉진하는 선택 유전자가 추가 편입될 수 있다. DNA 영역은 이들이 서로 기능적으로 관련되는 경우 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 신호 웨პ타이드에 대한 DNA(분비 리더)는 이것이 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전구체로서 발현되는 경우, 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결된다; 프로모터는 이것이 서열 전사를 조절하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다; 또는 리보솜 결합 부위는 이것이 번역을 허용하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 효모 발현 시스템에서 사용하기 위한 구조 요소에는 숙주 세포에 의한 번역된 단백질의 세포외 분비를 가능케 하는 리더 서열이 포함된다. 대안적으로, 재조합 단백질이 리더 또는 도입 서열 없이 발현되는 경우, N-말단 메티오닌 잔기가 포함될 수 있다. 상기 잔기는 임의로 발현된 재조합 단백질로부터 후속 절단되어 최종 산물을 제공할 수 있다.

[0247] 발현 조절 서열 및 발현 벡터의 선택은 숙주의 선택에 의존할 것이다. 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 유용한 발현 벡터에는, 예를 들면 SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터의 발현 조절 서열을 포함하는 벡터가 포함된다. 박테리아 숙주에 유용한 발현 벡터에는 공지된 박테리아 플라스미드, 예컨대 pCR 1, pBR322, pMB9 및 그것의 유도체를 포함하는 에스케리치아 콜리로부터의 플라스미드, 더 넓은 숙주 범위의 플라스미드, 예컨대 M13 및 섬유상 단일가닥 DNA 파아지가 포함된다.

[0248] FOLR1-결합 폴리펩타이드 또는 항체(또는 항원으로 사용하기 위한 FOLR1 단백질)의 발현에 적합한 숙주 세포에는 적절한 프로모터의 조절 하에 있는 원핵생물, 효모, 곤충 또는 고등 진핵 세포가 포함된다. 원핵생물에는 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들면 *E. coli* 또는 바실러스가 포함된다. 고등 진핵 세포에는 포유동물 기원의 확립된 세포주가 포함된다. 무세포 번역 시스템도 이용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모, 및 포유동물 세포 숙주와 사용하기 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 Pouwels 등(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985)에 의해 기재되며, 그 관련된 개시내용이 참조로 편입된다. 항체 생산을 포함하는 단백질 생산 방법에 관한 추가 정보는, 예를 들면 미국 특허 공개 번호 2008/0187954, 미국 특허 번호 6,413,746 및 6,660,501, 및 국제 특허 공개 번호 WO 04009823에서 찾아볼 수 있고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 편입된다.

[0249] 다양한 포유동물 또는 곤충 세포 배양 시스템이 또한 재조합 단백질을 발현하기 위해 유익하게 이용된다. 포유동물 세포에서의 재조합 단백질의 발현은 그와 같은 단백질이 일반적으로 정확하게 폴딩되고, 적절하게 개질되고, 완전히 기능적이므로, 수행될 수 있다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예에는 HEK-293 및 HEK-293T, Gluzman(Cell 23:175, 1981)에 의해 기재된 원숭이 신장 세포 COS-7 세포주, 및 예를 들면, L 세포, C127, 3T3, 차이니즈 햄스터 난소(CHO), HeLa 및 BHK 세포주를 포함하는 다른 세포주가 포함된다. 포유동물 발현 벡터는 비전사 요소, 예컨대 복제 기점, 발현될 유전자에 연결된 적합한 프로모터 및 인핸서, 및 다른 5' 또는 3' 인접 비전사 서열, 및 5' 또는 3' 비번역 서열, 예컨대 필요한 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여체 및 수신체 부위, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서 이종성 단백질의 생산을 위한 배클로바이러스 시스템은 [Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47(1988)]에서 검토된다.

[0250] 형질전환된 숙주에 의해 생산된 단백질은 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. 그와 같은 표준 방법에는 크로마토그래피(예를 들면, 이온 교환, 친화도 및 사이징 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술이 포함된다. 친화도 태그, 예컨대 핵사히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 피막 서열 및 글루타티온-S-전달효소가 적절한 친화도 칼럼에 걸친 통과에 의해 용이한 정제를 허용하기 위해 단백질에 부착될 수 있다. 단리된 단백질은 또한 단백분해, 핵 자기 공명 및 x-선 결정학과 같은 기술을 이용하여 물리적으로 분석될 수 있다.

[0251] 예를 들면, 배양 배지 내로 재조합 단백질을 분비하는 시스템으로부터의 상청액은 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들면 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 장치를 이용해서 농축될 수 있다. 농축 단계 후, 농축물이 적합한 정제 매트릭스로 적용될 수 있다. 대안적으로, 음이온 교환 수지, 예를 들면, 돌출형 디에틸아미노에틸(DEAE) 그룹을 갖는 매트릭스 또는 기질이 이용될 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로스 또는 통상적으로 단백질 정제에서 이용된 다른 유형일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 단계가 이용될 수 있다. 적합한 양이온 교환기에는 설포프로필 또는 카복시메틸 그룹을 포함하는 다양한 불용성 매트릭스가 포함된다. 마지막으로, 소수성 RP-HPLC 배지, 예를 들면 돌출형 메틸 또는 다른 지방족 그룹을 갖는 실리카겔을 이용하는 하나 이상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 단계가 FOLR1-결합제를 추가 정제하기 위해 이용될 수 있다. 전술된 정제 단계의 일부 또는 전부가 다양한 조합으로 또한 동종성 재조합 단

백질을 제공하기 위해 이용될 수 있다.

[0252] 박테리아 배양에서 생산된 재조합 단백질은, 예를 들면 세포 펠렛으로부터의 최초 추출에 이어, 하나 이상의 농축, 염석, 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 단리될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 최종 정제 단계를 위해 이용될 수 있다. 재조합 단백질의 발현에서 이용된 미생물 세포는 냉동-해동 사이클링, 초음파처리, 기계적 파괴, 또는 세포 용해제의 사용을 포함하는 임의의 편리한 방법에 의해 파괴될 수 있다.

[0253] 항체 및 다른 단백질의 정제를 위해 당해기술에서 공지된 방법에는 또한, 예를 들면 미국 특허 공개 번호 2008/0312425, 2008/0177048, 및 2009/0187005에 기재된 것들이 포함되며, 이를 각각은 그 전문이 본원에 참조로 편입된다.

III. 폴리뉴클레오타이드

[0255] 어떤 구현예에서, 본 발명은 인간 FOLR1 수용체에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 또는 그와 같은 폴리펩타이드의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들면, 본 발명은 인간 FOLR1에 대한 항체를 인코딩하거나 그와 같은 항체의 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 RNA 형태 또는 DNA 형태일 수 있다. DNA에는 cDNA, 게놈 DNA, 및 합성 DNA가 포함되고; 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있고, 단일 가닥인 경우 코딩 가닥 또는 비-코딩(안티-센스) 가닥일 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 내인성 인트론이 없는 DNA 또는 cDNA이다.

[0256] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 비-천연 발생 폴리뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 재조합적으로 생산된다.

[0257] 어떤 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 단리된다. 어떤 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 실질적으로 순수하다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 천연 성분으로부터 정제된다.

[0258] 본 발명은 서열식별번호: 3-38 및 59-67로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 서열식별번호: 3-38 및 59-67에 대해 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다.

[0259] 본 발명은 추가로, 아래의 표 7 및 8에서 나타낸 것들로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0260]

표 7: 가변 중쇄 폴리뉴클레오타이드 서열

항체	가변 중쇄 폴리뉴클레오타이드 서열 (서열식별번호)
muFRIHC2-1 ("2.1")	cagggtccaaactgcagcagactggacactgagctggtaagcctggggcttcagtgaggatatactgcagg cttctgggtacacccatcaaactctatattactcggtgaaaaagaggcgtggacaggacttgagtgg ttggatggatttatcctgaaagtctaatactcaatacatgagaagtcaaggccaaggccacactgact gacaagtcctcagcacatcctacatcgacgtcagcgtcgtggactctgcggctattctgt caagaagggtatttattactctccatgtggaccactggggcaaggcgtcagtcacccgtc ctca (서열식별번호:39)
muFRIHC5-7 ("5.7")	cagggtccaaactgcagcagactggacactgagggtgaaagcctggggcttcagtgaggatatactgcagg cttctgggtacacccatcaaactactatatactacactgggtgaagcagaggcgtggacaggacttgagtgg ttggatggatttatcctgaaagttaatgttagtacaatgagaagtcaaggccaaggccacactgact agacaatcctccagcacagtcatacatgcaactcagcagcgtgacactgaggactctgggttattctgt gcaagaagggtatttattactctccatgtggactactggggcaaggcgtcagtcacccgtc ctca (서열식별번호:41)
muFRIHC9-20 ("9.20")	cagggtccaaactgcagcagactggacactgacactggtaagcctggggcttcagtgaggatatactgcagg cttctgggtacacccatcaaactactatatactacactgggtgaagcagaggcgtggacaggacttgagtgg ttggatggatttatcctgaaatgttaatgttagtacaatgagaagtcaaggccaaggccacactgact agacaatcctccagcacagtcatacatgcaactcagcagcgtgacactgaggactctgggttattctgt tgcagaagggtatttattactactctccatgtggactactggggcaaggcgtcagtcacccgtc ctca (서열식별번호:43)
huFRIHC2-1 (재표면화됨)	aagcttgcaccATGGGTTGGAGCTGCATTATCCTTTCTGTGGCTA CAGCTACTGGCGTTCACTCTCAGGTACAATTGGTCAGTCAGGA GCCGAGGTCTAAAGCCCGGTGCCAGTGTGAAGATCTCATGCAA GGCAAGCGTTATACTTTACAAACTCTTACATTCAATTGGGTGAA AAAGCGGCCGCCAGGGTCTCGAACATGGATCGGCTGGATCTACC CAGAAAGTCTGAACACTCAATACAACCAGAAGTTCAAGGTAAG GCAACTCTCACTGCCGACAAGAGCTTAGCACAAGCTATATGCA GTTGTCTAGTTGACAAGCGAGGATAGCGCAGTTACTTTGTGC TCGGCGTGGTATTATTACTACTCACCTTATGCTCTGGATCACTG GGGACAGGGTGCCTGTGTTACCGTTCCAGTCATCCACCAaggccc c (서열식별번호:70)
huFRIHC2-1 (이식됨)	aagcttgcaccATGGGCTGGAGCTGCATAATCCTCTCGTAGC TACCGCCACTGGGGTGCATTCTCAAGTACAGTTGGTCAGTC CGGAGCTGAAGTCAAGAACGCCAGGGCTCTGTTAAGGTGA GCTGTAAGGCTCCGGATATACCTTCACAAACAGTTATATCC ATTGGGTGAGGCAAGCTCCAGGCCAGGGTCTCGAACATGGATG GGATGGATCTACCCCGAGAGTCTGAACACCCAGTACAACGA GAAGTTCAAGGCACGTGTGACCATGACAAGAGACACCTCCA TCAGTACAGCCTATATGGAATTGAGCCGTCTCAGAAGTGATG ATACAGCAGTGTACTACTGCGCCAGGCCAGGGCATCTACTACT ACAGCCCACGCTCTCGACCACTGGGGACAAGGAACACTG

[0261]

	GTAACCGTAAGCTCAGCTTCTACAAaggccc (서열식별번호:71)
--	---

[0262]

[0263]

표 8: 가변 경쇄 폴리뉴클레오타이드 서열

항체	가변 경쇄 폴리뉴클레오타이드 서열 (서열식별번호)
muFRIHC2-1 ("2.1")	agtcatgtttctgacccaaactccactctctgtcaatattggagatcaagcccttatcttgcaggcttcaagacttcgaatgtgattcaattttggactgttccagacaggcactggcagttggcaggatccaaactatcttgcacgttcccgaggggggaccagctggaaataaaacgg (서열식별번호:40)
muFRIHC5-7 ("5.7")	agtcatgtttctgacccaaactccactctctgtcaatattggagatcaagcccttatcttgcaggcttcaagacttcgaatgtgattcaattttggactgttccagacaggcactggcagttggcaggatccaaactatcttgcacgttcccgaggggggaccagctggaaataaaacgg (서열식별번호:42)
muFRIHC9-20 ("9.20")	agtcatgtttctgacccaaactccactctctgtcaatattggagatcaagcccttatcttgcaggcttcaagacttcgaatgtgattcaattttggactgttccagacaggcactggcagttggcaggatccaaactatcttgcacgttcccgaggggggaccagctggaaataaaacgg (서열식별번호:44)
huFRIHC2-1 v. 1.0 (재표면화됨)	gaattcgccaccATGGGTTGGTCATGTATAAATACCTTCTGGTAGCTACTGCTACTGGTGTGCATTCAAGATGTGGTGTGACTCAGTC ACCCTTGCTCTCCAGTCATCTGGAGCTCTCTGAAGCTGGATGGCTT ACTTATCTGACTGGTATCTCCAGAAGCCAGGACAGTCCCC CGGCTGCTCATCTACCTGGTTCTAAATCATTAGTGGCGTCC CTGACCGCTCTGGAGTGAAGTGGGACCGATTACAC TGAAGATCTCCAGGGTCGAAGCTGAGGACCTGGGGTTACT ACTGTTCCAGAGCAACTACCTCCCTGACATTGGCCAGG GAACCAAGCTGGAAATCAAGctacg (서열식별번호:72)

[0264]

huFRIHC2-1 v. 1.01 (재표면화됨)	gaattcgccaccATGGGTTGGTCTTGTATCATTCTGTTCTGGTCGC CACTGCCACAGGAGTTCACTCAGACGTGGTACTCACACAATC TCCCCTTCCCTGCCTGTGAACCTGGGACAGCCAGCCTCAATCAGTTGCAAGAGCTCTAAATCTGCTCAATAGCGATGGCTT TACCTACTTGGATTGGTACCTCCAGAAGCCGGCAGTCTCC TCGGCTCCTGATTACCTGTTCAAATCACTTTCAAGCGTGC CCTGACCGGTTCTCCGGATCTGGCTCAGGGACAGACTTCACC CTGAAGATCTCCCGCTCGAGGCAGAGGATCTGGCGTGTAT TACTGTTCCAAGTAACTACCTGCCATTGACTTTGGACAA GGAACCAAGCTGGAAATCAAAGctacg (서열식별번호:73)
huFRIHC2-1 v. 1.0 (이식됨)	gaattcgccaccATGGGATGGAGTTGTATTATTCTGTTCTGGTCGC TACTGCAACAGGGCGTTCACTCTGACATCGTAATGACCCAGAC ACCTCTGAGTCTGAGTGTCACTCCGGCCAGCCCGCTCTATT TCATGTCGTAGCTCTCGCTCCCTGCTCAATTCCGACGGTTTA CCTACTTGGACTGGTATCTTCAGAAACCTGGGAGAGCCCTC AGCTTCTGATCTATCTGGTGTCCAATCACTTCAGTGGCGTCCC AGACCGATTTCGGGAAGCGGAAGCGGAACCGACTTACCCCT GAAGATATCCCGCTCGAAGCAGAGGACGTGGCGTGTATT ATTGCTTCAAAGCAATTACTGCCATTGACTTTGGACAAAG GCACAAAAGCTGGAGATAAAGctacg (서열식별번호:74)
huFRIHC2-1 v. 1.01 (이식됨)	gaattcgccaccATGGGCTGGTCATGCATCATACTGTTCTGGTGGC TACAGCAACCGGGGTGCACAGCGATATTGTTATGACACAGAC ACCACTGAGTTGTCACTGGGACCCGGCCAGCCAGCCTCTAT ATCCCTGCAAGTCTCAAAAAGTCTCCTGAATAGCGATGGCTT TACCTACCTCGACTGGTATCTTCAGAAAGCCGGTCAAAGCCC TCAGCTGCTGATATCTGGTGTCAAACCAATTAGCGGAGTC CCCGACCGCTTTCAAGGCTCCGGCAGTGGCACCGACTTCACC CTTAAGATTCTCGCGTGGAGGCTGAAGATGTAGGGGTCTAC TACTGTTCCAGTCAAACTACCTGCCACTGACCTTGGTCAAG GCACTAAGCTCGAAATTAAGctacg (서열식별번호:75)

[0265]

- [0266] 서열식별번호: 39-44의 임의의 하나에 대해 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다.
- [0267] 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 가변 경쇄 서열과 동일한 가변 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다.
- [0268] 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 가변 경쇄를 인코딩하는 가변-경쇄 인코딩 서열과 동일한 가변 경쇄-인코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다.
- [0269] 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 가변 중쇄 서열과 동일한 가변 중쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다.
- [0270] 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%이거나, ATCC 수탁 번호 PTA-120196 또는 PTA-120197을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 가변 중쇄를 인코딩하는 가변 중쇄-인코딩 서열과 동일한 가변 중쇄-인코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다.
- [0271] 어떤 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들면 숙주 세포로부터 폴리펩타이드의 발현 및 분비를 보조하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 세포로부터 폴리펩타이드의 도입을 조절하기 위한 분비 서열로 기능하는 리더 서열)에 동일한 해독틀로 융합된 성숙된 폴리펩타이드에 대한 코딩 서열을 포함한다. 리더 서열을 갖는 폴리펩타이드는 프리단백질이며, 숙주 세포에 의해 절단되어 폴리펩타이드의 성숙 형태를 형성하는 리더 서열을 가질 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 성숙 단백질 + 추가의 5' 아미노산 잔기인 프로단백질을 인코딩할 수 있다. 프로서열을 갖는 성숙 단백질은 프로단백질이며, 단백질의 불활성 형태이다. 프로서열이 절단되면, 활성 성숙 단백질은 남는다.
- [0272] 어떤 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들면 인코딩된 폴리펩타이드의 정체를 허용하는 마커 서열에 대해 동일한 해독틀로 융합된 성숙 폴리펩타이드에 대한 코딩 서열을 포함한다. 예를 들면, 마커 서열은 박테리아 숙주인 경우 마커에 융합된 성숙 폴리펩타이드의 정체를 제공하는 pQE-9 벡터에 의해 공급된 헥사-히스티딘 태그, 또는 포유동물 숙주(예를 들면, COS-7 세포)가 사용되는 경우, 마커 서열은 인플루엔자 혈구응집소 단백질로부터 유도된 혈구응집소(HA) 태그일 수 있다.
- [0273] 본 발명은 추가로, 예를 들면 단편, 유사체, 및 유도체를 인코딩하는 본원에서 상술된 폴리뉴클레오타이드의 변이체에 관한 것이다.
- [0274] 폴리뉴클레오타이드 변이체는 코딩 영역, 비-코딩 영역, 또는 둘 모두에 변경을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 침묵 치환, 부가, 또는 결실을 생성하지만, 인코딩된 폴리펩타이드의 특성 또는 활성을 변경시키지 않는 변경을 함유한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 변이체는 유전자 암호의 축퇴로 인해 침묵 치환에 의해 생산된다. 폴리뉴클레오타이드 변이체는 다양한 이유로, 예를 들면 특정한 숙주에 대한 코돈 발현을 최적화하기(인간 mRNA에서의 코돈을 박테리아 숙주, 예컨대 *E. coli*에서 바람직한 것으로 변화시키기) 위해 생성될 수 있다.
- [0275] 본원에서 기재된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 및 세포가 또한 제공된다.
- [0276] IV. 생물학적 샘플
- [0277] 생물학적 샘플은 종종 고정제로 고정된다. 알데하이드 고정제, 예컨대 포르말린(포름알데하이드) 및 글루타르알데하이드가 전형적으로 사용된다. 다른 고정 기술, 예컨대 알코올 액침(Battifora and Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095)을 이용해서 고정된 조직 샘플도 적합하다. 사용된 샘플은 또한 파라핀 중에 임베딩될 수 있다. 일 구현예에서, 샘플은 포르말린-고정되고 더불어 파라핀-임베딩(FFPE)될 수 있다. 또 다른 구현예에서, FFPE 코어 샘플에 대해 특정 영역(들)을 선택하기 위해, FFPE 블록은 분석을 위해 하나 이상의 부분을 선택하기 전에 혼마록실린 및 에오신으로 염색된다. 이들 미립자 시료로부터의 조직 블록의 제조 방법은 다양한 예후 인자의 이전 IHC 연구에서 사용되었고 및/또는 당해분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다(예를 들면, Abbondanzo 등, Am J Clin Pathol. 1990 May;93(5):698-702; Allred 등, Arch Surg. 1990 Jan;125(1):107-13 참고).
- [0278] 간단히, 임의의 온전한 장기 또는 조직은 상당히 작은 조각으로 절단되고 조직이 "고정될" 때까지 다양한 기간

동안 다양한 고정제(예를 들면 포르말린, 알코올 등) 중에서 인큐베이션될 수 있다. 샘플은 신체로부터 수술로 제거된 사실상 모든 온전한 조직일 수 있다. 샘플은 조직병리 실험실에서 일상적으로 사용된 장비 상에 피팅되는 상당히 작은 조각(들)으로 절단될 수 있다. 절단 조각의 크기는 전형적으로 수 밀리미터 내지 수 센티미터 범위이다. 생물학적 샘플은 또한 유체 추출물, 혈액, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 및 또는 비장 제조물일 수 있다.

[0279] V. FOLR1 발현 및 치료적 효능의 상관관계

[0280] 항체 메이탄시노이드 접합체(AMC) IMGN853은 절단가능 설포-SPDB(N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트) 링커를 통해 부착된 메이탄시노이드, DM4(N(2')-데아세틸-N2'-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신)에 접합된 FOLR1-결합 단클론성 항체, huMov19(M9346A)를 포함한다. IMGN853(huMov19)의 항체 서열은 서열식별번호: 45 및 47로 아래에 제공되며, IMGN853 및 huMov19는 미국 출원 공개 번호 2012/0009181(현재 8,557,966)에 기재되며, 이는 본원에 그 전문이 참조로 편입된다.

[0281] 서열식별번호: 45 - huMov19 vHC

[0282] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSTEDFAVYYCTRYDGS
RAMDYWGQQGTTVTVSS

[0283] 서열식별번호: 46 - huMov19 vLCv1.00

[0284] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF
GGGTKEIKR

[0285] 서열식별번호: 47 - huMov19 vLCv1.60

[0286] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF
GGGTKEIKR

[0287] 서열식별번호: 48 - huMov19 vLC CDR1

[0288] KASQSVSFAGTSLMH

[0289] 서열식별번호: 49 - huMov19 vLC CDR2

[0290] RASNLEA

[0291] 서열식별번호: 50 - huMov19 vLC CDR3

[0292] QQSREYPYT

[0293] 서열식별번호: 51 - huMov19 vHC CDR1

[0294] GYFMN

[0295] 서열식별번호: 52 - huMov19 vHC CDR2 - 카밧 정의됨

[0296] RIHPYDGDTFYNQKFQG

[0297] 서열식별번호: 53 - huMov19 vHC CDR2 - Abm 정의됨

[0298] RIHPYDGDTF

[0299] 서열식별번호: 54 - huMov19 vHC CDR3

[0300] YDGSRAMDY

[0301] 서열식별번호: 55 - huMov19 HC 아미노산 서열

[0302] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSTEDFAVYYCTRYDGS
RAMDYWGQQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPVCPAPELGGPSVFLFPKPKDLMISRTPETCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSL
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- [0303] 서열식별번호: 56 - huMov19 LCv1.00
- [0304] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0305] 서열식별번호: 57 - huMov19 LCv1.60
- [0306] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0307] 서열식별번호: 58 - muMov19 vHC CDR2 - 카밧 정의됨
- [0308] RIHPYDGDTFYQNQNFKD
- [0309] IMGN853은 FOLR1 양성 난소암, 비-소세포 폐암, 자궁내막모양 암, 신장 암, 및 다른 상피성 악성물이 포함되는 다양한 치료 적응증에 대해 현재 임상 개발 중이다. 난소암은 가장 큰 FOLR1 침투를 나타내며, IMGN853을 이용한 치료를 위한 주요 적응증으로 고려된다(Antony AC. Ann Rev Nutr 16:501-21(1996); Yuan Y 등, Hum Pathol 40(10):1453-1460(2009)). 환자 혈장 샘플에서 FOLR1의 수준 측정은 AMC 치료에 더 잘 반응할 수 있는 환자 집단의 확인을 도울 수 있다.
- [0310] 어떤 구현예에서, 본 발명은 특히, 예를 들면 IHC에서 FOLR1 발현 수준의 동적 범위를 검출할 수 있는 본원에 제공된 항체 및 그것의 항원-결합 단편을 이용하여, 대상체에서 발현되는 FOLR1의 상승된 발현 수준으로 인해 FOLR1-표적화 항암 요법에 유리하게 반응할 수 있는 대상체의 확인 방법을 제공한다.
- [0311] 환자 샘플 및 이종이식 모델을 이용한 생체내 효능에 대한 상관관계의 평가는 치료에 더 잘 반응할 수 있는 대상체를 선택하기 위한 발현 분석력을 나타낸다. IHC는 종양 세포 상에서 FOLR1 발현에 대한 스코어를 제공한다: 0(발현 없음) 내지 3(또는 3+)(매우 높은 발현 수준). 이종이식 모델을 이용한 생체내 데이터는 FOLR1 발현에 대한 샘플 스코어링 2, 또는 3(또는 3+)이 FOLR1 면역접합체의 임상적으로-관련된 용량에서 FOLR1-표적화된 항암 요법에 반응할 증가된 가능성을 가짐을 나타낸다(예를 들면, 이들 모두 그 전문이 본원에 참조로 편입되는 미국 출원 번호 61/823,317 및 61/828,586 및 국제 출원 번호 PCT/US2014/037911을 참고). 따라서, 상승된 FOLR1 스코어를 갖는 개인의 확인은 임상적으로 관련된 투여량에 반응할 수 있는 개인의 확인을 도울 것이다. 게다가, 더 균일한 수준의 FOLR1의 발현은 치료적 이점과 더 우수한 상관관계를 제공한다. 따라서, 동종성 염색 균일성 또는 이종성 염색 균일성을 갖는 증가된 염색 조합은 증가된 FOLR1 발현을 시사할 수 있다. 예를 들면, 2 헤테로 초파의 스코어가 FOLR1 치료제를 이용한 치료를 위한 환자 선택 기준으로 사용될 수 있다(예를 들면, 본원에 그 전문이 참조로 편입된 미국 공개 출원 번호 2012/0282175 참고).
- [0312] FOLR1 발현 분석으로 또한 감소된 수준의 FOLR1-표적화 항암 요법("저용량 요법")이 항종양 반응을 유도하기 위해 유효할 수 있는 환자를 확인한다. 당해기술에서 이해되는 바와 같이, 화합물은 원하는 치료 반응을 달성하는 최소 투여량에서 일반적으로 투여된다. 이것은 특히 임상 부작용을 유도하는 치료제에 있어서 중요하다. 상승된 FOLR1 발현 수준을 갖는 대상체를 인식하는 능력은 FOLR1-표적화 치료제의 투여량 최소화를 허용하며, 이에 따라 치료 효능을 유지하면서 가능한 부작용을 감소시킨다.
- [0313] 따라서, 본원에서 제공된 항체 및 항원-결합 단편은 이들이 FOLR1 발현 수준의 동적 범위를, 예를 들면 IHC에서 검출할 수 있으므로, 그와 같은 방법에서 사용하기에 특히 유리하다.
- [0314] VI. 훌린 항원 분석
- [0315] 환자 혈장 샘플 내 순환 항원(훌린 항원) 수준의 측정은 치료, 예를 들면 항체 메이탄시노이드 접합체(AMC) 치료에 더 잘 반응할 수 있는 환자 집단의 확인을 도울 수 있다. 높은 수준의 훌린 항원은 치료적 항체의 약동학에 현저하게 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Tolcher A. 등, 20th Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics; October 21-24, 2008; Geneva, Switzerland: EORTC-NCI-AACR, p163, #514; Baselga J 등, J Clin Oncol 14:737-744(1996)). 환자 혈장 샘플로부터의 훌린 항원 수준은 요인, 예컨대 항원 표적, 질환 적응증 및 질환 경과에 따라 가변적일 것이다. 항-FOLR1 면역접합체 IMGN853에 대한 질환 적응증에서의 현재 훌린 항원 수준은 충분히 조사되지 않은 반면, 고형 종양 발현과의 상관관계는 제한된다. FOLR1의 상승이 난소 선암종에서 보고되었으나, 데이터는 이것이 다른 FOLR1+ 종양 적응증, 예컨대 소세포 폐 암종에서 상승되지 않음을 제시한다(Mantovani LT 등, Eur J Cancer 30A(3):363-9(1994); Basal E 등, PLoS ONE 4(7):

e6292(2009)). 본 방법은 본원에서 제공되고 훌린 FOLR1의 동적 범위를 검출할 수 있는 항체 및 그것의 항원-결합 단편을 이용하여 높은 엽산의 존재 하에 FOLR1 수용체의 검출을 허용한다. 이전의 분석은 분석 설계에서 Mov19를 사용하였다. IMGN853이 Mov19를 함유하고, 일 구현예에서 본 발명의 표적 요법이므로, 방법이 Mov19의 존재 또는 부재 하에 FOLR1을 검출하는 것이 필수적이다. Mov19를 이용하는 이전 분석은 경쟁적 효과를 가지며, IMGN853 치료를 수여받는 환자에서 유의미하게 더 적거나 없는 FOLR1을 검출할 것이다.

[0316] 일 구현예에서, 인간 공급 유체 샘플에서 FOLR1의 검출을 위한 본 방법은 전통적 샌드위치 ELISA 포맷을 이용한다. 일 구현예에서, 방법은 고형 지지체에 부착된 FOLR1에 대한 포착제(즉, 항체)를 이용한다. 일 구현예에서, 고형 지지체는 미세적정 플레이트이다. 이를 위해, 샘플(복수액, 혈장 등)이 희석 없이 첨가되며, 제1 포착제의 결합을 방해하지 않는 상이한 검출제(상이한 항체)에 의해 검출된다. 이어서 검출제는 제1 검출제에 1 회를 초과하여 결합할 수 있고 이에 따라 검출 신호를 증폭하는 2차 검출제(바이오틴/스트렙타비딘, 항-인간 2차 단클론성 또는 다클론성 항체 등)의 사용을 통해 검출된다. 2차 검출제는 일부 다른 수단(예를 들면, TMB/페록시다제, 섬광 계수, 형광 프로브 등)의 사용에 의해 정량된다. 추가로, 분석은 FOLR1을 검출하며, Mov19, IMGN853, 다른 FOLR1 패밀리 멤버, 또는 엽산의 존재에 의해 부정적으로 영향을 받지 않는다.

[0317] 본 발명의 분석에는 FOLR1-기반 요법을 수여받기 위한 적격 환자를 선택하기 위한 분석 및 환자 반응을 모니터링하기 위한 분석이 모두 포함된다. 반응 예측을 위한 분석은 요법 선택 전에 수행되며, FOLR1의 수준이 요법 결정에 영향을 미칠 수 있다. 환자 반응을 모니터링하기 위해, 분석은 샘플 내 FOLR1의 기준선(또는 소정) 수준을 구축하기 위해 요법의 개시 시 수행된다. 이어서 동일한 샘플이 분석되고, FOLR1 수준이 기준선 또는 소정 수준과 비교된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "소정 수준"은 일반적으로 소정 수준에 대해 분석 결과를 비교하고, 소정 수준이 이미 다양한 임상 파라미터(예를 들면, 약물로 치료받고 있는 대상체가 약물의 유효한 혈액 수준을 달성하였는지의 모니터링, 항암 약물을 이용한 암 치료를 수여받고 있는 대상체의 반응 모니터링, 상기 종양에 대한 치료를 수여받고 있는 대상체에서 종양의 반응 모니터링 등)와 연결되거나 관련된 경우, 진단 결과를 평가하기 위해 사용되는 분석 컷오프 값을 나타낸다. 소정 수준은 절대 값 또는 요법의 개시 전에 환자로부터 수득된 값을 감산하여 정규화된 값을 수 있다. 사용될 수 있는 소정 수준의 예는 임의로 하나 이상의 질환 또는 병태를 겪을 수 있는 하나 이상의 대상체로부터 수득된 기준선 수준이다. 분석된 바이오마커의 수준과 기준선 또는 소정 수준의 비교(또는 정보 분석)는 자동화된 시스템, 예컨대 분석이 수행되는 장비(예를 들면, 컴퓨터 플랫폼)의 일부이거나 이와 상용성인 소프트웨어 프로그램 또는 인텔리전스 시스템에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, 상기 비교 또는 정보 분석은 의사에 의해 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 수준이 동일하게 유지되거나 감소하는 경우, 요법이 유효할 수 있고 계속될 수 있다. 기준선 수준(또는 소정 수준)에 비해 유의미한 증가가 일어나는 경우, 환자가 반응하고 있지 않을 수 있다. 또 다른 구현예에서, 훌린 FOLR1 수준 증가는 증가된 세포사 및 훌린 FOLR1의 증가된 방출을 시사할 수 있다. 이 구현예에서, 훌린 FOLR1의 증가는 치료적 효능을 시사한다.

[0318] 본 발명의 분석은 임의의 단백질 분석 방법에 의해 수행될 수 있다. 본 발명에서 유용한 단백질 분석 방법은 당해기술에서 잘 알려져 있고, FOLR1의 발현된 단백질 또는 단편에 대해 특이적인 표지되지 않은 또는 표지된 항체 또는 단백질의 결합이 관여되는 면역분석 방법이 포함된다. 유용한 면역분석 방법에는 당해기술에서 공지된 임의의 포맷을 이용하여 수행된 용액상 분석, 예컨대 비제한적으로 Biacore, 시간 분해 형광 에너지 전달(TR-FRET), ELISA 포맷(샌드위치, 전방 및 후방 경쟁적 억제) 또는 형광 분극화 포맷, 및 고상 분석, 예컨대 면역조직화학이 모두 포함된다. 본원에서 제공된 FOLR1 항체 및 그것의 항원-결합 단편은, 예를 들면 이들이 FOLR1의 동적 범위를 검출할 수 있으므로, 이러한 면역분석 방법을 위해 특히 유용하다.

VII. 순환 종양 세포 분석

[0319] 본원에 기재된 항-FOLR1 항체는 또한 순환 종양 세포 분석에서 FOLR1의 검출을 위해 사용될 수 있다. 순환 종양 세포(CTCs)는 종양으로부터 맥관구조 내로 흘려지고 혈류 중에 순환하는 세포이다. CTC는 순환에서 극히 낮은 갯수로 존재한다. 일반적으로, CTC는 당해기술에 공지된 다양한 기술에 의해 환자 혈액 또는 혈장으로부터 농축된다. CTC는 비제한적으로, 유세포측정-기반 방법 및 IHC-기반 방법을 포함하는 당해기술에서 공지된 방법을 이용하여 특정 마커에 대해 염색될 수 있다. CTC는 종양 세포에 독특한 단백질 마커에 대해 염색될 수 있고, 이는 정상 혈구로부터 CTC 확인 및 구별을 허용한다. CTC는 또한 비제한적으로 2.1, 5.7, 및 9.20을 포함하는 본원에서 제공된 항체를 이용하여 FOLR1에 대해 염색될 수 있다. CTC 분석에는 또한 CTC의 갯수 및/또는 FOLR1 양성 CTC의 갯수의 정량적 분석이 포함될 수 있다. 본원에 기재된 FOLR1 항체는 CTC에 존재하는 FOLR1을 측정하기 위해 암을 갖는 대상체로부터 단리된 CTC를 염색하기 위해 사용될 수 있다. FOLR1 발현 CTC의 증가는 대상체가 FOLR1 기반 요법에 반응할 수 있는 암을 갖는 것으로 확인하는 것을 돋거나 FOLR1 항체 또는 면역접합체를 이용

한 치료 레지멘의 최적화를 허용할 수 있다. CTC FOLR1의 정량은 종양 단계, 요법에 대한 반응 및/또는 질환 진행에 대한 정보를 제공할 수 있다. 이는 예후, 예측 또는 약동력학 바이오마커로 사용될 수 있다. 또한, 본원에서 제공된 항체를 이용한 FOLR1에 대한 CTC의 염색은 액체 생검으로서 단독으로 또는 고형 생검 샘플의 추가 종양 마커 분석과 조합되어 사용될 수 있다.

[0321] VIII. 검출

본 발명은 추가로, 적어도 하나의 제제에 연결되어 검출 항체 접합체를 형성하는, 일반적으로 단클론성 유형의 FOLR1에 대한 항체를 제공한다. 항체 분자의 진단제로서의 효능을 증가시키기 위해, 적어도 하나의 원하는 분자 또는 모이어티를 연결하거나 공유 결합시키거나 착화하는 것이 통상적이다. 그와 같은 분자 또는 모이어티는 비제한적으로 적어도 하나의 리포터 분자일 수 있다. 리포터 분자는 분석을 이용해서 검출될 수 있는 임의의 모이어티로 정의된다. 항체에 접합된 리포터 분자의 비-제한적인 예에는 효소, 방사선표지, 합텐, 형광 표지, 인광 분자, 화학발광 분자, 발색단, 발광 분자, 광친화도 분자, 착색된 입자 및/또는 리간드, 예컨대 바이오틴이 포함된다.

항체 접합체의 어떤 예는 본원에서 제공된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 검출가능한 표지에 연결되는 접합체이다. "검출가능한 표지"는 그것의 특정한 기능적 특성, 및/또는 화학적 특성, 이들이 부착되는 항체 또는 항원-결합 단편이 검출될 수 있도록 하는 용도에 의해 검출될 수 있고 및/또는 원하는 경우 추가로 정량화될 수 있는 화합물 및/또는 요소이다.

많은 적절한 조영제가 항체에 대한 이들의 부착 방법과 같이 당해기술에 공지되어 있다(예를 들면, 각각 본원에 참조로 편입된 미국 특허 번호 5,021,236; 4,938,948; 및 4,472,509 참고). 이용된 조영 모이어티는, 예를 들면 상자성 이온; 방사활성 동위원소; 형광단, NMR-검출가능 물질; 및/또는 X-선 조영일 수 있다.

결합제(예를 들면, 항체) 접합체로 사용하기 위해 고려된 예시적인 형광 표지에는, 예를 들면 Alexa 350, Alexa 430, Alexa 488, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 캐스케이드 블루, Cy3, Cy5, 6-FAM, Dylight 488, 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), 녹색 형광 단백질(GFP), HEX, 6-JOE, 오레곤 그린 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 퍼시픽 블루, 파이코에리트린, REG, 로다민 그린, 로다민 레드, 테트라메틸 로다민(TMR) 래노그라핀, ROX, TAMRA, TET, 테트라메틸로다민, 텍사스 레드, 및 이들 표지의 유도체(즉, 할로겐화 유사체, 이소티오시아네이트 또는 접합을 위한 다른 링커로 개질된 것 등)가 포함된다. 예시적인 방사선표지는 삼중수소이다.

본 발명에서 고려된 항체 또는 항원-결합 단편 검출 접합체에는 시험관내 사용을 위한 것이 포함되며, 여기서 항체 또는 단편은 발색 기질과 접촉 시 착색 산물을 산출할 2차 결합 리간드 및/또는 효소(효소 태그)에 연결된다. 본원에서 제공된 FOLR1 항체 및 그것의 항원-결합 단편은, 예를 들면 이들이 FOLR1의 동적 범위를 검출할 수 있으므로, 접합 방법에 특히 유용하다. 적합한 효소의 예에는 우레아제, 알칼리성 포스파타제, (홀스래디쉬) 수소 폐록시다제 및/또는 글루코스 옥시다제가 포함된다. 일부 구현예에서, 2차 결합 리간드는 바이오틴 및/또는 아비딘 및 스트렙타비딘 화합물이다. 그와 같은 표지의 사용은 당해분야의 숙련가에게 잘 알려져 있고, 예를 들면 각각 본원에 참조로 편입되는 미국 특허 번호 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 및 4,366,241에 기재된다).

아지도 그룹을 함유하는 분자는 또한 낮은 세기의 자외선광에 의해 산출되는 반응성 니트렌 중간체를 통해 단백질에 대한 공유 결합을 형성하기 위해 사용될 수 있다(Potter & Haley, 1983). 특히, 퓨린 뉴클레오타이드의 2- 및 8-아지도 유사체는 미가공 세포 추출물에서 뉴클레오타이드 결합 단백질을 확인하기 위한 부위 지향적 광프로브로 사용되었다(Owens & Haley, 1987; Atherton 등, 1985). 2- 및 8-아지도 뉴클레오타이드는 또한 정제된 단백질의 뉴클레오타이드 결합 도메인을 맵핑하기 위해 사용되었고(Khatoon 등, 1989; King 등, 1989; 및 Dholakia 등, 1989) 항체 결합제로 사용될 수 있다.

항체의 그 접합체 모이어티에 대한 부착 또는 접합을 위한 몇몇 방법이 당해기술에 공지되어 있다. 일부 부착 방법에는, 예를 들면 결합제(예를 들면, 항체)에 부착된 유기 칠레이트제, 예컨대 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물(DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔설폰아미드; 및/또는 테트라클로로-3 α -6 α -디페닐글리쿠릴-3을 이용하는 금속 칠레이트 착물의 사용이 관여된다(각각 본원에 참조로 편입된 미국 특허 번호 4,472,509 및 4,938,948). 단클론성 항체는 또한 커플링제, 예컨대 글루타르알데하이드 또는 퍼아이오레이트의 존재 하에 효소와 반응될 수 있다. 플루오레신 마커와의 단백질 결합(예를 들면, 항체) 접합체는 이들 커플링제의 존재 하에 또는 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조된다. 미국 특허 번호 4,938,948에서, 유방 종

양의 조영은, 예를 들면 단클론성 항체를 이용해서 달성되며, 검출가능한 조영 모이어티는 링커, 예컨대 메틸-p-하이드록시벤즈이미데이트 또는 N-석신이미딜-3-(4-하이드록시페닐)프로피오네이트를 이용해서 항체에 결합된다.

- [0329] 다른 구현예에서, 항체 조합 부위를 변경하지 않는 반응 조건을 이용해서 면역글로불린의 Fc 영역 내에 설프하이드릴 그룹을 선택적으로 도입하는 면역글로불린의 유도체화가 고려된다. 상기 방법론에 따라 생성된 항체 접합체는 향상된 수명, 특이성 및 민감성을 나타내는 것으로 개시된다(본원에 참조로 편입된 미국 특허 번호 5,196,066). 리포터 또는 효과기 문자가 Fc 영역에서 탄수화물 잔기에 접합되는 효과기 또는 리포터 문자의 부위-특이적인 부착도 문헌(O'Shannessy 등, 1987)에 개시되었다.
- [0330] 본 발명의 다른 구현예에서, 면역글로불린은 핵종, 예컨대 삼중수소로 방사선표지된다. 추가 구현예에서, 나노금 입자(예컨대 약 0.5 nm-40 nm 크기) 및/또는 양자 점(Hayward, Calif.)이 이용된다.
- [0331] 샌드위치 분석 포맷이 사용되는 경우, 포착 항체는 표지되지 않을 것이다. 검출 항체는 직접적으로 표지되거나, 제1 항체에 대해 유도된 물 과잉의 제2, 표지된 항체의 부가(과잉 검출 항체 세척 후)에 의해 간접적으로 검출된 것이다.
- [0332] 검출 항체에 대해 사용된 표지는 FOLR1 항체의 결합을 방해하지 않는 임의의 검출가능한 기능성 표지이다. 적합한 표지의 예는 직접적으로 검출될 수 있는 모이어티, 예컨대 형광색소, 화학발광, 및 방사성 표지뿐만 아니라 검출되기 위해 유도체화되거나 반응해야 하는 모이어티, 예컨대 효소를 포함하는, 면역분석에서의 사용을 위해 공지된 여러 표지이다. 그와 같은 표지의 예에는 방사선동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 및 ^{131}I , 형광단, 예컨대 희토류 키레이트 또는 플루오레신 및 그것의 유도체, 로다민 및 그것의 유도체, 단실, 엠벨리페론, 루시퍼라제, 예를 들면 개똥벌레 루시퍼라제 및 박테리아 루시퍼라제(미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디하이드로프탈라진디온, 홀스래디쉬 폐록시다제(HRP), 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들면 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 탈수효소, 헤테로사이클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 잔틴 옥시다제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 채용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토페록시다제, 또는 마이크로폐록시다제와 커플링된 것, 바이오틴/아비딘, 바이오틴/스트렙타비딘, 바이오틴/스트렙타비딘- β -갈락토시다아제+MUG 스핀 표지, 박테리오파아지 표지, 안정한 유리 라디칼 등이 포함된다. 본원에서 언급된 바와 같이, 형광측정 검출은 하나의 예이다.
- [0333] 단백질 또는 폴리펩타이드에 이들 표지를 공유 결합시키기 위해 종래의 방법이 이용가능하다. 예를 들면, 커플링제, 예컨대 디알데하이드, 카보디이미드, 디말레이이미드, 비스-이미데이트, 비스-디아조화된 벤자린 등이 항체를 본원에 기재된 형광, 화학발광, 및 효소 표지로 태그화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, [미국 특허 번호 3,940,475(형광측정법) 및 3,645,090(효소); Hunter 등, Nature 144:945(1962); David 등, Biochemistry 13:1014-1021(1974); Pain 등, J. Immunol. Methods 40:219-230(1981); 및 Nygren J. Histochem. and Cytochem. 30:407-412(1982)]를 참고하라. 어떤 구현예에서, 본원에서의 표지는 증폭 및 민감성을 8 pg/ml로 증가시키기 위해 형광성이며, 더 바람직하게는 신호를 증폭하기 위한 스트렙타비딘- β -갈락토시다제 및 MUG와의 바이오틴이다. 어떤 구현예에서, 예를 들면, 검출가능한 항체가 바이오틴화되고 검출 수단이 아비딘 또는 스트렙타비딘-폐록시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤자린인 비색 표지가 사용된다.
- [0334] 효소를 포함하는 그와 같은 표지의 항체에 대한 접합은 면역분석 기술에서 당업자에 대한 표준 조작 절차이다. 예를 들면, [O'Sullivan 등, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, ed. J. J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73(Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166]를 참고하라.
- [0335] 최종 표지된 항체의 첨가 후, 결합된 항체의 양은 과잉의 미결합된 표지된 항체를 세척을 통해 제거한 다음 표지에 적절한 검출 방법을 이용해서 부착된 표지의 양을 측정하고, 측정된 양을 생물학적 샘플 내 홀린 FOLR1의 양과 연관시켜 결정된다. 예를 들면, 효소의 경우, 발색되고 측정된 색상의 양은 존재하는 홀린 FOLR1의 양의 직접적인 측정치일 것이다. 구체적으로 HRP가 표지인 경우, 색상은 450 nm 흡광도에서 기질 3,3',5,5'-테트라메틸 벤자린을 이용해서 검출될 수 있다.
- [0336] IX. 기질 및 인디케이터
- [0337] 기질 및 인디케이터의 사용이 FOLR1의 검출을 위해 고려된다.
- [0338] 홀스래디쉬 폐록시다제(HRP)는 먼저 과산화수소와 복합체를 형성한 다음 이것이 분해되도록 유도하여 물 및 원

자 산소를 생성하는 효소이다. 많은 다른 효소와 마찬가지로, HRP 및 일부 HRP-유사 활성은 과잉의 기질에 의해 억제될 수 있다. HRP 및 과잉의 과산화수소 간에 형성된 복합체는 촉매적으로 불활성이고, 전자 공여체(예를 들면 발색 물질)의 부재 하에 가역적으로 억제된다. 내인성 HRP 활성의 켄칭을 일으키는 것은 과잉의 과산화수소 및 전자 공여체의 부재이다. 분석 시스템에서 사용될 때, HRP는 또한 정의된 기질을 그 활성화된 발색제로 전환시켜 색상 변화를 유도하기 위해 사용될 수 있다. HRP 효소는 당해기술에 공지된 여러 방법에 의해 항체, 웹타이드, 폴리머, 또는 다른 분자에 접합될 수 있다. HRP 및 항체 혼합물을 함유하는 용액에 대한 글루타르알데하이드의 첨가는 효소에 비해 서로 접합되는 더 많은 항체 분자를 생성할 것이다. 2-단계 절차에서, HRP는 먼저 이작용성 시약과 반응한다. 제2 단계에서, 활성화된 HRP만 항체와 혼합되어 훨씬 더 효율적인 표지를 일으키고 중합은 일으키지 않는다. HRP는 또한 2-단계 글루타르알데하이드 절차를 이용해서 (스트렙트)아비딘에 접합된다. 상기 형태는, 예를 들면 LAB 및 LSAB가 기질인 절차에서 사용된다. 바이오틴이 HRP 효소의 앱실론아미노 그룹과 반응할 수 있기 전에 먼저 바이오틴-N-하이드록시석신이미드 에스테르 또는 바이오틴 하이드라자이드로 유도체화되어야 하므로, 바이오틴을 이용한 접합에는 2 단계가 관여된다.

[0339] 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)은 알코올 및 다른 유기 용매 중에 상당히 불용성인 갈색 최종 산물을 생성하는 효소, 예컨대 HRP에 대한 기질이다. DAB의 산화도 중합을 유도하여, 오스뮴 테트록사이드와 반응하는 능력으로 이어지며, 이에 따라 그 염색 세기 및 전자 밀도를 증가시킨다. 중합된 DAB의 광학 밀도를 강화하기 위해 사용된 몇몇 금속 및 방법 중, 은 살파이드와 조합된 금 클로라이드가 가장 성공적인 것으로 나타난다.

[0340] 3-아미노-9-에틸카바졸(AEC)은 효소, 예컨대 HRP에 대한 기질이며, 산화 시 알코올을 가용성인 장미-적색 최종 산물을 형성한다. 따라서, AEC로 가공된 시료는 알코올 또는 알코올계 용액(예를 들면, Harris 해마톡실린) 중에 액침되어서는 안 된다. 대신에, 수성 대조염색 및 마운팅 배지가 사용되어야 한다.

[0341] 4-클로로-1-나프톨(CN)은 청색 최종 산물을 침전하는 효소, 예컨대 HRP에 대한 기질이다. CN은 알코올 및 다른 유기 용매 중에 가용성이므로, 시료는 탈수되거나, 알코올계 대조염색에 노출되거나, 또는 유기 용매를 함유하는 마운팅 배지로 커버슬립되어서는 안 된다. DAB과는 달리, CN은 침전 부위로부터 확산하는 경향이 있다.

[0342] p-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드/피로카테콜(Hanker-Yates 시약)은 알코올 및 다른 유기 용매 중 불용성인 청흑색 반응 산물을 제공하는 효소, 예컨대 HRP에 대한 기질이다. 중합된 DAB과 마찬가지로, 상기 반응 산물은 오스뮴화될 수 있다. 면역페록시다제 기술에서 Hunker-Yates 시약으로 다양한 결과가 달성될 수 있다.

[0343] 소 창자 알칼리성 포스파타제(AP)(분자량 100 kD)는 P-O 결합을 절단하여 유기 에스테르로부터 포스페이트 그룹을 제거하고(가수분해에 의해) 이를 전달한다; 중간체 효소-기질 결합이 짧게 형성된다. AP에 대한 주요 금속 활성체는 Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ 및 Ca⁺⁺이다.

[0344] AP는 표지되지 않은 알칼리성 포스파타제-항-알칼리성 포스파타제(APAAP) 절차의 공개 전까지 면역조직화학에서 광범위하게 사용되지 않았다. 상기 절차에서 이용된 가용성 면역 복합체는 대략 560 kD의 분자량을 갖는다. 페록시다제 항-페록시다제(PAP) 기술 대비 APAAP 절차의 주요 이점은 내인성 페록시다제 활성에 의해 부과되는 간접의 부재이다. 내인성 페록시다제는 묽은 과산화수소 용액을 이용해서 차단될 수 있다. PAP 염색 상에서 내인성 페록시다제 활성의 잠재적 방해로 인해, APAAP 기술은 혈액 및 골수 도말표본 상에서의 사용에 대해 권장된다. 뼈, 신장, 간 및 일부 백혈구로부터의 내인성 알칼리성 포스파타제 활성은 5 mM이 더 유효한 것으로 나타났지만, 기질액에 1 mM 레바미솔의 첨가에 의해 억제될 수 있다. 창자 알칼리성 포스파타제는 레바미솔에 의해 적절하게 억제되지 않는다.

[0345] 면역알칼리성 포스파타제 염색 방법에서, 효소는 나프톨 포스페이트 에스테르(기질)를 페놀계 화합물 및 포스페이트로 가수분해한다. 페놀은 무색 디아조늄 염(발색체)에 커플링되어 불용성, 착색된 아조 염료를 생성한다. 몇몇 상이한 조합의 기질 및 발색체가 성공적으로 사용되었다.

[0346] 나프톨 AS-MX 포스페이트 AP 기질은 그 산 형태로 또는 나트륨 염으로 사용될 수 있다. 발색체 기질 Fast Red TR 및 Fast Blue BB는 각각 밝은 적색 또는 청색 최종 산물을 생성한다. 둘 다 알코올계 및 다른 유기 용매 중에 가용성이므로, 수성 마운팅 배지가 사용되어야 한다. 염색 세포가 도말표본인 경우 Fast Red TR이 바람직하다.

[0347] 추가의 예시적인 기질에는 나프톨 AS-BI 포스페이트, 나프톨 AS-TR 포스페이트 및 5-브로모-4-클로로-3-인독실 포스페이트(BCIP)가 포함된다. 다른 가능한 발색체에는, 예를 들면 Fast Red LB, Fast Garnet GBC, 니트로 블루 테트라졸륨(NBT) 및 아이오도니트로테트라졸륨 바이올렛(INT)이 포함된다.

[0348] X. 면역검출 방법

추가 구현예에서, 본 발명은 생물학적 성분, 예컨대 본 발명에 의해 고려되는 리간드의 결합, 정제, 제거, 정량 및/또는 달리 일반적으로 검출을 위한 면역검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 항체가 이용될 수 있다. 일부 면역검출 방법에는 소수를 언급하자면, 면역조직화학, 유세포측정, 효소 연결된 면역흡착 분석(ELISA), 방사선면역분석(RIA), 면역방사계수 분석, 플루오로면역분석, 화학발광 분석, 생물발광 분석, 및 웨스턴 블랏이 포함된다. 다양한 유용한 면역검출 방법의 단계는 과학 문헌, 예컨대 [Doolittle M H and Ben-Zeev O, Method Mol Biol. 1999;109:215-37; Gulbis B and Galand P, Hum Pathol. 1993 Dec;24(12):1271-85; 및 De Jager R 등, Semin Nucl Med. 1993 Apr;23(2):165-79]에 기재되었고, 각각 본원에 참조로 편입된다.

[0350] 일반적으로, 면역결합 방법에는 리간드 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 웨스턴 블랏을 포함하는 것으로 의심되는 샘플을 수득하는 단계, 및 샘플을 본 발명에 따른 제1 리간드 결합체(예를 들면, 항-리간드 항체)와, 가능한 경우 면역복합체의 형성을 허용하기에 유효한 조건 하에 접촉시키는 단계가 포함된다.

[0351] 항원 검출에 관해, 분석된 생물학적 샘플은 FOLR1을 검출하기 바람직한 임의의 샘플, 예컨대 유체 추출물, 혈액, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 조직 절편 또는 시료, 균질화된 조직 추출물, 생검 흡인물, 세포, 분리된 및/또는 정제된 형태의 FOLR1-함유 조성물, 또는 임의의 생물학적 유체일 수 있다. 일부 구현예에서, 혈액, 혈장, 또는 림프 샘플 또는 추출물이 사용된다.

[0352] 선택된 생물학적 샘플을 항체와, 면역 복합체(일차 면역 복합체)의 형성을 허용하기 충분한 시기 동안 유효 조건 하에 접촉시키는 단계는 일반적으로 단순히 항체 조성물을 샘플에 첨가하고, 항체가 존재하는 임의의 리간드 단백질 항원과 면역 복합체를 형성하기 충분한 시기 동안 혼합물을 인큐베이팅하는 것에 관한 것이다. 상기 시간 후, 샘플-항체 조성물, 예컨대 조직 절편, ELISA 플레이트, 닷 블랏 또는 웨스턴 블랏은 일반적으로 임의의 비-특이적으로 결합된 항체 종을 제거하기 위해 세척되어 일차 면역 복합체 내에 특이적으로 결합된 항체만 검출되도록 할 것이다.

[0353] 일반적으로, 면역복합체 형성의 검출은 당해기술에서 잘 알려져 있고, 여러 접근법의 적용을 통해 달성될 수 있다. 이들 방법은 일반적으로 표지 또는 마커, 예컨대 임의의 방사성, 형광, 생물학적 및 효소적 태그의 검출에 기반한다. 그와 같은 표지의 사용에 관한 미국 특허들에는 미국 특허 번호 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 및 4,366,241이 포함되며, 각각 본원에 참조로 편입된다. 물론, 당해기술에 공지된 바와 같이, 2차 결합 리간드, 예컨대 제2 항체 및/또는 바이오틴/아비딘 리간드 결합 배열의 사용을 통해 추가 이점을 찾을 수 있다.

[0354] 검출에서 이용된 항-리간드 항체는 검출가능한 표지에 자체 연결될 수 있고, 여기서 단순히 상기 표지를 검출함으로써 조성물 중 일차 면역 복합체의 양이 결정되도록 할 것이다. 대안적으로, 일차 면역 복합체 내에서 결합되는 제1 항체는 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 제2 결합체에 의해 검출될 수 있다. 이러한 경우에, 제2 결합체는 검출가능한 표지에 연결될 수 있다. 제2 결합체는 자체가 종종 항체이며, 따라서 "2차" 항체로 불릴 수 있다. 일차 면역 복합체는 표지된, 2차 결합체, 또는 항체와, 2차 면역 복합체의 형성을 허용하기 충분한 시간 동안 유효 조건 하에 접촉된다. 이어서 2차 면역 복합체는 일반적으로 세척되어 임의의 비-특이적으로 결합된 표지된 2차 항체 또는 리간드가 제거되고, 2차 면역 복합체 내의 잔여 표지가 검출된다.

[0355] 추가 방법에는 2-단계 접근법에 의한 일차 면역 복합체의 검출이 포함된다. 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 제2 결합체, 예컨대 항체가 본원에 기재된 바와 같이 2차 면역 복합체를 형성하기 위해 사용된다. 세척 후, 2차 면역 복합체는 제2 항체에 대한 결합 친화도를 가지는 제3 결합체 또는 항체와, 다시 면역 복합체(3차 면역 복합체)의 형성을 허용하기 충분한 시기 동안 유효 조건 하에 접촉된다. 제3 리간드 또는 항체는 검출가능한 표지에 연결되어, 이렇게 형성된 3차 면역 복합체의 검출을 허용한다. 상기 시스템은 바람직한 경우, 신호 증폭을 제공할 수 있다.

[0356] 또 다른 구현예에서, 바이오틴화된 단클론성 또는 다클론성 항체가 표적 항원(들)을 검출하기 위해 사용되며, 이어서 제2 단계 항체가 복합체화된 바이오틴에 부착된 바이오틴을 검출하기 위해 사용된다. 상기 방법에서, 시험될 샘플은 제1 단계 항체를 포함하는 용액 중에서 먼저 인큐ベ이션된다. 표적 항원이 존재하는 경우, 일부 항체가 항원에 결합하여 바이오틴화된 항체/항원 복합체를 형성한다. 그 뒤 항체/항원 복합체가 스트렙타비딘(또는 아비딘), 바이오틴화된 DNA, 및/또는 상보적 바이오틴화된 DNA의 후속 용액 중 인큐ベ이션에 의해 증폭되며, 각각의 단계는 추가 바이오틴 부위를 항체/항원 복합체에 추가한다. 증폭 단계는 적합한 증폭 수준이 달성될 때까지 반복되며, 이 시점에 샘플이 바이오틴에 대한 제2 단계 항체를 포함하는 용액 중에 인큐ベ이션된

다. 상기 제2 단계 항체는, 예를 들면 발색체 기질을 이용한 조직효소학에 의해 항체/항원 복합체의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있는 효소로 표지된다. 적합한 증폭으로, 거시적으로 가시적인 접합체가 생성될 수 있다.

[0357] 일 구현예에서, 면역조직화학(IHC)이 면역학적 검출을 위해 사용된다. IHC를 이용하여, 샘플 중 FOLR1의 검출은 샘플을 프로브, 예를 들면, 항-FOLR1 항체로 표적화하여 달성될 수 있다. 프로브는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 표지에 연결될 수도 있고, 또는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 표지에 연결되는 또 다른 프로브에 의해 검출될 수도 있다.

[0358] 일부 구현예에서, IHC, 예를 들면 보정된 IHC는 상이한 수준의 단백질 발현 간을 구별할 수 있다. 일부 구현예에서, IHC는 낮은 FOLR1, 중간 FOLR1, 또는 높은 FOLR1 발현을 갖는 샘플에 대해 염색 세기를 구별할 수 있다.

[0359] 일 구현예에서, FOLR1의 면역학적 검출(면역조직화학에 의한)은 세기 및 균일성(염색된 세포 퍼센트 - 막 단독) 둘 다에 대해 스코어링된다. 세기에 대한 FOLR1 발현의 비교 척도는 0 - 음성, 0-1 - 매우 약함, 1 - 약함, 1-2 - 약함 내지 중간 정도임, 2 - 중간 정도임, 2-3 - 중간 정도 내지 강함, 3 - 강함, 3+ - 매우 강함으로 연관된다. 정량적으로, 스코어 0은 막 염색이 판측되지 않음을 나타낸다. 스코어 1은 희미한/겨우 인지가능한 막 염색이 검출됨을 나타낸다. 스코어 2에 있어서는 약하거나 중간 정도의 전체 막 염색이 판측된다. 마지막으로, 스코어 3(또는 3+)은 중간 정도 내지 전체 막 염색이 판측됨을 나타낸다. FOLR1 발현에 대해 스코어 0 또는 1을 갖는 샘플은 상승된 FOLR1 발현을 갖지 않는 것으로 분석될 수 있는 반면, 스코어 2 또는 3을 갖는 샘플은 과발현으로 또는 상승된 FOLR1을 갖는 것으로 분석될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 항체, 그것의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩타이드를 이용하여, FOLR1 발현에 대해 스코어 0을 갖는 샘플은 상승된 FOLR1 발현을 갖지 않는 것으로 분석될 수 있고, 스코어 1을 갖는 샘플은 FOLR1의 증가된 발현을 갖는 것으로 분석될 수 있고, 스코어 2 또는 3을 갖는 샘플은 과발현으로 또는 상승된 FOLR1을 갖는 것으로 분석될 수 있다.

[0360] FOLR1을 과발현하는 샘플은 또한 세포 별로 발현된 FOLR1 분자 또는 세포 별로 결합된 항체(ABC)의 카페 수에 대응하는 면역조직화학 스코어에 의해 등급화될 수 있고, 생화학적으로 결정될 수 있다. FOLR1 균일성(세포막 염색 퍼센트)에 대한 비교 척도는 하기와 같다: 음성 = 0%; 국소 = < 25%; 이종성(헤테로) = 25-75%, 및 동종성(호모) = > 75%.

[0361] 일 구현예에서, FOLR1의 면역학적 검출(면역조직화학에 의함)은 H-스코어를 이용해서 스코어링된다. H-스코어는 염색 세기 스코어(예를 들면, 0 내지 3의 스코어, 여기서 0은 염색이 없음을 나타내고, 3은 강한 염색을 나타냄)를 막 염색에 대해 양성인 세포의 백분율(즉, 균일성)과 조합한다. H-스코어는 하기와 같이 계산될 수 있다:

[0362] $H\text{-스코어} = [0*(세기 0의 세포 염색 백분율)] + [1*(세기 1의 세포 염색 백분율)] + [2*(세기 2의 세포 염색 백분율)] + [3*(세기 3의 세포 염색 백분율)].$ 따라서, H-스코어는 0(세포막 염색 없음) 내지 300(세기 3에서 모든 세포 막 염색) 범위일 수 있다.

[0363] 일 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 50이다. 일 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 75이다. 일 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 100이다. 일 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 125이다. 일 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 150이다. 일 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 175이다. 일 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 200이다. 또 하나의 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 225이다. 또 하나의 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 250이다. 또 하나의 구현예에서, 암이 있는 대상체는 항-

[0366] 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 50 내지 300이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 50이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 75이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 100이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 125이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 150이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 175이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 200이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 225이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 250이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 적어도 275이다. 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때, 상기 대상체로부터의 자궁내막 종양 샘플 중 FOLR 발현의 H-점수는 300이다.

[0367] 예로써, 난소암을 갖는 대상체에서의 H-점수는 하기와 같을 수 있다:

[0368] H 점수 = (세기 0에서 75%) + (세기 1에서 0%) + (세기 2에서 0%) + (세기 3에서 25%) = 75; 또는

[0369] H 점수 = (세기 0에서 0%) + (세기 1에서 75%) + (세기 2에서 0%) + (세기 3에서 25%) = 150.

[0370] 또 하나의 예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체에서의 H-점수는 하기와 같을 수 있다:

[0371] H 점수 = (세기 0에서 75%) + (세기 1에서 0%) + (세기 2에서 25%) + (세기 3에서 0%) = 50; 또는

[0372] H 점수 = (세기 0에서 0%) + (세기 1에서 75%) + (세기 2에서 25%) + (세기 3에서 0%) = 125.

[0373] 모두 4개의 상기 실시예에서, 상기 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인될 수 있다.

[0374] 일 구현예에서, FOLR1의 (면역조직화학에 의한) 면역학적 검출은 은 샘플에 대하여 퍼센트 양성을 및 세기를 사용하여 점수화될 수 있다. 이 구현예에서, 항-FOLR1 레지멘에 의한 치료에 대한 선택은 염색 세기 (예를 들면, 1, 2, 또는 3) 및 균일성 (예를 들면, 이종성 또는 균질 (참고 표 11)) 둘 모두를 반응하는 명시된 수준에서 막 FOLR1을 발현시키는 것으로서 발견된 샘플에서 세포의 백분율을 기반으로 한다. 예를 들면, 3에서 FOLR1 양성을 에 대한 세포 염색의 적어도 25% (즉, 25-75% 또는 > 75%)을 갖는 샘플은 "3개의 헤테로" 및 "3개의 호모", 또는 총괄적으로, "3에서 적어도 25% 양성"을 특징으로 할 수 있다.

[0375] 일 구현예에서, 난소암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR1 막 발현의 적어도 25%는 IHC에 의해 세기 3의 점수를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 IHC는 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 수행된다.

[0376] 또 하나의 구현예에서, 자궁내막암을 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 막 발현의 적어도 25%는 IHC에 의해 적어도 2의 세기 점수를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 IHC는 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 수행된다.

[0377] 또 하나의 구현예에서, NSCLC를 갖는 대상체는 항-FOLR1 레지멘 (예를 들면, IMGN853)에 의한 치료를 위한 후보로서 확인되고, 이때 상기 대상체로부터의 종양 샘플에서의 FOLR 막 발현의 적어도 25%는 IHC에 의해 적어도 2

의 세기 점수를 갖는다. 일 예에서, 상기 IHC는 IHC에 대해 FOLR1-2.1 항체를 사용하여 수행된다.

[0378] IHC는 수작업으로 또는 자동화된 시스템을 사용하여 (예를 들면, 자동화된 염색기를 사용하여) 수행될 수 있다. IHC는 세포, 세포 펠렛, 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 또는 림프액으로부터 제제 등 상에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플은 고정된 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 파라핀 포매된 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 포르말린 고정된 및 파라핀 포매된 샘플이다.

[0379] 일 구현예에서, 유세포측정은 면역학적 검출을 위해 사용된다. 따라서, 예를 들면, 세포 (ABC) 당 결합된 항체의 수는 유세포측정을 사용하여 평가될 수 있다. 세포 당 결합된 항-FOLR1 항체의 높은 수는 높은 FOLR1 발현 수준 및 항-FOLR1 항체 또는 그것의 면역접합체에 의한 치료에 민감할 높은 가능성을 나타낼 수 있다.

XI. 조성물 및 키트

[0381] 본원에서 개시된 바와 같이 본 발명의 실시에서 사용하기 위한 조성물 및 키트가 또한 본 발명에서 제공된다. 그와 같은 키트는 용기를 포함할 수 있고, 용기 각각은 예를 들면, 마커에 이미 부착된 하나 이상의 결합체 (항체)를 포함하는 본 방법에서 사용된 다양한 시약 (전형적으로 농축 형태) 중 하나 이상을 가지거나, 또는 본 발명의 실시를 지지하기 위해 결합체를 항체 (뿐만 아니라 마커 자체)에 커플링시키기 위한 시약, 버퍼, 및/또는 시약 및 단리 (임의로 혼미해부에 의한) 단리용 기기장치를 임의로 갖는다. 본 발명의 리간드 검출 방법에서 키트 구성요소를 기재하는 표지 또는 인디케이터, 또는 그것을 사용하는 설명서의 세트가 전형적으로 포함될 것이다, 여기서 설명서는 키트 또는 그것의 구성요소의 포장내 삽입물 및/또는 패키징과 관련될 수 있다.

[0382] 또 추가의 구현예에서, 본 발명은 본원에서 기재된 면역검출 방법으로 사용하기 위한 면역검출 키트에 관한 것이다. 항체가 FOLR1를 검출하기 위해 일반적으로 사용되기 때문에, 상기 항체는 키트 내에 일반적으로 포함될 것이다. 따라서 면역검출 키트는, 적합한 용기 수단 내에, FOLR1에 결합하는 제1 항체 및/또는 임의로, 면역검출 시약 및/또는 추가로 임의로, FOLR1 단백질 또는 FOLR1를 함유하는 세포 샘플을 포함할 것이다.

[0383] 키트의 면역검출 시약은 주어진 항체와 관련되고/거나 그것에 부착된 검출가능 표지들을 포함하는 다양항 형태 중 임의의 하나를 취할 수 있다. 2차 결합 리간드와 관련되고/거나 그것에 부착된 검출가능 표지가 또한 고려된다. 예시적인 2차 리간드는 제1 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 2차 항체들이다.

[0384] 본 키트에서 사용하기 위한 추가의 적합한 면역검출 시약은 제2 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 제3 항체와 함께, 제1 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 2차 항체를 포함하는 2-성분 시약을 포함하고, 제3 항체는 검출가능한 표지에 연결된다. 본원에서 언급된 바와 같이, 수많은 예시적인 표지는 당해기술에 공지되어 있고/거나 모든 그와 같은 표지는 본 발명과 관련하여 적당하게 이용될 수 있다.

[0385] 본 키트는 암의 치료용 치료제, 예컨대 항-FOLR1 면역접합체를 추가로 포함할 수 있다.

[0386] 본 키트는 FOLR1 검출 시약을 포함하는 대상체에서 FOLR1 발현을 측정하기 위해 사용된 FOLR1 검출 시약, 및 사용 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, FOLR1 검출 시약은 FOLR1 결합 웹타이드 또는 항-FOLR1 항체를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 본 키트는 추가로, 항-FOLR1 항체에 결합하는 2차 항체를 포함한다.

[0387] 일 구현예에서 FOLR1-특이적 항체는 하기의 농도로 포함된다: 약 0.1 내지 약 20 $\mu\text{g/mL}$, 약 0.1 내지 약 15 $\mu\text{g/mL}$, 약 0.1 내지 약 10 $\mu\text{g/mL}$, 약 0.5 내지 약 20 $\mu\text{g/mL}$, 약 0.5 내지 약 15 $\mu\text{g/mL}$, 약 0.5 내지 약 10 $\mu\text{g/mL}$, 약 1 내지 약 20 $\mu\text{g/mL}$, 약 1 내지 약 15 $\mu\text{g/mL}$, 약 1 내지 약 10 $\mu\text{g/mL}$, 약 2 내지 약 20 $\mu\text{g/mL}$, 약 2 내지 약 15 $\mu\text{g/mL}$, 또는 약 2 내지 약 10 $\mu\text{g/mL}$. 또 하나의 구현예에서, FOLR1-특이적 항체는 하기의 농도로 포함된다: 약 1.5 $\mu\text{g/mL}$, 약 2 $\mu\text{g/mL}$, 약 3 $\mu\text{g/mL}$, 약 4 $\mu\text{g/mL}$, 약 5 $\mu\text{g/mL}$, 약 6 $\mu\text{g/mL}$, 약 7 $\mu\text{g/mL}$, 약 8 $\mu\text{g/mL}$, 약 9 $\mu\text{g/mL}$, 또는 약 10 $\mu\text{g/mL}$. 또 하나의 구현예에서, FOLR1-특이적 항체는 약 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함된다. 또 하나의 구현예에서, FOLR1-특이적 항체는 약 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함된다.

[0388] 또 하나의 구현예에서, 항체는 하기의 최종 농도를 달성하기 위해 희석용 설명과 함께 농축된 용액 내에 포함된다: 약 1 내지 약 20 $\mu\text{g/mL}$, 약 1 내지 약 15 $\mu\text{g/mL}$, 약 1 내지 약 10 $\mu\text{g/mL}$, 약 2 내지 약 20 $\mu\text{g/mL}$, 약 2 내지 약 15 $\mu\text{g/mL}$, 또는 약 2 내지 약 10 $\mu\text{g/mL}$. 또 하나의 구현예에서, 항체는 하기의 최종 농도를 달성하기 위해 희석용 설명과 함께 농축된 용액 내에 포함된다: 약 1.5 $\mu\text{g/mL}$, 약 2 $\mu\text{g/mL}$, 약 3 $\mu\text{g/mL}$, 약 4 $\mu\text{g/mL}$, 약 5 $\mu\text{g/mL}$, 약 6 $\mu\text{g/mL}$, 약 7 $\mu\text{g/mL}$, 약 8 $\mu\text{g/mL}$, 약 9 $\mu\text{g/mL}$, 또는 약 10 $\mu\text{g/mL}$. 또 하나의 구현예에서, 항체는 약 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 최종 농도를 달성하기 위해 희석용 설명과 함께 농축된 용액 내에 포함된다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 약 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 최종 농도를 달성하기 위해 희석용 설명과 함께 농축된 용액 내에 포함된다.

- [0389] 또 하나의 구현예에서, 본 키트는 추가로, 효소, 형광단, 방사성 표지, 및 발광단으로 이루어진 군으로부터 선택된 검출 시약을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 검출 시약은 바이오틴, 디옥시제닌, 플루오레신, 삼중수소, 및 로다민으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0390] 본 키트는 FOLR1 발현의 검출 및 평점용 설명서를 또한 포함할 수 있다. 본 키트는 대조군 또는 참조 샘플을 또한 포함할 수 있다. 대조군 또는 참조 샘플의 비-제한적인 예는 정상 (정상 대조군) 또는 종양 (양성 대조군) 샘플로부터 유도된 세포 펠렛 또는 조직 배양 세포주를 포함한다. 예시적인 세포주는 FOLR1를 발현시키는 발현 벡터로 안정되게 또는 일시적으로 형질감염된 세포주를 포함한다. 추가의 예는 실시예에서 기재된 세포 펠렛 및 조직 샘플을 포함한다.
- [0391] 일부 구현예에서, 키트는 하기의 기본적 요소를 포함하는 포장된 조합이다: (a) 인간 FOLR1에 대항하는 단클론 성 항체를 포함하는 포착 시약; 및 (b) FOLR1 단클론성 항체를 또한 포함하지만, FOLR1에 결합된, 검출가능한 (표지된 또는 비표지된) 항체를 포함하는 검출 시약. 이들 기본적 요소는 본원에서 정의된다.
- [0392] 일 구현예에서, 본 키트는 추가로, 별개의 구성요소로서 제공될 수 있거나 포착 시약이 이미 고정된 포착 시약에 대한 고형 지지체를 포함한다. 그러므로, 본 키트 중 포착 항체는 고형 지지체 상에 고정될 수 있거나, 또는 키트와 함께 포함되거나 키트와는 별도로 제공된 그와 같은 지지체 상에 고정될 수 있다.
- [0393] 일 구현예에서, 포착 시약은 미세적정 플레이트 상에 코팅된다. 검출 시약은 직접적으로 검출된 표지된 항체, 또는 상이한 종에서 상승된 비표지되니 항체에 대항하여 유도된 표지된 항체에 의해 검출된 표지된 항체일 수 있다. 표지가 효소일 때, 키트는 효소에 의해 필요한 보조인자 및 기질을 대개 포함할 것이고, 그리고 표지가 형광단일 때, 검출가능한 발색단을 제공하는 염료 전구체를 포함할 것이다. 검출 시약이 비표지되는 경우, 본 키트는 추가로, 검출가능한 항체, 예컨대 형광측정-검출된 포맷에서 비표지된 항체에 대해 유도된 표지된 항체를 위한 검출 수단을 포함할 수 있다. 표지가 효소인 경우, 키트는 대개, 효소에 의해 필요한 보조인자 및 기질을 포함할 것이고, 표지가 형광단인 경우, 검출가능한 발색단을 제공하는 염료 전구체를 포함할 것이고, 그리고 표지가 바이오틴인 경우, 아비딘 예컨대 아비딘, 스트렙타비딘, 또는 HRP에 접합된 스트렙타비딘 또는 MUG를 갖는 β -갈락토시다아제를 포함할 것이다.
- [0394] 일 구현예에서, 포착 시약은 FOLR1 항체 2.1, 5.7, 또는 9.20 또는 항체 2.1, 5.7 또는 9.20의 서열을 포함하는 항체이다. 일 구현예에서, 검출 시약은 FOLR1 항체 2.1, 5.7, 또는 9.20 또는 항체 2.1, 5.7 또는 9.20의 서열을 포함하는 항체이다. 또 하나의 구현예에서, 검출 시약 FOLR1 항체 2.1, 5.7, 또는 9.20 또는 항체 2.1, 5.7 또는 9.20의 서열을 포함하는 항체는 바이오틴화된다.
- [0395] 키트는 또한 전형적으로, 분석을 수행하기 위한 설명서, 및/또는 항원 표준으로서 FOLR1 단백질, 또는 그것의 단편 (예를 들면, FOLR1 세포외 도메인 또는 FOLR1 세포외 도메인 및 GPI 연결부 도메인의 모두 또는 일부), 뿐만 아니라 다른 첨가제 예컨대 안정제, 세정 및 인큐베이션 버퍼, 등을 수용한다. 일 구현예에서, FOLR1 항원 표준은 FOLR1-Fc 면역부착소이다. 본 키트는 FOLR1 발현의 검출 및 평점용 설명서를 또한 포함할 수 있다.
- [0396] 본 키트의 구성요소는 분석의 민감도를 실질적으로 최대화하는 시약의 용액 종 농도를 제공하도록 적당하게 변화된 다양한 시약의 상대적인 양과 함께 예정된 비로 제공될 수 있다. 특히, 시약은 용해시, 시험될 샘플과 결합하기 위해 적절한 농도를 갖는 시약 용액을 제공한 부형제를 포함하는, 보통 동결건조된 건조 분말로서 제공될 수 있다.
- [0397] 본원에서 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 짜하는 조성물이 또한 제공된다. 일 구현예에서, 상기 조성물은 항-FOLR1 본원에서 기재된 항체 또는 항원-결합 단편 및 버퍼, 예를 들면, 검출 분석 예컨대 FACS, IHC, 또는 ELISA에서 사용될 수 있는 버퍼를 포함한다. 그와 같은 버퍼는 당해분야의 숙련가에게 공지되어 있고 희석제를 포함한다. 예로써, 어떤 FACS 버퍼는 본원, 예를 들면, 실시예에서 제공된다. FACS 버퍼는 또한, 예를 들면, 하기를 함유할 수 있다: 혈청 또는 알부민 (예컨대 송아지 혈청, 염소 혈청, 또는 BSA) 및/또는 나트륨 아자이드. FACS 버퍼는 PBS, EDTA, 및/또는 DNase 또는 이들의 임의의 조합을 함유할 수 있다. IHC 버퍼는 또한 본원에서 제공되고 당해분야의 숙련가에게 공지되어 있다. IHC 버퍼는, 예를 들면, 하기를 함유한다: 카세인 혈청 또는 알부민 (예컨대 송아지 혈청, 염소 혈청, 또는 BSA), Tween 또는 트리톤, PBS 및/또는 나트륨 아자이드 또는 이들의 임의의 조합. ELISA 버퍼는 또한 본원에서 제공되고, 당해분야의 숙련가에게 공지되어 있다. ELISA 버퍼는, 예를 들면, 하기를 함유할 수 있다: 혈청 또는 알부민 (예컨대 송아지 혈청, 염소 혈청, 또는 BSA), 탈지분유, 카세인, 및/또는 젤라틴 또는 이들의 임의의 조합.
- [0398] 본 개시내용의 구현예는 본 개시내용의 어떤 항체의 제조 및 본 개시내용의 항체를 사용하는 방법을 상세히 기

재하는 하기 비-제한적인 예를 참고로 추가로 정의될 수 있다. 물질 및 방법 둘 모두에 대한 많은 변형은, 본 개시내용의 범위를 벗어나지 않으면서 실시될 수 있다는 것은 당해분야의 숙련가에게 분명할 것이다.

[0399] 실시예

[0400] 본원에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시적 목적을 위한 것이며, 그 견지에서 다양한 개질 또는 변화가 당해분야의 숙련가에게 제시될 것이고, 본원의 사상 및 영역 내에 포함될 것임이 이해된다.

[0401] 실시예 1: FOLR1 하이브리도마의 산출

[0402] 면역조직화학(IHC) 염색에 적합한 항-인간 FOLR1 단클론성 항체(본 발명의 항체)를 생산하는 하이브리도마가 16,000 개를 초과하는 하이브리도마로부터 선택되었다. 하이브리도마는 하기를 포함하는 상이한 항원을 이용한 야생형 Balb/c 마우스의 면역화에 의해 생산되었다: 인간 FOLR1, 인간 FOLR1-쥐과 IgG2a Fc 재조합 단백질, 및 인간 FOLR1 재조합 단백질로 전달감염된 포르말린 고정된 300-19 세포. 고정된 300-19 세포를 이용한 면역화는 임의의 아쥬반트의 부재 하에 PBS 중 전달감염된 300-19 세포의 피하 주사(5E6 세포/마우스/주사)에 의해 수행되었다. FOLR1 재조합 단백질을 이용한 면역화는 완전 프로인트 아주반트(CFA) 또는 추가접종을 위한 불완전 프로인트 아주반트(Sigma) 또는 Magic 마우스 아쥬반트(Creative Diagnostics) 중 에멀젼화된 단백질의 피하 주사에 의해 수행되었다. 일반적으로, 마우스는 융합 3 일 전 면역원의 복강내 주사에 의한 최종 추가접종 수여 전에 2 주 간격으로 5 회 면역화되었다.

[0403] 총 16 개의 독립적인 융합(융합 352, 353, 및 354 포함)은 면역화된 야생형 Balb/c 마우스 및 쥐과 골수종 P3X63Ag8.653 세포(P3 세포)로부터 유래된 비장 세포를 이용해서 수행되었다. 세포 융합은 표준 프로토콜에 따라 ECM200 전자융합 기계(BTX Harvard Apparatus)를 이용해서 수행되었다. 각각의 융합은 1,000 개를 초과하는 하이브리도마를 생성하였다. 이를 하이브리도마에 의해 생산된 항체가 변성된 FOLR1-양성 및 FOLR1-음성 세포를 이용한 FACS 기반 방법에 의해 스크리닝되고 확인되었다. 스크리닝된 16,000 개를 초과하는 하이브리도마 중에서, FACS 스크리닝에 의해 양성인 14 개의 하이브리도마가 발견되었다. 모든 양성 하이브리도마는 인간 FOLR1-쥐과 IgG2a Fc 재조합 단백질로 면역화된 마우스로부터 유래되었다.

[0404] FACS 스크리닝에 의해 처음에 양성이었던 14 개의 하이브리도마 중에서, 10 개만 추가 분석을 위해 충분한 IgG 농도를 나타내었다.

[0405] 실시예 2. 하이브리도마 상청액의 면역조직화학 평가

[0406] 최초의 14 개의 하이브리도마 중 10 개가 IHC에 의해 분석되었다. 분석은 표 9에 열거된 Leica Bond RX 자동화 염색기 그리고 시약 및 조건을 이용해서 수행되었다.

[0407]

표 9: IHC 시약 및 분석 조건

단계	작용/시약 (판매인)	시간
베이크	온도: 60°C	30 분
탈립	결합 탈립 용액 (Leica) 100% 에탄올 (Pharmco Aaper)	고정된
항원 회수	결합 에피토프 회수 2 (에틸렌디아민테트라아세트산 기반 pH 9.0 용액)	20 분
내인성 폐록시다아제 블록	퍼옥사이드 (Leica)	5 분
시험품	ImmunoGen, Inc. Leica 항체 희석제에서 희석에 의해 제조된 가변 농도에서의 산출된 항체	15 분
검출	초기후 리젠틴(Regent) (Leica)	8 분
	폴리머 (Leica)	8 분
	혼합된 DAB (Leica)	10 분
대조염색	해마톡실린 (Leica)	5 분

[0408]

포르말린 고정 파라핀 임베딩(FFPE) 세포, 정상 조직, 환자 폐 종양 생검, 및 환자 난소 종양 생검을 함유하는 슬라이드가 60°C에서 베이킹되고 결합 탈립 용액 및 100% 에탄올을 이용하여 탈립되었다. Bond Epitope Retrieval 2(에틸렌디아민테트라아세트산 기반 pH 9.0 용액)를 이용한 열 유도된 에피토프 검색이 20 분 동안 수행되었고, 내인성 폐록시다아제가 5 분 동안 퍼옥사이드로 차단되었다. 슬라이드는 15 분 동안 가변 농도로 ImmunoGen, Inc.에서 산출된 항체 또는 Leica/Novocastra muIgG1 대조군 항체와 인큐베이션되었다. 결합된 항체는 Leica Bond Refine 검출 시스템과의 인큐베이션에 의해 검출되었다. 항체 적용 후, 슬라이드가 8 분 동안 후-일차 시약(토끼 항-마우스 IgG), 8 분 동안 폴리머(염소 항-토끼 폴리머), 및 10 분 동안 DAB(3,3-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드)과 인큐베이션되어 갈색 신호를 생성하였다. 슬라이드는 5 분 동안 해마톡실린으로 대조염색되었다.

[0410]

FFPE 조직 샘플은 아래에 요약한 바와 같이 Proteogenex 및 Cooperative Human Tissue Network(CHTN)에서 수득된 인간 조직 블록으로부터 유도되었다. FFPE 세포 샘플은 American Tissue Culture Collection에 의해 공급된 KB 세포주로부터 유도되었다. 샘플 섹션을 함유하는 슬라이드가 5 μm로 설정된 마이크로톱을 이용해서 FFPE 블록으로부터 제조되었고, 양으로 하전된 슬라이드 상에 마운팅되었다. 이들 슬라이드는 염색 전에 밤새 대기 전 조되도록 하였다.

[0411]

표 10: FFPE 시험 샘플

인간 조직 유형	상업적 공급원
정상 폐	CHTN
정상 췌장	CHTN
정상 타액샘	CHTN
난소 유두상 장액 선암종	Proteogenex
폐 선암종	CHTN

[0412]

FOLR1 염색 세기 및 분포 패턴은 대조군 IgG 염색(비-특이적) 대비 스코어링되었다. 세기는 0 내지 3의 척도로

스코어링되었으며, 여기서 0 = 염색 없음, 1 = 약한 염색, 2 = 중간 정도의 염색, 및 3 = 강한 염색이다. 염색 균일성은 음성(양성 염색을 나타내는 세포 없음), 국소(염색된 세포 < 25%), 이종성(염색된 세포 25-75%), 및 동종성(염색된 세포 > 75%)으로 스코어링되었다. 염색 세기 및 스코어링 척도는 아래에 기재된다. 모든 염색은 위원회 인증 병리학자에 의해 평가되었다.

[0414] 표 11: 염색의 세기 및 균일성

세기 (막 염색의 양)		균일성 (양성 세포의 퍼센트)	
0	음성	0	음성
1	약함	초점	<25%
2	중간 정도	이종성 (해테로)	25-75%
3	강함	균질 (호모)	>75%

[0415]

[0416] FFPE FOLR1 IHC에 대한 하이브리도마(들)를 확인하기 위한 IHC 선택 방법

[0417] FOLR1-양성 변성 세포(총 10 개 클론) 상에서 FACS에 의해 양성인 일차 클론이 IHC에 의해 평가되었다. 2 개 클론이 융합 352로부터 수득되었다(클론 352.1 및 352.2). 6 개 클론이 융합 353으로부터(클론 353.1, 353.2, 353.3, 353.5, 353.9, 353.15), 그리고 2 개 클론이 융합 354로부터 수득되었다(클론 354.1 및 354.2). 하이브리도마 상청액이 배양된 하이브리도마 세포로부터 수집되어 분석을 위해 사용되었다. 하이브리도마 상청액 중 항체 농도는 상청액으로부터 쥐과 단클론성 항체를 포착하기 위한 항-쥐과 L-사슬 특이적 다클론성 항체 및 포착된 항체를 검출하기 위한 항-쥐과 Fc-특이적 다클론성 항체를 이용하여 ELISA에 의해 결정되었다; 농도를 아는 쥐과 단클론성 IgG1 샘플이 IgG 농도를 계산하기 위한 표준으로 사용되었다. 세포 배양 배지(희석되지 않음)는 IHC 염색 방법을 방해하지 않는 것으로 나타났다(배지가 일차 항체 대신 사용된 경우, 배경/비-특이적 염색이 주지되지 않았음). Leica 항체 희석제 중 최대 10 µg/mL의 가변 농도로 희석된 10 개의 상청액(IMGN 352.1, 352.2, 353.1, 353.2, 353.3, 353.5, 353.9, 353.15, 354.1, 및 354.2)이 FOLR1 공지된 양성 대조군 샘플(인간 정상 폐, 환자 유도된 난소 장액 유두상 선암종, 및 KB 세포)을 이용해서 염색되고 평가되어 양성 후보 클론(FOLR1 양성 샘플에서 허용가능한 막 염색 및 특이성을 나타내는 클론)을 확인하였다. 10 개 클론 중 5 개가 FOLR1 양성 샘플에서 허용가능한 막 염색 및 우수한 특이성을 나타내었다. 적합한 염색 농도는 하기와 같이 각각의 5 후보 클론에 대해 실험적으로 결정되었다: 353.1(0.7 µg/mL), 353.2(2.3 µg/mL), 353.3(2.3 µg/mL), 353.5(2 µg/mL 및 10 µg/mL), 및 353.9(2 µg/mL 및 10 µg/mL). 나머지 5 개 클론 중, 클론 353.15(2 및 10 µg/mL에서 염색됨)은 KB 세포 및 정상 폐 조직에서 허용가능한 막 염색을 나타내었다. 그러나, 시험된 환자 난소 종양 조직에서는 세포질 염색만 관측되었다. 클론 352.1, 352.2, 및 354.1은 어느 샘플에서도 가시적인 염색을 나타내지 않았고, 클론 354.2는 분명한 비-특이적 세포질 염색만 나타내어, 모두 허용불가능한 것으로 간주되었다.

[0418] 5 개 후보 클론이 추가로 서브클로닝되었다. 4 개 클론(353.2, 353.3, 353.5 및 353.9)에 대한 서브클론이 성공적으로 확인되었고, 클론 353.1의 서브클론은 산출되지 않았다. 총 8 개의 서브클론이 정제되었다. 2 개의 서브클론이 클론 353.5로부터 수득되었다(353.5-7 및 353.5-10). 2 개의 서브클론이 클론 353.9로부터 수득되었다(353.9-20 및 353.9-21). 2 개의 서브클론이 클론 353.3로부터 수득되었고(353.3-8 및 353.3-9), 2 개의 서브클론이 클론 353.2로부터 수득되었다(353.2-1 및 353.2-12) (이들 서브클론이 각각 5.7, 5.10, 9.20, 9.21, 3.8, 3.9, 2.1, 및 2.12로도 불림을 주지하라). 서브클론의 IHC 특성규명은 2 및 10 µg/mL의 항체 농도에서 상술된 방법을 이용해서 수득되었다(표 9: IHC 시약 및 분석 조건). 8 개의 서브클론은 또한 아래 실시예 3에 기재된 바와 같이 시퀀싱되었다. 후보 서브클론이 하기와 같이 최적의 막 염색 및 특이성을 확인하고 순위를 매기기 위해 추가 평가되었다: [353.2-1, 353.2-12], [353.9-20, 353.9-21], [353.5-7, 353.5-10], 및 [353.3-8, 353.3-9]가 추가 특성규명을 위해 선택되었다(서브클론은 실시예 3에 기재된 서열 동일성에 따라 함께 팔호로 묶임).

[0419] 2 개의 서브클론: 353.2-1 및 353.9-20이 추가 IHC 분석 최적화를 위해 선택되었다. 두 항체가 모두 인간 정상 폐, 인간 정상 침샘, 인간 정상 퀘장, 환자 난소암 생검, 환자 비-소세포 폐암(NSCLC) 생검, 및 환자 투명 세포 신장 세포 암종 생검을 염색하기 위해 사용되었다. 최적 조건에서(아래 표 12 및 도 13 참고), 두 서브클론 모

두 인간 정상 및 환자 종양 조직 모두에서 특이적이고 적절하게 민감한 염색을 나타내었다. 췌장 관, 정상 폐의 호흡기 상피, 및 사이관은 양성 막 관련 염색을 나타내었다. 음성일 것으로 예상된 췌장의 샘파리 세포/소도, 폐의 폐포간 결합 조직, 및 침샘의 샘파리 세포는 어느 서브클론에서도 양성 염색을 나타내지 않았다. 양성일 것으로 예상된 난소암, NSCLC, 및 투명 세포 신장 세포 암종 샘플로부터의 종양 세포는 종양 세포에 국재화된 양성 막 관련 염색을 나타내었다. 음성으로 예상된 종양 하위구조(간질, 혈관, 및 림프구)는 353.2-1 또는 353.9-20으로 양성 염색을 나타내지 않았다. 353-2.1(FOLR1-2.1)을 이용한 정상 조직의 추가 염색이 아래의 표 13에 요약되고 도 14에 나타난다. 함께 종합해보면, IHC 특성규명 데이터는 353.2-1 및 353.9-20이 FFPE 조직에서 FOLR1에 특이적임을 제시한다(도 1 및 도 2 참고).

[0420] 표 12: 최적화된 분석 조건

단계	작용/시약 (판매인)	시간
베이크	온도: 60°C	30 분
탈락	결합 탈락 용액 (Leica) 100% 에탄올 (Pharmco Aaper)	고정됨
항원 회수	결합 애피토프 회수 2 (에틸렌디아민테트라아세트산 기반 pH 9.0 용액)	20 분
내인성 폐록시다아제 블록	퍼옥사이드 (Leica)	5 분
시험품	1.5µg/mL에서 IMGN353.2-1 6.0 µg/mL에서 IMGN353.9-20	15 분
검출	초기후 리젠티(Regent) (Leica) 폴리머 (Leica) 혼합된 DAB (Leica)	8 분 8 분 10 분
대조염색	헤마톡실린 (Leica)	5 분

[0421]

[0422]

표 13: 최적화된 분석 조건

정상 조직, 구조	2.1 염색
부신	+
유선 소엽	+
나팔관, 표면 상피	+
신장, 소관	+
췌장, 관	+
뇌하수체, 뇌하수체 세포	+
타액샘, 사이관	+
유방, 결합 조직	-
식도 점막하조직 및 근판	-
눈, 각막	-
신장, 사구체	-
폐, 폐포간 결합 조직	-
간, 간세포	-
췌장, 샘꽈리 세포	-
폐, 상피	-/+
위, 표면 상피, 우묵한 곳	-

[0423]

[0424] 실시예 3. 선택된 항-FOLR1 항체의 특성규명

[0425] 실시예 2에서 상술된 바와 같이, 일차 및 확인 FACS 스크리닝에 기반하여 선택된 14 개 하이브리도마 클론 중, 10 개의 일차 클론이 면역조직화학(IHC) 분석에 의해 분석되었다. 10 개의 일차 클론(즉, 352.1, 352.2, 353.1, 353.2, 353.3, 353.5, 353.9, 353.15, 354.1, 및 354.2) 중, 5 개가 IHC에 의해 양성이었고(즉, 353.1, 353.2, 및 353.3, 353.5, 및 353.9), 5 개 모두 동일한 융합(융합 353)으로부터 유도되었다. 5 개 중 4 개가 성공적으로 서브클로닝되었다. 일차 클론 353.2의 1 개의 서브클론이 선택되어 353.2-1("2.1")로 명명되었다. 일차 클론 353.3의 1 개의 서브클론이 선택되어 353.3-8("3.8")로 명명되었다. 일차 클론 353.5의 1 개의 서브클론이 선택되어 353.5-7("5.7")로 명명되었고, 일차 클론 353.9의 2 개의 서브클론이 선택되어 353.9-20("9.20") 및 353.9-21("9.21")로 명명되었다. 서브클론 9.20 및 9.21이 시퀀싱되고, 예상대로 두 서브클론 모두 동일한 서열을 가졌다. 또한, 2 개 클론, 2.1 및 9.20이 각각 2013. 4. 16.에 ATCC에 PTA-120197 및 PTA-120196으로 수탁되었다.

[0426]

웨스턴 블랏에 의한 항-FOLR1 항체의 특이성

[0427] 산출된 항체의 특이성이 FOLR1-양성(Igrov-1, Ovcar-3, Caov-3, Wish, 및 Skov-3) 및 FOLR1-음성(BxPC3, Panc-1, 및 ASPC1) 세포주로부터 제조된 세포 용해액 패널로 웨스턴 블랏에 의해 분석되었다. 분석을 위해, 용해액이 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 수행되고 표준 절차에 의해 니트로셀룰로스 막으로 이동되었다. 막은 본 발명의 항-FOLR1 항체와 인큐베이션되고, 형성된 항원-항체 복합체가 말-래디쉬 폐록시다제(hrp)가 접합된 2차 항-쥐과 항체로 검출되었다(도 3). 시험된 모든 항-FOLR1 항체는 높은 FOLR1 발현의 수준을 갖는 세포주(즉,

Igrov-1 및 Wish)에서 FOLR1을 인식하였다. 저발현 세포주 Ovcar-3, Caov-3 및 Skov-3에서의 FOLR1은 항-FOLR1 클론 2.1 및 9.21에 의해서만 검출되었다; 클론 3.8 및 5.7은 아마도 항체의 불충분한 민감성으로 인해 이들 세포 용해액을 염색시키지 않았다. 클론에 의한 FOLR1-양성 세포주에서의 추가적인 비-특이적 랜드는 검출되지 않았다; FOLR1-음성 세포주의 염색은 관측되지 않았다.

[0428] 변성된 및 변성되지 않은 세포에 대한 항-FOLR1 항체의 결합

[0429] 항-FOLR1 항체가 변성된 및 변성되지 않은(원상태 확인) FOLR1에 결합하는 능력이 FOLR1-양성 세포 KB 및 T47D를 이용한 간접적 FACS에 의해 분석되었다. 세포가 Versine으로 수확되고 포스페이트 완충 버퍼(PBS)로 세척되었다. 변성된 세포는 밤새 4°C에서 10% 포름알데하이드 함유 PBS 중에 세포를 인큐베이션한 다음 PBS로 세척하고, 30 분 동안 95°C에서 인큐베이션하여 제조되었다. 이어서 변성된 및 변성되지 않은 세포가 2 시간 동안 얼음 상에서 FACS 버퍼(2% 정상 염소 혈청으로 보충된 RPMI-1640 배지) 중 희석된 항-FOLR1 항체와 인큐베이션되었다. 세포가 원심분리되고, PBS로 세척되고, FITC-접합된 염소 항-마우스 IgG-항체로 40 분 동안 인큐베이션되었다. 세포가 다시 원심분리되고, PBS로 세척되고, 1% 포름알데하이드를 함유하는 0.2 ml의 PBS로 재현탁되었다. 세포-관련 형광이 HTS 다중웰을 갖는 FACSCalibur 유세포 측정기를 이용해서 측정되고, CellQuest Pro(BD Biosciences, San Diego, US)를 이용해서 분석되었다. 도 4 상에 나타낸 바와 같이, 모든 항-FOLR1 항체가 변성된 및 변성되지 않은 세포에 모두 결합하였다.

[0430] ELISA에 의한 항-FOLR1 항체의 친화도

[0431] 항-FOLR1 항체의 결합 친화도는 재조합 인간FOLR1-쥐과 Fc2a 단백질이 항원으로 사용된 ELISA로 조사되었다. 재조합 단백질이 미세적정 플레이트 상에 고정되고, 항체가 플레이트로 놓도 범위에 걸쳐 첨가되었다. 플레이트는 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션되고, 0.05% Tween-20으로 보충된 PBS로 세척되고, 실온에서 1 시간 동안 hrp-표지된 염소 항-쥐과 2차 항체와 인큐베이션되었다. 플레이트가 다시 PBS/Tween-20으로 세척되고, 결합된 hrp-접합된 항체가 hrp-기질 TMB(Bio-FX)의 첨가에 의해 검출되었다. 대표적인 결과를 도 5에 나타낸다. 항-FOLR1 항체는 0.5 내지 0.9 nM의 절반-최대 유효 농도(EC50)에서 인간 FOLR1에 대해 유사한 친화도를 가졌다.

[0432] 항-FOLR1 항체와 FOLR2 및 FOLR3의 비교차-반응성

[0433] FOLR1은 엽산 수용체 패밀리의 멤버이다. 항-FOLR1 항체의 패밀리의 다른 멤버 FOLR2 및 FOLR3과의 교차-반응성이 ELISA에 의해 분석되었다. 재조합 단백질 FOLR2-His 또는 FOLR3-His(R&D 시스템)가 Ni-NTA 플레이트(QIAGEN)로 고정되고, 항-FOLR1 항체가 플레이트로 첨가되고, 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션되었다. FOLR2 및 FOLR3 ELISA에 대한 양성 대조군으로서, 다클론성 항-FOLR2 및 FOLR3 항체(R&D Systems)가 각각 사용되었다. 형성된 항체-항원 복합체는 hrp-표지된 염소 항-쥐과 2차 항체로 검출되었다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 항-FOLR1 항체는 FOLR2 또는 FOLR3에 결합하지 않았다; 대조군 항체만 대응하는 항원을 검출하였다.

[0434] 실시예 4. 항원 에피토프 특성규명

[0435] 인간 FOLR1은 위치 69, 161 및 201(UniProt)에서 N-당화에 대한 3 개의 잠재 부위를 가지며, 문헌에 보고된 바와 같이, 모든 3 개 부위가 당화되어 있다. 본원에 기재된 항-FOLR1 항체에 의해 인식된 에피토프의 성질을 분석하기 위해, 탈당화된 및 처리되지 않은 수용체로 결합 실험이 수행되었다. 산출된 항-FOLR1 클론 중, 클론 2.1은 시퀀싱 데이터에 기반하여 동일한 에피토프에 결합할 수 있고 관련되므로, 이 클론만 연구에서 사용되었다. 클론 2.1에 부가하여, 2 개의 다른 항-FOLR1 항체: huMov19(WO 2011/106528) 및 클론 BN3.2(Leica)가 포함되었다. FOLR1을 탈당화하기 위해, 재조합 인간 FOLR1 또는 FOLR1-양성 KB 또는 Igrov-1 세포의 용해액이 제조자의 프로토콜에 따라 탈당화 효소(Enzymatic DeGlycoMX 키트, QA-bio)의 혼합물로 처리되었다. 이어서 처리된 및 처리되지 않은 FOLR1의 샘플이 ELISA 및 웨스턴 븍릿 분석에서 사용되었다. ELISA를 위해, 탈당화된 및 처리되지 않은 FOLR1이 ELISA 플레이트(Immulon)로 고정되었고, 항-FOLR1 항체 FRIHC2-1("2.1") 또는 huMov19가 첨가되었다. 2 h 인큐ベ이션 후, 항체-항원 복합체가 hrp-표지된 염소 항-인간(huMov19에 대해) 또는 항-쥐과(2.1에 대해) 2차 항체로 검출되었다(도 7). 웨스턴 븍릿 분석을 위해, 탈당화된 및 처리되지 않은 용해액 샘플 또는 huFOLR1 재조합 단백질이 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리되고 표준 절차에 의해 니트로셀룰로스 막으로 이동되었다. 막은 항-FOLR1 항체 2.1, huMov19, 또는 BN3.2와 인큐베이션되었고, 항원-항체 복합체가 말-래디쉬 페록시다제가 접합된 항 인간 항체 또는 적절한 2차 항-쥐과 항체로 검출되었다(도 8). 도 7 및 8에 나타낸 바와 같이, 항체 2.1의 탈당화된 대 처리되지 않은 FOLR1에 대한 결합은 유의미하게 감소되어, 항체가 당의존적 에피토프에 결합함을 제시하였다. 그에 반해서, 다른 2 개의 항-FOLR1 항체, huMov19 및 BN3.2는

탈당화된 및 처리되지 않은 수용체에 유사하게 결합하여, (i) FOLR1 단백질이 탈당화 절차 동안 손상되지 않았고, (ii) huMov19 및 BN3.2이 FOLR1의 단백질 에피토프를 인식함을 시사하였다.

[0436] 실시예 5. 항-인간 FOLR1 항체의 VL 및 VH 영역의 클로닝 및 시퀀싱

총 세포성 RNA가 제조자의 프로토콜에 따라 RNeasy 키트(QIAgen)를 이용하여 실시예 1에 기재된 FOLR1 하이브리도마 5×10^6 세포로부터 제조되었다. 이어서 8 개의 서브클론 클론(2.1, 2.12, 3.8, 3.9, 5.7, 5.10, 9.20, 및 9.21)에 대한 cDNA가 SuperScript II cDNA 합성 키트(Invitrogen)를 이용하여 총 RNA로부터 합성되었다.

[0438] 하이브리도마 세포로부터 유도된 항체 가변 영역 cDNA를 증폭하기 위한 PCR 절차는 [Wang 등((2000) J Immunol Methods. 233:167-77) 및 Co 등((1992) J Immunol. 148:1149-54)]에 기재된 방법에 기반하였다. 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH) 서열이 5' 말단 상의 축퇴 프라이머 및 3' 말단에서 각각의 쥐과 카파 또는 IgG1 불변 영역 특이적 프라이머 중 하나에 의해 증폭되었다. 이후, PCR 반응이 1% 저용융 아가로스 겔 상에서 수행된 다음, 300 내지 400 bp 앰플리콘 밴드가 절제되고, 이후 Zymo DNA 미니 칼럼을 이용해서 정제되었다. 정제된 앰플리콘은 두 방향 모두로부터 가변 영역 cDNA 서열을 산출하기 위해 PCR 반응의 동일한 5' 및 3' 프라이머를 이용한 시퀀싱을 위해 Beckman Coulter Genomics로 보내졌다.

[0439] VL 및 VH cDNA 서열을 클로닝하기 위해 사용된 축퇴 프라이머가 5' 말단을 변경하므로, 전체 cDNA 서열을 확인하기 위해 추가 시퀀싱 노력이 요구되었다. 항체 서열이 유도된 쥐과 생식계열 서열을 확인하기 위해, NCBI IgBlast 사이트(www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)의 검색 쿼리에 예비 서열이 입력되었다. 이어서 이러한 새로운 PCR 반응이 PCR 프라이머에 의해 변경되지 않은 전체 가변 영역 cDNA 서열을 산출하도록 PCR 프라이머가 쥐과 항체의 생식계열 연결된 리더 서열에 어닐링하도록 설계되었다. PCR 반응, 밴드 정제, 및 시퀀싱은 상술된 바와 같이 수행되었다.

[0440] 서열 확인을 위한 질량 결정

[0441] 각각의 항-FOLR1 항체에 대해 수득된 가변 영역 cDNA 서열이 생식계열 불변 영역 서열과 조합되어 전장 항체 cDNA 서열을 수득하였다. 그 뒤, 중쇄 및 경쇄의 분자량이 cDNA 서열의 번역으로부터 계산되고, 정제된 쥐과 항-FOLR1 항체의 LC/MS 분석에 의해 수득된 분자량과 비교되었다. LC/MS는 전장 경쇄 및 중쇄 펩타이드를 단리하기 위해 항체의 탈당화 및 환원에 의해 수행된다. 각각의 중쇄에 대해 관측된 분자량은 기대치에 매칭되었으나, 각각의 경쇄는 대략 85 Da 차이가 났다. 경쇄 단편의 LC/MS에 의한 후속 펩타이드 단편화 분석은 경쇄 리더 펩타이드의 마지막 세린이 실제로 성숙 경쇄 상에서 유지되어 예상된 MW에 약 87 Da을 추가함을 시사하였고, 따라서 각각의 FOLR1 항체에 대한 cDNA 서열을 확인하였다.

[0442] 항-FOLR1 항체에 대한 복합 CDR 서열

[0443] 8 개 서브클론에 대한 항체 서열의 정렬은 4 개의 최초 하이브리도마 중 3 개가 밀접하게 관련되었지만 독특한 항체를 생산하였음을 드러내었다. 예상대로, 각각의 4 개의 자매 서브클론 페어는 동일하였다. 또한, 2 개 세트의 서브클론도 동일하여 3 개의 독특한 항체 서열이 생성되었다(서열식별번호: 27-32) (2.1, 5.7, 및 9.20). 이들 3 개의 독특한 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 프레임워크 서열은 밀접히 관련되지만, 각각의 항체는 체세포 아미노산 치환 결과일 수 있는 독특한 CDR을 함유한다(아래의 표 14 참고). 쥐과 항-FOLR1 항체의 이들 CDR 변이체가 기능적으로 동일한 것으로 나타났으므로, 이들은 본 발명의 항-FOLR1 항체의 CDR의 서열 가요성에 대해 일부 구조적 의견을 제공한다. 경쇄 CDR 2 및 3은 각각의 항체에서 동일하여, 이들 고도 보존된 CDR이 FOLR1 결합을 위해 일관된 구조적 기반을 제공할 수 있음을 제시한다. 다른 한편으로, 나머지 CDR, 특히 중쇄 CDR 2 및 3에서의 아미노산 치환은, 이들 위치가 이들 항체의 친화도 및 특이성 정련을 위해 중추적임을 제시하였다. 이들 CDR 위치에서의 특정 잔기 치환은 또한 이들 항체의 조작된 버전 내로 편입될 수 있는 잔기의 예를 제공한다. 표 14는 본 발명의 항-FOLR1 항체로부터 컴파일링된 복합 CDR 서열 목록을 제공한다. 본원에서 확인된 복합 CDR은 본 발명의 항-FOLR1 항체의 기능적 속성을 보존할 것으로 예상되는 재조합 항체의 설계를 위해 사용될 수 있다.

[0444]

표 14: 복합 CDR

항-FOLR1 복합 CDRs
경쇄
CDR1: KS[T/S][K/E]SLLNSDGFTYLD (서열식별번호:24) CDR2: LVSNHFS (서열식별번호:25) CDR3: FQSNYLPLT (서열식별번호:26)
중쇄
CDR1: N[Y/S]YIH (서열식별번호:21) CDR2: WIYP[G/E][S/N][F/V/L]N[V/T][E/R/Q]YN[E/D]KFKA (서열식별번호:22) CDR3: RGIY[F/Y]YSPYA[L/M]D[Y/H] (서열식별번호:23)

[0445]

[0446]

항체 인간화

[0447]

FRIHC2-1 항체는 이전에, 예컨대 그 전문이 본원에 참조로 편입된 [Roguska 등, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973(1994) 및 Roguska 등, Protein Eng. 9(10):895-904(1996)]에 기재된 재표면화 방법에 따라 인간화되었다. 재표면화에는 경쇄 및 중쇄 모두에서의 가변 영역 프레임워크 표면 잔기의 확인 및 이들의 인간 동등 부로의 대체가 관여된다. 쥐과 CDR은 재표면화된 항체에서 보존된다. FRIHC2-1 항체의 예시적인 CDR이 표 14에 명시된 바와 같이 정의된다. CDR에 속하는 라이신 접합 효과에 대한 우려를 최소화하기 위해, 쥐과 FRIHC2-1 항체 경쇄 CDR1 내의 라이신 24 및 라이신 27이 인간화된 베전 1.0에 대해 아르기닌으로 대체되어(이텔릭체로 나타냄), 두 베전의 LC CDR1이 주어진다. 재표면화를 위해 이용된 AbM 중쇄 CDR2의 정의에 부가하여, 표는 FRIHC2-1 항체의 쥐과 및 인간 베전 모두에 대해 예시적인 카밧 정의된 중쇄 CDR2를 제공한다. 밀줄 친 서열은 재표면화를 위한 CDR로 고려되지 않은 카밧 중쇄 CDR2의 부분을 표시한다.

[0448]

표면 잔기 위치는 30% 이상의 상대 접근성을 갖는 임의의 위치로 정의되었다(Pedersen J.T. 등, J. Mol. Biol. 1994; 235: 959-973). 이어서 계산된 표면 잔기가 인간 생식계열 표면 서열과 정렬되어 가장 상동성이 높은 인간 표면 서열을 확인하였다. FRIHC2-1 항체의 VL 도메인에 대한 대체 표면으로 사용된 인간 생식계열 서열은 IGKV2-30*01이었던 반면, FRIHC2-1 항체 VH에 대한 대체 표면으로 IGHV1-69*10이 사용되었다. FRIHC2-1 항체에 대한 특정 프레임워크 표면 잔기 변화가 도 9에 주어진다. 재표면화된 경쇄에 바람직한 베전의 CDR1 라이신 치환이 포함되므로, 재표면화된 베전(v1.01)이 또한 CDR-L1에 보유된 쥐과 라이신을 이용해서 산출되었다. 도 10은 경쇄 및 중쇄 둘 다의 FRIHC2-1 가변 도메인에 대해 재표면화된 서열과 그것의 쥐과 대응부의 정렬을 나타낸다.

[0449]

가변 도메인 재표면화에 의한 인간화에 부가하여, FRIHC2-1 항체는 또한 상보적 결정 영역(CDR) 그라프팅 기술 (Jones 등, Nature 321: 604-608(1986) 및 Verhoeyen 등, Science 239: 1534-1536(1988))에 따라 인간화되었다. CDR 그라프팅 방법은 인간 항체의 Fv 프레임워크 영역(FRs) 상에 천연 진화된 쥐과 항체로부터의 CDR 그라프팅으로 구성된다. 카밧 넘버링 방식 및 카밧 CDR 정의가 FRIHC2-1 항체의 CDR 그라프팅을 위해 사용되었다. CDR 그라프팅을 위한 FRIHC2-1의 예시적인 CDR이 표 14에 주어진다. 쥐과 FRIHC2-1 항체에 대해 최고 상동성을 갖는 인간 면역글로불린 생식계열 서열은 [Lefranc, Nucleic Acids Res. 29: 207-209(2001)]에 기재된 바와 같이 International ImMunoGeneTics 정보 시스템®(IMGT(<http://imgt.cines.fr/>))의 상호작용 도구인 V-QUEST를 통해 확인되었다. FRIHC2-1 항체의 VL 및 VH 도메인에 대한 수신체 프레임워크로 사용된 인간 생식계열 서열은 각각 IGKV2D-29*02 및 IGHV1-2*02였다. CDR에 속하는 라이신 접합 효과에 대한 우려를 최소화하기 위해, 쥐과 FRIHC2-1 항체 경쇄 CDR1 내의 라이신 24 및 라이신 27이 CDR 그라프팅된 작제물에서 아르기닌으로 대체되었다(표 15). FRIHC2-1 항체의 CDR-그라프팅에서 특정 프레임워크 잔기 변화뿐만 아니라 CDR-L1 내에서의 치환이 도 11에 주어지며, FRIHC2-1 항체 가변 도메인에 대한 CDR-그라프팅된 서열과 그 쥐과 대응부의 정렬이

도 12에 예시된다.

[0450] 표 15

FRIHC2-1 CDR's (재표면화)	FRIHC2-1 CDR's (CDR 그라프팅)
경쇄	경쇄
젖과 및 재표현화된 v1.01 CDR1: KSSKSLLNSDGFTYLD (서열식별번호:6)	젖과 및 CDR-그라프팅된 v1.01 CDR1: KSSKSLLNSDGFTYLD (서열식별번호:6)
재표현화된 v1.0 CDR1: RSSRSLLNSDGFTYLD (서열식별번호:59)	CDR-그라프팅된 v1.0 CDR1: RSSRSLLNSDGFTYLD (서열식별번호:59)
CDR2: LVSNHFS (서열식별번호:7)	CDR2: LVSNHFS (서열식별번호:7)
CDR3: FQSNYLPLT (서열식별번호:8)	CDR3: FQSNYLPLT (서열식별번호:8)
중쇄	중쇄
CDR1: NSYIH (서열식별번호:3)	CDR1: NSYIH (서열식별번호:3)
CDR2: WIYPESLNTQ (서열식별번호:60)	CDR2: WIYPESLNTQ YNEKFKA (서열식별번호:4)
CDR3: RGIYYYSPYALDH (서열식별번호:5)	CDR3: RGIYYYSPYALDH (서열식별번호:5)
Kabat FRIHC2-1 HC CDR2	
젖과 HC CDR2: WIYPESLNT <u>QYNEKFKA</u> (서열식별번호:4)	
재표현화된 HC CDR2: <u>WIYPESLNTQYNQKFQG</u> (서열식별번호:61)	

[0451] [0452] 실시예 6. 인간 종양 샘플을 이용한 353-2.1(FOLR1-2.1) 항체의 IHC 평가.

[0453] 난소암(n=63), 폐 선암종(n=104), 및 자궁내막 선암종(n=58)을 대표하는 인간 종양 샘플이 353-2.1 항체를 이용한 IHC에 의해 FOLR1 발현에 대해 평가되었다. FOLR1 염색의 세기 및 스코어 분포가 아래 표 16에 요약된다. 도 15는 353-2.1 항체를 이용한 난소암 및 폐 선암종 조직의 염색 예를 나타낸다. 이를 결과는 FOLR1 표적화제(예를 들면, IMGN853)를 이용한 요법에 대한 잠재 후보로서의 환자를 확인하기 위해, IHC 분석에서 사용하기 위한 특이적이고 민감한 항체로서 353-2.1의 유용성을 나타낸다.

[0454]

표 16: 스코어 분포(양성%)

종양 유형:	난소암 n=63	폐 선암종 n=104	자궁내막 선암종 n=58
양성 (임의의 세기):	65%	70%	64%
염색된 적어도 25% 종양 세포에 의한 ≥ 수준 2 세기:	59%	47%	33%
염색된 적어도 25% 종양 세포에 의한 ≥ 수준 3 세기:	51%	19%	14%

[0455]

[0456]

FOLR1-2.1(FOLR1 353-2.1) 항체의 독특한 항원 특이성 및 높은 결합 친화도가 추가적인 IHC 분석을 이용해서 추가로 실증되었다. 상기 IHC 분석은 포르말린-고정 파라핀 염베딩 조직 샘플에서 FOLR1 단백질 발현의 반-정량적 결정을 위해 Ventana BenchMark XT 자동화 슬라이드 염색기 상에서 OptiView DAB 검출 키트를 이용한다. 분석은 정상 및 종양 조직 대조군을 이용해서 특이성, 민감성, 및 정밀도에 대해 최적화되고 검증되었다. 최적화된 조건 하에, 첨예한 막 염색이 종양 세포에서 명확히 관측된 반면 정상 간질 조직은 완전히 음성이었다(도 16). 또한, 상기 분석은 더 넓은 동적 범위를 달성함으로써 가장 강한 염색 세기(수준 3, 진갈색 염색, 도 17)로부터 중간 정도의 염색 세기(수준 2, 중간 갈색 염색, 도 17)의 더 우수한 구별을 허용한다. 증대된 동적 범위는 염색 세기에 기반하여 FOLR1 양성 샘플의 순위를 매기는 능력을 향상시키고, 최고 수준의 FOLR1 발현을 갖는 환자 하위집단의 추가 확인을 가능케 한다.

[0457]

BN3.2(Leica) 항체 및 FOLR1-2.1(FOLR1 353-2.1) 항체가 난소암 조직 마이크로 어레이(TMA)를 이용해서 비교되었다. IHC 분석(BN3.2 분석)에서 BN3.2(Leica) 항체를 이용하여, 50%에 가까운 샘플(35 개 중 16 개)이 최고 카테고리(적어도 25%의 종양 세포 상에서 수준 3의 염색 세기)에 스코어링되었다. 그에 반해서, Ventana BenchMark XT 자동화 슬라이드 염색기 상에서 OptiView DAB 검출 키트를 이용하는 상술된 IHC 분석(FOLR1-2.1 분석)에서 FOLR1-2.1(FOLR1 353-2.1) 항체의 이용은 이들 16 개 샘플의 2 개의 상이한 카테고리로의 추가 구분을 허용하였다: 6 개는 최고 카테고리(적어도 25%의 종양 세포 상에서 수준 3의 염색 세기, 표 17)로, 그리고 다른 10 개는 두 번째 높은 카테고리(적어도 25%의 종양 세포 상에서 수준 2의 염색 세기, 표 17)로. 따라서, FOLR1-2.1 분석에서 FOLR1-2.1 항체를 이용하여 수득된 보다 신중한 염색은 BN3.2 분석에서 BN3.2 항체를 이용하여 수준 3의 발현을 갖는 샘플로 모두 함께 그룹화된 샘플 간 구별을 허용한다.

[0458]

표 17: 난소암 TMA에서의 FOLR1 유병률 비교(n=35)

점수	FOLR1-2.1 분석	BN3.2 분석
양성 (임의의 세기)	24 (69%)	28 (80%)
염색된 적어도 25% 종양 세포에 의한 ≥ 수준 1 세기:	21 (60%)	27 (77%)
염색된 적어도 25% 종양 세포에 의한 ≥ 수준 2 세기:	17 (49%)	25 (71%)
염색된 적어도 25% 종양 세포에 의한 ≥ 수준 3 세기:	6 (17%)	16 (46%)

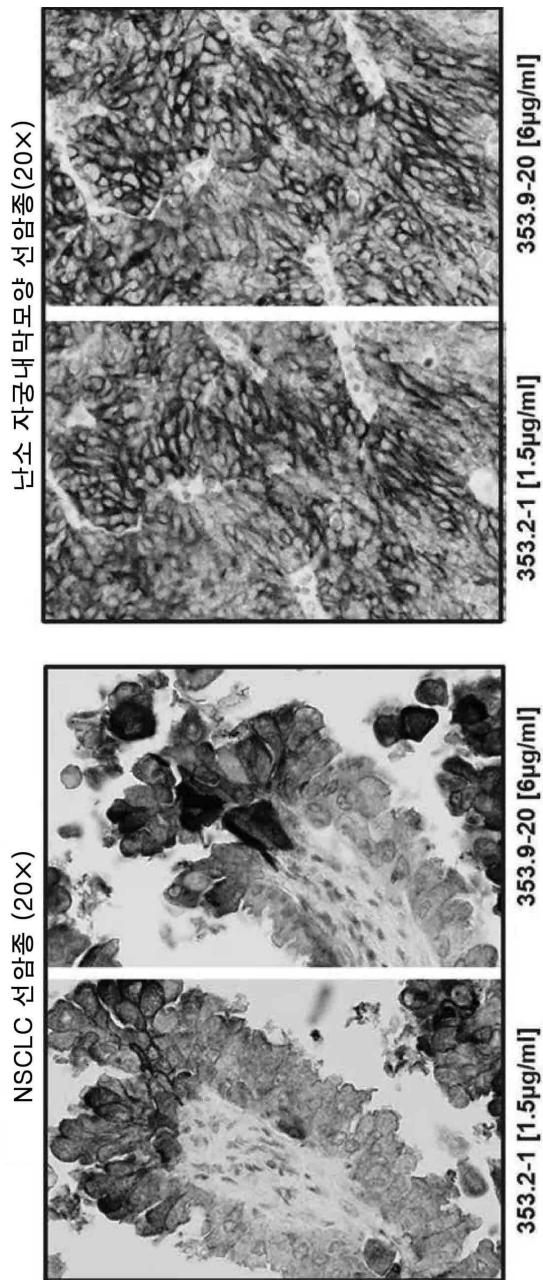
[0459]

[0460]

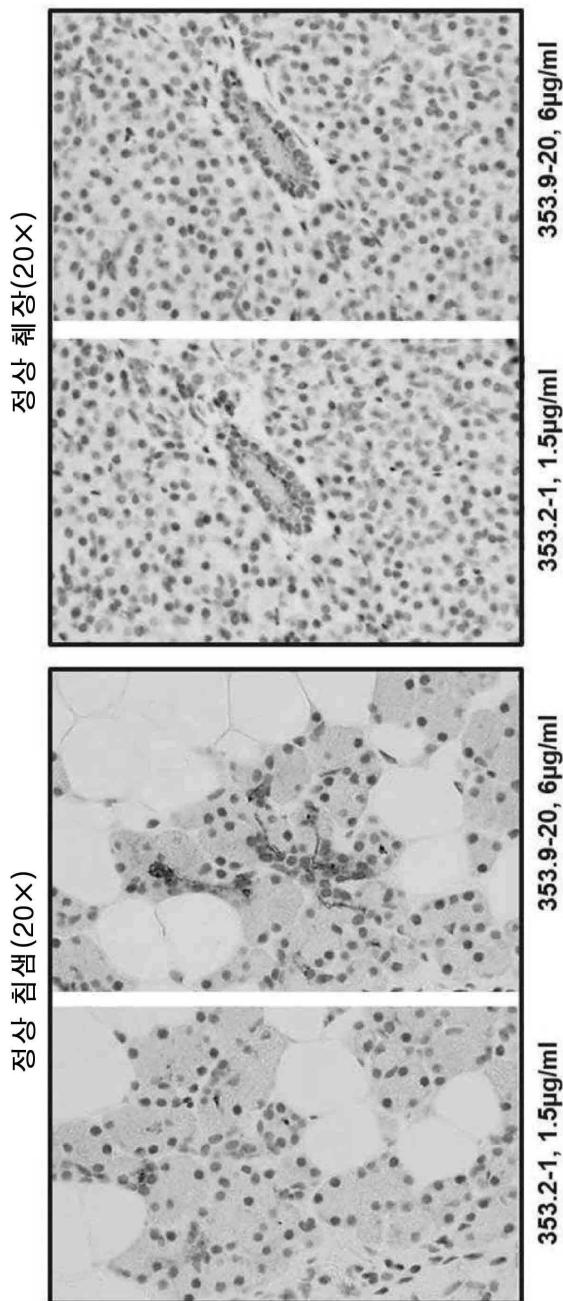
본원에서 언급된 모든 공보, 특허, 특히 출원, 인터넷 사이트, 및 수납 번호/데이터베이스 서열(폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열을 모두 포함)은 각각의 개별 공개, 특히, 특히 출원, 인터넷 사이트, 또는 수납 번호/데이터베이스 서열이 구체적이고 개별적으로 참조로 편입된 것으로 명시된 것과 동일한 정도로 여러 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 편입된다.

도면

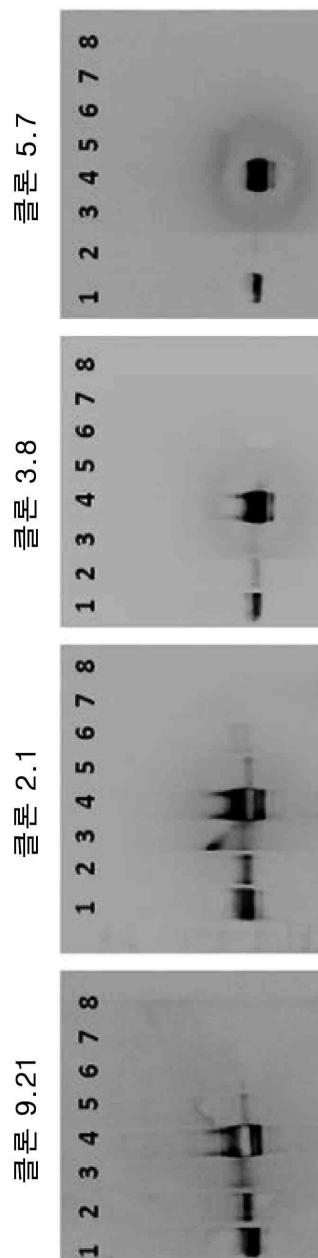
도면 1



도면2

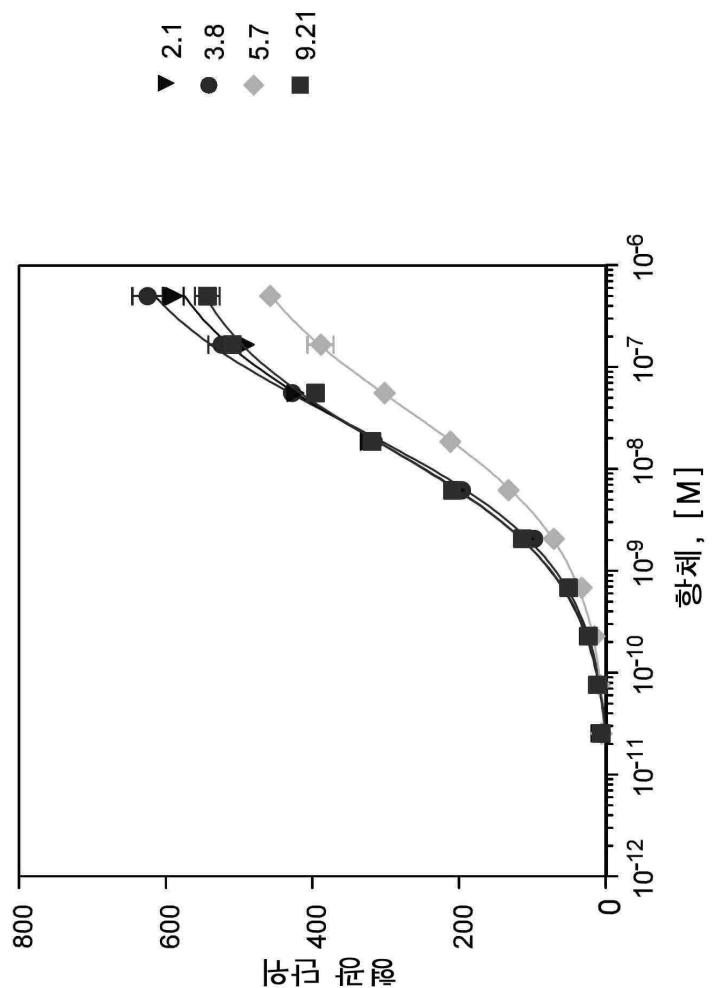


도면3

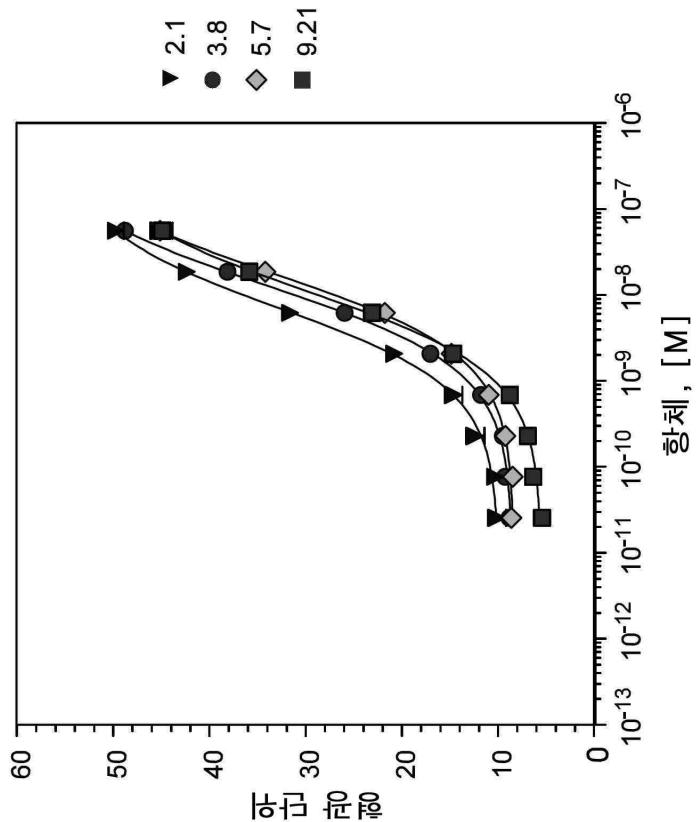


세포 종해액 : 1 – Igrov-1; 2 – Ovcar-3; 3 – Caov-3; 4 – Wish; 5 – Skov-3; 6 – BxPC3; 7 – Panc-1
8 - ASPC1

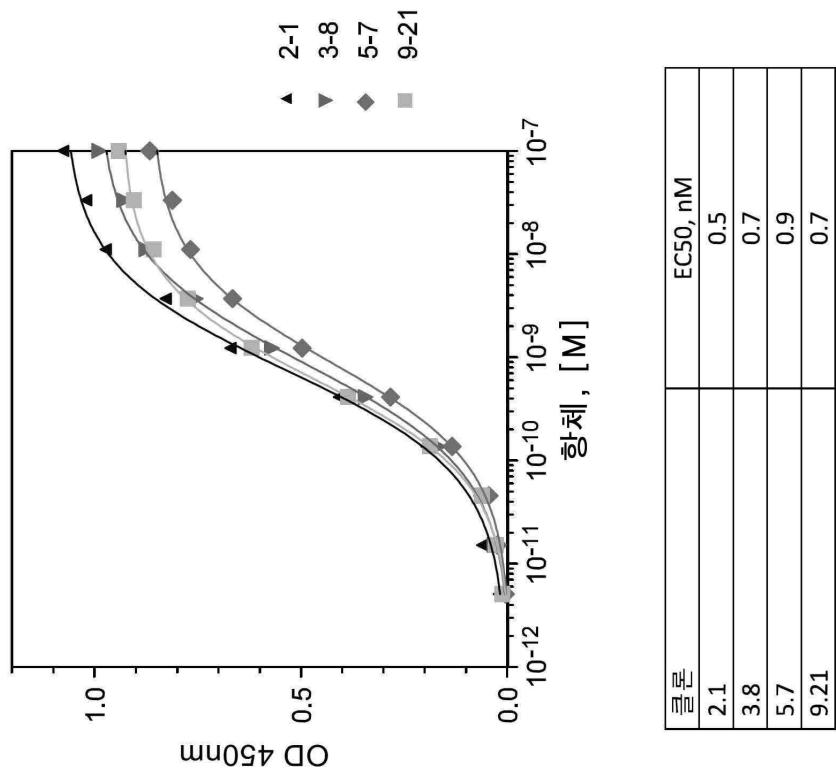
도면 4a



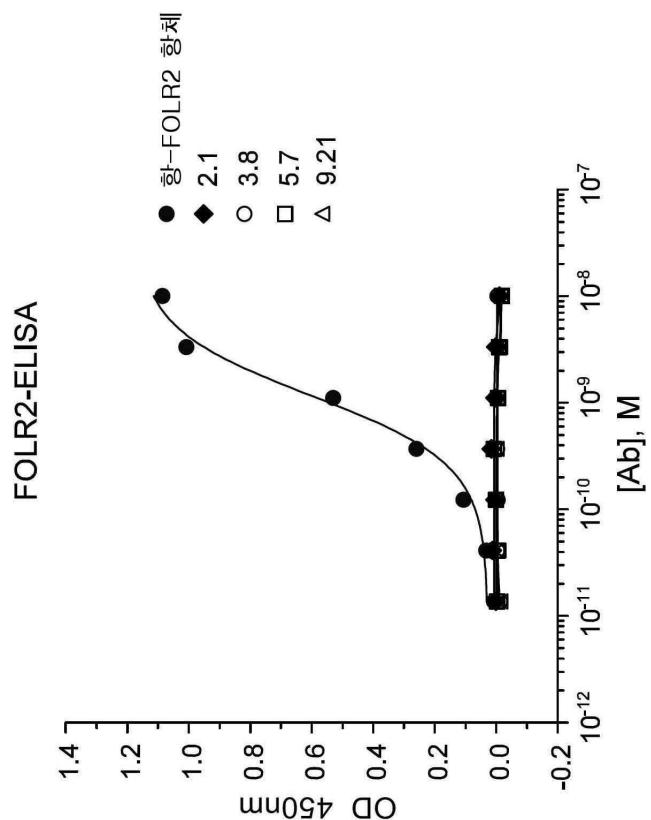
도면4b



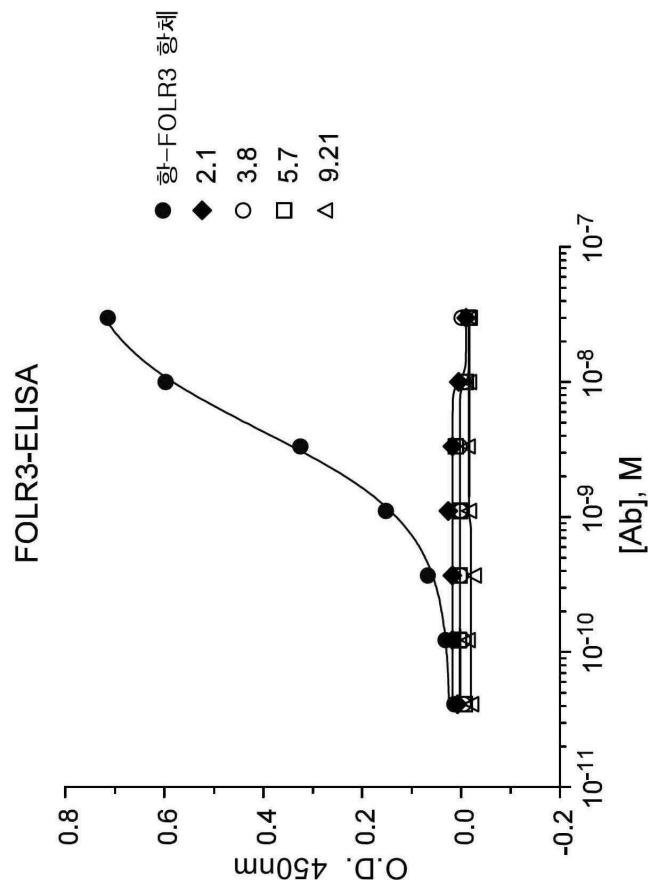
도면5



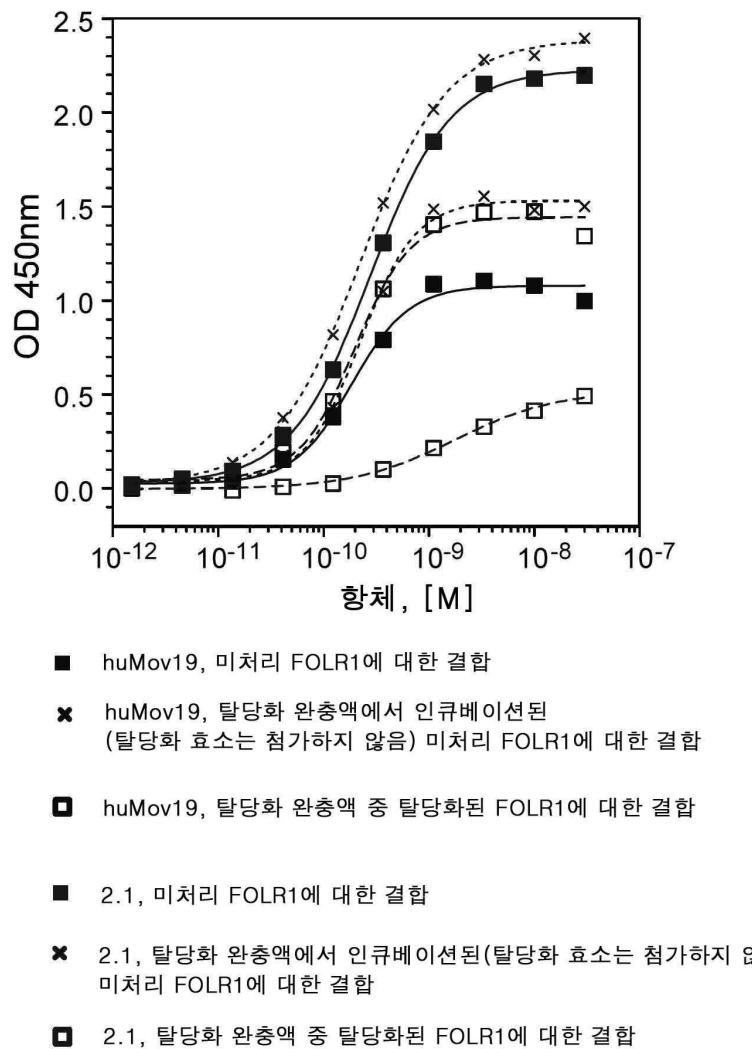
도면 6a



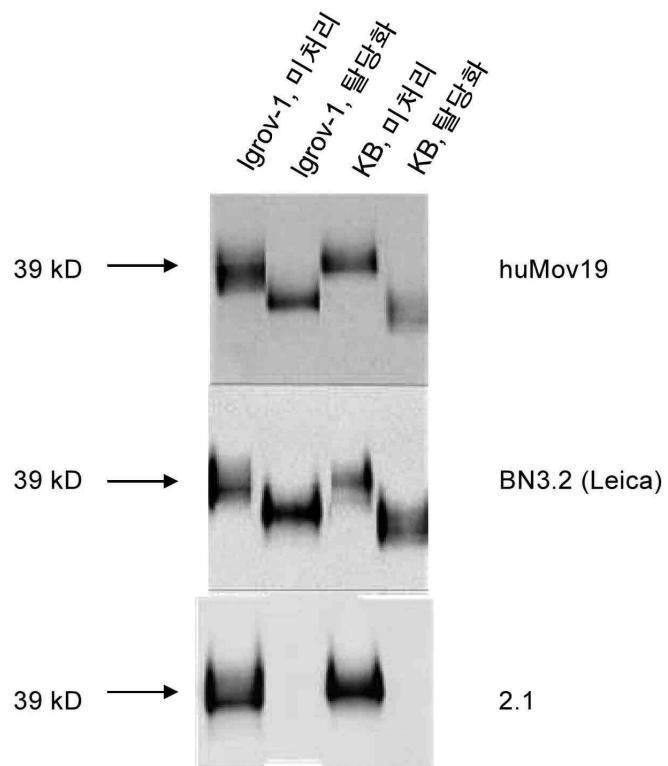
도면 6b



도면7



도면8



도면9

FRIHC2-1의 재표면화

A

FRIHC2-1- V _L			
Kabat 위치	쥐과 잔기	인간 v1.0 잔기	인간 v1.01 잔기
1	D	D	D
3	V	V	V
7	T	<u>S</u>	<u>S</u>
9	L	L	L
15	I	<u>L</u>	<u>L</u>
17	D	<u>Q</u>	<u>Q</u>
18	Q	<u>P</u>	<u>P</u>
40	P	P	P
41	G	G	G
42	K	K	K
45	Q	<u>R</u>	<u>R</u>
57	G	G	G
60	D	D	D
67	S	S	S
77	R	R	R
81	E	E	E
100	G	<u>Q</u>	<u>Q</u>
103	K	K	K
107	K	K	K
108	R	R	R
24	K	<u>R</u>	K
27	K	<u>R</u>	K

B

FRIHC2-1- V _H		
Kabat 위치	쥐과 잔기	인간 잔기
1	Q	Q
3	Q	Q
5	Q	<u>V</u>
9	P	<u>A</u>
11	L	<u>V</u>
13	K	K
14	P	P
19	R	<u>K</u>
23	K	K
28	T	T
41	P	P
42	G	G
43	Q	Q
61	E	<u>Q</u>
62	K	K
64	K	<u>Q</u>
65	A	<u>G</u>
73	K	K
74	S	S
82b	S	S
84	S	S
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

자 표면화 정렬

도면10

A

61	muFRICH2-1 VL	1 DWVL TQITPLSLPVNIGDQASISCKSSKSLLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLITYLVSNHFS
	huFRICH2-1 VL	S-----S-----R-----R-----R-----R-----
	huFRICH2-1 VLv1.01	S-----L-QP-----L-QP-----R-----R-----
62	muFRICH2-1 VL	113 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYPLTFGGGTLKLEIKR
	huFRICH2-1 VL	Q-----Q-----Q-----Q-----Q-----Q-----
	huFRICH2-1 VLv1.01	-----Q-----Q-----Q-----Q-----Q-----

B

61	muFRICH2-1 VH	1 QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYTHWVKRPGQGLEWIGMIVTYPESLNTQYN
	huFRICH2-1 VH	V-----V-----A-V-----K-----K-----
62	muFRICH2-1 VH	122 EKFKAATLTADKSSSTSYMQLSSLTSEDAVYFCARRGIYYSPYALDHMGQGASVTYSS
	huFRICH2-1 VH	Q-----QG-----Q-----Q-----Q-----

도면11

FRIHC2-1의 CDR-그라프팅

A

FRIHC2-1- V _L			
Kabat 위치	쥐과 잔기	인간 (CDR-그라프트) v1.0 잔기	인간 (CDR-그라프트) v1.01 잔기
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

B

FRIHC2-1- V _H		
Kabat 위치	쥐과 잔기	인간 (CDR-그라프트) 잔기
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

도면12

CDR 그라프팅 정렬

A

muFRIHC2-1 VL	1 DWL TQTPSLPVNIGDQASISCKSSKSLNNSDGFTYLDMYLQKPGQSPQLRYLVSNHFS
huFRIHC2-1 VL	-I-M S-TP-QP-R
huFRIHC2-1 VL	Gv1.0 -I-M S-TP-QP
huFRIHC2-1 VL	Gv1.01

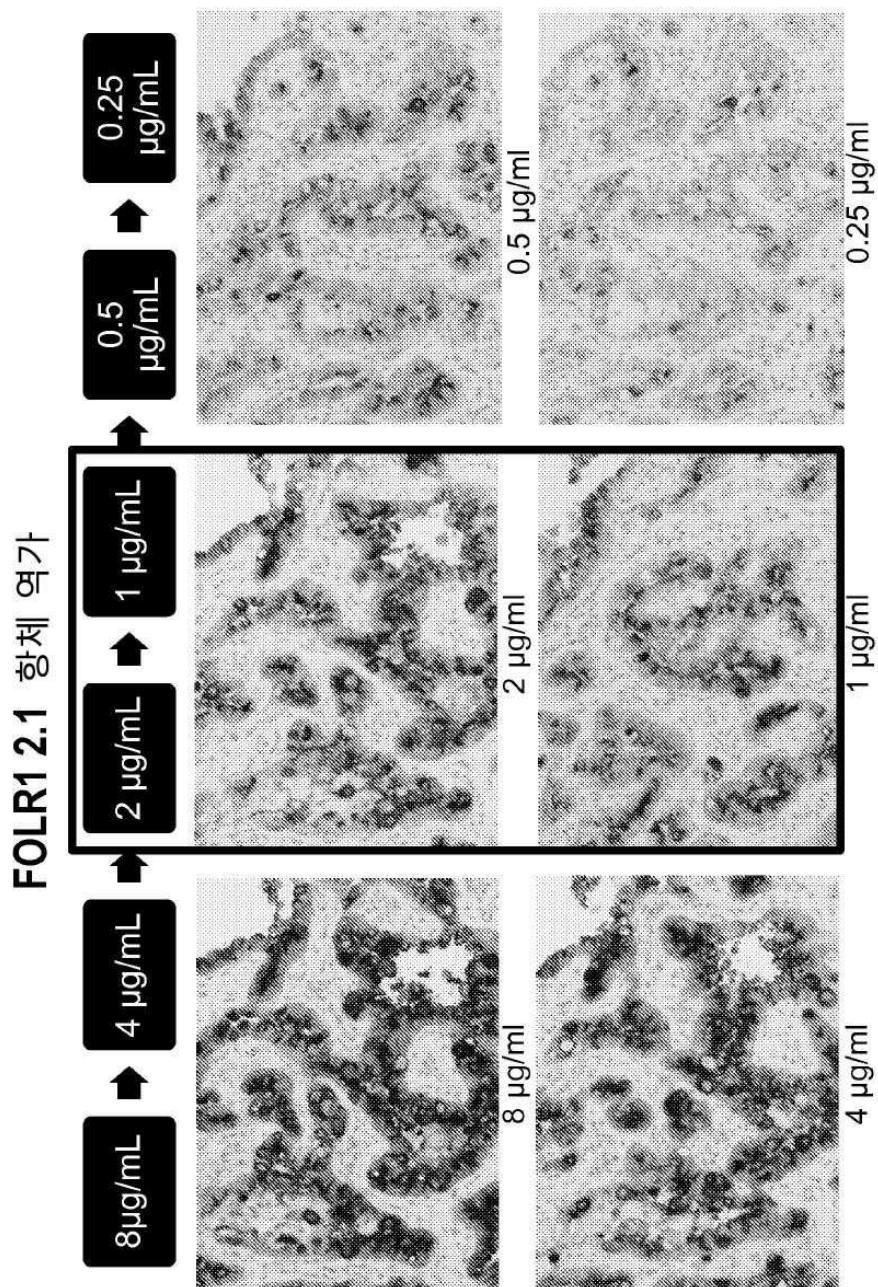
muFRIHC2-1 VL	61 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQSINYPLTFGGGTLKLEIKR
huFRIHC2-1 VL	V
huFRIHC2-1 VL	Gv1.0
huFRIHC2-1 VL	Gv1.01

B

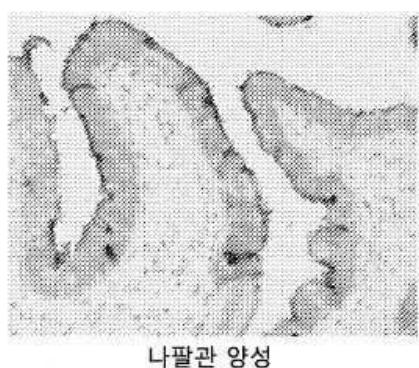
muFRIHC2-1 VH	1 QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYTHMVKKRPGQGLEMTIGWITYPESLNTQYN
huFRIHC2-1 VH	V A-VK KV RQA M

muFRIHC2-1 VH	62 EKFKA KATLTADKS SSTS YMLSSL TSEDS A VYFCARRG IYYSPY AL DHM GQ GAS VTVSS
huFRIHC2-1 VH	RV-M-R-T-I-A-E-R-R-D-T-Y TL

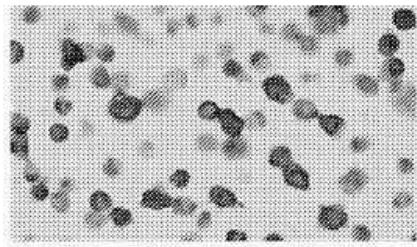
도면13



도면14a

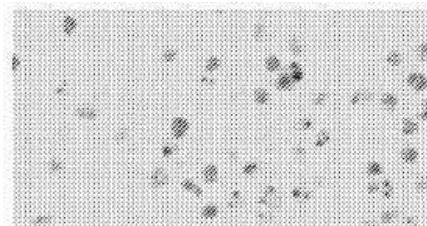


도면 14b



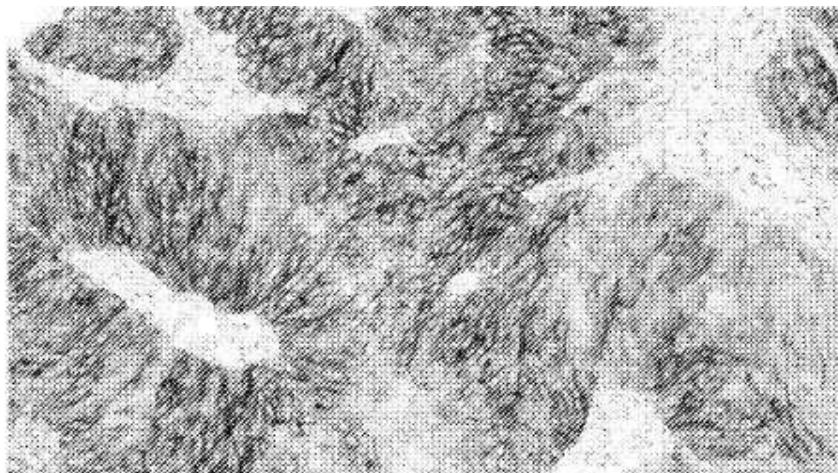
FOLR1 형질감염된 세포
양성

도면 14c



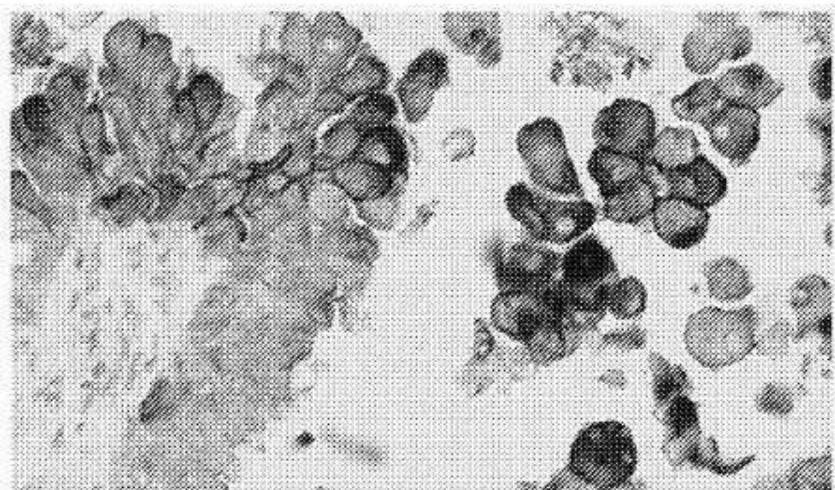
염색되지 않은
비-형질감염된 세포

도면 15a



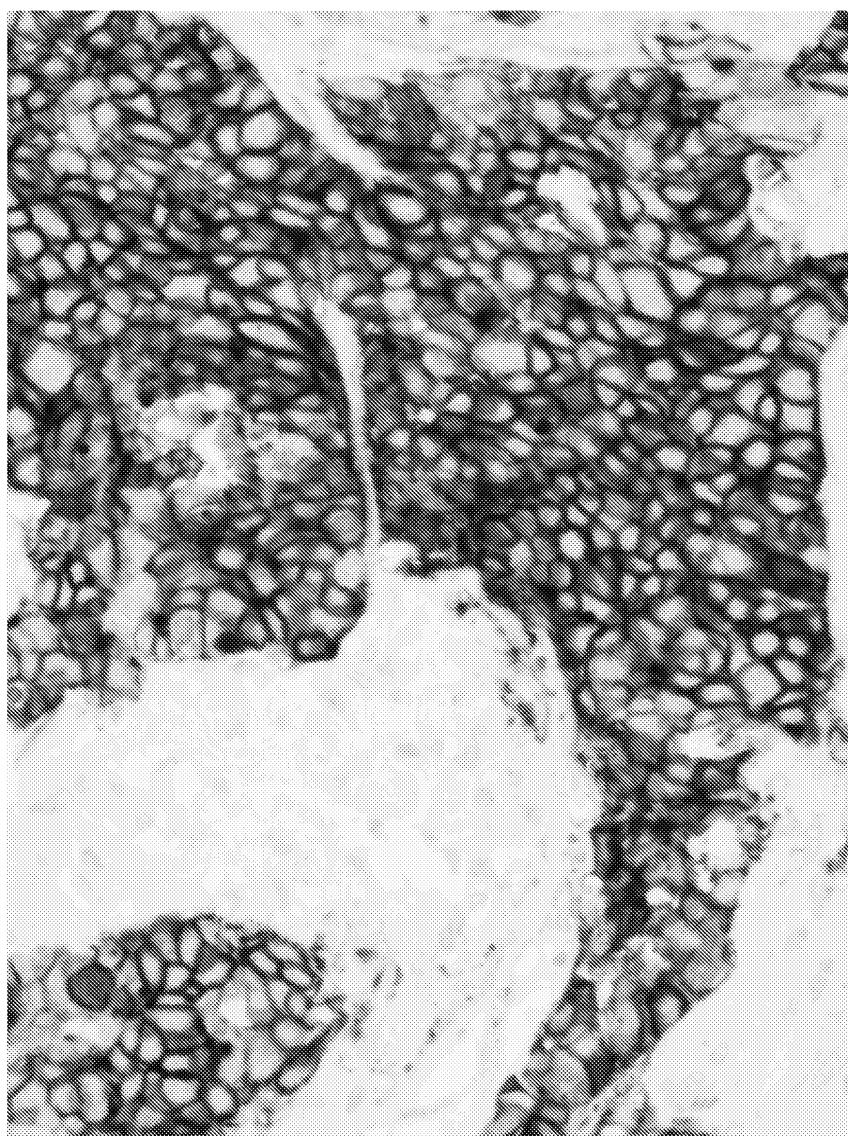
난소암

도면15b

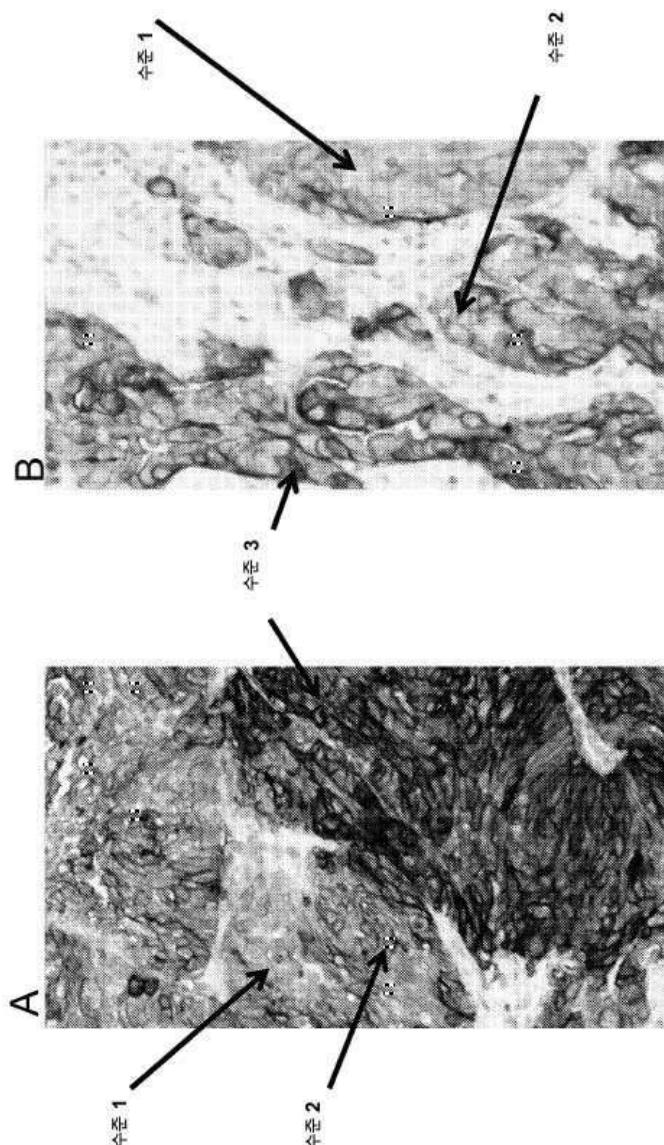


폐의 선암종

도면16



도면17



서열 목록

- <110> IMMUNOGEN, INC.
 AB, OLGA
 TAVARES, DANIEL
 SETIADY, JULIANTO
 LADD, SHARRON
 CARRIGAN, CHRISTINA N
 RUI, LINGYUN
 <120> ANTIBODIES AND ASSAYS FOR DETECTION OF FOLATE RECEPTOR 1
 <130> 2921.044PC03/EKS/CLD
 <150> 61/940,184
 <151> 2014-02-14

<150> 61/875,475
<151> 2013-09-09
<150> 61/872,407
<151> 2013-08-30
<160> 75
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 257
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val

1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu

20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly

35 40 45

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

50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu

130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp

145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln

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

<210>	2
<211>	771
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<400>	2
atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctcctctag tgtgggtggc tgttagtaggg	
gaggctcaga caaggattgc atggccagg actgagctc tcaatgtctg catgaacgcc	
aagcaccaca aggaaaagcc aggccccgag gacaagtgc atgagcagtgc tcgaccctgg	
aggaagaatgc cctgctgttc taccaacacc agccaggaag cccataagga tgttcctac	
ctatatagat tcaactggaa ccactgtgga gagatggcac ctgcctgcaa acggcatttc	
atccaggaca cctgcctcta cgagtgcgtcc cccaaacttgg gccctggat ccagcaggtg	
gatcagagct ggcgcaaaga gcgggtactg aacgtgcccc tgtgcaaaga ggactgtgag	
caatgggtgg aagattgtcg cacctcctac acctgcaaga gcaactggca caagggtgg	
aactggactt cagggttaa caagtgcgca gtgggagctg cctgccaacc ttccatttc	
tacttccca cacccactgt tctgtcaat gaaatctgga ctcactccta caaggtcagc	
aactacagcc gagggagtgg ccgctgcattc cagatgtggt tcgaccgcgc ccagggcaac	
cccaatgagg aggtggcgag gttctatgtt gcagccatga gtggggctgg gccctggca	
gcctggcctt tcctgcttag cctggcccta atgctgctgt ggctgctcag c	
<210>	3

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC2-1 VH-CDR1

<400> 3
Asn Ser Tyr Ile His

1	5	
<210>	4	
<211>	17	
<212>	PRT	

<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC2-1 VH-CDR2
<400> 4

Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC2-1 VH-CDR3
<400> 5

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

1	5	10	
<210>	6		
<211>	16		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		

<220><223> muFRIHC2-1 VL-CDR1
<400> 6

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

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC2-1 VL-CDR2

<400> 7

Leu Val Ser Asn His Phe Ser

1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC2-1 VL-CDR3

<400> 8

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC5-7 VH-CDR1

<400> 9

Asn Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC5-7 VH-CDR2

<400> 10

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

1 5 10 15

Ala

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC5-7 VH-CDR3

<400> 11

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

1	5	10
---	---	----

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC5-7 VL-CDR1

<400> 12

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> muFRIHC5-7 VL-CDR2

<400> 13

Leu Val Ser Asn His Phe Ser

1	5
---	---

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC5-7 VL-CDR3

<400> 14

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr

1	5
---	---

<210> 15

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC9-20 VH-CDR1

<400> 15
Asn Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC9-20 VH-CDR2

<400> 16

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

1 5 10 15

Ala

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC9-20 VH-CDR3

<400> 17

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

1 5 10

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC9-20 VL-CDR1

<400> 18

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

1 5 10 15

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC9-20 VL-CDR2
<400> 19

Leu Val Ser Asn His Phe Ser

1	5
---	---

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFRIHC9-20 VL-CDR3
<400> 20

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr

1	5
---	---

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Composite VH-CDR1
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (2)
<223> Xaa can be tyrosine or serine
<400> 21

Asn Xaa Tyr Ile His

1	5
---	---

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Composite VH-CDR2
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (5)

<223> Xaa can be glycine or glutamate
<220><221> MISC_FEATURE
<
222> (6)
<223> Xaa can be serine or asparagine
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (7)
<223> Xaa can be phenylalanine or valine or leucine
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (9)
<223> Xaa can be valine or threonine
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (10)
<223> Xaa can be glutamate or arginine or glutamine
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (13)
<223> Xaa can be glutamate or aspartate
<400> 22
Trp Ile Tyr Pro Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Asn Xaa Lys Phe Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Composite VH-CDR3
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (5)
<223> Xaa can be phenylalanine or tyrosine
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (11)
<223> Xaa can be leucine or methionine
<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)

<223> Xaa can be tyrosine or histidine

<400> 23

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

1 5 10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Composite VL-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> Xaa can be threonine or serine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa can be lycine or glutamate

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Composite VL-CDR2

<400> 25

Leu Val Ser Asn His Phe Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Composite VL-CDR3

<400> 26

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 27

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC2-1 VH Chain

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 28

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC2-1 VL Chain

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg

<210> 29

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC5-7 VH Chain

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC5-7 VL Chain

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC9-20 VH Chain

<400> 31

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

1	5	10	15
Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr			
20	25	30	
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Val Asn Val Arg Tyr Asn Asp Lys Phe			
50	55	60	
Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
85	90	95	
Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210>	32		
<211>	114		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	muFRIHC9-20 VL Chain		
<400>	32		
Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu			
1	5	10	15
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn			
20	25	30	
Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln			
35	40	45	
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val			
50	55	60	
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys			
65	70	75	80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln			

85	90	95
----	----	----

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

<210> 33
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> muFRIHC2-1 Full-Length Heavy Chain
 <400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Lys Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp

100 105 110
 Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 115 120 125
 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 130 135 140
 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165	170	175
-----	-----	-----

Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val

180	185	190
-----	-----	-----

Pro Ser Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His

195	200	205
-----	-----	-----

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys

210	215	220
-----	-----	-----

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe

225	230	235
-----	-----	-----

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro

245	250	255
-----	-----	-----

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val

260	265	270
-----	-----	-----

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr

275	280	285
-----	-----	-----

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu

290	295	300
-----	-----	-----

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys

305	310	315
-----	-----	-----

320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325	330	335
-----	-----	-----

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro

340	345	350
-----	-----	-----

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

355	360	365
-----	-----	-----

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly

370	375	380
-----	-----	-----

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn

385	390	395
-----	-----	-----

400

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

405	410	415
-----	-----	-----

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

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

<210> 34

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> muFRIHC2-1 Full-length Light Chain

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

130 135 140

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

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

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
 180 185 190
 Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
 195 200 205

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

<210> 35

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC5-7 Full-Length Heavy Chain

<400> 35

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

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

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

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

50 55 60

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

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

85 90 95

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

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

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

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

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205
 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
 210 215 220
 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 245 250 255
 Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 275 280 285
 Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 290 295 300
 Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 305 310 315 320
 Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 340 345 350
 Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 355 360 365
 Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn
 385 390 395 400
 Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp

405	410	415
Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His		
420	425	430
Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 36		
<211> 220		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> muFRIHC5-7 Full-Length Light Chain		
<400> 36		
Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile		
1	5	10
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Glu Ser Leu Leu Asn		
20	25	30
Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
35	40	45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
65	70	75
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln		
85	90	95
Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val		
100	105	110
Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser		
115	120	125
Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn		
130	135	140
Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu		
145	150	155
Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp		

165	170	175
Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr		
180	185	190
Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr		
195	200	205
Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
210	215	220

<210>	37		
<211>	446		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	muFRIHC9-20 Full-Length Heavy Chain		
<400>	37		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr			
20	25	30	
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Val Asn Val Arg Tyr Asn Asp Lys Phe			
50	55	60	
Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
85	90	95	
Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro			
115	120	125	
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met			
130	135	140	
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			

145	150	155	160
Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
165	170	175	
Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val			
180	185	190	
Pro Ser Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His			
195	200	205	
Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys			
210	215	220	
Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe			
225	230	235	240
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro			
245	250	255	
Lys Val Thr Cys Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val			
260	265	270	
Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr			
275	280	285	
Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu			
290	295	300	
Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys			
305	310	315	320
Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
325	330	335	
Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro			
340	345	350	
Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile			
355	360	365	
Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly			
370	375	380	
Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn			
385	390	395	400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 38

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC9-20 Full-Length Light Chain

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 39

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC2-1 VH Chain

<400> 39

cagggtccaaatgcagcagtc tggacctgag ctgggtgaagc ctggggcttc agtgaggata	60
tccctcaagg cttctggcta caccttcaca aactcctata ttcaactgggt gaaaaagagg	120
cctggacagg gactttagtg gattggatgg atttatcccg aaagtcttaa tactcaatac	180
aatgagaagt tcaaggccaa ggcccacactg actgcgtgaca agtcctccag cacatcctac	240
atgcagctca gcagtcgtac ctctgaggac tctgcggctt atttctgtgc aagaagggtt	300
atttattact actctcccta tgctctggac cactgggtc aaggagcctc agtcaccgtc	360

tcctca 366

<210> 40

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC2-1 VL Chain

<400> 40

agtgtatgttgc tcttgaccca aactccactc tctctgcctg tcaatattgg agatcaagcc	60
tctatctttt gcaagtcttc taagagtctt ctgaatagtg atggattcac ttatttggac	120
tggtaacctgc agaagccagg ccagtcctca cagtcctaa tatattgggt ttctaatcat	180

ttttctggag ttccagacag gttcagtggc agtgggtcag gaacagattt cacactcaag	240
atcagcagag tggaggctga ggatttggga gtttattatt gttccagag taactatctt	300
cctctcacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gg	342
<210> 41	
<211> 366	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> muFRIHC5-7 VH Chain	
<400> 41	
caggtc当地 tgtagcagtc tggacctgag gtggtaagc ctggggcttc agtgaggata	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg	120
cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttacctg gaagtttaa tgttgatgc	180
aatgagaagt tcaaggccaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagtctac	240
atgcaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggctt atttctgtgc aagaagggt	300
atttatttctt actctcccta tgcttggac tactgggtc aaggagcctc agtcaccgtc	360
tcctca	366
<210> 42	
<211> 342	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> muFRIHC5-7 VL Chain	
<400> 42	
agtgtatgtt ttctgaccca aactccactc tctctgcctg tcaatattgg agatcaagcc	60
tctatcttt gcaagtctac tgagagtctt ctgaatagtg atggattcac ttattttggac	120
tggtaacctgc agaagccagg ccagtctcca cagctctaa tatatttggt ttctaatcat	180
ttttctggag ttccagacag gttcagtggc agtgggtcag gaacagattt cacactcaag	240
atcagcagag tggaggctga ggatttggga gtttattatt gttccagag taactatctt	300
cctctcacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gg	342
<210> 43	
<211> 366	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> muFRIHC9-20 VH Chain

<400> 43

caggccaac	tgccggcgttc	tggacactgac	ctggtaagc	ctggggcttc	agtggggata	60
tcctgcagg	cttctggctt	cacccatca	aactactata	tacactgggt	gaaggcaggagg	120
cctggacagg	gacttgatgt	gattggatgg	atttacccctg	aaaatgttaa	tgttaggtac	180
aatgacaagt	tcaaggccaa	ggccacactg	actgcagaca	aatccctccag	cacagcctac	240
atgcagctca	gcagcctgac	ctctgaggac	tctgcggct	atttctgtgc	aagaagggt	300
atttattact	actctcccta	tgctatggac	tactgggtc	aaggagcctc	agtccccgtc	360
tcctca						366

<210> 44

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFRIHC9-20 VL Chain

<400> 44

agtgtatgtt	ttctgaccca	aactccactc	tctctgcctg	tcaatcttgg	agatcaagcc	60
tctatcttt	gcaagtctac	taagagtctt	ctgaatagt	atggattcac	ttatttggac	120
tggtaacctgc	agaagccagg	ccagtcctca	cagtcctaa	tatatttgg	ttctaatcat	180
ttttctggag	ttccagacag	gttcagtgcc	agtgggtcag	gaacagattt	caccctcaag	240
atcagcagag	tggaggctga	ggatgggaa	gtttatttt	gcttccagag	taactatctt	300

ccttcacgt	tcggaggggg	gaccaagctg	gaaataaaac	gg	342
-----------	------------	------------	------------	----	-----

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vHC

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35	40	45
Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His		
65	70	75
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115		
<210> 46		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> huMov19 vLCv1.00		
<400> 46		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
1	5	10
Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala		
20	25	30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro		
35	40	45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser		
65	70	75
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg		
85	90	95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	110

<210> 47

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vLCv1.60

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> huMov19 vLC CDR1

<400> 48

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His

1 5 10 15

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vLC CDR2

<400> 49

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vLC CDR3

<400> 50

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vHC CDR1

<400> 51

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vHC CDR2 - Kabat Defined

<400> 52

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

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vHC CDR2 - Abm Defined

<400> 53

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe

1 5 10

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vHC CDR3

<400> 54

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 55

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 HC amino acid sequence

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100	105	110	
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
130	135	140	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			

355

360

365

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

370

375

380

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

385 390 395 400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

<210> 56

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 LCv1.00

<400> 56

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85

90

95

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

100

105

110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 57

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 LCv1.60

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210	215	
-----	-----	--

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muMov19 vHC CDR2 - Kabat Defined

<400> 58

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRIHC2-1 Resurfaced or Grafted Light Chain v1.0 CDR1

<400> 59

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

1 5 10 15

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRIHC2-1 Resurfaced Heavy Chain CDR2

<400> 60

Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln

1 5 10

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRIHC2-1 Resurfaced HC CDR2

<400> 61

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

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huFRIHC2-1 (resurfaced) VH Chain

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 63

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (resurfaced) VL Chain

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 64
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (resurfaced) VL Chain
<400> 64
Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly

1	5	10	15
Gln	Pro	Ala	Ser
Ile	Ser	Cys	Lys
Ser	Ser	Lys	Ser
Leu	Leu	Asn	Ser
20	25	30	
Asp	Gly	Phe	Thr
Tyr	Leu	Asp	Trp
Tyr	Leu	Gln	Lys
Pro	Gly	Pro	Gln
35	40	45	
Asp	Arg	Leu	Leu
Ile	Tyr	Leu	Val
Ser	Asn	His	Phe
50	55	60	
Asp	Arg	Phe	Ser
Gly	Ser	Gly	Ser
Gly	Thr	Asp	Phe
65	70	75	80
Asp	Arg	Leu	Lys
Ile	Tyr	Leu	Ile

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Ser
85		90		95											
Asn	Tyr	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
100		105		110											
Arg															

<210> 65
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> huFRIHC2-1 (grafted) VH Chain
<400> 65
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

115 120 125

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (grafted) VL Chain

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 67

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (grafted) VL Chain

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 68

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muhuMov19 Full-Length Heavy Chain

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu
 165 170 175
 Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Met
 180 185 190
 Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
 210 215 220
 Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 245 250 255
 Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 260 265 270
 Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
 275 280 285
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
 305 310 315 320

 Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335
 Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
 340 345 350
 Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
 355 360 365
 Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe

 385 390 395 400
 Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
 405 410 415
 Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 420 425 430
 Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440
<210> 69
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muhuMov19 Full-Length Light Chain

<400> 69
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210 215

<210> 70

<211> 452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> huFRIHC2-1 (resurfaced) VH Chain

<400> 70

aagcttgcca ccatgggttg gagctgcatt atcctttcc ttgtggctac agctactggc	60
gttcactctc aggtacaatt ggttcagtca ggagccgagg tcgtaaagcc cggtgccagt	120
gtgaagatct catgcaaggc aagcggttat actttacaa actcttacat tcattgggtg	180
aaaaagcggc ccggccaggg tctcgaatgg atcggctgga tctaccaga aagtctgaac	240
actcaataca accagaagtt tcaggtaag gcaactctca ctgccgacaa gagctctagc	300

acaagctata tgcatgtgc tagttgaca agcgaggata ggcgagttt ctttgtct
cggcgtgta ttatattacta ctacacccat gctctggatc actggggaca ggggcctct
gttaccgtt ccagtgcata caccaaggc cc 360
<210> 71
<211> 452
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> huFRIHC2-1 (grafted) VH Chain
<400> 71
aagcttggcca ccatggcgtg gagctgcata atcctttcc tcttagctac cgccactggg 60
gtgcatttc aagtacagtt ggtgcgtcc ggagctgaag tcaagaagcc agggctct 120

gttaaggta gctgttaaggc ttccggatat accttcacaa acagtttat ccattgggtg 180
aggcaagctc caggccaggc tctcgatgg atggatgga tctacccga gagtctgaac 240
acccagttaca acgagaagtt caaggcacgt gtgaccatga caagagacac ctccatcgt 300
acagccata tggatttgag ccgtctcaga agtgcgtata cagcgtgtt cttactgc 360
aggcggggca tctactacta cagcccatac gctctcgacc actggggaca aggaacactg 420
gtaacggtaa gctcagcttc tacaaaggc cc 452
<210> 72
<211> 411
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (resurfaced) VL Chain
<400> 72
gaattcgcca ccatgggttg gtcgtatata atactttcc tggtagctac tgctactgg 60
gtgcatttcag atgtgggtct gactcgtca cccttgcctc tcccgatcaa tcttggcag 120
ccagcatcta tcagctgccg aagcagcagg tctctctga actccgatgg ctttacttat 180
cttgactggat atctccagaa gccaggacag tccccccggc tgctcatcta cctggttct 240
aatcattttta gtggcgccc tgaccgttc tctgggatgt gaagtgggac cgatttaca 300
ctgaagatct ccagggtcga agctgaggac cttgggttt actactgttt ccagagcaac 360

taccccttccct tgacattcgcc agggaaacc aagctggaaa tcaagcgtac g 411
<210> 73
<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (resurfaced) VL Chain

<400> 73

gaattcgcca ccatgggttg gtcttgtatc attctgttcc tggtcgccac tgccacagga	60
gttcactcag acgtggtaact cacacaatct cccctttccc tgcctgtgaa cctgggacag	120
ccagcctcaa tcagttgcaa gagctctaaa tctctgctca atagcgatgg cttagacctac	180
ttggatttgtt acctccagaa gccccggccag tctcctcgcc tccgttta ccttgttca	240

aatcacttt caggcgtgcc tgaccgggttc tccggatctg gtcaggac agacttaccc	300
ctgaagatct cccgcgtcga ggcagaggat ctcggcgtgtt attactgttt ccaaagtaac	360
tacctgcccattt tgacttttgg acaaggaact aaactggaaa tcaaacgtac g	411

<210> 74

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> huFRIHC2-1 v. 1.0 (grafted) VL Chain

<400> 74

gaattcgcca ccatgggatg gagttgtattt attctgttct tggtcgctac tgcaacaggc	60
gttcattctg acatcgtaat gacccagaca cctctgagtc tgagtgtcac tcccgccag	120

ccgcctcta ttcatgtcg tagctctcgcc tccctgtca attccgacgg ttttacctac	180
ttggacttgtt atttcagaa acctggcag agccctcagc ttctgatcta tctgggttcc	240
aatcacttca gtggcgtccc agaccgattt tccggaagcg gaagcggAAC cgactttacc	300
ctgaagatata cccgcgtcga agcagaggac gtggcgtgtt attattgttt tcaaagcaat	360
tacccat tgactttcgaa acaaggcaca aaactggaga ttaagcgtac g	411

<210> 75

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> huFRIHC2-1 v. 1.01 (grafted) VL Chain

<400> 75

gaattcgcca ccatgggctg gtcgtatcatactgttcc tggtggtac agcaaccggg	60
gtgcacagcg atattgttat gacacagaca ccactgagtt tgtcagtgc ccccgccag	120

ccagcctcta tattctgcaa gtcctcaaaa agtctcctga atagcgatgg cttaacctac	180
ctcgactggt atttcagaa gcccggtcaa agccctcagc tgctgatata tctgggtct	240
aaccattta gcggagtccc cgaccgctt tcaggctcg gcagtggcac cgacttcacc	300
cttaagattt ctcgcgtgga ggctgaagat gtaggggtct actactgttt ccagtcaaac	360
tacctgccac tgaccttgg tcaaggcact aagctcgaaa ttaagcgtac g	411