



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0079565
(43) 공개일자 2020년07월03일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)
 <i>C07K 16/30</i> (2006.01) <i>G01N 15/14</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/566</i> (2006.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 16/28</i> (2013.01)
 <i>A61K 39/39533</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7018333(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2013년08월30일
 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2015-7007933
 원출원일자(국제) 2013년08월30일
 심사청구일자 2018년03월21일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년06월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2013/057682</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/036495
 국제공개일자 2014년03월06일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/695,791 2012년08월31일 미국(US)
 61/756,254 2013년01월24일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 이뮤노젠 아이엔씨
 미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830</p> <p>(72) 발명자
 테스타 네이션 이
 미국 02453 메사추세츠주 월섬 머틀 스트리트 53
 넘버4
 캐리건 크리스티나 앤
 미국 02478 메사추세츠주 벨몬트 다트머스 스트리트 53에이
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인코리아나</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **엽산 수용체 1의 검출을 위한 진단성 검정 및 키트**

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 검정 인간 엽산 수용체 1에 결합하는 항체 및 엽산 수용체 기반의 요법을 위한 진단성 검정에 관한 것이다. 요법을 모니터링하기 위한 항체를 사용하는 방법이 추가로 제공된다. 본 발명은 표본에서 FOLR1의 검출을 위한 방법을 제공하며, 예를 들어, 환자들을 층화하는데 사용될 수 있다. 그러므로, 일 구현예에서, 본 발명은 엽산 수용체 1- 매개된 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 (a) 분비된 엽산 수용체 1 (FOLR1) 발현 수준 또는 환자로부터 채득된 표본에서의 순환 종양 세포 (CTC) 상에서의 FOLR1을 측정하는 것을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

G01N 15/14 (2013.01)

G01N 33/566 (2013.01)

G01N 33/57492 (2013.01)

G01N 2333/705 (2013.01)

(72) 발명자

아브 올가

미국 02054 매사추세츠주 밀스 베이베리 서클 26

타바레스 다니엘

미국 01760 매사추세츠주 네이틱 실베스터 로드 27

울프 베니 비

미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 페어뱅크스 로드 29

명세서

청구범위

청구항 1

다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 항체와 상동한 FOLR1 에피토프에 특이적으로 결합하거나, 이의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편:

- (a) 서열 식별 번호 25의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 29의 폴리펩티드를 포함하는 항체;
- (b) 서열 식별 번호 26의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 30의 폴리펩티드를 포함하는 항체;
- (c) 서열 식별 번호 27의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 31의 폴리펩티드를 포함하는 항체; 및
- (d) 서열 식별 번호 28의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 32의 폴리펩티드를 포함하는 항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편:

- (a) 서열 식별 번호: 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15;
- (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18;
- (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21;
- (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24; 및
- (e) 1, 2, 3, 또는 4의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 (a) 내지 (d)의 변이체.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편:

- (a) 서열 식별 번호: 25 및 서열 식별 번호: 29;
- (b) 서열 식별 번호: 26 및 서열 식별 번호: 30;
- (c) 서열 식별 번호: 27 및 서열 식별 번호: 31; 및
- (d) 서열 식별 번호: 28 및 서열 식별 번호: 32.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 무린의, 비-인간의, 인간화된, 키메라의, 재표면화된, 또는 인간의 것인, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

FOLR1에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드는 다음으로 구성되는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는, 폴리펩티드:

- (a) 서열 식별 번호: 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15;
- (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18;
- (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21;
- (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24; 및
- (e) 1, 2, 3, 또는 4의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 (a) 내지 (d)의 변이체.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 상기 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 인코딩하는, 핵산 분자.

청구항 7

표본에서 FOLR1 단백질을 검출하는 방법으로서, 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 상기 항체, 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드로 상기 표본을 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, FOLR1 단백질은 방사성면역검정, 웨스턴 블랏(western blot) 검정, 면역형광 검정, 효소 면역검정, 면역침전 검정, 화학발광 검정, 세포계측법, 또는 면역조직화학 검정에 의하여 검출되는, 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 세포계측법은 유동 세포계측법인, 방법.

청구항 10

청구항 7 또는 8에 있어서, 상기 FOLR1 단백질은 분비된 FOLR1 단백질인, 방법.

청구항 11

청구항 7 또는 8에 있어서, 상기 FOLR1 단백질은 상기 표본에서의 순환 종양 세포 상에서 검출되는, 방법.

청구항 12

청구항 8에 있어서, 상기 효소 면역검정은 효소 결합된 면역흡착검정(ELISA)인, 방법.

청구항 13

청구항 8에 있어서, 상기 FOLR1 단백질은 면역조직화학 검정에 의하여 검출되는, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 상기 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 생성하는, 세포.

청구항 15

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 상기 항체, 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법으로서, (a) 청구항 12의 상기 세포를 배양하는 것; 및 (b) 상기 항체, 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드를 상기 배양된 세포로부터 분리하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 16

표본에서 FOLR1 단백질을 검출하기 위한 면역검정 키트로서, 상기 키트는: (a) 제1 시약, 및 (b) 제2 시약을 포함하며, 여기서 상기 제1 시약은 청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 청구항 5의 상기 폴리펩티드이며, 상기 제2 시약은 검출제인, 면역검정 키트.

청구항 17

암을 치료하는 방법으로서, 상승된 FOLR1 단백질 수준을 갖는 환자에게 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 상승된 FOLR1 단백질 수준은 청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 청구항 5의 상기 폴리펩티드를 사용하여 측정되었던, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 분야는 일반적으로 인간 엽산 수용체 1 (FOLR1)에 결합하는 항체, FOLR1를 검출하는 방법, 암을 진단하고 치료하는 방법, 및 FOLR1-계 요법을 위한 진단성 검정 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 선진국에서 사망의 주요 원인 중 하나로서, 미국에서만 백만명을 초과하는 사람들이 암으로 진단받고, 연간 500,000명의 사망이 발생한다. 전체적으로, 3명 중 1명 초과の人들에서 그들의 일생 동안 암의 일정 형태가 발병한다. 200개 초과인 상이한 암의 유형이 있으며, 이 중 유방, 폐, 결장(colorectal), 및 전립선 암이 모든 새로운 경우들 중 반을 초과하는 부분을 차지한다 (Jemal et al., 2003, *Cancer J. Clin.* 53:5-26).

[0003] 또한 엽산 수용체-알파 또는 결합 단백질로 알려진, 엽산 수용체 1 (FOLR1)는 세포의 원형질막 상에서 발현된 N-글리코실화된 단백질이다. FOLR1는 엽산 및 몇몇의 환원된 엽산 유도체들에 고친화도를 갖는다. FOLR1는 생리학적인 엽산, 5-메틸테트라히드로엽산의 세포 내부로의 전달을 매개한다.

[0004] FOLR1는 난소암의 광범위한 대부분에서, 뿐만 아니라 많은 자궁, 자궁내막, 췌장, 신장, 폐, 및 유방암에서 과발현되며, 한편 정상 조직 상에서 FOLR1의 발현은 신장 근위세뇨관, 폐의 폐포세포, 방광, 고환, 맥락막, 및 갑상선에서 상피 세포의 꼭지면 막으로 제한된다 (Weitman SD, et al., *Cancer Res* 52: 3396-3401 (1992); Antony AC, *Annu Rev Nutr* 16: 501-521 (1996); Kalli KR, et al. *Gynecol Oncol* 108: 619-626 (2008)). FOLR1의 발현 패턴은 FOLR1-지시된 암 요법에 있어 바람직한 표적이 되게 한다.

[0005] 난소 암은 전형적으로 진행단계에 이를 때까지 무증상이므로, 이는 종종 말기에 진단되고, 현재 이용가능한 기술, 전형적으로 수술적 제거 이후 화학요법의 약물로 치료할 경우 불량한 예후를 갖는다 (von Gruenigen V et al., *Cancer* 112: 2221-2227 (2008); Ayhan A et al., *Am J Obstet Gynecol* 196: 81 e81-86 (2007); Harry VN et al., *Obstet Gynecol Surv* 64: 548-560 (2009)). 따라서, 난소암을 위한 더욱 효과적인 요법에 대한 명백히 충족되지 않은 의학적 필요성이 있다.

[0006] 분비된(shed) FOLR1를 검출하는데 사용되는 몇몇의 이전의 검정은 FOLR1에 충분히 특이적이지 않다. 예를 들어, 몇몇의 검정은 FOLR1 및 다른 엽산 수용체 계통 구성원 (FOLR2, 3, & 4) 사이를 구별하거나 또는 총 FBP (엽산 결합 단백질)에 대한 값들을 보고하지 않는다. 추가로, 몇몇 검정들은 인간 표본(예를 들어, 혈장)이 상기 수용체로부터 엽산을 분리하는 가벼운 산 세정 단계로 사전처리될 것을 요구한다. 몇몇 검정 결과들은 또한 항체 요법 및 진단성 항체 사이에서의 경쟁 효과로 인한 부정확성을 가질 수 있다. 추가로, 많은 상업적으로 수득가능한 키트는 그들의 시약에서, 및 그들의 랫간(lot-to-lot) 안정성에서 통례적으로 신뢰가능하지 않다. 이러한 키트들의 평가는 소정의 매우 혼조의 결과를 가지고, 연구 용도로만 의도된다. 많은 것들은 상기 인간 표본이 분석 전에 “매트릭스 효과”로 인한 위양성의 가능성을 줄이기 위하여 사전-희석되는 것을 요구한다. 그러므로, FOLR1-계 요법을 위한 지침으로서 높은 정도로 민감하고 정확한 진단성 검정에 대한 명백한 필요성이 있다.

발명의 내용

[0007] 발명의 요약

[0008] 본 발명은 표본에서 FOLR1의 검출을 위한 방법을 제공하며, 예를 들어, 환자들을 층화하는데 사용될 수 있다. 그러므로, 일 구현예에서, 본 발명은 (a) 참조 표본에서 분비된 또는 CTC FOLR1 수준과 비교하여, 항체 huMov19를 FOLR1에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여, 환자로부터 채득된 표본에서의 분비된 엽산 수용체 1 (FOLR1) 발현 수준 또는 순환 종양 세포 상에서의 FOLR1을 측정하는 것; 및 (b) 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 수준이 상승되었을 때 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 항원-결합 단편의 고정된 용량을 상기 환자에게 투여하는 것; 여기서 상기 항체 또는 항원-결합 단편의 고정된 용량은 상기 질병 또는 장애를 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 엽산 수용체 1-매개된 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

[0009] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 (a) FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 항원-결합 단편의 고정된 용량을 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자에게 투여하는 것; (b) 항체 huMov19의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여 대조 표본에서의 FOLR1 수준과 비교하여 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 발현 수준을 측정하는 것; 및 (c) 상기 환자의 분비 또는 CTC FOLR1 수준이 상승될 경우, 후속적인 고정된 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 것; 여기서 상기 환자의 FOLR1 수준을 증가 (예를 들어 증가

된 세포사가 분비된 FOLR1의 방출 증가를 초래하기 때문에) 또는 감소가 치료 효능을 나타내는 것을 포함하는, FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 후속적인 고정된 용량의 상기 양 또는 빈도는 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 수준이 감소될 경우 증가한다.

[0010] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 (a) 항체 huMov19의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여 대조 표본에서의 FOLR1 수준과 비교하여 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자로부터 채득된 표본에서 분비된 또는 CTC FOLR1 수준을 측정하는 것; 및 (b) 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 수준이 상승될 경우 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 고정된 용량을 상기 환자에게 투여하는 것; 여기서 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 투여는 상기 환자의 FOLR1을 증가 (예를 들어 증가된 세포사가 분비된 FOLR1의 방출 증가를 초래하기 때문에) 또는 감소시키는 것을 포함하는, 환자에서 FOLR1 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0011] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 (a) FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 고정된 용량을 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자에게 투여하는 것; (b) 대조 표본에서의 FOLR1 수준과 비교하여 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 발현 수준을 측정하는 것; 및 (c) 상기 환자의 분비 또는 CTC FOLR1 수준이 상승될 경우 후속적인 고정된 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 것; 여기서 상기 환자의 FOLR1 수준을 증가 (예를 들어 증가된 세포사가 분비된 FOLR1의 방출 증가를 초래하기 때문에) 또는 감소시키는 것을 포함하는, 환자에서 FOLR1 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0012] 일 구현예에서, 상기 질병은 암이다. 또 다른 구현예에서, 상기 암은 난소, 비-소세포 폐암, 자궁, 자궁내막, 췌장, 신장(renal), 폐, 및 유방암으로 구성된 그룹으로부터 선택된 FOLR1 상승된 암이다. 또 다른 구현예에서, 상기 암은 백금 저항성 또는 백금 내화성(refractory)인 난소암이다.

[0013] 본 발명은 또한 (a) 항체 huMov19를 FOLR1에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여, FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자로부터 채득된 표본에서 제1 분비된 또는 CTC FOLR1 수준을 측정하는 것; (b) FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 항원-결합 단편의 고정된 용량을 상기 환자에게 투여하는 것; (c) 항체 huMov19를 FOLR1에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여, 항체 투여 후 상기 환자로부터 채득된 표본에서 제2 분비된 또는 CTC FOLR1 수준을 측정하는 것; 및 (d) 상기 제2 FOLR1 수준을 상기 제1 FOLR1 수준과 비교하는 것; 여기서 상기 제1 및 제2 FOLR1 스코어(score) 간의 증가 (예를 들어 증가된 세포사가 분비된 FOLR1의 방출 증가를 초래하기 때문에) 또는 감소는 치료 효능을 나타내는 것을 포함하는, 환자에서 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 고정된 용량의 치료적 효과를 모니터링하는 방법을 제공한다.

[0014] 일 구현예에서, 상기 FOLR1 발현 수준은 체액에서 측정된다. 또 다른 구현예에서, 상기 체액은 복수(ascites) 유체이다. 또 다른 구현예에서, 상기 체액은 혈청, 혈액, 또는 혈장이다. 일 구현예에서, 상기 FOLR1 발현 수준은 말초 혈액 표본에서 측정된다.

[0015] 일 구현예에서, 상기 환자는 암을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 상기 암은 난소, 비-소세포 폐암, 자궁, 자궁내막, 췌장, 신장(renal), 폐, 및 유방암으로 구성된 그룹으로부터 선택된 FOLR1 상승된 암이다. 또 다른 구현예에서, 상기 암은 백금 저항성 또는 백금 내화성인 난소암이다.

[0016] 일 구현예에서, 상기 FOLR1 발현은 적어도 하나의 부가적인 항-FOLR1 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여 측정된다. 또 다른 구현예에서, 상기 FOLR1 발현은 2개의 항-FOLR1 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여 측정된다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체는 무린(murine)의, 키메라의, 인간화된, 또는 인간 항체이다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.0 내지 약 10 nM의 Kd로 인간 엽산 수용체 1에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 약 0.5 내지 약 5 nM의 Kd로 인간 엽산 수용체 1에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 결합 친화도는 세포계측법, 비아코어(Biacore), ELISA, 또는 방사성면역검정에 의하여 측정된다. 또 다른 구현예에서, 상기 세포계측법은 유동 세포계측법이다.

[0017] 일 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 엽산 수용체 2 또는 엽산 수용체 3과 결합하지 않는다.

[0018] 일 구현예에서, 상기 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 고정 지지체에 결합된다. 또 다른 구현예에서, 상기 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 마이크로티터 플레이트(microtiter plate)에 결합된다. 또 다른 구현예에서, 상기 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 검출제를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 검출제는 발색성 검출제, 형광원성 검출제, 효소적 검출제, 또는 전기화학발광 검출제이다. 또 다른 구현예에서, 상기 검출제는 호스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제(HRP)이다.

- [0019] 일 구현예에서, 상기 FOLR1 수준은 효소 결합된 면역흡착검정 (ELISA) 또는 세포계측법 (예를 들어, 유동 세포계측법)를 사용하여 측정된다. 또 다른 구현예에서, 상기 ELISA는 샌드위치(sandwich) ELISA이다.
- [0020] 일 구현예에서, 상기 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 상동한 FOLR1 에피토프에 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 항체로서 특이적으로 결합한다: (a) 서열 식별 번호 25의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 29의 폴리펩티드를 포함하는 항체; (b) 서열 식별 번호 26의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 30의 폴리펩티드를 포함하는 항체; (c) 서열 식별 번호 27의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 31의 폴리펩티드를 포함하는 항체; 및 (d) 서열 식별 번호 28의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 32의 폴리펩티드를 포함하는 항체.
- [0021] 일 구현예에서, 상기 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 FOLR1에 특이적으로 결합하며, 상기 항체 또는 그의 단편은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 항체의 FOLR1 결합을 경쟁적으로 억제한다: (a) 서열 식별 번호 25의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 29의 폴리펩티드를 포함하는 항체; (b) 서열 식별 번호 26의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 30의 폴리펩티드를 포함하는 항체; (c) 서열 식별 번호 27의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 31의 폴리펩티드를 포함하는 항체; 및 (d) 서열 식별 번호 28의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 32의 폴리펩티드를 포함하는 항체.
- [0022] 일 구현예에서, 상기 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 FOLR1에 특이적으로 결합하며, 상기 항체는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드 서열들을 포함한다: (a) 서열 식별 번호 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15; (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18; (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21; (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24; 및 (e) 1, 2, 3, 또는 4의 보존적 아미노산 치환을 갖는 (a) 내지 (d)의 변이체들.
- [0023] 일 구현예에서, 상기 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지된다.
- [0024] 일 구현예에서, 상기 투여된 항체는 FOLR1 항체 huMov19를 포함한다.
- [0025] 일 구현예에서, 상기 huMov19는 항체 메이탄시노이드 공액체로서 투여된다. 일 구현예에서, 상기 항체 메이탄시노이드 공액체는 메이탄시노이드 DM4 및 절단가능한 설폰-SPDB 링커 (IMG853)를 포함한다.
- [0026] 본 발명은 다음을 포함하는 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자를 치료하는 방법을 또한 제공한다: (a) FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 고정된 용량을 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자에게 투여하는 것; (b) FOLR1 발현 수준의 측정을 위하여 상기 환자로부터 채득된 표본을 제출하는 것; (c) 대조 표본에서의 FOLR1 수준과 비교하여 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 수준이 상승하였는지 여부를 측정의 결과로부터 결정하는 것; 및 (d) 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 수준이 상승할 경우 후속적인 고정된 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 것.
- [0027] 본 발명은 또한 다음을 포함하는 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다: (a) FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 고정된 용량을 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자에게 투여하는 것; (b) 분비된 또는 CTC FOLR1 발현 수준의 측정 및 참조 표본에서 FOLR1 수준과의 비교를 위하여 환자로부터 채득된 표본을 제출하는 것; 및 (c) 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 수준이 상승될 경우 후속적인 고정된 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 것; 여기서 상기 환자의 FOLR1 수준의 증가 (예를 들어 증가된 세포사가 분비된 FOLR1의 방출 증가를 초래하기 때문에) 또는 감소가 치료 효능을 나타낸다.
- [0028] 일 구현예에서, 상기 투여된 항체는 FOLR1 항체 huMov19를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 huMov19는 항체 메이탄시노이드 공액체로서 투여된다. 일 구현예에서, 상기 항체 메이탄시노이드 공액체는 메이탄시노이드 DM4 및 절단가능한 설폰-SPDB 링커 (IMG853)를 포함한다.
- [0029] 본 발명은 또한 (a) FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자로부터 표본을 수득하는 것; 여기서 상기 환자는 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 항원-결합 단편의 고정된 용량을 수용하였으며; (b) 항체 huMov19의 FOLR1로 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여 대조 표본에서의 FOLR1 수준과 비교하여 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 발현 수준을 측정하는 것; (c) 대조 표본에서의 FOLR1 수준과 비교하여 상기 환자의 분비된 또는 CTC FOLR1 수준이 상승하였는지 여부를 측정의 결과로부터 결정하는 것; (d) 상기 환자의 분비 또는 CTC FOLR1 수준이 상승될 경우 후속적인 고정된 용량의 양 또는 빈도를 증가시킬 것을 건강관리 공급자에게 나타내는 것; 여기서 상기 환자의 FOLR1 수준의 증가 (예를 들어 증가된 세포사가 분비된 FOLR1의 방출 증가를 초래하기 때문에) 또는 감소가 치료 효능을 나타내는 것을 포함하는, FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

- [0030] 본 발명은 표본에서 분비된 또는 CTC FOLR1를 검출하기 위한 면역검정 키트를 또한 제공하며, 상기 키트는 (a) 인간 FOLR1에 대한 포획 항체, 여기서 상기 키트는 포획 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 huMov19의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않으며, 및 (b) 검출 시약을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 키트는 상기 포획 시약을 위한 고정 지지체를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 포획 시약은 상기 고정 지지체 상에 고정된다. 또 다른 구현예에서, 상기 포획 시약은 마이크로티터 플레이트(microtiter plate) 상에서 코팅된다. 또 다른 구현예에서, 상기 검출 시약은 제2 FOLR1 항체이다. 또 다른 구현예에서, 상기 제1 및/또는 제2 FOLR1 항체는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드 서열들을 포함한다: (a) 서열 식별 번호 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15; (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18; (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21; (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24; 및 (e) 1, 2, 3, 또는 4의 보존적 아미노산 치환을 갖는 (a) 내지 (d)의 변이체들.
- [0031] 일 구현예에서, 상기 검출 시약은 종 특이적 항체를 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 상기 키트는 검출 가능한 항체를 위한 검출 수단을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 검출 수단은 비색성(colorimetric)이다. 또 다른 구현예에서, 상기 키트는 항원표준 으로서의 FOLR1 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 FOLR1 폴리펩티드는 FOLR1-Fc이다.
- [0032] 본 발명은 또한 상동한 FOLR1 에피토프에 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 항체로서 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다: (a) 서열 식별 번호 25의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 29의 폴리펩티드를 포함하는 항체; (b) 서열 식별 번호 26의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 30의 폴리펩티드를 포함하는 항체; (c) 서열 식별 번호 27의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 31의 폴리펩티드를 포함하는 항체; 및 (d) 서열 식별 번호 28의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 32의 폴리펩티드를 포함하는 항체.
- [0033] 본 발명은 또한 FOLR1에 특이적으로 결합하며, 항체 또는 그의 단편은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 항체의 FOLR1를 경쟁적으로 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다: (a) 서열 식별 번호 25의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 29의 폴리펩티드를 포함하는 항체; (b) 서열 식별 번호 26의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 30의 폴리펩티드를 포함하는 항체; (c) 서열 식별 번호 27의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 31의 폴리펩티드를 포함하는 항체; 및 (d) 서열 식별 번호 28의 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 32의 폴리펩티드를 포함하는 항체.
- [0034] 본 발명은 또한 FOLR1에 특이적으로 결합하며, 항체는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드 서열들을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다: (a) 서열 식별 번호 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15; (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18; (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21; (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24; 및 (e) 1, 2, 3, 또는 4의 보존적 아미노산 치환을 갖는 (a) 내지 (d)의 변이체들.
- [0035] 일 구현예에서, 상기 항체는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 90%의 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다: (a) 서열 식별 번호 25 및 서열 식별 번호 29; (b) 서열 식별 번호 26 및 서열 식별 번호 30; (c) 서열 식별 번호 27 및 서열 식별 번호 31; 및 (d) 서열 식별 번호 28 및 서열 식별 번호 32.
- [0036] 또 다른 구현예에서, 상기 폴리펩티드 서열은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 95%의 상동성을 갖는다: (a) 서열 식별 번호 25 및 서열 식별 번호 29; (b) 서열 식별 번호 26 및 서열 식별 번호 30; (c) 서열 식별 번호 27 및 서열 식별 번호 31; 및 (d) 서열 식별 번호 28 및 서열 식별 번호 32. 또 다른 구현예에서, 상기 폴리펩티드 서열은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 99%의 상동성을 갖는다: (a) 서열 식별 번호 25 및 서열 식별 번호 29; (b) 서열 식별 번호 26 및 서열 식별 번호 30; (c) 서열 식별 번호 27 및 서열 식별 번호 31; 및 (d) 서열 식별 번호 28 및 서열 식별 번호 32.
- [0037] 일 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 뮤린(murine)의, 비-인간의, 인간화된, 키메라의, 재표면화된(resurfaced) 또는 인간의 것이다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체는 인간 FOLR1에 결합하나, FOLR2 또는 FOLR3에는 결합하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체는 전체 길이 항체 또는 항원-결합 단편이다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 이황화결합된 Fv, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgGΔCH2, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb2, (scFv)₂, 또는 scFv-Fc을 포함한다.
- [0038] 본 발명은 또한 FOLR1에 특이적으로 결합하며, 폴리펩티드는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열들을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다: (a) 서열 식별 번호 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15; (b) 서열

식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18; (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21; (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24; 및 (e) 1, 2, 3, 또는 4의 보존적 아미노산 치환을 갖는 (a) 내지 (d)의 변이체들. 또 다른 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열들과 적어도 90%의 상동성을 갖는 서열들을 포함한다: (a) 서열 식별 번호 25 및 서열 식별 번호 29; (b) 서열 식별 번호 26 및 서열 식별 번호 30; (c) 서열 식별 번호 27 및 서열 식별 번호 31; 및 (d) 서열 식별 번호 28 및 서열 식별 번호 32. 또 다른 구현예에서, 상기 서열들은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열들과 적어도 95%의 상동성을 갖는다: (a) 서열 식별 번호 25 및 서열 식별 번호 29; (b) 서열 식별 번호 26 및 서열 식별 번호 30; (c) 서열 식별 번호 27 및 서열 식별 번호 31; 및 (d) 서열 식별 번호 28 및 서열 식별 번호 32. 또 다른 구현예에서, 상기 서열들은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열들과 적어도 99%의 상동성을 갖는다: (a) 서열 식별 번호 25 및 서열 식별 번호 29; (b) 서열 식별 번호 26 및 서열 식별 번호 30; (c) 서열 식별 번호 27 및 서열 식별 번호 31; 및 (d) 서열 식별 번호 28 및 서열 식별 번호 32.

[0039] 일 구현예에서, 상기 항체 또는 폴리펩티드는 약 1.0 내지 약 10 nM의 Kd로 인간 엽산 수용체 1에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 폴리펩티드는 약 1.0 nM의, 또는 그보다 양호한 Kd로 인간 엽산 수용체 1에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 결합 친화도는 세포계측법, 비아코어(Biacore), ELISA, 또는 방사성면역검정에 의하여 측정된다.

[0040] 또 다른 구현예에서, 상기 세포계측법은 유동 세포계측법이다. 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드로 표본을 접촉시키는 것을 포함하는, 표본에서 FOLR1 발현을 검출하는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지된다. 또 다른 구현예에서, 상기 표지는 면역형광 표지, 화학발광 표지, 인광성 표지, 효소 표지, 방사성 표지, 아비딘/비오틴 콜로이드성 금 입자, 착색된 입자, 및 자기성 입자로 구성된 그룹에서 선택된다. 또 다른 구현예에서, 상기 FOLR1 발현은 방사성면역검정, 웨스턴 블랏(western blot) 검정, 면역형광 검정, 효소 면역검정, 면역침전 검정, 화학발광 검정, 또는 면역조직화학 검정에 의하여 측정된다. 또 다른 구현예에서, 상기 FOLR1 발현은 순환 종양 세포 (CTC) 검정을 사용하여 측정되며, 여기서 CTC는 혈액, 혈장, 또는 혈청의 표본으로부터 농축(enriched)되며, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여 FOLR1 발현을 위하여 염색된다. CTC 검정에 유용한 항체들의 비제한적인 예시들은 FR1-9 및 FR1-13을 포함한다. 본 발명의 항체들을 사용한 CTC 검정은 FOLR1-계 요법에 응할 수 있는 대상체를 식별하는데 유용할 수 있다.

[0041] 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드를 생성하는 단리된 세포를 제공한다.

[0042] 본 발명은 또한 (a) 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함하는, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명은 또한 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 여기서 FOLR1 단백질의 증가된 발현은 상기 활성제의 투여 전에 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 본원에 제공된 폴리펩티드를 사용하여 상기 대상체로부터의 암성 표본에서 측정되었다.

[0044] 본 발명은 또한 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 환자 표본에서 FOLR1 단백질 수준을 측정하는 것; 및 (b) 상기 환자의 FOLR1 단백질 수준이 참조 FOLR1 단백질 수준에 비교하여 상승될 경우 상기 활성제의 고정된 용량을 상기 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0045] 본 발명은 또한 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 상기 활성제의 고정된 용량을 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자에게 투여하는 것; (b) 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 FOLR1 단백질 수준을 측정하는 것; 및 (c) 상기 환자의 FOLR1 단백질 수준이 참조 FOLR1 단백질 수준에 비교하여 상승될 경우 후속적인 고정된 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 것.

[0046] 본 발명은 또한 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 여기서: (a) 환자 표본에서 측정된 FOLR1 단백질 수준은 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여, 참조 FOLR1 단백질 수준과 비교되

며; 그리고 (b) 상기 활성제의 고정된 용량은 상기 환자의 FOLR1 단백질 수준이 참조 FOLR1 단백질 수준에 비교하여 상승될 경우 투여되며, 여기서 상기 제제의 투여는 FOLR1 단백질 수준을 감소시킨다.

[0047] 본 발명은 또한 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 여기서 환자에서의 FOLR1-발현 세포는 감소되며, (a) 상기 활성제의 고정된 용량이 상기 환자에게 투여되며; (b) 환자 표본에서 측정된 FOLR1 단백질 수준은 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여, 참조 FOLR1 단백질 수준과 비교되며; 그리고 (c) 상기 활성제의 고정된 용량은 상기 환자의 FOLR1 단백질 수준이 참조 FOLR1 단백질 수준에 비교하여 상승될 경우 투여되며, 여기서 상기 제제의 투여는 FOLR1 단백질 수준을 감소시킨다.

[0048] 본 발명은 또한 환자에서의 활성제의 고정된 용량의 치료 효능을 모니터링하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자로부터의 표본에서 제1 FOLR1 단백질 수준을 측정하는 것; (b) 상기 환자에게 상기 활성제의 고정된 용량을 투여하는 것; (c) 상기 환자로부터 채득된 표본에서 제2 FOLR1 단백질 수준을, 활성제 투여 후 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 측정하는 것; 및 (d) 상기 제2 FOLR1 단백질 수준을 상기 제1 FOLR1 단백질 수준과 비교하는 것; 여기서 상기 제1 및 제2 단백질 수준 사이의 감소는 치료 효능을 나타낸다.

[0049] 본 발명은 또한 환자에서 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 상기 활성제의 고정된 용량을 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자에게 투여하는 것; (b) FOLR1 발현 수준의 측정을 위하여 환자로부터 상기 채득된 표본을 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 추출하는 것; (c) 대조 표본에서의 FOLR1 수준과 비교하여 상기 환자의 분비된 또는 FOLR1 수준이 상승하였는지 여부를 측정의 결과로부터 결정하는 것; 및 (d) 상기 환자의 FOLR1 수준이 참조 FOLR1 단백질 수준과 비교하여 증가할 경우 후속적인 고정된 용량의 상기 양 및/또는 빈도를 증가시키는 것.

[0050] 본 발명은 또한 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 상기 활성제의 고정된 용량을 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자에게 투여하는 것; (b) 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드, 그리고 참조 FOLR1 단백질 수준과 상기 측정된 FOLR1 단백질 수준의 비교를 사용하여 FOLR1 발현 수준의 측정을 위하여 환자로부터 채득된 표본을 추출하는 것; 및 (c) 상기 환자의 FOLR1 단백질 수준이 참조 FOLR1 단백질 수준에 비교하여 상승될 경우 후속적인 고정된 용량의 양 또는 빈도를 증가시키는 것; 여기서 상기 환자의 FOLR1 수준의 감소는 치료 효능을 나타낸다.

[0051] 본 발명은 또한 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 갖는 환자로부터 표본을 수득하는 것, 여기서 상기 환자는 활성제의 고정된 용량을 수용하였으며; (b) 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 상기 표본으로부터의 FOLR1 단백질 발현 수준을 측정하는 것; (c) 참조 FOLR1 단백질 수준과 비교하여 상기 환자의 단백질 FOLR1 수준이 상승하였는지 여부를 결정하는 것; (d) 상기 환자의 FOLR1 단백질 수준이 참조 FOLR1 단백질 수준에 비교하여 상승될 경우 후속적인 고정된 용량의 양 및/또는 빈도를 증가시키는 것 또는 증가시킬 것을 건강관리 공급자에게 나타내는 것; 여기서 상기 환자의 FOLR1 수준의 감소는 치료 효능을 나타낸다.

[0052] 본 발명은 또한 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를 제공하며, 여기서 FOLR1 단백질의 증가된 발현은 상기 활성제의 투여 전에 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 상기 대상체로부터의 표본에서 측정되었다.

[0053] 일부 구현예에서, 상기 측정된 FOLR1 단백질은 분비된 FOLR1이다. 일부 구현예에서, 상기 측정된 FOLR1 단백질은 순환 종양 세포 상에 있다.

[0054] 일부 구현예에서, 상기 FOLR1 단백질 수준은 체액에서 측정된다. 일부 구현예에서, 상기 체액은 복수(ascites) 유체이다. 일부 구현예에서, 상기 체액은 혈청, 혈액, 또는 혈장이다. 일부 구현예에서, 상기 FOLR1 단백질 수준은 말초 혈액 표본에서 측정된다.

- [0055] 일부 구현예에서, 상기 환자는 암을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 FOLR1-매개된 질환 또는 장애는 암이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 난소, 비-소세포 폐암, 자궁, 자궁내막, 췌장, 신장(renal), 폐, 및 유방암으로 구성된 그룹으로부터 선택된 FOLR1 상승된 암이다. 일부 구현예에서, 상기 난소암은 백금 저항성 또는 백금 내화성이다. 일부 구현예에서, 상기 폐암은 비-소세포 폐암(NSCLC)이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 자궁내막암이다.
- [0056] 일부 구현예에서, FOLR1 단백질 수준은 FOLR1을 특이적으로 결합하는 2개의 상이한 항체들, 또는 그의 항원 결합 단편들, 또는 폴리펩티드들을 사용하여 측정된다. 일부 구현예에서, FOLR1 단백질을 검출하기 위하여 사용되는 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드는 고형 지지체에 결합된다. 일부 구현예에서, 상기 고형 지지체는 마이크로티터 플레이트이다.
- [0057] 일부 구현예에서, FOLR1 단백질을 검출하기 위하여 사용되는 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드는 검출제를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 검출제는 발색성 검출제, 형광원성 검출제, 효소적 검출제, 또는 전기화학발광 검출제이다. 일부 구현예에서, 상기 검출제는 호스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제(HRP)이다.
- [0058] 일부 구현예에서, 상기 FOLR1 단백질 수준은 효소 결합된 면역흡착검정(ELISA)을 사용하여 측정된다. 일부 구현예에서, 상기 ELISA는 샌드위치(sandwich) ELISA이다.
- [0059] 일부 구현예에서, 상기 활성제는 FOLR1 항체 huMov19를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 huMov19는 세포독성제에 공액된다. 일부 구현예에서, 상기 huMov19는 메이탄시노이드 DM4 및 절단가능한 세포-SPDB 링커(IMGN853)를 추가로 포함하는 항체 메이탄시노이드 공액체로서 투여된다.
- [0060] 본 발명은 또한 진단으로서 사용되기 위하여 본원에 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0061] 본 발명은 또한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제로 FOLR1-매개된 질병 또는 장애를 치료하고/하거나 환자에서의 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정된 용량의 치료 효능을 모니터링하기 위하여 사용되기 위하여, 예를 들어 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서 제공되는, 활성제의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편인, 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0062] 본 발명은 또한 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 제공하며, 이는 다음을 진단하는 방법에 사용되기 위한 것이다: (i) FOLR1-매개된 질병 또는 장애 및/또는 (ii) FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정된 용량으로 FOLR1-매개된 질병 또는 장애의 치료에 대한 대응 및/또는 (iii) FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제의 고정된 용량으로의 치료의 치료적 효능. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드는 그로 인하여 고통받는 환자에서 암 진단을 위한 방법에서 사용되기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 FOLR1의 상승된 수준과 관련된다. 일부 구현예에서, 상기 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드는 검출제를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 검출제는 발색성 검출제, 형광원성 검출제, 효소적 검출제, 또는 전기화학발광 검출제이다.
- [0063] 본 발명은 또한 방법들을 제공하며, 여기서 FOLR-1 매개된 질병은 암이며, 상기 활성제는 IMGN853를 포함하며, 그리고 여기서 상기 분비된 FOLR1 단백질 수준은 적어도 2개의 상기 활성제의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항-FOLR1 항체들을 사용하여, ELISA 검정을 사용하여 측정되며, 여기서 상기 적어도 2개의 항-FOLR1의 각각은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열들을 포함한다: (a) 서열 식별 번호 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15; (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18; (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21; (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24.
- [0064] 본 발명은 또한 방법들을 제공하며, 여기서 FOLR-1 매개된 질병은 암이며, 상기 활성제는 IMGN853를 포함하며, 그리고 여기서 상기 적어도 2개의 상기 활성제의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항-FOLR1 항체들은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열들을 포함한다: (a) 서열 식별 번호 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15; (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18; (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21; (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24; 여기서 상기 FOLR1 단백질은 세포계측법에 의하여 검출된다.

- [0065] 상기 방법들의 일부 구현예에서, 상기 암은 난소암이다. 일부 구현예에서, 상기 난소암은 백금 저항성 또는 백금 내화성이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 NSCLC이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 자궁내막암이다.
- [0066] 본 발명은 또한 활성제들을 제공하며, 여기서 FOLR-1 매개된 질병은 암이며, 상기 활성제는 IMG853를 포함하며, 그리고 여기서 상기 분비된 FOLR1 단백질 수준은 적어도 2개의 상기 활성제의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항-FOLR1 항체들을 사용하여, ELISA 검정을 사용하여 측정되며, 여기서 상기 적어도 2개의 항-FOLR1의 각각은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열들을 포함한다: (a) 서열 식별 번호 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15; (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18; (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21; (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24.
- [0067] 본 발명은 또한 활성제들을 제공하며, 여기서 FOLR-1 매개된 질병은 암이며, 상기 활성제는 IMG853를 포함하며, 그리고 여기서 상기 분비된 FOLR1 단백질 수준은 적어도 2개의 상기 활성제의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항-FOLR1 항체들을 사용하여, ELISA 검정을 사용하여 측정되며, 여기서 상기 적어도 2개의 항-FOLR1의 각각은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열들을 포함한다: (a) 서열 식별 번호 1, 2, 및 3 및 서열 식별 번호: 13, 14, 및 15; (b) 서열 식별 번호: 4, 5, 및 6 및 서열 식별 번호: 16, 17, 및 18; (c) 서열 식별 번호: 7, 8, 및 9 및 서열 식별 번호: 19, 20, 및 21; (d) 서열 식별 번호: 10, 11, 및 12 및 서열 식별 번호: 22, 23, 및 24.
- [0068] 상기 활성제들의 일부 구현예에서, 상기 암은 난소암이다. 일부 구현예에서, 상기 난소암은 백금 저항성 또는 백금 내화성이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 NSCLC이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 자궁내막암이다.
- [0069] 본 발명은 또한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를, 참조 FOLR1 단백질 수준과 비교하여 상승된 분비된 FOLR1 단백질 수준을 갖는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 환자의 FOLR1 단백질 수준은 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 측정되었다.
- [0070] 본 발명은 또한 FOLR1 활성을 조절하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 활성제를, 참조 FOLR1 단백질 수준과 비교하여 순환 종양 세포 상에서 상승된 FOLR1 단백질 수준을 갖는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 환자의 FOLR1 단백질 수준은 본원에 제공된 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드를 사용하여 측정되었다. 일부 구현예에서, 상기 활성제는 IMG853를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 난소암이다. 일부 구현예에서, 상기 난소암은 백금 저항성 또는 백금 내화성이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 NSCLC이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 자궁내막암이다.
- [0071] 본 발명은 또한 *시험관내* 표본에서 FOLR1 단백질 수준을 측정하기 위하여 본원에 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0072] 도 1. FOLR1 분비된 항원 검정의 도식적 묘사.
- 도 2. (A) Mov19 경쟁 ELISA 검정의 도식적 묘사. (B) Mov19를 사용한 샌드위치 ELISA에 의한 muFR1-13의 결합 친화도 측정.
- 도 3. (A) 비-경쟁 FOLR1 결합 에피토프를 측정하기 위한 직접적인 결합 경쟁 ELISA의 도식적 묘사. (B) Mov19를 갖는 항-FOLR1 항체의 결합 간섭에 있어 스크리닝을 위한 경쟁 ELISA 결과의 로그 변형 그래프.
- 도 4. muFR1-13를 갖는 항-FOLR1 항체의 결합 간섭에 있어 스크리닝을 위한 경쟁 ELISA 결과의 로그 변형 그래프.
- 도 5. 샌드위치 ELISA에 의한 항-FOLR1 항체의 결합 친화도.
- 도 6. (A) 유동 세포계측법 및 (B) 샌드위치 ELISA 둘 다에 의한 FR1-13의 결합 친화도.
- 도 7. (A) FOLR2로의 항체 결합 및 (B) 샌드위치 ELISA에 의한 FOLR3를 위한 결과의 로그 변형 그래프.
- 도 8. FR1-9 및 FR1-13을 사용한 분비된 FOLR1 항원의 검출 상에서 FOLR1로의 사전-결합된 염산의 효과.
- 도 9. FOLR1의 존재 및 간섭 검정 단백질의 존재에 있어 인간 복수(ascites) 표본의 분석.

- 도 10. FOLR1의 존재 및 간접 검정 단백질의 존재에 있어 정상인 혼주(pooled) 혈장 표본의 분석.
- 도 11. FOLR1 샌드위치 ELISA를 사용한 인간 난소 환자 혈장 표본의 FOLR1 농도의 측정.
- 도 12. 연속-희석된 정제된 FOLR1-Fc 융합 단백질 기준의 4PL S자형 용량 반응 곡선 적합(curve fit)에 기반한 환자 표본에서의 FOLR1의 양의 보간을 위한 도식적 묘사.
- 도 13. FOLR1 발현 수준의 범위를 갖는 세포주를 사용한 항-FOLR1 항체의 적정. 각각의 세포주 및 희석에 있어, 3가지의 염색이 수행되었다. 평균 형광 강도 (MFI)는 FRA 발현을 위하여 측정되었고, 평균산출되었고, 그리고 표에서 보여진다 (오차는 SEM을 나타낸다).
- 도 14. 항-FOLR1 항체의 최적 희석을 사용한 세포주에서의 FOLR1 발현을 보여주는 막대그래프.
- 도 15. 항-FOLR1 항체 및 IMGN853 사이의 경쟁을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073]

발명의 상세한 설명

[0074]

본 발명은 환자 표본에서 순환 종양 세포 상에서의 분비된 인간 엽산 수용체 1 (FOLR1) 또는 FOLR1을 검출하는 신규한 방법을 제공한다. 상기 FOLR1는 항-FOLR1 활성제 (예컨대 항체 huMov19를 포함하는 활성제)의 FOLR1로의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체들을 사용하여 검출될 수 있다. 항-FOLR1 활성제의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 항체들은 항-FOLR1 활성제로 치료받았던 환자들로부터의 표본에서 FOLR1 (예컨대 분비된 FOLR1 또는 순환 종양 세포 상에서의 FOLR1)를 검출하는데 있어 특히 유용하다. 분비된 FOLR1 또는 순환 종양 세포 상에서의 FOLR1는 FOLR1의 과발현에 의하여 특성화된 암 치료에 대한 반응의 치료 효능, 또는 공산(likelihood)을 모니터링 또는 측정하기 위하여 사용될 수 있다. 분비된 FOLR1 검출 방법, 뿐만 아니라 부가적인 FOLR1 검출 방법 (예컨대, 막 결합 및 세포 연관된 FOLR1 및 CTC 검정을 위한 IHC) 에서 유용한 신규한 FOLR1-결합 폴리펩티드들, 예컨대 항체들, 이 또한 개시된다. 관련된 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드, FOLR1-결합 제제를 포함하는 조성물, 및 FOLR1-결합 제제를 제조하는 방법이 또한 제공된다. 또한, 본원에 제공된 방법은 환자 층화(stratification)를 위하여 사용될 수 있다.

[0075]

I. 정의

[0076]

본 발명의 이해를 촉진하기 위하여, 많은 용어들 및 구들이 아래 정의된다.

[0077]

용어 “인간 엽산 수용체 1”, “FOLR1”, 또는 “엽산 수용체 알파 (FR-α)” 는, 본원에 사용된 바와 같이, 달리 지시되지 않는다면, 임의의 원산(native) 인간 FOLR1를 나타낸다. 그러므로, 이러한 용어들 모두는 본원에 지시된 바와 같이, 단백질 또는 핵산 서열을 나타낼 수 있다. 용어 “FOLR1” 는 “전체-길이”, 비처리된 FOLR1, 뿐만 아니라 세포 내에서의 처리로부터 초래된 FOLR1의 임의의 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한 FOLR1의 자연 발생 변이체, 예컨대 스플라이스 변이체 (FOLR2, FOLR3, 또는 FOLR4를 포괄하는 변이체들 제외), 대립성 변이체 및 이소형을 포괄한다. 본원에 기술된 FOLR1 폴리펩티드는 다양한 공급원으로부터, 예컨대 인간 조직 유형, 또는 또 다른 공급원으로부터 단리될 수 있거나 재조합 또는 합성 방법에 의하여 제조될 수 있다. FOLR1 서열의 예시는 비제한적으로 NCBI 참조 번호 P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1, 및 NP_057936.1를 포함한다. 인간 FOLR1 서열은 아래와 같다:

[0078]

```
MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGGEAQTRIAWARTELLNVCMAKHHKEKPGPEDKLHEQCR
PWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWI
QQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRSTYCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGA
ACQPFHFYFPTPTVLCNEIWITHSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM
SGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS (서열 식별 번호:49).
```

[0079]

용어 “분비된 항원” 및 “분비된 FOLR1” 는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 이러한 용어들은 용해성이 고, 세포 연관되지 않은 FOLR1 단백질을 나타낸다. 일부 구현예에서, 이는 세포의 도메인 (ECD) 및 글리코실포스파티딜 이노시톨 (GPI) 링커를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 분비된 FOLR1는 오직 ECD를 포함한다. FOLR1는 신호 펩티드 (아미노산 1-24), FOLR1 단백질 사슬 (아미노산 25-233 또는 234), 및 절단할 수 있는 프로펩티드 (아미노산 235 내지 257)를 포함한다. 분비된 FOLR1는 아미노산 1 내지 257, 1 내지 233, 1 내지 234, 25 내지 233, 25 내지 234 또는 그의 임의의 단편을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 신호 서열은 절단된다. 다른 구현예에서, 상기 ECD 및 GPI 부분은 막 (예컨대 용해성 지질 뗏목(raft)) 에서 내장될 수 있다. 일 구현예

에서, 상기 분비된 FOLR1는 아미노산 1-233 또는 그의 단편을 포함할 수 있다.

- [0080] 용어 “항체”는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내의 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통하여, 표적, 예컨대 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 또는 앞서 언급한 것의 조합을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 “항체”는 온전한 폴리클로날 항체, 온전한 모노클로날 항체, 항체 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편), 단일 사슬 Fv (scFv) 돌연변이체, 이중특이 항체와 같은 다가특이적 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 및 상기 항체가 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항원 인식 부위를 포함하는 다른 임의의 개질된 면역글로불린 분자를 포괄한다. 항체는 다음 면역글로불린의 5개의 주요 분류 중 임의의 것일 수 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 또는 그의 하위분류 (이소형) (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)이며, 이는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤로 각각 불리는 그들의 중쇄 불변 도메인의 식별정보에 근거한다. 면역글로불린의 상이한 분류는 상이하고 잘 알려진 하부단위 구조 및 3-차원 구성을 갖는다. 항체들은 독소, 방사성 동위원소 등과 같은 다른 분자들에 대해 나출형(naked) 또는 공액형일 수 있다.
- [0081] 일부 구현예에서, 항체는 비-자연발생 항체이다. 일부 구현예들에서, 항체는 천연 성분으로부터 정제된다. 일부 구현예에서, 항체는 재조합 생성된다. 일부 구현예에서, 항체는 하이브리도마(hybridoma)에 의하여 생성된다.
- [0082] “차단” 항체 또는 “길항제” 항체는, FOLR1와 같이, 결합되는 항원의 생물학적 활성을 억제시키거나 또는 감소시키는 것이다. 특정 구현예에서, 차단 항체 또는 길항제 항체는 실질적으로 또는 완전히 상기 항원의 생물학적 활성을 억제한다. 바람직하게, 상기 생물학적 활성은 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 100% 만큼 감소한다.
- [0083] 용어들 “항-FOLR1 항체” 또는 “FOLR1에 결합하는 항체”는 충분한 친화도로 FOLR1과 결합할 수 있어, 이로써 상기 항체가 FOLR1을 표적화하는데 진단성 및/또는 치료성 제제로서 유용한, 항체를 나타낸다. 항-FOLR1 항체의 비연관된, 비-FOLR1 단백질과의 결합의 정도는, 예로 방사성 면역 검정 (RIA)에 의해 측정된 바와 같이, 상기 항체가 항원에 결합하는 정도의 10% 미만이다. 특정 구현예들에서, FOLR1에 결합하는 항체는 분리 계수 (K_d) ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, 또는 ≤ 0.1 nM를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 항-FGFR1 항체는 FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGR4, 또는 염산과 결합하지 않는다.
- [0084] 용어 “항체 단편”은 온전한 항체의 부분을 나타내며, 그리고 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 나타낸다. 항체 단편들의 예시들은 비제한적으로 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편들, 선형 항체들, 단일-사슬 항체들, 및 항체 단편들로부터 형성된 다가특이적 항체들을 포함한다. 본원에 사용된 용어 “모노클로날 항체”는 실질적으로 상동한 항체들의 집단, 즉 적은 양으로 존재할 수 있는 가능한 돌연변이체, 예를 들어 자연발생 돌연변이체, 를 제외하고 상동한 집단을 포함하는 개별 항체들로부터 수득된 항체를 나타낸다. 그러므로, 변형체 “모노클로날”은 상기 항체의 특성이 개별 항체들의 혼합물이 아님을 지시한다. 특정 구현예에서, 그러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 상기 항체-결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택을 포함하는 과정에 의하여 수득되었다. 예를 들어, 상기 선택은 다수의 클론들, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론, 또는 재조합 DNA 클론으로부터 특이 클론의 선택일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은 예를 들어, 상기 표적에 대한 친화도를 개선시키기 위하여, 상기 표적 결합 서열을 인간화하기 위하여, 세포 배양에서의 생성을 개선하기 위하여, 체내 면역원성을 감소시키기 위하여, 다가특이적 항체를 창조하기 위하여, 등등을 위하여 추가로 변경될 수 있으며, 상기 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체 또한 본 발명의 모노클로날 항체인 것이 이해되어야 한다. 전형적으로 상이한 결정인자 (에피토프)에 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제조와는 대조적으로, 모노클로날 항체 제조의 각 모노클로날 항체는 항원 상에서 단일 결정인자에 대해 지시된다. 그들의 특이성에 부가하여, 모노클로날 항체 제조는 전형적으로 다른 면역글로불린에 의하여 비오염된다는 점에 있어 이롭다. 변형체 “모노클로날”은 상기 항체의 특성이 항체들의 실질적으로 상동한 집단으로부터 수득됨을 지시하며, 임의의 특별한 방법에 의하여 상기 항체의 생성이 필요한 것으로 해석되지 않는다.
- [0085] 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 다음을 포함하는 다양한 기술에 의하여 제조될 수 있다: 예를 들어, 하이브리도마 방법 (예를 들어, Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: 실험실 매뉴얼(A Laboratory Manual), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., 다음에서의: 모노클로날 항체 및 T-세포 하이브리도마 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참고), 파지-디스플레이(phage-display) 기술 (예를 들어, Clackson et al., Nature, 352: 624-628

(1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004), 및 인간 면역 글로불린 서열을 인코딩하는 인간 면역글로불린 유전자좌 또는 유전자의 부분 또는 전체를 갖는 동물에서의 인간 또는 인간-유사 항체 생성을 위한 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

[0086] 용어 “인간화 항체”는 최소의 비-인간 (예를 들어, 쥐의) 서열을 함유하는 특이적 면역글로불린 사슬, 키메라 면역글로불린, 또는 그의 단편인 비-인간 (예를 들어, 쥐의) 항체의 유형을 나타낸다. 전형적으로, 인간화 항체는 상보적 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 중쇄 (예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린이다 (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). 일부 예시에서, 인간 면역글로불린의 상기 뼈대구조(architecture) 영역 (FR) 잔기들은 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 중쇄로부터의 항체에서 상응하는 잔기들로 교체된다. 인간화 항체는 항체 특이성, 친화도 및/또는 능력을 개선하고 최적화하기 위해 Fv 뼈대구조 구역에서 및/또는 대체된 비인간 잔기 내에 추가의 잔기의 치환으로 추가로 변형될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비인간 면역글로불린에 상응하는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 구역을 함유하는 적어도 1개, 전형적으로 2개 또는 3개의 가변 도메인 모두를 실질적으로 포함할 것이며, 한편 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 공통 서열의 구역이다. 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인 (Fc)의 적어도 한 부분, 전형적으로 인간 면역글로불린의 부분을 포함할 수 있다. 인간화 항체를 생성시키기 위해 사용되는 방법의 예시들은 미국 특허 5,225,539, 또는 5,639,641에 기재되어 있다. “재표면화(resurfacing)” 항체는 일반적으로 경쇄 및 중쇄 둘다에서 가변 영역 뼈대구조 표면 잔기의 식별 및 그들을 인간 동등체로 교체하는 것을 포함한다. 항체를 재표면화하는 방법은, 예를 들어 Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994) 및 Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996)에 제공되었으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

[0087] 항체의 “가변 영역”은 항체 경쇄의 가변 영역, 또는 항체 중쇄의 가변 영역, 단독 또는 조합을 나타낸다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 전형적으로 초가변 영역으로도 알려진 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의하여 연결된, 4개의 뼈대구조 영역 (FR)으로 구성된다. 각각의 사슬에서의 CDR은 FR에 의해 매우 인접하게 고정되고, 다른 사슬로부터의 CDR에 의해, 항체의 항원 결합 자리의 형성에 기여한다. CDR을 결정하는 적어도 두가지 기술이 있다: (1) 교차 중 서열 가변성에 기초한 접근법(즉, 카바트(Kabat) 등의 문헌. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기초한 접근법(Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). 추가로, CDR을 결정하기 위해 이러한 2가지 접근법의 조합이 본 분야에서 종종 사용된다.

[0088] 카바트 넘버링(Kabat numbering) 시스템은 일반적으로 가변 도메인의 잔기 (대략 경쇄의 1-107개 잔기 및 중쇄의 1-113개 잔기)를 나타낼 때 사용된다 (예를 들어, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)).

[0089] 카바트에서와 같이 넘버링된 아미노산 위치는 다음에서 항체들의 모음(compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인을 위하여 사용되는 넘버링 시스템을 나타낸다: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 상기 실제적인 선형 아미노산 서열은, 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 이의 삽입에 상응하는 더 적은 또는 부가적인 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 이후 단일 아미노산 삽입체 (카바트에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 잔기 82 이후 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 소정의 항체에 있어 “기준” 카바트 넘버링된 서열로 항체의 서열 상동체의 영역에서의 정렬에 의하여 결정될 수 있다. 조시아(Chothia)는 구조적 루프 대신에 상기 위치를 언급한다 Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). 조시아(Chothia) CDR-H1 루프의 말단은 카바트 넘버링 방식을 사용하여 넘버링되었을 때 H32 및 H34 사이에서 변

화한다 (이는 카뱃 넘버링 도식이 상기 삽입을 H35A 및 H35B에서 위치시키며; 35A와 35B가 모두 존재하지 않을 경우, 루프는 32에서 종료되고; 35A만 존재할 경우, 루프는 33에서 종료되며; 35A와 35B가 모두 존재할 경우, 루프는 34에서 종료되기 때문이다). AbM 초가변영역은 카뱃 CDR 및 조시아(Chothia) 구조 루프 사이에서의 절충을 나타내며, 옥스포드 분자(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다.

루프	카뱃(Kabat)	AbM	조시아(Chothia)
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34 (카뱃 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32 (조시아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0090]

[0091]

용어 “인간 항체”는 본 분야에서 알려진 임의의 기술을 사용하여 만들어진 인간에 의하여 생성된 항체에 상응한 아미노산 서열을 갖는 인간 또는 항체에 의하여 생성된 항체를 의미한다. 인간 항체의 정의는 온전한 또는 전체-길이 항체, 그의 단편, 및/또는 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체, 예를 들어, 예컨대 뮤린의 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함한다.

[0092]

용어 “키메라 항체”는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 2개 또는 그 이상의 종으로부터 유래된 항체를 나타낸다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 둘다의 가변 영역은 원하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 포유 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 등) 중 하나의 종으로부터 유래된 항체들의 가변 영역과 상응하며, 한편 상기 불변 영역은 그러한 종에서 면역 반응의 야기를 회피하기 위하여 다른 (보통 인간)으로부터 유래된 항체에서의 서열과 상동하다.

[0093]

용어 “에피토프” 또는 “항원성 결정인자”는 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 인식될 수 있고 특정 항체에 의하여 특이적으로 결합되는 항원의 부분을 나타낸다. 항원이 폴리펩티드일 때, 에피토프는 단백질의 3차 접힘(folding)에 의하여 병치된 인접한 아미노산 및 비인접한 아미노산 둘다로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 통상적으로 단백질 변성 시 보유되고, 한편 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 통상적으로 단백질 변성 시 소실된다. 에피토프는 독특한 공간 구성에서 통상적으로 적어도 3개, 더 일반적으로, 적어도 5개 또는 8-10개의 아미노산을 포함한다.

[0094]

“결합 친화도”는 일반적으로 분자(예를 들면, 항체)의 단일 결합 자리와 이의 결합 파트너(예를 들면, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 의미한다. 달리 표시되지 않은 한, 본원에 기재된 “결합 친화도”는 결합 쌍(예를 들면, 항체 및 항원)의 구성원 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 의미한다. 분자 X의 이의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(Kd)로 표시될 수 있다. 본원에 기재된 방법을 비롯하여 본 분야에 알려진 일반 방법에 의해 친화도를 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원에 천천히 결합하고 용이하게 분해되는 경향이 있고, 고친화도 항체는 일반적으로 항원에 신속히 결합하고 더 오래 결합된 채 있는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법은 본 분야에 알려져 있고, 이의 임의의 것은 본 발명의 목적을 위하여 사용될 수 있다. 구체적인 예시의 구현에 본원에 기술된다.

[0095]

“또는 더 양호한”은 본원에서 결합 친화도를 언급하기 위하여 사용될 때 분자 및 이의 결합 파트너 사이의 보다 강한 결합을 나타낸다. “또는 더 양호한”은 본원에서 사용될 때 보다 작은 수치의 Kd 값에 의하여 나타낸 보다 강한 결합을 나타낸다. 예를 들어, “0.6 nM 또는 그보다 양호한” 항원 결합 친화도를 갖는 항체의 경우, 상기 항체의 항원에 대한 친화도는 <0.6 nM, 즉, 0.59 nM, 0.58 nM, 0.57 nM 등 또는 0.6 nM 미만의 임의의 값이다. 일 구현예에서, Kd에 의하여 측정된 바와 같은 항체의 친화도는 약 10^{-3} 내지 약 10^{-12} M 사이, 약 10^{-6} 내지 약 10^{-11} M 사이, 약 10^{-6} 내지 약 10^{-10} M 사이, 약 10^{-6} 내지 약 10^{-9} M 사이, 약 10^{-6} 내지 약 10^{-8} M 사이, 또는 약 10^{-6} 내지 약 10^{-7} M 사이일 것이다.

[0096]

본원에 사용된 구 “실질적으로 유사한” 또는 “실질적으로 상동한”은 2개의 수치 (일반적으로 본 발명의 항체와 연관된 하나와 참조/비교자 항체와 연관된 다른 것) 사이의 유사성의 충분히 높은 정도를 나타내며, 이로써 본 분야의 숙련가는 두 수치 사이의 차이가 상기 수치에 의하여 측정된 생물학적 문맥 (예를 들어, Kd 값) 내에서의 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 매우 작거나 또는 없는 것으로 고려할 것이다. 상기 두 수치 사이의

차이점은 참조/비교자 항체에 있어서의 수치의 기능으로서 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 또는 약 10% 미만이다.

[0097] “단리된” 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 자연에서 발견되지 않는 유형인 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물이다. 단리된 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 그들이 더 이상 자연에서 발견되지 않는 유형인 정도로 정제되었던 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 단리된 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 실질적으로 순수(pure)하다.

[0098] 본원에서 사용된 “실질적으로 순수한”은 적어도 50% 순수한 (즉, 오염으로부터 자유로운), 적어도 90% 순수한, 적어도 95% 순수한, 적어도 98% 순수한, 또는 적어도 99% 순수한 물질을 나타낸다.

[0099] 용어 FOLR1의 “증가된 발현”은 참조 표본, 참조 FOLR1 수준, 또는 동일 대상체로부터 검출된 이전의 FOLR1과 비교하여 증가된 수준의 FOLR1 발현을 함유하는 표본을 나타낸다. 그러므로, 예를 들어, 환자 표본에서 “증가된 FOLR1 단백질 수준”은 비-암성 참조 표본에서의 FOLR1 단백질 수준보다 높은 FOLR1 단백질 수준을 가질 수 있다. 환자 표본에서 “증가된 FOLR1 단백질 수준”은 또한, 예를 들어 암성 참조 표본에서의 FOLR1 단백질 수준과 동등한 FOLR1 단백질 수준을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, “증가된 FOLR1 단백질 수준”이 검출될 때, 여기서 환자의 FOLR1 단백질 수준은 동일한 대상체로부터 검출된 이전의 FOLR1 수준보다 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 50% 크다. 순환 종양 세포 검정에서, “증가된 FOLR1 단백질 수준”은 FOLR1이 세포 상에서 높은 수준으로 검출되는 세포 또는 표본보다 더 큰 % 상에서 FOLR1이 검출되는 표본을 나타낼 수 있다. 그러므로, 일부 구현예에서, “증가된 FOLR1 단백질 수준”이 CTC 검정에서 검출될 때, 여기서 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 50% 더 많은 세포들이 FOLR1 발현을 보여준다. 부가적으로, 일부 구현예에서, “증가된 FOLR1 단백질 수준”이 CTC 검정에서 검출될 때, 여기서 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 50% 더 많은 FOLR1이 세포들 상에서 검출된다.

[0100] “참조 표본”은 시험 표본으로부터 본 발명의 방법으로 수득된 결과를 연관 및 비교하는데 사용될 수 있다. 참조 표본은 세포 (예를 들어, 세포주, 세포 펠렛(pellet)), 체액, 또는 조직일 수 있다. “참조 표본”에서의 FOLR1 수준은 FOLR1의 절대량 또는 상대량, 양의 범위, 최소 및/또는 최대 양, 평균량, 및/또는 중앙치(median)의 양일 수 있다. “참조 표본”은 또한 시험 표본과 비교되는 FOLR1 발현의 기준선으로서 작용할 수 있다. “참조 표본”은 상동한 환자로부터의 이전 표본 또는 기준선 표본, 정상 참조, 또는 관련된 환자 집단으로부터의 참조를 포함할 수 있다. 일반적으로, FOLR1 수준은 표준 곡선에서의 값으로 표현된다. 표준 곡선은 표본에서 FOLR1의 농도를 측정하기 위하여 검정 데이터를 나타내는 양적 방법이다. 일 구현예에서, 참조 표본은 정제된 FOLR1 또는 FOLR1-Fc를 포함하는 항원 표준이다. 본 발명의 진단 방법은 시험 표본에서의 FOLR1의 발현 수준 사이의 비교 및 “참조값” 또는 “참조 수준”을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 참조값은 참조 표본에서의 FOLR1 발현 수준이다. 참조값은 설정된 값일 수 있고, 시험 표본과 병행하여 시험된 참조 표본 (예를 들어, 대조군 생물학적 표본)으로부터 또한 측정될 수 있다. 참조 값은 단일 컷오프(cut-off) 값, 예컨대 중앙치 또는 평균, 또는 값의 범위, 예컨대 신뢰구간일 수 있다. 참조 값은 개체의 다양한 하위그룹들, 예컨대 암에 취약한 개체들, 조기 또는 말기 단계 암을 갖는 개체들, 암 치료를 겪는 남성 및/또는 여성 개체들을 위하여 확립될 수 있다. 정상 참조 표본 또는 값, 및 양성 참조 표본 또는 값의 예시들은 본원에 기술된다.

[0101] 본원에서 용어 “1차 항체”는 표본에서 표적 단백질 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 나타낸다. 1차 항체는 일반적으로 ELISA 검정에 사용되는 제1 항체이다. 일 구현예에서, 1차 항체는 IHC 절차에서 사용되는 유일한 항체이다. 본원에서 용어 “2차 항체”는 가능할 경우 1차 항체에 특이적으로 결합하여, 이로써 상기 1차 항체 및 후속적인 시약 사이에서 가교를 형성하는 항체를 나타낸다. 2차 항체는 일반적으로 면역조직화학 절차에서 사용되는 제2 항체이다.

[0102] 본원에서 사용된 바와 같이, “면역조직화학”은 예를 들어 세포 또는 조직을 분석하기 위하여 사용되는 조직화학적 및 면역학적 방법을 나타낸다. 그러므로, 용어 “면역조직화학”, “면역세포화학” 및 “면역화학”은 상호교환가능하게 사용된다.

[0103] 본 발명의 “표본” 또는 “생물학적 표본”은 생물학적 기원의 것이며, 특이적 구현예에서, 예컨대 진핵 생물로부터의 것이다. 바람직한 구현예에서, 상기 표본인 인간 표본이나, 동물 표본 또한 본 발명의 실시에서 사용될 수 있다. 본 발명에 사용되는 표본의 비제한적 공급원은 예를 들어, 고형 조직, 생검 흡인물, 복수액, 유체 추출물, 혈액, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부의 외부 구획, 호흡기, 장, 및 비뇨생식기 관, 눈물, 타액,

유액, 종양, 기관, 세포 배양물, 및/또는 세포 배양 구성성분들을 포함한다. 본 발명은 복수액과 같은 체액을 일반적으로 포함하는, 가능한 물질의 양이 작을 경우의, 암 표본에 특히 유용하다. 상기 방법은 FOLR1의 발현 또는 표본의 상태를 관찰하기 위하여 사용될 수 있으며, 비제한적으로 세포 또는 조직의 상이한 유형을 비교하는 것, 상이한 진행성 단계를 비교하는 것, 및 질병 또는 이상현상의 존재 및/또는 유형을 검출 또는 측정하는 것을 포함한다.

[0104] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “포획 시약”은 표본에서 표적 분자를 결합 및 포획이 가능하여, 이로써 적절한 조건 하에서 상기 포획 시약-표적 분자 복합체는 상기 표본의 나머지에서 분리될 수 있는 시약을 나타낸다. 일 구현예에서, 상기 포획 시약은 고정된다. 일 구현예에서, 샌드위치 면역 검정 상의 상기 포획 시약은 항체 또는 표적 항원에 대한 상이한 항체들의 혼합물이다.

[0105] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “검출가능한 항체”는 직접적으로 검출 수단을 이용하여 증폭된 표지를 통하여 또는 간접적으로 예를 들어 표지된 다른 항체를 통하여 검출될 수 있는 항체를 나타낸다. 직접적인 표지를 위하여, 상기 항체는 전형적으로 몇몇 수단에 의하여 검출 가능한 모이어티에 공액된다. 일 구현예에서, 검출가능한 항체는 비오티닐화된(biotinylated) 항체이다.

[0106] 용어 “표지”는 본원에서 사용될 때 “표지된” 항체를 생성하도록 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된 탈착형 화합물 또는 조성물을 의미한다. 상기 표지는 그 자체로 검출가능할 수 있으며 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에, 검출 가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉진할 수 있다.

[0107] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “검출 수단”은 본원의 ELISA에서 검출가능한 항체의 존재를 검출하는데 사용되는 모이어티 또는 기술을 나타내고, 마이크로티터 플레이트 상에서 포획되는 표지와 같은 고정된 표지를 증폭시키는 검출제를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 검출 수단은 아비딘, 스트렙타비딘과 같은 형광측정 검출제이다.

[0108] 보통 “샌드위치 ELISA”는 다음 단계를 채용한다: (1) 마이크로티터 플레이트는 포획 항체로 코팅된다; (2) 표본이 부가되고, 존재하는 임의의 항원은 포획 항체에 결합한다; (3) 검출 항체가 부가되고, 항원에 결합한다; (4) 효소-결합된 2차 항체가 부가되고, 검출 항체에 결합한다; 및 (5) 기질이 부가되고 효소에 의해 검출 가능한 형태로 변환된다.

[0109] “연관짓다” 또는 “연관짓는”은 임의의 방식에서, 제1 분석의 수행 및/또는 결과를 제2 분석의 수행 및/또는 결과로 비교하는 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 제2 분석을 수행함에 있어 제1 분석의 결과를 사용할 수 있고/있거나 제1 분석의 결과를 사용하여 제2 분석이 수행되어야만 하는지의 여부를 결정할 수 있으며, 및/또는 제2 분석의 결과로 제1 분석의 결과를 비교할 수 있다. 일 구현예에서, FOLR의 증가된 발현은 FOLR1-표적화 항암 요법의 효과의 증가된 공산(likelihood)과 연관지을 수 있다.

[0110] “암” 및 “암성(cancerous)”은 조절되지 않은 세포 성장을 전형적으로 특징으로 하는 포유동물에서 생리적 상태를 의미하거나 기술한다. 암의 예시는 비제한적으로: 암종, 림프종, 아세포종, 및 백혈병을 포함한다. 그러한 암의 더욱 특별한 예시는 자궁내막, 간엽세포, 또는 상피 기원의 암, 예컨대 폐암 (예를 들어 편평상피 세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 중피종, 및 폐의 편평상피 암종), 복막암 (예를 들어, 1차 복막), 간세포 암, 소화관 암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 대장암, 결장암, 자궁내막의 (예를 들어 자궁내막 선암종) 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 뇌암 (예컨대, 교모세포종, 맥락막암의 종양) 및 두경부암의 다양한 유형, 및 또한 혈관 및 나팔관의 종양들을 포함한다. 암은 또한 상승된 FOLR1 발현 수준을 갖는 세포들을 함유하는 암을 포괄한다. 그러한 FOLR1-상승된 암은 비제한적으로 난소, 비-소세포 폐암, 자궁, 자궁내막, 췌장, 신장(renal), 폐, 및 유방암을 포함한다.

[0111] “종양” 및 “신생세포(neoplasm)”는 전-암적(pre-cancerous) 병변을 포함하는 양성 (비암성) 또는 악성 (암성)인, 과도한 세포 성장 또는 증식으로부터 초래된 임의의 조직 덩어리를 나타낸다.

[0112] 용어 “암 세포”, “종양 세포” 및 문법상 등가물은 종양 세포 집단 대부분을 포함하는 비종양형성 세포 및 종양형성 줄기 세포(암 줄기 세포) 둘 다를 포함하는 종양 또는 전암성 병변 유래의 전체 세포 집단을 의미한다. 본원에서 사용되는 용어 “종양 세포”는 신생시키고 분화시키는 능력이 결여된 그러한 종양 세포를 단독으로 언급할 때 암 줄기 세포로부터 이 종양 세포를 구별하기 위해 용어 “비-종양형성”으로 변형될 것이다.

[0113] 용어 “대상체”는 특정한 치료의 수용자인 인간, 비인간 영장류, 설치류 등(이들로 제한되지는 않음)을 비롯한

임의의 동물(예를 들면, 포유동물)을 의미한다. 통상적으로, 용어 "대상체" 및 "환자"는 인간 대상체를 언급할 때 본원에서 상호 교환되어 사용된다.

- [0114] 용어 "약제학적 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하는 형태로 있고 제제가 투여되는 대상체에게 허용되지 않게 독성인 추가의 성분을 포함하지 않는 제제를 의미한다. 그러한 제제는 무균성일 수 있다.
- [0115] 본원에 개시된 "유효량"의 항체는 구체적으로 설명된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "유효량"은 언급된 방식과 비교하여 경험상 및 일상적 방식으로 결정할 수 있다.
- [0116] 용어 "치료적 유효량" 또는 "고정된 용량"은 대상 또는 포유동물에서 질병 또는 장애를 "치료"하는데 효과적인 항체 또는 다른 약물의 양을 나타낸다. 암의 경우, 약물의 치료적 유효량은 암 세포의 수를 감소시키고; 종양 크기를 감소시키고; 말초 기관 내로의 암 세포 침윤을 억제하고 (즉, 어느 정도로 감소시키거나, 특정 구현예에서 정지시키고); 종양 전이를 억제하고 (즉, 어느 정도로 감소시키거나, 특정 구현예에서 정지시키고); 어느 정도까지 종양 성장을 억제하고; 암과 연관된 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 완화하고; 및/또는 양호한 반응, 예컨대 증가된 진행-유리 생존 (PFS), 질병-유리 생존 (DFS), 또는 전체 생존 (OS), 완전 반응 (CR), 부분 반응 (PR), 또는, 몇몇 경우에서, 변화없는(stable) 질병 (SD), 진행성 질병의 감소 (PD), 감소된 진행 시간 (TTP), 난소암의 경우에서 CA125에서의 감소, 또는 그의 임의의 조합을 초래할 수 있다. "치료"의 본원의 정의를 참고하라. 상기 약물이 성장을 막고/막거나 암 세포를 사멸할 수 있는 정도까지, 이는 세포정지성 및/또는 세포독성일 수 있다. "예방학적 유효량"은 필요한 용량에서 몇 시간 동안 원하는 예방학적 결과를 성취하기 위해 효과적인 양을 의미한다. 전형적으로, 그러나 비필수적으로, 초기 질환 병기 전에 또는 이 병기에서 대상체에서 예방학적 용량을 사용할 수 있으므로, 반드시 그런 것은 아니지만 통상적으로 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적다.
- [0117] PFS, DFS, 및 OS는 국립 암 연구소(National Cancer Institute) 및 미국 식품의약국(the U.S. Food and Drug Administration)에 의하여 설정된 표준에 의하여 신규한 약물의 승인을 위하여 측정될 수 있다. Johnson et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411를 참고하라.
- [0118] "진행 유리 생존" (PFS)는 질병 진행 또는 사망까지의 시작으로부터의 시간을 나타낸다. PFS는 일반적으로 고형 종양 (RECIST) 1.1 표준에서 카폴란-마이어 방법 및 반응 평가 기준을 사용하여 측정된다. 일반적으로, 진행 유리 생존은 환자가 암의 악화 없이 생존할 경우의 상황을 나타낸다.
- [0119] "종양 진행 시간" (TTP)는 질병 진행까지의 시작으로부터의 시간으로 정의된다. TTP는 일반적으로 RECIST 1.1 기준을 사용하여 측정된다.
- [0120] "완전 반응" 또는 "완전 관해기(remission)" 또는 "CR"은 치료에 반응한 종양 또는 암의 모든 신호의 소멸을 지시한다. 이는 언제나 상기 암이 치료되었다는 것을 의미하지 않는다.
- [0121] "부분 반응" 또는 "PR"은 하나 또는 그 이상의 종양 또는 병변의 크기 또는 부피에서의, 또는 치료에 반응하여 체내 암의 정도에서의 감소를 나타낸다.
- [0122] "변화없는(stable) 질병"은 진행 또는 재발 없는 질병을 나타낸다. 변화없는 질병에서는 부분 반응의 자격으로 충분한 종양 수축 및 진행성 질병 자격으로 충분한 종양 증가가 둘 다 없다.
- [0123] "진행성 질병"은 하나 또는 그 이상의 신규한 병변 또는 종양의 발생 및/또는 기존 비-종양 병변의 명백한 진행을 나타낸다. 진행성 질병은 또한 치료가 종양 질량의 증가 또는 확산으로 인하여 시작되었으므로 20% 초과 종양 성장을 나타낼 수 있다.
- [0124] "질병 유리 생존" (DFS)는 환자가 질병의 유리상태에 남아있는 치료 동안 및 후에 시간의 길이를 나타낸다.
- [0125] "전체 생존" (OS)는 환자 등록으로부터 사망 또는 알려진 마지막 생존 일자까지의 시간의 길이를 나타낸다. OS는 순수(naive) 또는 비처리된 개체 또는 환자와 비교하여 기대 수명에서의 연장을 포함한다. 전체 생존은 환자가 치료 또는 진단 시간으로부터 정의된 시간 기간, 예컨대 1년, 5년, 등등 동안 생존 상태에 남아있을 경우의 상황을 나타낸다.
- [0126] "CA125 수준의 감소"는 (부인암학회(Gynecologic Cancer Intergroup) (GCI) 가이드라인에 따라 평가될 수 있다. 예를 들어, CA125 수준은 기준선 CA125 수준을 확립하기 위하여 치료전 측정될 수 있다. CA125 수준은 치료 도중 또는 후에 1회 또는 그 이상으로 측정될 수 있고, 기준선 수준과 비교하여 시간에 따른 CA125 수준의 감소는 CA125 수준의 감소로 고려된다.

- [0127] "치료하는 것", 또는 "치료", 또는 "치료하는" 또는 "완화하는 것" 또는 "완화하는" 과 같은 용어는 1) 진단된 병리학적 상태 또는 장애의 진행을 치료, 완화, 감소, 및/또는 정지하는 치료적 수단 및 2) 표적화된 병리학적 상태 또는 장애의 진행을 방지 및/또는 완화하는 예방학적 또는 방지적 수단 둘 다를 포함한다. 따라서, 치료를 필요로 하는 사람은 이미 질환을 앓고 있는 사람; 질환을 앓기 쉬운 사람; 및 질환을 예방하고자 하는 사람을 포함한다. 특정 구현예에서, 대상체는 본 발명의 방법에 따라, 환자가 다음 중 하나 이상을 보여줄 경우, 암에 대해 성공적으로 "치료"된다: 악액질의 감소, 생존 시간의 증가, 종양 진행까지의 시간 연장, 종양 질량 감소, 종양 부하 감소, 및/또는 종양 전이, 종양 재발까지의 시간 연장, 완전 반응, 부분 반응, 변화없는 질병, 진행성 질병, 진행 유리 생존 (PFS), 전체 생존 (OS), 이는 각각 국립 암 연구소(National Cancer Institute) 및 미국 식품의약국(the U.S. Food and Drug Administration)에 의하여 설정된 표준에 의하여 신규한 약물의 승인을 위하여 측정된다. Johnson et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411를 참고하라.
- [0128] 본원에서 상호교환가능하게 사용된 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머를 나타내며, DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 뉴클레오티드는 디옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 개질된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라아제에 의하여 폴리머로 포함될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 메틸화된 뉴클레오티드와 같은 개질된 뉴클레오티드 및 그들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재한다면, 뉴클레오티드 구조에 대한 개질은 중합체의 조합 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의하여 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 반응 후에 예를 들어 표지 성분으로의 공액에 의하여 추가로 개질될 수 있다. 개질의 다른 유형들은, 예를 들어, "캡(cap)", 하나 또는 그 이상의 자연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 예컨대 비하전된 결합 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스터, 포스포아미데이트, 카바메이트 등)을 갖는 및 하전된 결합 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포디티오에이트 등)을 갖는 것들과 같은 뉴클레오티드간 개질, 측쇄(pendant) 모이어티를 함유하는, 예를 들어 단백질들 (예를 들어 뉴클라아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, pty-L-리신, 등)과 같은 것을, 삽입체를 갖는 것들 (예를 들어, 아크리딘, 소랄렌 등), 킬레이터를 갖는 것들 (예를 들어 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등), 알킬화제를 함유하는 것들, 개질된 결합을 갖는 것들 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등), 뿐만 아니라 폴리뉴클레오티드(들)의 비개질된 형태를 포함한다. 더욱이, 당에 보통 존재하는 히드록실 기의 임의의 것은 예를 들어 포스포네이트 기, 포스페이트 기로 교체될 수 있으며, 표준 보호기에 의하여 보호되거나, 또는 부가적인 뉴클레오티드들로 부가적인 결합을 제조하기 위하여 활성화될 수 있으며, 또는 고정 지지체로 공액될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 1 내지 20의 탄소 원자들의 아민 또는 유기 캐핑(capping) 기 모이어티로 포스포릴화 또는 치환될 수 있다. 다른 히드록실 또한 표준 보호기로 유도될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 리보스 또는 디옥시리보스 당이 유사 형태를 포함할 수 있으며, 이는 본 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-O-플루오로, 또는 2'-아지도-리보스, 탄소고리 당 유사체, 알파-아노머 당, 아라비노스, 자일로스 또는 릭소오스와 같은 에피머 당, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로오스, 비고리 유사체 및 메틸 리보시드와 같은 무염기 뉴클레오티드 유사체를 함유한다. 하나 또는 그 이상의 포스포디에스터 결합은 대안적인 결합기로 교체될 수 있다. 이러한 대안적인 결합기는, 비제한적으로 구현예들을 포함하며, 여기서 포스페이트는 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO or CH₂ ("폼아세탈(formacetal)")로 교체될 수 있으며, 여기서 각 R 또는 R'은 독립적으로 H 또는 임의로 에터(--O--) 결합, 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐, 또는 아랄딜을 함유하는 치환된 또는 비치환된 알킬 (1-20 C)이다. 폴리뉴클레오티드에서 모든 결합이 상동할 필요는 없다. 선행하는 기재사항은 본원에 언급된, RNA 및 DNA를 포함하는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.
- [0129] 용어 "백터"는 숙주 세포에서 관련된 하나 또는 그 이상의 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달 및 발현할 수 있는 작제물을 의미한다. 백터의 예시들은 비제한적으로, 바이러스 백터, 나출형(naked) DNA 또는 RNA 발현 백터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 백터, 양이온성 축합 제제와 연관된 DNA 또는 RNA 발현 백터, 리포솜에서 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 백터, 및 생산자세포와 같은 진핵 세포를 포함한다.
- [0130] 용어 "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 본원에서 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 나타내기 위해 상호교환가능하게 사용된다. 상기 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 이는 개질된 아미노산을 포함할 수 있고, 이는 비-아미노산에 의하여 중단될 수 있다. 상기 용어들은 또한 자연적으로, 또는 개입에 의하여 개질된 아미노산 중합체; 예를 들어 이황화결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 개질, 예컨대 표지 구성성분으로의 공액을 포괄할 수 있다. 상기 정의 내에 또한 포함된 것은, 예를 들어 (예를 들어, 비천대 아미노산 등을 포함하는) 아미노산의 하나 또는 그 이상의 유사체를 함유하는 폴리펩티드, 뿐만 아니라 본 분야에 알려진 다른 변형들이다. 본 발명의 폴리펩티드가 항체를 기반으로 하고 있으므로, 특정

구현예에서, 상기 폴리펩티드는 단일 사슬 또는 연합 사슬로서 발생할 수 있다는 것이 이해된다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드, 펩티드, 또는 단백질은 비-자연적으로 발생한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드, 펩티드, 또는 단백질은 다른 자연적으로 발생한 구성성분으로부터 정제된다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드, 펩티드, 또는 단백질은 재조합으로 생성된다.

[0131] 두개 또는 그 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 문맥에서, 용어 “상동한” 또는 퍼센트(%) “상동성”은, 최대 상응성을 위하여 비교 및 정렬(필요하다면 갭(gap)을 도입하여) 시에, 상동한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기들의 특정 %를 갖거나 또는 상동한 2개 또는 그 이상의 서열 또는 하부서열을 나누내며, 서열 상동성의 일부로서 임의의 보존성 치환들은 고려하지 않는다. % 상동성은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 사용하여, 또는 외관 검사에 의하여 측정될 수 있다. 다양한 알고리즘 및 소프트웨어는 본 분야에 잘 알려져 있으며, 이는 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 정렬을 수득하기 위하여 사용될 수 있다. 서열 정렬 알고리즘의 그러한 하나의 비제한적인 예시는 Karlin et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268에 기술되어 있으며, Karlin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877에서 변형된 바 있으며, NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 포함된다 (Altschul et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). 특정 구현예에서, 갭핑된 (Gapped) BLAST는 Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) 또는 Megalign (DNASTAR)은 서열 정렬을 위하여 사용될 수 있는 부가적인 공개적으로 이용가능한 소프트웨어 프로그램이다. 특정 구현예에서, 2개의 뉴클레오티드 서열들 사이의 % 상동성은 GCG 소프트웨어에서의 GAP 프로그램을 사용하여 (예를 들어 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70, 또는 90의 갭 중량, 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 사용하여) 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 니들만 및 운치(Needleman and Wunsch) (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970))의 알고리즘을 포함하는 GCG 소프트웨어 패키지에서의 GAP 프로그램은 2개의 아미노산 서열 사이의 % 상동성을 측정하기 위하여 사용될 수 있다 (예를 들어, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량, 및 1, 2, 3, 4, 5의 길이 중량을 사용하여). 대안적으로, 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열들 사이의 % 상동성은 마이어 및 밀러(Myers and Miller)의 알고리즘을 사용하여 측정될 수 있다 (CABIOS, 4:11-17 (1989)). 예를 들어, % 상동성은 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)를 사용하여, 그리고 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티, 및 4의 갭 패널티를 갖는 PAM120를 사용하여 측정될 수 있다. 특정한 정렬 소프트웨어에 의한 최대한의 정렬을 위한 적절한 파라미터는 본 분야의 숙련가에 의하여 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 정렬 소프트웨어의 디폴트 파라미터가 사용된다. 특정 구현예에서, 제1 아미노산 서열의 제2 아미노산 서열에 대한 % 상동성 “X”는 $100 \times (Y/Z)$ 로 산출되며, 여기서 Y는 상기 제1 및 제2 서열들의 정렬에서 상동한 매치로서 스코어링되는 아미노산 잔기의 수이며 (외관 검사 또는 특정 서열 정렬 프로그램에 의하여 정렬된 바와 같이), 그리고 Z는 상기 제2 서열에서의 잔기의 총 수이다. 제1 서열의 길이가 제2 서열의 길이보다 길 경우, 상기 제2 서열에 대한 제1 서열의 % 상동성은 상기 제2 서열의 상기 제1 서열에 대한 % 상동성보다 길 것이다.

[0132] 비제한적인 예시로서, 임의의 특별한 폴리뉴클레오티드가 참조 서열에 대해 특정 % 서열 상동성 (예를 들어, 적어도 80% 상동한, 적어도 85% 상동한, 적어도 90% 상동한, 및 일부 구현예에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동한)을 갖는지의 여부는, 특정 구현예에서, 베스트핏(Bestfit) 프로그램을 사용하여 측정될 수 있다 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). 베스트핏(Bestfit) 프로그램은 2개의 서열 사이에서 최적의 상동 세그먼트를 찾기 위하여 스미스 및 워터만(Smith and Waterman), *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), 의 국지적 상동성 알고리즘을 사용한다. 베스트핏 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 사용하여 특정 서열이, 예를 들어, 본 발명에 따른 참조 서열과 95% 상동한지를 측정할 시에, 파라미터는 상동성의 %가 참조 뉴클레오티드 서열의 전체 길이를 초과하여 산출되도록, 그리고 참조 서열에서의 뉴클레오티드의 총 숫자의 5% 이하의 상동성 갭이 허용되도록 설정된다.

[0133] 일부 구현예에서, 본 발명의 2개의 핵산 또는 폴리펩티드는 실질적으로 상동하며, 최대 상응성을 위하여 비교되고 정렬될 때, 서열 비교 알고리즘을 사용하여 또는 외관 관찰에 의하여 측정된 바와 같이, 이는 그들이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 및 일부 구현예에서 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 상동성을 갖는다는 것을 의미한다. 특정 구현예에서, 상동성은 길이가 약 10, 약 20, 약 40-60 잔기 또는 또는 그들 사이의 임의의 적분치인 서열의 영역 상에 존재하거나, 또는 60-80 잔기들, 적어도 약 90-100 잔기들보다 긴 영역 상에서 존재하며, 또는 상기 서열들은 예를 들면 뉴클레오티드 서열의 코딩 영역과 같이, 실질적으로 비교된 서열들의 전체 길이 상에서, 실질적으로 상동하다.

- [0134] “보존적 아미노산 치환”은 하나의 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산 잔기로 교체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계통군은 본 분야에 정의되어 있으며, 이는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄 (예를 들어, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 예를 들어, 페닐알라닌의 티로신으로의 치환은 보존적 치환이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 항체의 서열에서의 보존적 치환은 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩티드 또는 항체의 항원(들), 즉 폴리펩티드 또는 항체가 결합하는 FOLR1로의 결합을 폐지(abrogate)하지 않는다. 항원-결합을 제거하지 않는 뉴클레오티드 및 아미노산 보존적 치환을 식별하는 방법은 본 분야에 잘 알려져 있다 (예를 들어, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); 및 Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997) 참고).
- [0135] 명세서 및 청구항들에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "하나" ("a", "an") 및 "당해" ("the")는 문맥에 명확히 지시되지 않으면, 복수의 언급을 포함한다.
- [0136] 용어 “포함하는”으로 본원에 기술된 구현예들은, 달리 "로 구성된" 및/또는 “필수적으로 구성된”의 측면에서 기술된 유사한 구현예들이 또한 제공되는 것으로 이해된다.
- [0137] 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 구문에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A" 및 "B" 둘 다를 의미하는 것으로 의도된다. 유사하게, "A, B, 및/또는 C"와 같은 구에서 사용된 바와 같은 용어 "및/또는"은 다음 구현예의 각각을 포괄하는 것으로 의도된다: 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).
- [0138] II. 분비된 항원 검정
- [0139] 항체 메이탄시노이드 공액체 (AMC), IMG853는 메이탄시노이드 DM4 (N(2')-테아세틸-N2'-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소헨틸)-메이탄신)에 공액된, 절단가능한 설포-SPDB (N-숙시미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트) 링커를 통하여 부착된, FOLR1-결합 모노클로날 항체, huMov19 (M9346A)를 포함한다. IMG853 및 huMov19은 동시 미국 출원 공보 번호 2012/0009181에서 기술되며, 이것은 본원에 참조로 그 전체가 편입되어 있다. FOLR1 항원은 Mov19에 의하여 인식된 단일 에피토프를 함유한다. 일 구현예에서, 상기 huMov19는 다음 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함한다:
- [0140] 서열 식별 번호:46: huMov19 vHC
- [0141] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDIFY
NQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTITVTVSS
- [0142] 서열 식별 번호:47 - huMov19 vLCv1.00
- [0143] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGPRLLIYRASNLEAGV
PDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGTKEIKR
- [0144] 서열 식별 번호:48 - huMov19 vLCv1.60
- [0145] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGPRLLIYRASNLEAGV
PDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGTKEIKR.
- [0146] 일부 구현예에서, 항-FOLR1 활성제, 예컨대 IMG853는 FOLR1 활성을 조절하며, 예를 들어 FOLR1 단백질의 활성을 감소시킨다.
- [0147] IMG853는 현재 FOLR1 양성 난소암, 비소세포 폐암, 자궁내막양(endometrioid) 암, 신장암, 및 다른 상피 악성 종양들을 포함하는 다양한 치료적 지시들에 대한 임상적 진행 중에 있다. 난소암은 가장 큰 FOLR1 침투도를 나타내고, IMG853로의 치료를 위한 주요 지시들로 고려된다 (Antony AC. *Ann Rev Nutr* 16:501-1 (1996); Yuan Y et al. *Hum Pathol* 40(10):1453-1460 (2009)).
- [0148] 환자 혈장 표본 (분비된 표본)에서 순환하는 항원의 수준을 측정하는 것은 AMC 치료에 반응할 가능성이 더욱 큰 환자 집단을 식별하는데 도움을 줄 수 있다. 분비된 항원의 높은 수준은 치료성 항체의 약동학에 현저히 영향을

주는 것으로 보고되어 왔다 (Tolcher A. et al. 20th Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics; October 21-24, 2008; Geneva, Switzerland: EORTC-NCI-AACR, p163, #514; Baselga J, et al. J Clin Oncol 14:737-744 (1996)). 환자 혈장 표본으로부터의 분비된 항원 수준은 항원 표적, 질병 지시, 및 질병 전개와 같은 인자에 따라 가변적일 확률이 크다. 현재 IMG853에 대한 질병 지시에서의 분비된 항원 수준은 충분치 않게 관찰되었으며, 한편 고형 종양 발현과의 연관관계는 제한적이다. FOLR1의 상승이 난소 선암종에서 보고된 한편, 데이터는 예컨대 소세포 폐암과 같은 다른 FOLR1+ 종양 지시에서 상승되지 않은 것을 제시한다 (Mantovani LT, et al. Eur J Cancer 30A(3):363-9 (1994); Basal E, et al. PLoS ONE 4(7): e6292 (2009)). 본 발명의 방법은 높은 염산의 존재 하에서 FOLR1 수용체의 검출을 가능케한다. 이전의 검정은 검정의 설계에서 Mov19를 사용하였다. IMG853가 Mov19를 함유하므로, 그리고 일 구현예에서 이는 본 발명의 표적화된 요법이므로, IMG853가 FOLR1의 검출 이전에 투여되는 일부 구현예에서 상기 방법이 Mov19의 존재 또는 부재 하에서 FOLR1를 검출하는 것이 필수적이다. Mov19를 사용하는 이전 검정은 경쟁적 효과를 가지고, IMG853 치료를 수용한 환자들에서 FOLR1이 현저히 더 적거나 없는 것을 검출할 것이다.

[0149] 일 구현예에서, 인간 공급원의 유체 표본에서 FOLR1를 검출하기 위한 본 발명의 방법은 통례의 샌드위치 ELISA 포맷을 사용한다 (도 1). 일 구현예에서, 상기 방법은 고형 지지체에 부착된 FOLR1에 대한 포획 제제 (즉, 항체, 다른 단백질)를 사용한다. 일 구현예에서, 상기 고형 지지체는 마이크로티터 플레이트이다. 여기까지, 상기 표본 (복수 유체, 혈액, 혈청, 혈장 등)은 희석 없이 부가되며, 상기 제1 포획 제제의 결합을 간섭하지 않는 상이한 검출제 (상이한 항체 또는 단백질)에 의하여 검출된다. 상기 검출제는 상기 제1 검출제에 1회 초과로 결합할 수 있는 제2 검출제 (비오틴/스트렙타비딘, 항-인간 2차 모노 또는 폴리클로날 항체 등)의 사용을 통해 이후 검출되며, 이로써 검출의 신호가 증폭된다. 상기 2차 검출제는 몇몇 다른 수단들 (예를 들어, TMB/퍼옥시다제, 신틸레이션 계수, 형광 프로브 등)의 사용에 의하여 이후 정량화된다. 부가적으로, 상기 검정은 FOLR1를 검출하고, Mov19, IMG853, 다른 FOLR1 계통군 구성원, 또는 염산의 존재에 의하여 부정적으로 영향받지 않는다.

[0150] 본 발명의 검정은 FOLR1-계 요법을 수용하기에 적합한 환자들 선택하기 위한 검정, 및 환자 반응을 모니터링하기 위한 검정을 둘다 포함한다. 반응 예측을 위한 검정은 요법 선정 전에 진행되며, 분비된 FOLR1의 수준은 요법 결정에 영향을 줄 수 있다. 환자 반응을 모니터링하기 위하여, 상기 검정은 요법 개시 시에 진행되어 표본에서 FOLR1의 기준선 (또는 설정된) 수준을 확립한다. 상동한 표본은 이후 검정되고, FOLR1의 수준은 기준선 또는 설정된 수준과 비교된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “설정된 수준”은 일반적으로, 상기 설정된 수준에 대하여 검정 결과를 비교함으로써 진단성 결과를 평가하는데 사용되는 검정 컷오프 값을 나타내며, 여기서 상기 설정된 수준은 다양한 임상적 파라미터들과 결합 또는 연관된다 (예를 들어, 약물로 치료되는 대상체가 상기 약물의 효과적인 혈액 수준을 달성하는지 여부를 모니터링하는 것, 항-암 약물로 암 치료를 수용하는 대상체의 반응을 모니터링하는 것, 상기 종양 치료를 수용하는 대상체에서 종양의 반응을 모니터링하는 것, 등등). 상기 설정된 수준은 절대값 또는 요법 개시 이전에 환자로부터 취득된 값을 제함으로써 정상화된 값일 수 있다. 사용될 수 있는 설정된 값의 예시는 하나 또는 그 이상의 질병 또는 병태로부터 임의로 고통받고 있는 하나 또는 그 이상의 대상체로부터 취득된 기준선 수준이다. 상기 검정된 바이오마커의 기준선 또는 설정된 수준과의 비교(또는 정보 분석)는 자동화 시스템, 예컨대 상기 검정이 수행되는 장치 (예를 들어 컴퓨터 플랫폼)의 부분인 또는 이와 호환되는 소프트웨어 프로그램 또는 지능 시스템에 의하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 이러한 비교 또는 정보 분석은 의사에 의하여 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 수준이 상동하거나 또는 감소하는 상태로 남아있을 경우, 상기 요법은 효과적일 수 있고, 계속될 수 있다. 기준선 수준 (또는 설정된 수준)을 초과하여 현저한 증가가 발생하였을 경우에, 환자는 응하지 않을 수 있다. 또 다른 구현예에서, 분비된 FOLR1 수준의 증가는 증가된 세포사 및 분비된 FOLR1의 증가된 방출을 나타낼 수 있다. 이러한 구현예에서, 분비된 FOLR1의 증가는 치료 효능을 나타낸다. 따라서, 일부 구현예에서, 분비된 FOLR1가 측정되며, 세포사가 측정된다. 세포사를 측정하는 검정은 본 분야에 잘 알려져 있으며, 이는 예를 들어 M30-항원의 검출 (카스파제-절단된 시토케라틴), γ -H2AX와 같은 DNA 손상의 마커, 또는 단편화된 및/또는 축합된 DAPI-염색된 핵과 같은 세포의 형태학적 특성을 포함한다.

[0151] 본 발명의 검정은 임의의 단백질 검정 방법에 의하여 수행될 수 있다. 본 발명에서 유용한 단백질 검정 방법은 본 분야에 잘 알려져 있으며, 특이적 표지되지 않은 또한 표지된 항체 또는 단백질의 FOLR1의 발현된 단백질 또는 단편으로의 결합을 포함한 면역 검정을 포함한다. 유용한 면역 검정 방법은 본 분야에 알려진 임의의 포맷을 사용하여 수행된 비제한적으로, 비아코어(Biacore), 시간-분해 형광 에너지 전달 (TR-FRET), ELISA 포맷 (샌드위치, 정방향 및 역방향 경쟁적 억제) 또는 형광 편광화 포맷을 포함하는 용액 상 검정 및 면역 조직 화학과 같

은 고형 상 검정 둘 다를 포함한다. 아래 제공된 FOLR-1 결합 제제는 이러한 면역검정 방법에 특히 유용하다.

III. FOLR1-결합 제제

본 발명은 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 제제를 제공한다. 이들 제제는 본원에서 “FOLR1-결합 제제”로 불리운다.

FOLR1-결합 제제는 muFR1-9, muFR1-13, muFR1-53, muFR1-62, 및 muFR1-64의 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 포함하는 FOLR1-결합 제제를 포함한다. CDR 서열 muFR1-9, muFR1-13, muFR1-53, 및 muFR1-62는 아래 표 1 및 2에 기술된다.

표 1: 가변 중쇄 CDR 아미노산 서열

항체	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
muFR1-9	SFGMH (서열 식별 번호:1)	YISSGSSTFYADTVKG (서열 식별 번호:2)	ELTGTFAY (서열 식별 번호:3)
muFR1-13	RYSVH (서열 식별 번호:4)	MIWSGGNTDYNSVFKS (서열 식별 번호:5)	FDGKVSWFAY (서열 식별 번호:6)
muFR1-53	DYDIS (서열 식별 번호:7)	EIYPGSGRTYYNERFKG (서열 식별 번호:8)	SYYYGTNSPFAY (서열 식별 번호:9)
muFR1-62	TYTMH (서열 식별 번호:10)	YINPTSGYNNYNQKFKE (서열 식별 번호:11)	GGAYGRRPVDY (서열 식별 번호:12)

표 2: 가변 경쇄 CDR 아미노산 서열

항체	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
muFR1-9	RASQSINNNLH (서열 식별 번호:13)	YASQSI (서열 식별 번호:14)	QQSNSWPQVT (서열 식별 번호:15)
muFR1-13	KASQSVSNDVL (서열 식별 번호:16)	YAYNRYS (서열 식별 번호:17)	QQDHSSPFT (서열 식별 번호:18)
muFR1-53	RASQDISNYLH (서열 식별 번호:19)	YTSLQS (서열 식별 번호:20)	QQGNSLPPT (서열 식별 번호:21)
muFR1-62	KASQNVGTNVA (서열 식별 번호:22)	SASSRYS (서열 식별 번호:23)	HQYNSYPYT (서열 식별 번호:24)

FOLR1 결합 분자는 muFR1-9, muFR1-13, muFR1-53, muFR1-62, 또는 muFR1-64를 CDR 당 4개 이하 (즉 0, 1, 2, 3, 또는 4)의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편일 수 있다.

폴리펩티드는 본원에 기술된 개별적 가변 경쇄 또는 가변 중쇄 중 하나를 포함할 수 있다. 항체 및 폴리펩티드는 또한 가변 경쇄 및 가변 중쇄를 둘 다 포함할 수 있다. 무린 muFR1-9, muFR1-13, muFR1-53, 및 muFR1-62 항체의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 서열이 아래 표 3 및 4에서 제공된다.

[0161] 표 3: 가변 중쇄 CDR 아미노산 서열

항체	VH 아미노산 서열 (서열 식별 번호)
muFR1-9HCvar	QVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHVVRQAPEKGLEWV AYISSGSSTFYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAK ELTGTFAIYWGQGLTVTVSA (서열 식별 번호:25)
muFR1-13HCvar	QVQLKESGPDLVAPQSLSITCTVSGFSLSRYSVHWIRQPPGKGLEWLG IWSGGNTDYNVFKSRLNITKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYCATFD GKVSWFAYWGQGLTVTVSA (서열 식별 번호:26)
muFR1-53HC	QVQLQQSGPELVRPGASVKMSCKASGYKFTDYDISWVLQRTGQGLEWI GEIYPGSGRTYYNERFKGKATLTADKSSNTVYMQSSLTSEDSAVYFCAS SYYYGTNSPFAYWGQGTTLTVSS (서열 식별 번호:27)
muFR1-62HC	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPGQGLEWI AYINPTSGYNNYNQKFKEKATLTADKSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYYCA SGGAYGRRPVDYWGQGTSTVTVSS (서열 식별 번호:28)

[0162]

[0163] 표 4: 가변 경쇄 CDR 아미노산 서열

항체	VL 아미노산 서열 (서열 식별 번호)
muFR1-9LCvar	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSINNHLHWYQQKSHESPRLLIKY ASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVETEDFGMYFCQQSNSWPQVTFGA GTKLELKR (서열 식별 번호:29)
muFR1-13LCvar	SIVMTQTPKFLLVSTGDRFTITCKASQSVSNDVLWYQQKPGQSPKLLIYY AYNRYSGVPDRFTGSGYGTDFITITTVQSEDLAVYFCQQDHSSPFTFGS GTKLEIKR (서열 식별 번호:30)
muFR1-53LC	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLHWYQRKPDGTVKLLVY YTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNSLPPTFGS GTKLEIKR (서열 식별 번호:31)
muFR1-62LC	DIVMTQSQKFMSISVGDVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKTLI YSASSRYSGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCHQYNSYPYTF GGGKLEIKR (서열 식별 번호:32)

[0164]

[0165] 또한 제공되는 것은 서열 식별 번호: 25-28와 적어도 약 90% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) 서열 식별 번호: 29-32와 적어도 약 90% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드이다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 서열 식별 번호: 25-32와 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 (a) 서열 식별 번호: 25-28와 적어도 약 95% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) 서열 식별 번호: 29-32와 적어도 약 95% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 (a) 서열 식별 번호: 25-28와 아미노산 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) 서열 식별 번호: 29-32와 아미노산 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 폴리펩티드이다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 무린의, 키메라의, 또는 인간화된 항체이다. 특정 구현예에서, 서열 식별 번호: 25-32와 특정 %의 서열 상동성을 갖는 상기 폴리펩티드는 서열 식별 번호: 25-32와 오직 보존적 아미노산 치환에 의하여 다르다.

[0166] 폴리펩티드는 본원에 기술된 개별적 가변 경쇄 또는 가변 중쇄 중 하나를 포함할 수 있다. 항체 및 폴리펩티드는 또한 가변 경쇄 및 가변 중쇄를 둘 다 포함할 수 있다. 무린의 muFR1-9, muFR1-13, muFR1-53, 및 muFR1-62 항체의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 서열이 아래 표 5 및 6에서 제공된다.

[0167] 표 5: 전체-길이 중쇄 CDR 아미노산 서열

항체	전체-길이 중쇄 아미노산 (서열 식별 번호)
muFR1-9HC	QVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSFGMHWVRQAPEKGLEWVA YISSGSSTFYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAKEL TGTFAYWGQGLTVTVSAAKTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGY FPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESPLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCN VAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITPKV TCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMH QDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAK DKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMNTNGSYFVYSKL NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (서열 식별 번호:33)
muFR1-13HC	QVQLKESGPDVAPSQSLSTCTVSGFSLSRYSVHWIRQPPGKLEWLGM WSGGNTDYNVFKSRLNITKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCATFDGK VSWFAYWGQGLTVTVSAAKTPPSVYPLAPGCGDTTGSSTVLGCLVKGY FPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTPSSTWPSQVTCS VAHPASSTVDKLEPSGPSTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNI KDVLMSLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY NSTIRVVSTLPIQHQDWMGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQV YILPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLD SDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDTSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK (서열 식별 번호:34)
muFR1-53HC	QVQLQQSGPELVRPGASVKMSCKASGYKFTDYDISWVLQRTGQGLEWIG EIYPGSGRTYYNERFKGKATLTADKSSNTVYMQLSSTSEDSAVYFCASSY YYGTNSPFAYWGQGTTLTVSSAKTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV KGYFPPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESPLYTLSSSVTPSSMRPSETV TCNVAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITL PKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELP

[0168]

	IMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQM AKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMNTNGSYFVYS KLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (서열 식별 번호:35)
muFR1-62HC	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYFTTYTMHWVKRPGQGLEWV AYINPTSGYNNYNQKFKEKATLTADKSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYYCAS GGAYGRRPVDYWGQGTSTVTVSSAKTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG LVKGYFPPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESPLYTLSSSVTPSSMRPSE TVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLIT ITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSV SELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPK EQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMNTNGSY FVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (서열 식별 번호:36)

[0169]

[0170] 표 6: 전체-길이 경쇄 아미노산 서열

항체	전체-길이 경쇄 아미노산 (서열 식별 번호)
muFR1-9LC	DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSCLRASQSIINNHLHWYQQKSHESPRLLIKYA SQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVETEDFGMYFCQQSNSWPQVTFGAGT KLELEKRAADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNRENEC (서열 식별 번호:37)
muFR1-13LC	SIVMTQTPKFLLVSTGDRFTITCKASQSVSNDVLWYQQKPGQSPKLLIYY AYNRYSGVPDRFTGSGYGTDFTFITITVQSEDLAVYFCQQDHSSPFTFGS GTKLEIKRAADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENEC (서열 식별 번호:38)
muFR1-53LC	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLHWYQRKPDGTVKLLVYY TSRLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNLPPFTFGSGT KLEIKRAADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNRENEC (서열 식별 번호:39)
muFR1-62LC	DIVMTQSQKFMISVGDVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKTLIY SASSRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLISNVQSEDLADYFCHQYNSYPYTFG GGTKLEIKRAADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENEC (서열 식별 번호:40)

[0171]

[0172]

또한 제공되는 것은 서열 식별 번호: 33-36과 적어도 약 90% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) 서열 식별 번호: 37-40과 적어도 약 90% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드이다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 서열 식별 번호: 33-40과 적어도 약 95% 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 (a) 서열 식별 번호: 33-36과 적어도 약 95% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) 서열 식별 번호: 37-40과 적어도 약 95% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 (a) 서열 식별 번호: 33-36과 아미노산 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) 서열 식별 번호: 37-40과 아미노산 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 폴리펩티드이다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 FOLR1에 특이적으로 결합하는 뮤린의, 키메라의, 또는 인간화된 항체이다. 특정 구현예에서, 서열 식별 번호: 33-40과 특정 %의 서열 상동성을 갖는 상기 폴리펩티드는 서열 식별 번호: 33-40과 오직 보존적 아미노산 치환에 의하여 다르다.

[0173]

항원에 대한 항체의 친화도 또는 결합력(avidity)는 본 분야에 잘 알려진 임의의 적절한 방법을 사용하여 실험적으로 측정될 수 있으며, 이는 예를 들어 세포계측법 (유동 계측법 포함), 효소-결합된 면역흡착 검정 (ELISA), 또는 방사성면역검정 (RIA), 또는 역학 (예를 들어, 표면 플라스몬 공명 (BIACORE™) 분석)이 있다. 직접적 결합 검정 뿐만 아니라 경쟁적 결합 검정 포맷이 용이하게 채용될 수 있다 (예를 들어, 다음 참고 Berzofsky, et al., "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 본원에 기술된 방법들. 특정한 항체-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건하에서 측정될 경우 변화할 수 있다 (예로, 염 농도, pH, 온도). 그러므로, 친화도 및 다른 항원-결합 파라미터 (예를 들어, KD 또는 Kd, K_{on}, K_{off})의 측정은 항체 및 항원의 표준화된 용액 및 본원에 기술된 완충액과 같이 본 분야에서 잘 알려진 표준화된 완충액으로 제조된다.

[0174]

일 양태에서, 결합 검정은 세포계측법 (예를 들어, 유동 세포계측법)을 사용하여 표면 상에서 FOLR1 항원을 발현하는 세포 상에서 수행될 수 있다. 예를 들어, SKOV3와 같은 FOLR1-양성 세포는 항-FOLR1 항체의 변화하는 농도로 100 μ L FACS 완충액 (2% 정상 염소 혈청으로 보충된 RPMI-1640 배지)에서 표본당 1 x 10⁵ 세포를 사용하여 인큐베이션되었다. 이후, 세포들은 펠렛화되고, 세정되고, 그리고 1시간 동안 100 μ L의 FITC-공액된 염소-항-마우스 또는 염소-항-인간 IgG-항체로 인큐베이션되었다(예를 들어 잭슨 실험실(Jackson Laboratory)로부터 수득가능한 것과 같은 FACS 완충액에서 6 μ g/mL). 세포들은 다시 펠렛화되고, FACS 완충액으로 세정되며, 그리고

1% 포름알데히드를 함유하는 200 μ L의 PBS로 재현탁되었다. 표본은 예를 들어, FACSCalibur 유동 세포계측기를 사용하여 HTS 멀티웰(multiwell) 샘플러(sampler)로 획득되었으며, CellQuest Pro (모두 BD Biosciences, San Diego, US로부터의)를 사용하여 분석되었다. 각 표본에 있어서, FL1 (MFI)에 대한 평균 형광 강도는 결합 곡선을 생성하는 세미-로그 플롯에서 항체 농도에 대하여 엑스포팅(export) 및 플로팅(plot)되었다. S자형 용량-반응 곡선은 결합 곡선에 피팅되며, EC50 값은 GraphPad 프리즘 v4와 같은 프로그램을 디폴트 파라미터로 사용하여 산출된다 (GraphPad software, San Diego, CA). EC50 값은 각 항체에 대하여 분명한 해리 상수 "Kd" 또는 "KD"에 대한 측정치로서 사용될 수 있다.

[0175] 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 예컨대 Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495에 기술된 것들을 사용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법을 사용하여, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적절한 동물은 면역화 항원에 특이적으로 결합될 항체의 림프구에 의한 생성을 야기하기 위하여 상기 기술된 바와 같이 면역화될 수 있다. 림프구는 또는 시험관내 면역화될 수 있다. 면역화 후, 림프구는 단리되며, 적절한 골수종 세포주와, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 융합되며, 비융합된 림프구 및 골수종 세포들로부터 떨어져 선택될 수 있는 하이브리도마 세포를 형성한다. 특이적으로 선택된 항원에 지시된 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마는, 면역침전, 면역블롯팅, 또는 시험관내 결합 검정 (예를 들어, 방사성면역검정 (RIA); 효소-결합된 면역흡착 검정 (ELISA))에 의하여 측정된 바와 같이, 이후 표준 방법을 사용하여 시험관내 배양 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) 또는 동물에서의 체내 복수 종양으로 전파될 수 있다. 모노클로날 항체는 이후 폴리클로날 항체에 있어 기술된 바와 같이 배양 배지 또는 복수 유체로부터 정제될 수 있다.

[0176] 대안적으로 모노클로날 항체는 또한 재조합 DNA 방법을 사용하여 미국 특허 4,816,567에서 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 모노클로날 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 성숙한 B-세포 또는 하이브리도마 세포로부터, 예컨대 RT-PCR에 의하여 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자를 특이적으로 증폭시키는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 단리되며, 그들의 서열은 통례적인 절차를 사용하여 측정된다. 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 이후 적절한 발현 벡터로 클로닝되며, 이는 달리 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 이. 콜라이 세포, 시미안(simian) COS 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주세포로 형질감염될 때, 모노클로날 항체는 상기 숙주세포에 의하여 생성된다. 또한, 원하는 종의 재조합 모노클로날 항체 또는 그의 단편은 (McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628; 및 Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597)에 기술된 바와 같이 원하는 항체의 CDR을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0177] 모노클로날 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(들)은 추가로 많은 상이한 방식에서 재조합 DNA 기술을 사용하여 개질되어 대안적인 항체를 생산할 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 마우스모노클로날 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인은 1) 예를 들어, 키메라 항체를 생성하는, 예를 들어 인간 항체의 영역들로 또는 2) 융합 항체를 생성하는 비-면역글로불린 폴리펩티드로 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 불변 영역은 모노클로날 항체의 원하는 항체 단편을 생성하기 위하여 절단 또는 제거된다. 가변 영역의 부위-지시의 또는 고-밀도 돌연변이생성은 모노클로날 항체의 특이성, 친화도 등을 최적화하기 위하여 사용될 수 있다.

[0178] 일부 구현예에서, 인간 FOLR1 항체에 대한 모노클로날 항체는 인간화된 항체이다. 특정 구현예에서, 그러한 항체는 인간 대상체에 투여될 때 항원성 및 HAMA (인간 항-마우스 항체) 반응을 줄이기 위하여 치료적으로 사용될 수 있다.

[0179] 비-인간 또는 인간 항체를 조작, 인간화, 또는 재표면화하기 위한 방법이 또한 사용될 수 있고 본 분야에 잘 알려져 있다. 인간화된, 재표면화된, 또는 유사하게 조작된 항체는 비-인간, 예를 들면, 비제한적으로 마우스, 래트, 토끼, 비-인간 영장류 또는 다른 포유동물인 공급원으로부터 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는, 전형적으로 알려진 인간 서열의 "임포트(import)" 가변, 불변, 또는 다른 도메인으로부터 채득된, 종종 "임포트" 잔기로 불리우는 잔기로 교체된다.

[0180] 그러한 임포트된 서열은 면역원성(immunogenicity)을 감소하거나, 본 분야에 알려진 바와 같이 결합, 친화도, 온-레이트(on-rate), 오프-레이트(off-rate), 결합력, 특이성, 반감기, 또는 임의의 다른 적절한 특성을 감소, 개선, 또는 개질시키기 위하여 사용될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 FOLR1 결합에 영향을 주는 것에 관련된다. 따라서, 비-인간 또는 인간 CDR 서열의 부분 또는 전부는 유지되는 한편, 가변 및 불변 영역의 비-인간 서열은 인간 또는 다른 아미노산으로 교체될 수 있다.

[0181] 항체들은 또한 임의로 항원 FOLR1에 대한 높은 친화도 및 다른 양호한 생물학적 특성의 보유로 조작된

인간화된, 재표면화된, 조작된, 또는 인간의 항체일 수 있다. 이러한 목표를 달성하기 위하여, 인간화된 (또는 인간의) 또는 조작된 항-FOLR1 항체 및 재표면화된 항체는 임의로 부모서열, 및 부모의, 조작된, 그리고 인간화된 서열의 3-차원 모델을 사용한 다양한 개념적 인간화된 및 조작된 생성물의 분석의 과정에 의하여 제조될 수 있다. 3-차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 이용가능하며, 본 분야의 숙련가에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 개연성있는 3-차원 형태 구조를 예시하고 보여주는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이의 관찰은 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 있음직한 역할의 분석, 즉 FOLR1와 같은 이의 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 경우, 뼈대구조 (FR) 잔기는 공동 및 임포트 서열로부터 선택 및 조합될 수 있으며, 이로써 상기 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성된다.

[0182] 본 발명의 항체의 인간화, 재표면화, 또는 조작은 임의의 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있으며, 이는 비제한 적으로 다음에 기술되어 있다: Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994), Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996), 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, 이의 각각은 그에 인용된 참조를 포함하여 그 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다.

[0183] 특정 대안적인 구현예에서, FOLR1에 대한 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 본 분야에 알려진 다양한 방법을 사용하여 직접적으로 제조될 수 있다. 표적 항원에 대해 지시된 항체를 생성하는 면역화된 개체로부터 체내 면역화되거나 단리된 불멸화된 인간 B 림프구가 생성될 수 있다 (예를 들어 Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; 및 미국 특허 5,750,373 참조). 또한, 인간 항체는 파지 라이브러리에서 선택될 수 있고, 여기서 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현하며, 이는 예를 들어 다음에 기술된 바와 같다: Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, 및 Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). 항체 파지 라이브러리의 생성 및 사용을 위한 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 et al., 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018에 기술되어 있다 (이의 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다). 친화도 성숙 전략 및 사슬 셔플링 전략 (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783, 그 전체가 참조로 본원에 포함) 은 본 분야에 알려져 있으며, 높은 친화도의 인간 항체를 생성하기 위하여 채용될 수 있다.

[0184] 인간화된 항체는 또한 내생성 면역글로불린 생성의 부재에서 인간 항체의 전체 레퍼토리를 면역화상에서 생성할 수 있는 인간 면역글로불린 유전자좌를 함유하는 형질전환 마우스에서 또한 제조될 수 있다. 이러한 접근은 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016에 기술되어 있다.

[0185] 이러한 발명은 또한 인간 엽산 수용체 1를 특이적으로 인식하는 이중특이적 항체를 포괄한다. 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프를 특이적으로 인식하고 결합할 수 있는 항체이다. 상기 상이한 에피토프는 상동한 분자 (예를 들어, 상동한 인간 엽산 수용체 1) 내에, 또는 상이한 분자들 상에 있을 수 있으며, 예를 들어, 항체들은 인간 엽산 수용체 1, 뿐만 아니라, 예를 들어, 1) T-세포 수용체 (예를 들어, CD3)와 같은 백혈구 상에서의 효과기 분자 또는 Fc 수용체 (예를 들어, CD64, CD32, 또는 CD16) 또는 2) 아래 상세하게 기술된 세포독성 제제를 특이적으로 인식 및 결합할 수 있다.

[0186] 예시적인 이중특이적 항체는 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있으며, 이의 적어도 하나는 본 발명의 폴리펩티드에서 기원한다. 대안적으로, 면역글로불린 분자의 항-항원성 암은 T 세포 수용체 분자 (예를 들어, CD2, CD3, CD28, 또는 B7), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체와 같은 백혈구 상에서 특정 항원을 발현하는 세포에 세포 방어 매커니즘을 집중시키기 위하여 촉발 분자에 결합하는 암과 결합될 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성 제제를 특정 항원을 발현하는 세포들로 나타내는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 항원-결합 암 및 EOTUBE, DPTA, DOTA, 또는 TETA와 같은 세포독성 제제 또는 방사성 핵종 킬레이터에 결합하는 암을 소지한다. 이중특이

적 항체를 제조하는 기술은 본 분야에 일반적이다 (Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science 229:81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 121:120; Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368; 및 미국 특허 5,731,168). 2 초과 원자가를 갖는 항체가 또한 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다 (Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)).

[0187] 그러므로, 특정 구현예에서, FOLR1에 대한 항체는 인간 항체이다. 특정 구현예에서 예를 들어 종양 투과도를 증가시키는 항체 단편이 제공된다. 항체 단편의 생성을 위한 다양한 기술이 알려져 있다. 전통적으로, 이러한 단편들은 온전한 항체의 단백질 가수분해를 통하여 유래된다 (예를 들어 Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229:81). 특정 구현예에서, 항체 단편은 재조합으로 생성된다. Fab, Fv, 및 scFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이(E. coli) 또는 다른 숙주 세포에서 발현되고 분리될 수 있으며, 이로써 이들의 단편들의 많은 양의 생성을 허락한다. 그러한 항체 단편은 또한 상기 고찰된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 5,641,870에 기술된 선형 항체일 수 있으며, 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다. 항체 단편의 생성을 위한 다른 기술들은 숙련된 실시자에게 자명할 것이다.

[0188] 본 발명의 따라, 기술들은 인간 염산 수용체 1에 특이적인 단일-사슬 항체의 생성을 위하여 조정될 수 있다 (미국 특허 번호 4,946,778 참고). 부가적으로, 방법들은 염산 1 수용체에 대한 원하는 특이성, 또는 유도체, 단편, 그의 유사체 또는 상동체를 갖는 모노클로날 Fab 단편의 빠르고 효과적인 식별을 허용하기 위한 Fab 발현 라이브러리의 작제를 위하여 조정될 수 있다 (Huse, et al., Science 246:1275-1281 (1989)). 항체 단편들은 다음을 비제한적으로 포함하는 본 분야의 기술에 의하여 생성될 수 있다: (a) 항체 분자의 펩신 소화에 의하여 생성된 F(ab')₂ 단편; (b) F(ab')₂ 단편의 이황화교를 감소시킴으로서 생성된 Fab 단편, (c) 파파인 및 감소제로의 항체 분자 치료에 의하여 생성된 Fab 단편, 및 (d) Fv 단편.

[0189] 이는 추가로 항체 단편이 이의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여 항체를 개질하는 경우 특히 바람직할 수 있다. 이는 예를 들어, 항체 단편에서의 적절한 영역의 돌연변이에 의한 항체 단편으로의 구조 수용체 결합 에피토프의 포함에 의하여, 또는 상기 에피토프를 말단 또는 중앙에서 항체 단편에 이후 결합되는 펩티드 태그에 포함시킴에 의하여 (예를 들어 DNA 또는 펩티드 합성) 달성될 수 있다.

[0190] 이종공액(heteroconjugate) 항체는 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 이종 공액 항체는 두가지의 공유결합된 항체로 구성되어 있다. 그러한 항체는, 예를 들어, 면역 세포를 원치 않는 세포로 표적화하는데 제안되어 왔다 (미국 특허 번호 4,676,980). 항체들은 알려진 방법을 사용하여, 가교제를 포함한 것들을 포함하는 합성 단백질 화학에서 시험관내 제조될 수 있다. 예를 들어, 면역 독소는 이황화 교환 반응을 사용하여, 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 작제될 수 있다. 이러한 목적에 적절한 시약은 이미노티오에이트 및 메틸-4-메르캅토부티르 이미네이트를 포함한다.

[0191] 본 발명의 목적을 위하여, 개질된 항체는 인간 FOLR1의 폴리펩티드를 갖는 항체의 연합을 제공하는 가변 영역의 임의의 유형을 포함할 수 있다. 이와 비교하여, 가변 영역은 채액 반응을 증가시키도록 유도될 수 있는 포유동물의 임의의 유형을 포함하거나 이로부터 유래될 수 있고, 원하는 종양 연관된 항원에 대해 면역글로불린을 생성할 수 있다. 그러하게, 개질된 항체의 가변 영역은, 예를 들어, 인간, 무린, 비-인간 영장류 (예를 들어 사이토물구스 원숭이, 마카크 등), 또는 이리 유래의 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 개질된 면역글로불린의 가변 및 불변 영역은 인간이다. 다른 구현예에서, 호환가능한 항체 (일반적으로 비-인간 공급원으로부터 유래된)의 가변 영역은 결합 특성을 개선하거나 상기 분자의 면역원성을 감소시키기 위하여 조작 또는 특이적으로 재단될 수 있다. 이러한 관점에서, 본 발명에서 유용한 가변 영역은 인간화되거나 또는 달리 임포트(import)된 아미노산 서열의 포함을 통하여 변화될 수 있다.

[0192] 특정 구현예에서, 상기 가변 도메인은 중쇄 및 경쇄 둘 다에서 하나 또는 그 이상의 CDR의 적어도 부분적인 교체에 의하여, 필요하다면, 부분적인 뼈대구조 영역 교체 및 서열 변화에 의하여 변화된다. CDR이 그 뼈대구조 영역이 유래한 항체와 상동한 분류의, 또는 심지어 상동한 하부 분류의 항체로부터 유래될 수 있음에도 불구하고, CDR이 상이한 분류의 항체로부터, 그리고 특정 구현예에서 상이한 종으로부터의 항체로부터 유래될 것임이 고려된다. 하나의 가변 도메인의 항원-결합 능력을 다른 것으로 전달하기 위하여 공여자 가변 영역으로부터의 완전한 CDR로 모든 CDR을 교체할 필요는 없다. 대신, 항원-결합 부위의 활성을 유지시키기 위하여 필요한 잔기들을 전달하는 것이 오직 필요할 것일 수 있다. 미국 특허 번호에 나타난 설명에 근거하여 5,585,089,

5,693,761 및 5,693,762, 이는 통상적인 실험을 수행함으로써 또는 실험 및 감소된 면역원성을 갖는 기능성 항체를 수득하기 위한 오류 시험에 의하여 능히 본 분야의 숙련가의 능숙함 내에 있을 것이다.

[0193] 가변 영역의 변화에도 불구하고, 본 분야의 숙련가는 본 분야의 개질된 항체가, 원산 또는 변화되지 않은 불변 영역을 포함하는 대략적으로 상동한 면역원성의 항체와 비교하였을 때 증가된 종양 국지화 또는 감소된 혈청 반감기와 같은 원하는 생화학적 특성을 제공하기 위하여, 적어도 하나 또는 그 이상의 불변 영역 도메인이 결실되거나 달리 변화된 항체 (예를 들어 전체-길이 항체 또는 그의 면역활성 단편)을 포함할 것임을 알 것이다. 일부 구현예에서, 상기 개질된 면역글로불린의 불변 영역은 인간 불변 영역을 포함할 것이다. 본 발명과 호환 가능한 불변 영역에 대한 변형은 하나 또는 그 이상의 도메인에서 하나 또는 그 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다. 즉, 본원에 개시된 개질된 항체는 하나 또는 그 이상의 3개의 중쇄 불변 도메인 (CH1, CH2 또는 CH3) 및/또는 경쇄 불변 도메인 (CL) 중 하나 또는 그 이상에 대한 변화 또는 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 도메인이 부분적으로 또는 전체적으로 결실된 개질된 불변 영역이 고려된다. 일부 구현예에서, 상기 개질된 항체는 상기 전체 CH2 도메인이 제거될 경우 도메인 결실된 작제물 또는 변이체를 포함할 것이다 (Δ CH2 작제물). 일부 구현예에서, 상기 누락된 불변 영역 도메인은 상기 부재한 불변 영역에 의하여 전형적으로 부여된 분자 가요성의 일부를 제공하는 짧은 아미노산 스페이서 (예를 들어 10개 잔기)에 의하여 교체될 것이다.

[0194] 특정 구현예에서, 상기 개질된 항체는 각각의 개질된 항체의 경첩(hinge) 영역에 직접적으로 CH3을 융합시키도록 조작될 수 있다는 것이 고지될 것이다. 다른 작제물에서, 이는 경첩 영역 및 개질된 CH2 및/또는 CH3 도메인 사이에서 펩티드 스페이서를 제공하는데 바람직할 수 있다는 것이 공지될 것이다. 예를 들어, 호환가능한 작제물은 CH2 도메인이 결실되고 잔여 CH3 도메인 (개질된 또는 비개질된)이 5-20 아미노산 스페이서를 갖는 경첩 영역에 결합될 경우 발현될 수 있다. 그러한 스페이서는 예를 들어 불변 도메인의 조절 요소가 유리되고 접근가능한 채로 있거나 경첩 영역이 가요적인 채로 있는 것을 보장하기 위하여 부가될 수 있다. 그러나, 아미노산 스페이서는, 몇몇 예시에서, 면역원성임을 입증하고 작제물에 대하여 원치않는 면역 반응을 야기할 수 있다는 것을 주목해야 한다. 따라서, 특정 구현예에서, 작제물에 부가된 임의의 스페이서는 상기 개질된 항체의 원하는 생화학적 질을 유지하기 위하여 상대적으로 비-면역원성일 것이고, 또는 심지어 생략될 것이다.

[0195] 전체 불변 영역의 도메인 결실 이외에, 본 발명의 항체가 수가 적거나 심지어 단일의 아미노산의 부분적인 결실 또는 치환에 의해 제공 될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, CH2 도메인의 선택된 영역에서의 단일 아미노산의 돌연변이는 실질적으로 Fc 결합을 감소시키기에 충분하며, 이로써 종양 국지화를 증가시킬 수 있다. 유사하게, 조절될 효과기 기능(예, C1Q에 결합 보완)을 제어하는 하나 또는 그 이상의 불변 영역 도메인의 일부를 단순히 제거하는 것이 바람직 할 수 있다. 이러한 불변 영역의 부분 결실는 항체의 선택된 특성(혈청 반감기)을 향상시킬 수 있는 한편, 대상체 불변 영역 도메인과 연관된 다른 바람직한 기능을 유지할 수 있다. 더욱이, 위에서 언급한 바와 같이, 개시된 항체의 불변 영역은 생성된 작제물의 프로파일을 개선하는 하나 또는 그 이상의 아미노산의 치환 또는 돌연변이를 통해 수정 될 수 있다. 이 점에서 실질적으로 변형 된 항체의 면역원성 및 프로파일 구성을 유지하면서 그 보존된 결합 부위 (예를 들어, Fc 결합)에 의해 제공된 활성을 방해하는 것이 가능할 수 있다. 특정 구현예들은 이펙터 기능을 감소 또는 증가와 같은 바람직한 특성을 향상시키기 위하여 또는 더 큰 세포 독소 또는 탄수화물 부착을 위하여 불변 영역에 하나 또는 그 이상의 아미노산의 부가를 포함할 수 있다. 그러한 구현예에서, 선택된 불변 영역 도메인으로부터 유래된 특정 서열을 삽입또는 복제하는 것이 바람직 할 수 있다.

[0196] 본 발명은 또한 본원에서 키메라, 인간화 및 인간 항체 또는 그의 항체 단편과 실질적으로 상동한 변이체 및 등가물을 추가로 포함한다. 이는 예를 들어, 보존적 치환에 의하여, 즉 유사한 아미노산에 의한 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 예를 들어, 보존적 치환은, 예컨대, 하나의 산성 아미노산을 또 다른 산성 아미노산으로, 하나의 염기성 아미노산을 또 다른 염기성 아미노산으로 또는 하나의 중성 아미노산을 또 다른 중성 아미노산으로와 같이, 상동한 일반 분류 내의 하나의 아미노산을 또 다른 것으로 치환하는 것을 나타낸다. 보존적 아미노산 치환에 의해 의도되는 것은 본 분야에 알려져 있다.

[0197] 본 발명의 폴리펩티드는 인간 FOLR1 대해 이들 항체 또는 그의 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드, 천연 폴리펩티드, 또는 합성 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명의 일부의 아미노산 서열은 단백질의 구조 또는 기능에 현저한 영향없이 변화시킬 수있는 기술 분야에서 인식 될 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 인간 염산 수용체 단백질에 대해 실질적인 활성을 나타내는 항체 또는 이들의 영역, 또는 그의 단편을 포함하는 폴리펩티드의 변형을 추가로 포함한다. 그러한 돌연변이는 결실, 삽입, 반전, 반복 및 유형 치환을 포함한다.

- [0198] 폴리펩티드 및 유사체는 부가적인 화학적 모이어티를 함유하고, 정상적으로 단백질의 일부를 함유하지 않도록 추가로 개질될 수 있다. 이러한 유도화된 잔기는 단백질의 용해도, 생물학적 반감기 또는 흡수를 향상시킬 수 있다. 모이어티는 또한 단백질 및 기타 등등의 임의의 바람직한 부작용을 감소시키거나 제거할 수 있다. 그러한 모이어티에 대한 고찰은 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000)에서 발견할 수 있다.
- [0199] 본원에서 기술된 단리 폴리펩티드는 본 분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다. 그러한 방법은 직접적인 단백질 합성 방법으로부터 격리 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 DNA 서열을 작제하고 적합한 형질전환된 숙주에서 이러한 서열을 발현하는 것까지 이른다. 일부 구현예에서, DNA 서열은 야생형 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 합성하거나 단리하는 제조합 기술을 사용하여 작제된다. 임의로, 서열은 이의 작용 유사체를 제공하는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 돌연변이 형성 될 수 있다. 예를 들어 Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) 및 미국 특허 번호 4,588,585를 참고하라.
- [0200] 일부 구현예에서, 관련된 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오티드 합성을 사용하여 화학적 합성에 의하여 작제될 것이다. 그러한 올리고뉴클레오티드는 원하는 폴리펩티드의 아미노산 서열 및 관련된 제조합 폴리펩티드를 제조할 수 있는 숙주 세포에서 선호되는 코돈을 선택하는 것에 기반하여 설계 될 수 있다. 표준 방법은 관련된 단리된 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 합성하는데 적용될 수 있다. 예를 들어, 완전한 아미노산 서열은 역번역 유전자를 구성하기 위하여 또한 사용될 수 있다. 또한, 특정 단리된 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 올리고머가 합성될 수 있다. 예를 들어, 원하는 폴리펩티드의 일부를 코딩하는 몇몇 작은 올리고뉴클레오티드가 합성될 수 있고 이후 결합될 수 있다. 뉴클레오티드는 전형적으로 상보적 어셈블리에 대한 5' 또는 3' 오버행을 함유한다.
- [0201] 일단 (합성, 부위 특이 적변이 또는 다른 방법에 의해) 조립되면, 특정 관련된 단리된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 벡터에 삽입되고 원하는 숙주에서 단백질의 발현에 적합한 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된다. 적절한 어셈블리는 적합한 숙주에서 생물학적으로 활성인 폴리펩티드의 뉴클레오티드 서열, 제한 효소 맵핑 및 발현에 의해 확인 될 수 있다. 본 분야에 알려진 바와 같이, 숙주에서 형질감염된 유전자의 높은 발현 수준을 수득하기 위해, 선택된 발현 숙주에서 기능적인 유전자는 전사 및 번역 발현 대조군 서열에 작동적으로 결합되어야만 한다.
- [0202] 특정 구현예에서, 제조합 발현 벡터는 인간 FOLR1 대하여, DNA 부호화 항체 또는 그의 단편을 증폭 및 발현하기 위해 사용된다. 제조합 발현 벡터는 포유 동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자 유래의 적절한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동적으로 결합하는, 항-FOLR1 항체 또는 그의 단편의 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 합성 또는 cDNA-유래된 DNA 단편을 갖는 복제 가능한 DNA 작제물이다. 전사 단위는 일반적으로 (1) 전사 프로모터 또는 인핸서를 포함하는 예를 들어, 유전자 발현에서 조절 역할을 갖는 유전적 요소 또는 요소들 (2) mRNA로 전사 및 단백질로 번역되는 구조 또는 암호화 서열, 및 (3) 적절한 전사 및 번역 개시 및 종결 서열의 어셈블리를, 아래에서 상세하게 기술된 것처럼, 포함한다. 그러한 조절 요소는 전사를 제어하는 오퍼레이터 서열을 포함 할 수 있다. 보통 복제 원점에 의해 부여된 숙주에서 복제 할 수있는 능력, 및 형질 전환체의 인지를 용이하게 하기 위한 선별 유전자가 추가로 포함될 수 있다. DNA 영역은 서로 기능적으로 관련될 때 작동적으로 연결된다. 예를 들면, 신호 펩티드 (분비 리더)에 대한 DNA는 그것이 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전구체로서 발현되는 경우 폴리펩티드를 위한 DNA에 작동적으로 연결되며; 프로모터는 그것이 서열의 전사를 제어하는 경우에 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되고; 또는 리보솜 결합 부위는 그것이 번역을 허용하기 위하여 위치하였을 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 효모 발현 시스템에 사용하기 위한 구조적 요소는 숙주 세포에 의해 번역된 단백질의 세포 외 분비를 가능하게 하는 리더 서열을 포함한다. 대안적으로, 제조합 단백질이 리더 또는 전송 서열 없이 발현되는 경우, 그것은 N 말단 메티오닌 잔기를 포함 할 수 있다. 이러한 잔기는 임의로 최종 생성물을 제공하는 발현된 제조합 단백질로부터 후속적으로 절단될 수 있다.
- [0203] 발현 조절 서열 및 발현 벡터의 선택은 숙주의 선택에 따라 달라질 것이다. 다양한 발현 숙주 / 벡터 조합이 채용 될 수 있다. 진행 호스트에 유용한 발현 벡터는 예를 들어, SV40의 발현 조절 서열, 소 파필 로마 바이러스, 사이토 메갈로 바이러스 및 아데노 바이러스를 포함하는 벡터들을 포함한다. 박테리아 호스트에 유용한 발현 벡터는 알려진 박테리아 플라스미드, 대장균 콜라이로부터의 플라스미드, pCR 1, pBR322, pMB9 및 그의 유도체, M13와 필라멘트 단일가닥 DNA 파지와 같은 넓은 숙주 범위의 플라스미드를 포함한다. FOLR1 결합 폴리펩티드 또는 항체의 발현을 위한 적합한 숙주 세포(또는 FOLR1 단백질)는 항원으로서 사용할 적절한 프로모터의 제어 하에서 원핵 생물, 효모, 곤충 또는 그보다 높은 분류의 진행 세포를 포함한다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들면 이. 콜라이 또는 바킬루스이다. 고등 진행 세포는 아래 기술된 바와 같이 곤충 세포 및

포유동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 또한 무세포 번역 시스템이 채용되었다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유동물 세포성 숙주와 함께 사용하기 위한 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 'Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985)'에 의해 기술되었으며, 이의 관련 개시사항은 본원에 참조로서 포함된다. 항체 생성을 포함한 단백질 생성 방법에 관한 부가적 정보는 예를 들면 미국 특허 공보 번호 2008/0187954, 미국 특허 번호 6,413,746 및 6,660,501 및 국제 특허 공보 번호 WO 04009823에서 기술되며, 이의 각각은 본원에 참조로 그 전체가 편입되어 있다.

[0204] 각종 곤충 또는 포유 동물 세포 배양 시스템은 유리하게 재조합 단백질을 발현하는 데 이용된다. 포유 동물 세포에서 재조합 단백질의 발현은 그러한 단백질이 일반적으로 옳게 폴딩(fold)되고, 적절하게 개질되며, 그리고 완전히 기능적이므로 수행될 수 있다. 적절한 포유 동물 숙주 세포주의 예는 Gluzman (Cell 23:175, 1981)에 기재된, HEK-293 및 HEK-293T, 원숭이 신장 세포주의 COS-7주, 및 예를 들어 L 세포, C127, 3T3, 중국 햄스터 난소 (CHO), HeLa 및 BHK 세포주를 포함하는 다른 세포주를 포함한다. 포유 동물 발현 벡터는 복제 원점과 같은 비전사 요소, 발현될 유전자에 결합된 적절한 프로모터 및 인핸서, 및 다른 5' 또는 3' 비전사 플랜킹 서열, 필요한 리보솜 결합 부위와 같은 5' 또는 3' 비번역 서열, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스(splice) 공여체 및 수용체 부위, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서 이중 단백질의 생산을 위한 배큘로바이러스(Baculovirus) 시스템은 Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)에 의하여 고찰된다.

[0205] 형질전환된 숙주에 의해 생성된 단백질은 임의의 적절한 방법에 따라 정제될 수 있다. 이러한 표준 방법은 단백질 정제에 대한 (예를 들어, 이온 교환, 친 화성 컬럼 및 사이징 크로마토 그래피) 크로마토 그래피, 원심 분리, 차등 용해도, 또는 임의의 다른 표준 기술에 의해 포함된다. 핵사티딘, 말토오스 결합 도메인, 인플루엔자 코트(coat) 서열 및 글루타치온 S 트랜스퍼와 같은 친화도 태그는 적당한 친화도 컬럼을 통해 통로가 용이한 정제를 가능케할 수 있도록 단백질에 부착될 수 있다. 단리된 단백질은 물리적으로 단백질 가수 분해, 및 핵자기 공명 X 선 결정학 등의 기술을 이용하여 특성화될 수 있다.

[0206] 예를 들면, 배양 배지로 재조합 단백질을 분리하는 시스템으로부터의 상청액은 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과(ultrafiltration) 단위과 같은 상업적으로 수득가능한 단백질 농축 여과기를 사용하여 우선 농축시킬 수 있다. 농축 단계 후, 농축액을 적절한 정제 매트릭스에 적용할 수 있다. 대안적으로, 음이온 교환 수지는, 예를 들면, 측쇄 디에틸 아미노에틸 (DEAE) 기를 갖는 기질 또는 매트릭스로, 채용될 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로오스 또는 일반적으로 단백질 정제에 사용되는 다른 형태일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 단계를 사용할 수 있다. 적합한 양이온 교환기는 나프탈렌 또는 카르복시 메틸 기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다. 마지막으로, 예로 측쇄 메틸 또는 다른 지방족기를 갖는 실리카겔을 채용하는 소수성 RP-HPLC 매체를 이용하는 하나 또는 그 이상의 역상 고성능 액체 크로마토 그래피 (RP-HPLC) 단계는 FOLR1-결합 체제를 정제하기 위해 추가로 채용될 수 있다. 일부 또는 모두의 상기 정제 단계는, 다양한 조합으로, 또한 균일한 재조합 단백질을 제공하기 위해 이용될 수 있다.

[0207] 박테리아 배양물에서 생성된 재조합 단백질은 하나 또는 그 이상의 농축, 솔팅-아웃(salting-out), 수용성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토 그래피 단계 후 세포 펠렛(pellet)으로부터 초기 추출에 의하여 단리될 수 있다. 고성능 액체 크로마토 그래피 (HPLC)는 최종 정제 단계를 위해 사용될 수 있다. 재조합 단백질의 발현에 채용된 균체는 동결-해동 반복, 초음파 처리, 기계적 파쇄, 또는 용해제의 사용을 포함하여, 임의의 편리한 방법에 의해 중단될 수 있다. 항체 및 다른 단백질을 정제하기 위한 방법은 또한, 예를 들어 미국 특허 공보 번호 2008/0312425, 2008/0177048, 및 2009/0187005에서 기술되며, 이의 각각은 본원에 참조로 그 전체가 편입되어 있다.

[0208] IV. 폴리뉴클레오티드

[0209] 특정 구현예에서, 본 발명은 그러한 폴리펩티드의 인간 FOLR1 수용체 또는 단편에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다. 예를 들어, 본 발명은 인간 FOLR1에 항체를 인코딩하거나 그러한 항체의 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RNA 형태 또는 DNA 형태일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 합성 DNA를 포함하며; 그리고 만약 단일 가닥이 코딩 가닥 또는 비-코딩 (안티센스) 가닥이 될 수 있으면 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리 뉴클레오티드의 cDNA 또는 하나 또는 그 이상의 내인성 인트론이 결여된 DNA이다.

[0210] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 비-자연발생 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드

는 제조함 생성된다.

- [0211] 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 단리된다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 순수하다. 몇몇의 구현예들에서, 폴리뉴클레오티드는 천연 성분으로부터 정제된다.
- [0212] 본 발명은 단리된 폴리뉴클레오타이드, 여기서 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열 식별 번호: 1-40으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리펩티드를 제공한다. 또한 제공되는 것은 서열 식별 번호: 1-40과 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0213] 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 숙주 세포로부터 폴리펩티드의 발현 및 분비를 돕는 상동한 리딩 프레임에 결합된 성숙한 폴리펩티드를 위한 코딩 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 세포에서 폴리펩티드의 수송을 제어하기 위한 분비 서열로서 작용하는 리더 서열). 리더 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 또한 전구 단백질(preprotein)이고 폴리펩티드의 성숙한 단백질을 형성하기 위하여 숙주 세포에 의해 절단되는 리더 서열을 가질 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 성숙한 단백질과 함께 5 '아미노산 잔기인 프로단백질에 대해 인코딩 할 수 있다. 프로 서열을 갖는 성숙 단백질은 프로단백질(proprotein)이고 단백질의 비활성 형태이다. 일단 프로 서열이 절단되면 활성 성숙한 단백질이 남아있다.
- [0214] 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 인코딩된 폴리펩티드의 정제를 가능케하는 마커 서열로의 상동한 리딩 프레임에 결합된 성숙한 폴리펩티드를 위한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 마커 서열은 박테리아 숙주의 경우에서 마커에 융합된 성숙한 폴리펩티드의 정제를 제공하기 위하여 pQE-9 벡터에 의해 공급된 헥사 히스티딘 태그일 수 있으며, 또는 마커 서열은 포유 동물 숙주 (예, COS-7 세포)를 사용되는 경우, 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유도된 헤마글루티닌 (HA) 태그일 수 있다.
- [0215] 또한, 본 발명은 추가로 예를 들어, 단편, 유사체 및 유도체를 인코딩하는 앞서 언급한 폴리뉴클레오티드의 변이체에 관한 것이다.
- [0216] 폴리뉴클레오티드 변이체는 코딩 영역, 비-코딩 영역 또는 둘 모두의 변화를 포함 할 수 있다. 일부 구현예에서 폴리 뉴클레오티드 변이체는 치환, 추가 또는 결실을 생성하는 변화를 함유하지만, 인코딩된 폴리펩티드의 특성이나 활성을 변경하지는 않는다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 변이체는 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여 침묵(silent) 치환에 의해 제조된다. 폴리 뉴클레오티드 변이체는 다양한 이유로, 예를 들어 특정 숙주를 위한 코돈 발현을 최적화하기 위해 (이. 콜라이와 같은 박테리아 숙주에 의해 선호되는 것들로 인간 mRNA에서 코돈 변화), 생성 될 수 있다.
- [0217] 본원에 기술된 벡터 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포가 또한 제공된다.
- [0218] V. 검출
- [0219] 샌드위치 ELISA 포맷을 사용하는 경우, 포획 항체가 표지되지 않을 것이다. 검출 항체가 직접적으로 표지되거나, 또는 간접적으로 제1 항체에 대해 지시된 제2 표지된 항체의 물 과량의 부가(과량 검출 항체를 세척 후)에 의하여 검출될 것이다. 검출에 사용되는 항체는 표지 FOLR1 항체의 결합을 방해하지 않는 임의의 검출 가능한 기능이다.
- [0220] 적절한 표지의 예로는 효소 등의 형광색소, 화학발광 및 방사성표지로서 직접 검출 될 수 있는 모이어티를 포함하는 면역 검정에서 사용되기 위한 것으로 알려진 많은 표지들 뿐만 아니라, 검출되기 위하여 반드시 반응 및 유도화되어야 하는 효소와 같은 모이어티이다. 그러한 표지의 예는 방사성 동위 원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 및 ^{131}I , 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체와 같은 형광소, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론, 루시페라아제, 예를 들어, 개뿔 벌레 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈아진디온, 홀스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리 포스파타아제, β -갈락토시다제, 글루코아미라제, 리소자임, 당류 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 탈수소 효소, 우리카제 및 산틴 옥시다제와 같은 헤테로시클릭 옥시다제를, 마이크로퍼옥시다제, 비오틴/아비딘, 비오틴/스트렙 타비딘, 비오틴/스트렙타비딘- β -갈락토스같은 염료 전구체를 산화시키기 위해 MUG, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 유리 라디칼과 함께 채용하는 효소와 결합되어, 포함할 수 있다. 전술한 바와 같이, 형광 검출은 하나의 예시이다.
- [0221] 기존의 방법은 단백질이나 폴리펩티드에 공유 결합된 표지를 결합할 수 있다. 예를 들면, 디알데히드, 카르보디이미드, 디말레이미드, 비스-이미데이트, 비스-디아조화된 벤지딘 등과 같은 커플링제는 상술한 형광, 화학발광

및 효소 표지를 갖는 항체를 태깅하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 3,940,475 (fluorimetry) and 3,645,090 (enzymes); Hunter et al. Nature 144:945 (1962); David et al. Biochemistry 13:1014-1021 (1974); Pain et al. J. Immunol. Methods 40:219-230 (1981); 및 Nygren J. Histochem. and Cytochem. 30:407-412 (1982)를 참고하라. 특정 구현예에서, 표지는 본원에서 증폭 및 민감도를 8 pg/ml로 증가시키기 위하여 형광이며, 더욱 바람직하게 신호를 증폭시키기 위한 스트렙타비딘-β-갈락토시다제를 갖는 비오틴이다. 특정 구현예에서, 비색성 표지가 사용되며, 예로, 여기서 검출 가능한 항체는 비오틴결합되며, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라 메틸 벤지딘이다.

[0222] 효소를 포함한 그러한 표지의 항체로의 접합은 면역검정 기술에서 당업자에게 표준 조작 절차이다. 예를 들어, O'Sullivan et al. "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, ed. J. J. Langone 및 H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166 를 참고하라.

[0223] 마지막 표지 항체의 부가 후, 결합된 항체의 양은 세척을 통해 과량의 미결합 표지된 항체를 제거하고, 레이블에 적절한 검출 방법을 이용하여 부착된 표지의 양을 측정하고, 측정된 양을 생물학적 시료에서 순환 종양 세포에 상에서 분비된 FOLR1 또는 FOLR1의 양으로 연관지음으로써 결정된다. 예를 들어, 효소의 경우에는, 현상 및 측정된 색의 양이 순환 종양 세포 상에 존재하는 분비된 FOLR1 또는 FOLR1의 직접적인 측정일 것이다. 특히, HRP이 레이블인 경우 색은 기질 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘을 450 nm의 흡광도에서 사용하여 검출 될 수 있다.

[0224] VI. 순환 종양 세포 검정

[0225] 본원에 기술된 항-FOLR1 항체는 순환 종양 세포 검정에서 FOLR1 검출을 위하여 사용될 수 있다. 순환 종양 세포 (CTC)는 종양 혈관으로 분비되고 혈류에서 순환하는 세포이다. CTC는 매우 낮은 농도로 순환에 존재한다. 일반적으로, CTC는 본 분야에 공지된 다양한 기술에 의해 환자의 혈액 또는 혈장에서 농축된다. CTC는 세포계측법 (예를 들면, 유동 세포 계측법)-기반의 방법 및 IHC-기반의 방법을 비제한적으로 포함하는, 본 분야에 알려진 방법을 사용하여 특이적 마커에 대해 염색될 수 있다. CTC는 정상적인 혈액 세포로부터 CTC의 식별 및 구별을 허용하는 종양 세포에 고유한 단백질 마커에 대해 염색될 수 있다. CTC는 FR1-9 및 FR1-13를 비제한적으로 포함하는 본 발명의 항체를 사용한 FOLR1에 대해 또한 염색될 수 있다. CTC 분석 또한 CTC 수의 정량 분석 및/또는 FOLR1 양성 CTC의 개수를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 본원에 기재된 FOLR1 항체는 CTC에서의 FOLR1 존재를 측정하기 위한 암을 가진 개체로부터 분리된 CTC를 염색하는데 사용될 수 있다. FOLR1 발현 CTC의 증가는 FOLR1 계 요법에 응하고 FOLR1 항체 또는 면역공액체로의 치료성 식이요법의 최적화를 가능케할 가능성이 큰 암을 갖는 대상체를 식별하는데 도움을 줄 수 있다. CTC FOLR1 정량은 종양의 단계에 대한 정보, 치료 및 / 또는 질병의 진행에 대한 응답을 제공할 수 있다. 이는 예후, 예측, 또는 약생화학적(pharmacodynamic) 바이오 마커로서 사용될 수 있다. 또한, 특정 마커에 대한 CTC의 염색은 비제한적으로 FOLR1를 포함하며, 액상 표본 단독으로 또는 추가적인 종양 마커 분석과 조합하여 사용될 수 있다.

[0226] VII. 키트

[0227] 편의상, 본 발명의 검정 방법은 키트 형태로 제공 될 수 있다. 그러한 키트는 다음의 기본 요소를 포함하는 패키지 조합이다: (a) 제1 시약, 이는 인간 FOLR1에 대한 모노클로 날 항체로 이루어진 포획 항체일 수 있다; 및/또는 (b) 검출 시약인 제2 시약. 검출 시약은 또한 FOLR1 모노클로 날 항체를 포함할 수 있을 뿐만 아니라 FOLR1에 결합된 검출가능한 (또는 표지된 표지된) 항체를 포함한다. 그러한 기본 요소는 상기 및 아래의 예에 정의되어 있다.

[0228] 일 구현예에서, 상기 제1 시약 및 상기 제2 시약은 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 FOLR1에 결합하는 폴리펩티드이며, 상기 제1 및 제2 시약은 상이한 항체, 그의 항원-결합 단편, 또는 폴리펩티드이다. 일 구현예에서, 제1 시약은 제2 FOLR1 시약 보다 상이한 FOLR1 에피토프에 결합한다. 일 구현예에서, 상기 제1 시약 또는 상기 제2 시약 어떤 것도 FOLR1으로의 결합으로부터 활성제 (예컨대 항체 huMov19를 포함하는 활성제 또는 그의 항원-결합 단편)의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는다.

[0229] 일 구현예에서, 상기 키트는 별도의 소자로서 제공되거나 포획 시약이 이미 고정화된 포획 시약을 위한 고정 지지체를 추가로 포함한다. 그러므로, 키트에 포획 항체는 고정 지지체에 부착 될 수 있거나, 이들은 키트에 포함 또는 키트는 별도로 제공되는 그러한 지지체 상에 고정화 될 수 있다.

[0230] 일 구현예에서, 상기 포획 시약은 마이크로티터 플레이트(microtiter plate) 상에서 코팅된다. 검출 시약이 직접적으로 검출된 항체이거나, 또는 상이한 종에서 봉기된 비표지된 항체에 대하여 지시된 표지된 항체에 의하여

검출된 비표지된 항체일 수 있다. 표지가 표지되지 않은 경우, 상기 키트는 효소에 의하여 요구된 기질 및 공동인자를 보통 포함하며, 여기서 상기 표지는 광 물질, 검출 가능한 발색단을 제공하는 염료 전구체이다. 검출 시약이 표지되지 않은 경우, 상기 키트는 예를 들어 형광계-검출된 포맷에서 비표지된 항체에 지시된 표지된 항체와 같은 검출가능한 항체의 검출 수단을 추가로 포함할 수 있다. 표지가 표지되지 않은 경우, 상기 키트는 효소에 의하여 요구된 기질 및 공동인자를 보통 포함하며, 여기서 상기 표지는 광 물질, 검출 가능한 발색단을 제공하는 염료 전구체이며, 여기서 상기 표지는 비오틴, 아비딘, 스트렙타아비딘, 또는 MUG로 HRP 또는 β -갈락토시다아제에 공액된 스트렙타아비딘과 같은 아비딘이다.

[0231] 일 구현예에서, 포획 시약은 FOLR1 항체 FR1-9 및 검출 시약은 FOLR1 항체 FR1-13이다. 또 다른 구현예에서, 상기 FR1-13은 비오틴결합된다.

[0232] 상기 키트는 전형적으로 항원 표준으로서 검정, 및/또는 FOLR1 단백질, 또는 그의 단편 (예로 FOLR1 외부 도메인 또는 FOLR1 외부 도메인 및 GPI의 결합 도메인의 전부 또는 일부) 수행을 위한 지침들, 뿐만 아니라 안정제, 세척 및 배양 완충제 등과 같은 다른 첨가제를 함유할 수 있다. 일 구현예에서, FOLR1 항원 표준은 FOLR1-Fc 면역접합체이다. 상기 키트는 또한 FOLR1 발현의 검출 및 스코어링을 위한 지침을 포함 할 수 있다.

[0233] 키트의 성분은 실질적으로 검정의 감도를 최대화하는 시약의 용액 농도를 제공하기 위해 적합하게 다양한 각종 시약의 상대적인 양으로, 소정의 비율로 제공 될 것이다. 특히, 시약은 용해사 테스트 할 표본을 결합하기 위한 적절한 농도를 갖는 시약 용액을 제공할 것인 부형제를 포함하는, 통상 동결건조된 건조 분말로서 제공될 수 있다.

[0234] 본 발명의 구현예들은 본 개시사항의 특정 항체의 구체적인 제조 및 본 개시사항의 항체를 사용하기 위한 방법을 기술하는 다음의 비제한적인 실시예들을 참조하여 추가로 정의될 수 있다. 많은 변형들이 본 개시사항의 범위로부터 벗어나는 것 없이 실시될 수 있다는 점이 본 분야의 숙련가들에게 명백할 것이다.

[0235] 실시예

[0236] 본원에 기재된 실시예 및 실시양태가 오직 예시적인 목적을 위한 것이고 이에 대한 다양한 변경 또는 변형이 본 분야의 당업자에게 제시되고 본원의 정신 및 이해범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0237] 실시예 1

[0238] 무린 항-FOLR1 항체의 개발

[0239] 두 개의 상이한 면역화/스크리닝 시리즈가 있었다. 제1 시리즈에서, 마우스는 대략 5×10^6 FOLR1-발현 KB 세포로 피하 면역화되었다 (American Tissue Culture Collection, ATCC CCL-17). 제2 시리즈에서, 표면에서 인간 FOLR1를 발현하는 300-19 세포는 마우스를 면역화하기 위하여 사용되었다. 이들 세포를 만들기 위해, 인간 FOLR1 아미노산 서열은 NCBI 홈페이지 (접수(accession) NP_057937)로부터 수득한 다음, 이를 pSRa 포유 동물 발현 벡터 내로 클로닝 촉진하도록 EcoRI 및 XbaI에 의하여 플랜킹된 블루 헤론 바이오기술에 의해 코돈 최적화 및 합성되었다. 300-19 세포, Balb / C 마우스 (Reth et al., *Nature*, 317:353-355 (1985))로부터 유도 된 예비 B 세포주를 세포 표면에서 안정적으로 높은 수준 발현하는 pSRa-FoIR1 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 예를 들면 ImmunoGen, Inc에서 사용되는 것과 같은, 당업자에게 공지된 표준 면역 프로토콜은 두 시리즈에 적용되었다. 면역화된 마우스는 3일간 하이브리도마 생성에 희생되기 전에 항원접종 하였다. 마우스의 비장과 같은 동물의 표준 프로토콜에 따라 수집하고 RPMI-1640 배지에서 단일 세포 현탁액을 수득하기 위하여 두 멸균 젯빛 현미경 슬라이드 간 조직을 분쇄하였다. 비장 세포를 폴리에틸렌 글리콜-1500을 사용하여 원심분리, 펠렛화, 세정하였으며, 그리고 예를 들어 P3X63Ag8.653와 같은 무린 골수종과 융합하였다 (Kearney et al., *J. Immunol.*, 123:1548-1550 (1979)). 융합된 세포를 하이포크산틴-아미노프테린-티미딘 (HAT) (시그마 H-0262)를 함유하는 RPMI-1640 선택 배지에 재현탁시키고, 5 % CO₂ 37 °C에서 96 웰 평면 바닥 배양 플레이트 (코닝-코스타 3596, 웰 당 세포 현탁액 0.2 ml)의 성장을 위하여 선정하였다. 배양 5 일 후에 배양 상청액 0.1 ml를 각 웰로부터 제거하고, 배지 함유 산틴 - 티미딘 (HT) 보충제 (시그마 H-0137) RPMI-1640 0.1 ml로 교체했다. 5 % CO₂ 37 °C에서의 인큐베이션은 하이브리도마 클론이 항체 스크리닝에 대한 준비가 될 때까지 계속되었다. 면역화 및 하이브리도마 생성의 다른 기술들이 사용될 수 있으며, 이는 Langone 등의 (Langone et al. (Eds., "Immunochemical Techniques, Part I", Methods in Enzymology, Academic Press, volume 121, Florida) 및 Harlow et al. ("Antibodies: A Laboratory Manual"; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988)) 문헌에 기재된 것들을 포함한다.

- [0240] 실시예 2
- [0241] 하이브리도마 스크리닝 및 선정
- [0242] 인간 FOLR1 및 KB 세포로 형질감염된 FOLR1-300-19 세포가 상응하게 스크리닝의 제1 및 제2 시리즈에 사용되었다. 하이브리도마로부터의 배양 상청액을 예컨대 FOLR1-발현 300-19 세포 또는 KB 세포 같은 FOLR1 양성 세포에 결합하고, 비-형질감염된 300-19 세포 같은 FOLR1 음성 세포에는 결합하지 않는 마우스 모노클로날 항체의 분비를 위한 유동 세포계측법에 의하여 스크리닝 하였다. 0.1 ml의 하이브리도마 상청액을 0.1 ml FACS 완충액 (2 % 정상 염소 혈청에 보충된 RPMI-1640 배지)에서 FOLR1-양성 세포 또는 비-형질감염된 300-19 세포 (표본당 1×10^5 세포)로 3시간 동안 인큐베이팅하였다. 이후, 세포들은 펠렛화되고, 세정되고, 그리고 1시간 동안 0.1 ml의 PE-공액된 염소-항-마우스 또는 염소-항-인간 IgG-항체로 인큐베이팅되었다 (예를 들어 잭슨 실험실(Jackson Laboratory)로부터 수득가능한 것과 같은 FACS 완충액에서 6 μ g/mL). 세포들은 다시 펠렛화되고, FACS 완충액으로 세정되며, 그리고 1% 포름알데히드를 함유하는 0.2 μ L의 PBS로 재현탁되었다. 세포-연관된 형광은 예를 들어, FACSCalibur 유동 세포계측기 또는 FACS 검정 유동 세포계측기를 사용하여 CellQuest Pro (모두 BD Biosciences, San Diego, US로부터의)를 사용하여 측정되었다. 양성 하이브리도마 클론을 희석 제한에 의하여 서브클로닝하였다. 각각의 하이브리도마에서 하나의 서브클론(subclone)은, 유동 세포 계측법에 의해 부모(parental) 세포와 FOLR1에 대해 상동한 반응성을 보였으며, 후속적인 분석을 위해 선택되었다. 안정적인 서브클론을 배양하고 각 분비 항-FOLR1 항체의 이소형은 상업적 이소유형 시약 (로슈 1493027)를 사용하여 확인 하였다. 무린 항체는 전술한 바와 같이 청소된 하이드로마 배지로부터 정제된 단백질 A였다. 이 항체는 FR-1 항체로 지정되었다.
- [0243] 하나의 클론, muFR1-13을 (1) 동시에 Mov19의 상동한 항원으로의 결합을 경쟁 또는 저해하지 않았고, (2) 일반적인 유동 세포 계측법 기술에 의하여 입증된 바와 같은 표적으로의 높은 결합 특이성을 가졌던 항-FOLR1 클론으로서 식별하였다(도 2a 및도 2b). 이러한 두 특성은 이 검정의 개발에서 필요하며, 그러므로 상기 검정에서 사용되기 위하여 클론 muFR1-13이 선택되었다.
- [0244] 나머지 64 항-FOLR1 클론 패널에서, 제2 항체가 muFR1-13에 대하여 필요했던 상동한 기준을 설정한 검정을 위하여 요구되었다. 또한, 상기 제2 항체는 같은 항원으로의 muFR1-13의 동시 결합을 경쟁 또는 방해할 수 없었다 (즉, Mov19, muFR1-13, 및 최종 클론은 모두 뚜렷하게 개별적인 에피토프를 가져야 한다). 이러한 조건을 만족시키기 위해, 경쟁 ELISA 실험을 일련의 65개의 클론 항-염산의 나머지 패널에 실시하였다(도 3a). 항체가 상동한 또는 입체적으로 유사한 에피토프를 공유할 경우, 신호의 감소가 관찰된다(도 3b). 이러한 방법을 사용하여, 64개의 시험물 중 5개의 항체는 Mov19과 경쟁하는 에피토프를 갖는 것으로 식별되었으며, 그러므로 추가적인 고려 대상에서 제거되었다.
- [0245] 동일한 방법으로 Mov19 공액된 비오틴을 공액된 muFR1-13 비오틴으로 치환하는 것이 반복되었다 (도 4). 이 방법을 사용하여, 6개의 추가 항원은 muFR1-13과 경쟁하는 에피토프를 갖는 것으로 식별되었으며, 그러므로 추가적인 고려 대상에서 제거되었다. 잔여 53개 클론 중에서, 13개의 클론이 불량한 친화도를 갖는 것으로 나타났고 고려 대상에서 제거되었다.
- [0246] 나머지 40 개의 클론을 도 1에 보여진 유사한 ELISA 포맷을 사용하여 스크리닝하였다. 40개의 클론을 대안적으로 다이어그램에서 muFR1-9 대신에, 검정 플레이트 상에 코팅하고, 생성된 결합 곡선은 도 5에서 보여진 바와 같이 분석하였다. 최하위 하프(half)-최대 반응 (EC50)을 함유했던 항체들은 FOLR1에 가장 높은 결합 특이성을 가지는 것으로 고려되었고, 따라서 분석을 위한 최고의 후보로서 선택되었다. 본 방법으로 검정된 상위 4개 클론의 결합 친화도는, 일단 신규하고 높은 질의 물질이 시험을 위하여 이용가능하면, $\sim 1-5 \times 10^{-9}$ M 범위이다.
- [0247] 실시예 3
- [0248] 무린 모노클로날 항체 정제
- [0249] 예시적인 항체는 단백질 A 또는 G 크로마토그래피(HiTrap 단백질 A 또는 G HP, 1 ml, Amersham Biosciences)와 같은 표준 방법을 사용하여 하이브리도마의 서브클론 상청액으로부터 정제하였다. 간단히, 상청액을 1 M 트리스/HCl 완충액, pH가 8.0의 1/10 용적의 부가에 의한 크로마토그래피를 위해 제조 하였다. pH의 조정된 상청액을 0.22 μ m 필터 막을 통해 여과하였고 결합 버퍼 (PBS, pH를 7.3)로 평형된 컬럼에서 로딩하였다. 열에 안정한 기준선 280 nm에서의 흡광도보다 높지 않게 수득될 때까지 결합 완충액으로 세척하였다. 항체는 0.5 mL/분의 유속을 사용하여, 0.15 M 염화나트륨, pH가 2.8를 함유하는 0.1 M 초산 완충액으로 용출시켰다. 대략 0.25 ml 단

위의 분획물을 수거하고, 1 M 트리스 / 염산, pH 8.0 1/10 용적의 부가에 의하여 중화시켰다. 피크 분획(들)을 1X PBS에 대해 하룻밤 투석하고 0.2 μ m 여과 막을 통해 여과에 의해 멸균 하였다. 정제된 항체를 흡광도 A₂₈₀에서 정량화하였다.

[0250] 실시예 4

[0251] 유동 계측법에 의한 결합 특성

[0252] 결합 특이성을 정제 된 항체를 사용하여 유동 세포 계측법으로 시험하였다. 각 항체를 FOLR1-발현 300-19 세포 또는 비-형질감염된 300-19 세포 (표본당 1×10^5 세포)로 0.1 ml FACS 완충액 (2 % 정상 염소 혈청에 보충된 RPMI-1640 배지)에서 3시간 동안 인큐베이팅하였다. 이후, 세포들은 펠렛화되고, 세정되고, 그리고 1시간 동안 0.1 ml 의 FITC-공액된 염소-항-마우스 또는 염소-항-인간 IgG-항체로 인큐베이팅되었다 (예를 들어 잭슨 실험실(Jackson Laboratory)로부터 수득가능한 것과 같은 FACS 완충액에서 6 μ g/mL). 세포들은 다시 펠렛화되고, FACS 완충액으로 세정되며, 그리고 1% 포름알데히드를 함유하는 200 μ L의 PBS로 재현탁되었다. 표본은 예를 들어, FACSCalibur 유동 세포계측기를 사용하여 HTS 멀티웰(multiwell) 샘플러 또는 FACS 검정 유동 세포계측기로 획득되었으며, CellQuest Pro (모두 BD Biosciences, San Diego, US로부터의)를 사용하여 분석되었다. 항-FOLR1 항체의 FACS 히스토그램은 형광 변화를 보여준 한편, 부모 300-19 세포는 그렇지 않았다. 또한, 세포주 중 하나가 단독으로 FITC 공액된 염소 항-인간 IgG 항체와 함께 배양했을 때, 유의한 변화는 형광 검출되지 않았다.

[0253] 실시예 5

[0254] muFR1-9과 FR1-53의 VL 및 VH 영역의 클로닝 및 시퀀싱

[0255] 총 세포 RNA를 5×10^6 하이브리도마 세포로부터 Rneasy 키트(QIAgen)를 사용하여 제조 업체의 프로토콜에 따라 제조하였다. cDNA를 슈퍼스크립트(SuperScript) II cDNA 합성 키트 (Invitrogen 사)를 사용하여 전체 RNA로부터 이후 합성하였다. 하이브리도마 세포로부터 유래 된 cDNA의 제1 라운드 비분화 PCR 반응을 위한 절차는 다음 문헌에 기재된 방법에 기초 하였다: Wang et al. (2000) J Immunol Methods Jan 13;233(1-2):167-77) 및 Co et al. (1992) J Immunol. Feb 15;148(4):1149-54)). VH 서열은 다음 비분화 프라이머를 사용한 PCR에 의하여 증폭되었다: EcoMH1 CTTCCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTC (서열 식별 번호:45), EcoMH2 CTTCCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (서열 식별 번호:41), 및 BamIgG1 GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTGGC (서열 식별 번호:42). VL 서열은 다음 퇴성 프라이머를 사용한 PCR에 의해 증폭하였다: SacIMK GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (서열 식별 번호:43) 및 HindKL TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (서열 식별 번호:44). (다음과 같이 혼합된 염기가 정의된다: N=G+A+T+C, S=G+C, Y=C+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T)

[0256] 이후, PCR 반응 혼합물은 1 % 저용융 아가로스(agarose) 겔상에서 수행되었으며, 300 내지 400 bp의 밴드가 Zymo DNA 미니 컬럼을 사용하여 절제, 정제되었으며, 그리고 Agencourt 생명 과학에 시퀀싱을 위하여 보내졌다. 각각의 5' 및 3' PCR 프라이머는 두 방향에서 가변 영역의 cDNA를 시퀀싱 시퀀싱 프라이머로 사용하였다. VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 VectorNTI 소프트웨어 DNA 시퀀싱 결과를 변환함으로써 수득하였다.

[0257] 예비 가변 영역의 cDNA 서열은 뮤린 항체 mRNA보다는 미분화 PCR 프라이머로부터 유래된 5' 말단 서열을 포함하였으며, 그러므로 마우스 항체 생식 계열 서열과의 서열 비교는 이러한 시퀀싱 작제물의 식별 및 제거를 용이하게 하였다. NCBI IgBlast 사이트 (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)는 예비 항체의 cDNA 서열 유래하고 프라이머 유도된 5' 말단 서열이 상응하는 생식계 서열로 교체되는 뮤린 생식계 서열을 검색하기 위해 이용되었다. 투명 가변 영역 서열을 이후 뮤린 카파 및 IgG1의 불변 영역 (각각 접수번호 AJ294736.1 및 D78344.1)을 위한 NCBI 참조 서열과 결합하여 전체 길이 뮤린 항체 서열을 조립하였다. 예상된 뮤린 FR1-9 및 FR1-53 경쇄 및 중쇄의 분자량을 산출하고, 액체 크로마토 그래피 / 질량 분광 분석 (LC / MS)에 의해 측정된 질량과 비교하였다.

[0258] 뮤린 FR1-9 경쇄를 시퀀싱하기 위한 초기 노력은, 상술한 방법에 따라, 성공적이지 못한 것으로 밝혀졌으며, 그래서 대안적인 방법이 채용되었다. FR1-9와 관련된 하이드로마의 경쇄 서열은 FR1-9 경쇄 프레임 워크의 추정 리더 서열에 어닐링하기 위하여 KS77LClead PCR 프라이머 (ttttgagctctggattccagcctccagaggt)를 설계하는데 사

용되었다. 이러한 리더 프라이머 PCR 반응 및 시퀀싱이 상술한 바와 같이 수행되었으며, LC / MS에 의해 측정된 FR1-9 경쇄 질량과 매칭되는 경쇄를 인코딩하는 완전한 cDNA 서열을 산출하였다.

[0259] 실시예 6

[0260] FOLR1 Fc 융합 대조군 표본

[0261] 인간 엽산 수용체 1 Fc 융합체 분자는 통상적으로 모유 유래의 인간 엽산 결합 단백질로 대체 가용성 항원 소스로서 작제하였다. 상기 번역화 예에 기재된 인간 FOLR1 cDNA 아미노 말단을, EcoRI 및 다이제스트의 Pst1 제한 전장 서열로부터 절제 하였다. 이 단편은 huFOLR1의 GPI 결합 사이트 (NCBI 수탁 NM_016731.2)의 스트림 최대 잔기 N 말단 신호 펩티드로부터 233개의 아미노산을 코딩하는 cDNA를 함유하였다. BamHI 올리고뉴클레오타이드 링커에 대한 Pst1은 pmuFc2ANL-EK 포유류 발현 플라스미드에서 뮤린의 IgG2a의 경첩, CH2 및 CH3 항체 불변 영역 서열 (NCBI 수탁 P01863)으로 인-프레임된 FOLR1 단편의 클로닝을 촉진하였다. 인간 FOLR1-Fc 융합 단백질은 그런 다음 HEK-293T 또는 CHO 세포와 같은 포유 동물 숙주 세포주의 일시적인 또는 안정한 발현에 의해 형질 감염시켰다. 475 아미노산의 융합 단백질은 뮤린 IgG2a 불변 영역을 포함하므로, 분자는 전술한 표준 뮤린 항체 정제 절차에 따라 정제하였다.

[0262] 실시예 7

[0263] 분비된 항원 ELISA 검정

[0264] 재료들이 예상대로 연속 수행되었다는 것을 보장하기 위해, 모든 항체는 본 분야에 공지된 방법, ELISA 및 유동 세포 계측법에 의한 결합을 위하여 스크리닝하였다. 유동 계측법을 당업계에 공지된 시험관 내 세포 배양 기술을 이용하여 T47D 세포를 발현하는 FOLR1를 사용하여 수행하였다. 항체는 이 세포에 결합되었고 및 팩스칼리버 (FACScalibur) 기계에 염소 항-뮤린 알렉사-블루 488 검출 항체를 이용하여 간접적으로 검출하였다 (도 6a-b). 동일한 방법으로 다른 항체에 적용되었고, 최종 선택된 항체들 FR1-13 및 FR1-9은 양 방법에 의하여 각각 대략 $1-3 \times 10^{-9}$ M 및 $2-4 \times 10^{-9}$ 의 결합 친화도를 보였다.

[0265] 검정은 오직 FOLR1를 검출하고, FOLR2 또는 특히 FOLR3 (일반적으로 인간 혈장에서 분비된 단백질로 발견)를 검출하지 않는 것이 중요하며, 이는 Mov19가 오직 FOLR1에 특이적이기 때문이다. 이를 확인하기 위하여, 상위 4개 클론은 상업적으로 이용 가능한 ELISA 키트 (도 7a-b)에 의해 스크리닝되었다. 양성 대조군 검출 항체는 FOLR2 또는 FOLR3의 검출을 나타내는 배경 위로 양성 신호를 나타낸다. 나머지 항체 (FR1-9, FR1-53, FR1-62, FR1-64, & Mov19)는 검정에서 신호를 생성하지 않으며, 그러므로 FOLR2 또는 FOLR3에 결합하지 않는다.

[0266] 추가로, FOLR1에 결합된 엽산의 존재는 잠재적으로 선택된 항체의 에피토프를 모호(obscure)하게 할 수 있다. 인간 혈액에서의 엽산의 생리화학적 양으로 FOLR1를 검출 할 것을 보장하기 위해, 엽산을 FOLR1 표준 정제 단백질로 사전-인큐베이팅하였고 검정 플레이트에 부가하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 엽산의 존재는 엽산 함유하지 않는 양성 대조군과 비교하였을 때 검정의 검출 친화도 상에서 무시할만한 영향을 미쳤다. 따라서, 상기 검정이 심지어 결합된 엽산의 존재에서 FOLR1를 검출할 수 있다고 결론 지었다.

[0267] 상위 4개 항체 클론(FR1-9, 53, 62, 또는 64) 중 어떤 것도 Mov19 또는 FR1-13의 결합에 간섭을 보이지 않았고, FOLR2, FOLR3 또는 엽산의 존재에서 어떠한 부정적 결합 특성도 관찰되지 않았으므로, 원래의 64개 클론의 이러한 4개의 후보는 검정에서 사용하기 위하여 생존하였다. 이러한 4개 클론 중, 이는 클론 FR1-9 및 FR1-53이 FR1-62 및 FR1-64에 비하여 더 높은 결합 친화도를 갖는다는 것이 측정되었다. 부모 하이브리도마로부터의 FR1-53 항체의 생성은 지속적으로 불량한 수율을 생성하였으며, 그러므로 클론 FR1-9는 항체 생성, 높은 항체 순도, 및 % 단량체의 용이성을 위하여 선택되었다.

[0268] 분석을 최적화 하기 위한 노력에서, FR1-9, 비오틴결합된 FR1-13, Strp-HRP의 농도 및 각각의 인큐베이션 시간이 FOLR1-Fc 융합 단백질을 항원 표준으로서 사용하여 최적화된 체계적인 접근이 사용되었다. FOLR1-Fc 융합은 huFOLR1 및 뮤린 IgG2A 경첩, CH2, CH3의 융합 펩티드이다. 최적 조건을 설정하기 위한 기준은 잡음 비율, 인간 혈장 표본에서의 최소 매트릭스 효과, 높은 반복성 및 정밀도 및 검출의 가장 낮은 하한치에 대한 높은 신호를 갖는 재현성 신호였다.

[0269] 보다 구체적으로, 상기 분석은 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ 의 $\mu\text{FR1-9}$ 로 분석 플레이트를 코팅함으로써 수행하였고 인큐베이팅 하였다. 비특이적 단백질로 차단한 후, 표본을 (표준 항원과 인간 혈장 표본을 포함) 인큐베이팅할 검정 플레이트에 부가하였다. 플레이트를 세척하고 $\mu\text{FR1-13b}$ 검출 항체 ($2 \mu\text{g} / \text{ml}$)을 각 웰에 첨가 하였다. 플레이트를 스트렙타빈 공액된 홀스래디쉬 퍼옥시다제 (1:5,000)의 물 과량을 첨가하기 전에 다시 세척 하였다. 플레이

트를 3,3', 5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 전에 다시 세정하고, 첨가 하였다. TMB는 표본에 존재하는 FOLR1의 양에 상응하는 강도로 청색을 형성하는 퍼옥시다제와 반응시켰다. 반응은 색이 황색으로 변할 때 산 함유 용액으로 중단시켰다. 검정은 이후 각 표본 (흡광도)의 발색 반응의 강도를 측정하는 SPECTRAmax 플레이트 판독기에서 판독되었다. 필요시, S 자형 용량-반응 (가변 경사) 곡선은 4PL 방정식: $Y = \text{하부} + (\text{상부} - \text{하부}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50}-X) * \text{힐 슬로프}(\text{Hill Slope}))})$ 를 모든 회색 시리즈에 사용하여 Graphpad Prism v5.04 소프트웨어로 생성되었다.

[0270] 최종 ELISA 형식의 적합성을 결정하기 위해, 인간의 난소 암 환자의 혈장과 비-종양 공급원의 인간 복수 표본을 시험 하였다. 복수 유체를 갖는 비-종양 갖는 환자에서, 15개 표본이 FOLR1의 존재를 위하여 분석되었다. 어떤 FOLR1도 모든 15개 표본의 검정에 의해 검출되지 않았으며, 어떤 위양성 반응도 매트릭스 효과로 인해 관찰되지 않았다 (도 9). 대안적으로, 이들 복수의 표본들을 추가로 인간 FOLR1 단백질을 정제하였고, 후속 검출을 수행 하였다. 상기 검정으로 측정된 FOLR1 단백질의 회수는 알려진 첨가량의 85 % 이상이었다 (도시 생략). 따라서, 표본의 회색이 심지어 없더라도 비-종양 관련 인간의 복수 유체에서 간접 단백질이 없었다고 추정되었다.

[0271] 같은 분석을 혼주(pooled) 정상인 혈장에서 수행하였다 (혼주된 것은 랫당 n=10 환자들이었다). 어떠한 내인성 FOLR1 분석으로는 검출되지 않았고, 어떠한 간접 단백질도 추가로 부가된 정제 huFOLR1-Fc 단백질을 갖는 인간 혈장의 회색되지 않은 표본에서 발견되지 않았다(도 10). 인간의 난소 암 플라즈마의 표본은 다나 파버(Dana Farber) 암 연구소 또는 매스 제네럴(Mass General) 병원에서 제공되었다. 지금까지 분석 된 표본 72개 중, 7개 표본이 0.7-30.6 nM의 범위의 범위로 FOLR1의 검출 가능한 수준을 가지는 것으로 확인되었다. 이 데이터의 대표적인 분석은 도 11에 나타난다. 본원에서, 8개 표본 중 3개는 각각 표본 PB105, PB106 및 PB109에 대한 0.74, 0.91 및 30.6 nM의 FOLR1의 검출가능한 수준이 함유되었다. huFOLR1-Fc를 사용하여 생성된 관련 표준 곡선 데이터의 보간을 위한 방법은 도 12에 도시된다.

[0272] 실시예 8

[0273] 순환 종양 세포 검정

[0274] FOLR1 발현의 다양한 수준을 갖는 3개 세포주가 높은 발현 (KB), 낮은 발현 (OVCAR3), 및 발현 없음 (A549)으로서 선정되었다. 비표지된 FR1-9 및 FR1-13뿐만 아니라 상업적 항-FOLR1 항체 ("상용 FRA")를 적정하고, 최적의 적정은 선택된 셀 (LSC) 검출 레이저 스캐닝 계측법을 사용하여 항체를 각각 측정 하였다. 형광은 평균 형광 강도 (MFI)로 측정되었고, 도 13에 도시된다. 3개 항체 모두가 KB 세포에서 엽산 수용체의 발현을 보였다. 최적의 회색은 다음과 같이 각각의 항체에 대해 확인되었다: 상업적 FRA에 있어 1:5, muFR1-9에 있어 1:100, 및 muFR1-13에 있어 1:200. 시험된 항체 중, 상기 상업적 항체는 배경 비율 (8.0 대 4.07 (muFR1-9) 및 4.19 (muFR1-13))에 대해 가장 좋은 신호를 주었으며, 그러나 오직 muFR1-9만이 OVCAR3 세포에서 (A549 세포 보다 대략 30% 더 많은 신호)를 보여주었다. 도 14를 참고하라.

[0275] MGN853로의 치료 또는 효능을 모니터링하는 것을 포함하는 적용에 있어서, CTC 검정에서 사용하기 위해 선택된 항체는 FOLR1로의 결합을 위하여 IMG853 (즉, huMov19 (M9346A))의 항체 성분과 경쟁하지 않아야 한다. 경쟁 검정은 임의의 항체가 FOLR1로의 결합을 위해 IMG853와 경쟁하는 항체 중 임의의 것인지 측정하기 위하여 수행 되었다. 이러한 검정의 경우, A549 (음성)과 KB (높은 발현자) 세포는 M9346A 항체 또는 비히클 단독으로 처리 하였다. 세포를 세척한 후, 각각의 세 항체로 염색하고, 발현은 LSC로 분석하였다. 결과를 도 15에 도시한다. 연한 막대 (왼쪽)는 비히클 단독을 나타내고, 어두운 막대 (오른쪽)은 IMG853 처리된 세포를 나타낸다. 치료성 IMG853과의 경쟁이 존재한다면, KB 세포에서 어두운 막대 (우측)은 연한 막대 (왼쪽)보다 낮을 것이다. 도 15의 결과는 상업적인 FRA 항체가 IMG853와의 결합을 위하여 경쟁한다는 것 (FRA 신호에서 ~66 % 감소)을 보여주며, 한편 muFR1-9 및 muFR1-13 항체는 IMG853 처리에 영향받지 않았다.

[0276] 종합하면, 이들 결과는 muFR1-9 및 muFR1-13이 IMG853과 경쟁하지 않았다는 것을 입증하며, 이로써 IMG853 치료 후에 체액 (예 : 혈액 또는 혈장), 순환 종양 세포, 또는 조직 표본에서 FOLR1 수준을 모니터링하는 검정에 사용되기 위한 더욱 바람직한 후보임을 보여주었다. 또한 muFR1-9은 더 민감하고 낮은 수준의 발현을 분석했고 이러한 유형의 바람직한 후보 항체 OVCAR3 세포에서의 발현을 검출하는 독특한 능력을 보여 주었다.

[0277] 실시예 9

[0278] NSCLC 및 난소암 환자로부터 단리된 순환 종양 세포 (CTC)에서의 FOLR1의 검출

[0279] 혈액 표본은 다음의 시점에서 NSCLC 난소 암 또는 암 환자로부터 채득되었다: 스크리닝 (기준선까지 28일 이하); 기준선; 주기 3 이전; 및 주기 4의 종료. CTC는 표본으로부터 농축되었으며, 상기 실시예 8에서 기술된 항

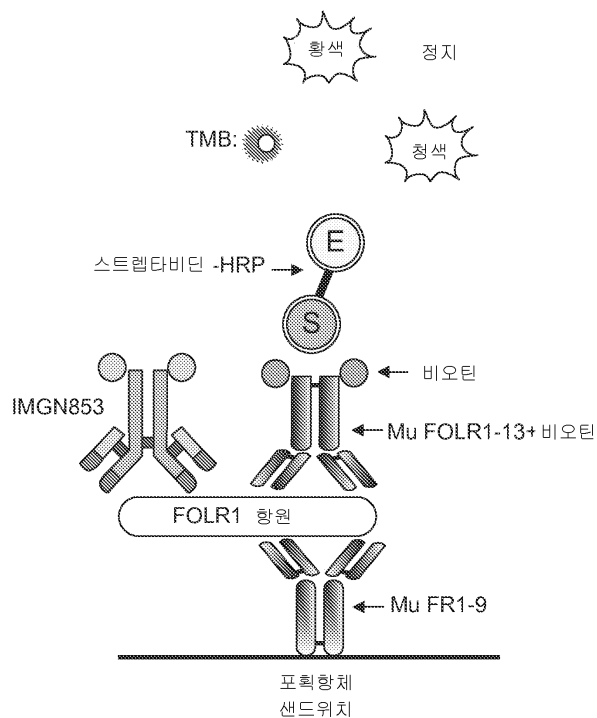
체 및 희석을 사용하여 CK, CD45, 핵, 및 FOLR1에 대해 염색되었다. CTC의 개수 (즉, CK + / CD45- 유핵 세포), CK-/ CD45- 유핵 세포의 수에 CTC FOLR1의 발현, CK-/ CD45- 유핵 세포의 수 및 FOLR1 포지티브 핵분열 CTC 및 CK-/ CD45- 핵 세포는 각각의 표본에 대한 LSC에 의해 결정된다. 데이터는 IMGN853 용 상 I 임상 시험 동안 다양한 시점에서의 CTC에서의 FOLR1 발현 수준을 측정하는데 사용된다.

[0280]

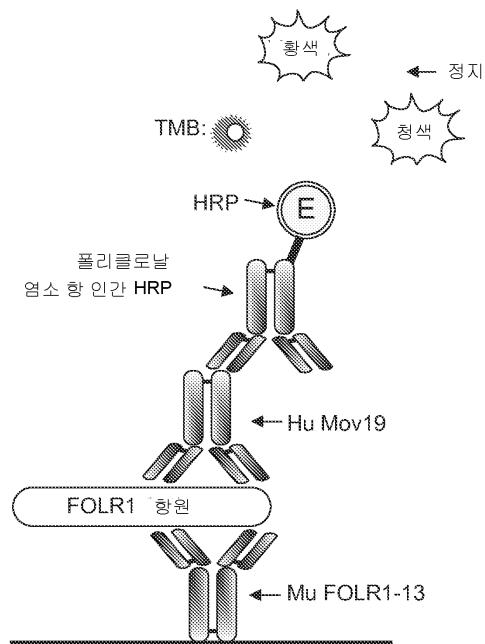
본원에 언급된 모든 공보, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트, 및 접수 번호/데이터베이스 서열(폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열)은 각각의 개별적인 공보, 특허, 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 그리고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함되어 있다.

도면

도면1

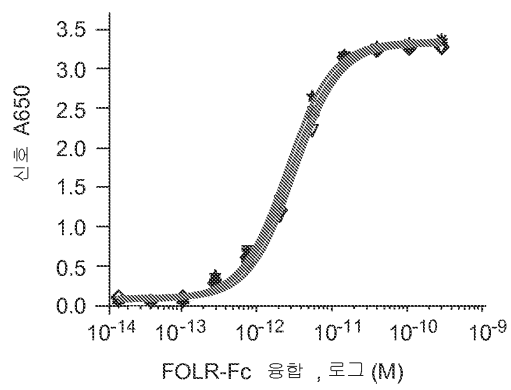


도면2a

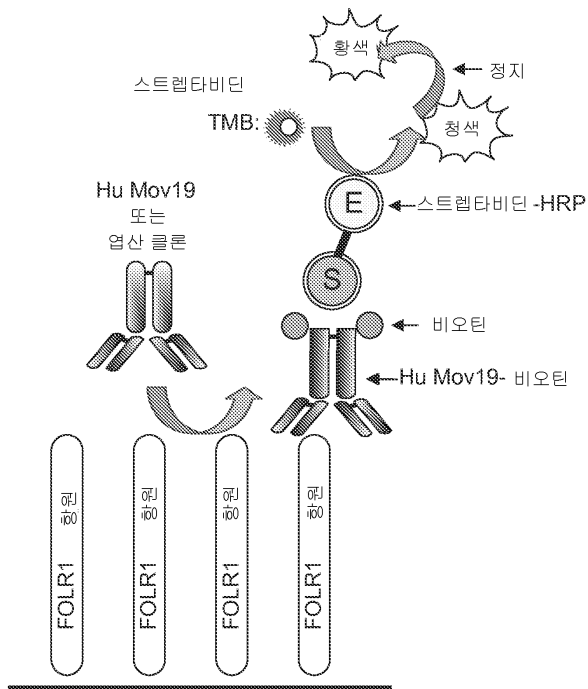


도면2b

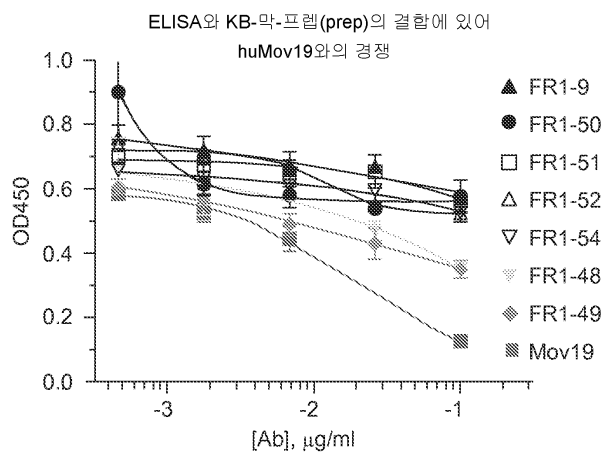
샌드위치 ELISA에 의하여 결정된
muFR1-13의 결합 친화도의 측정



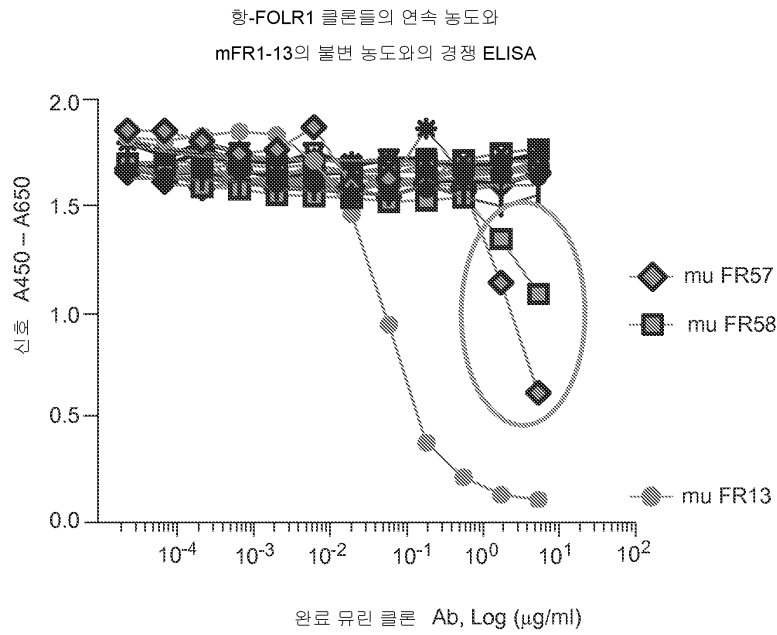
도면3a



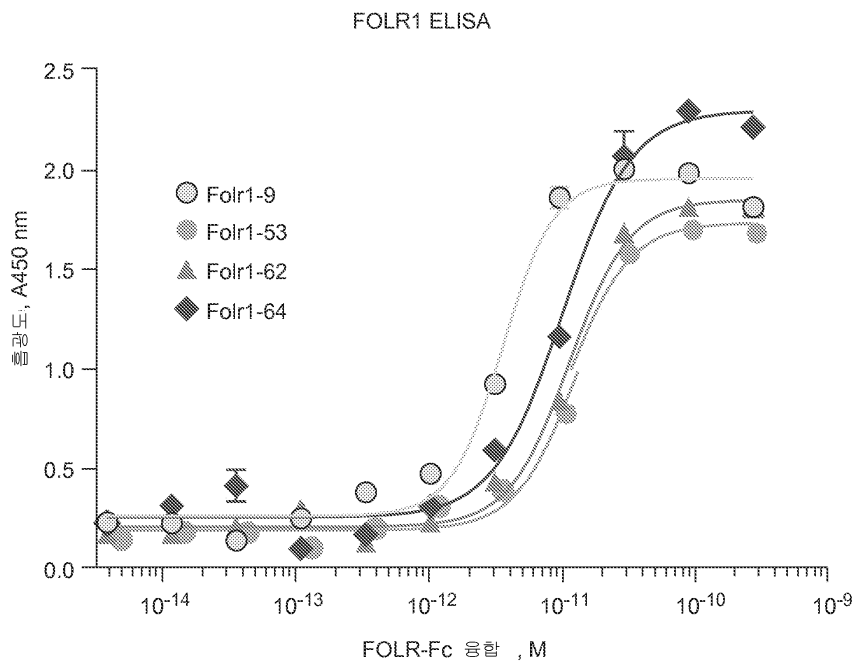
도면3b



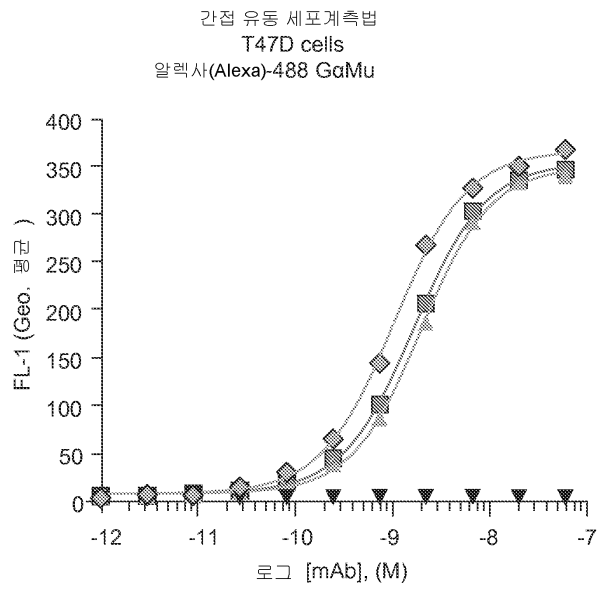
도면4



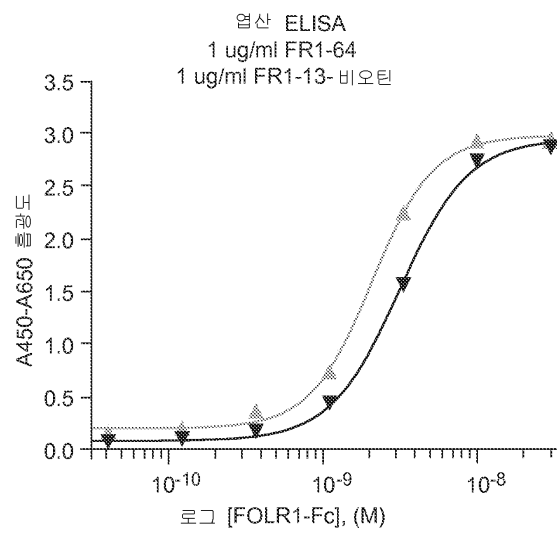
도면5



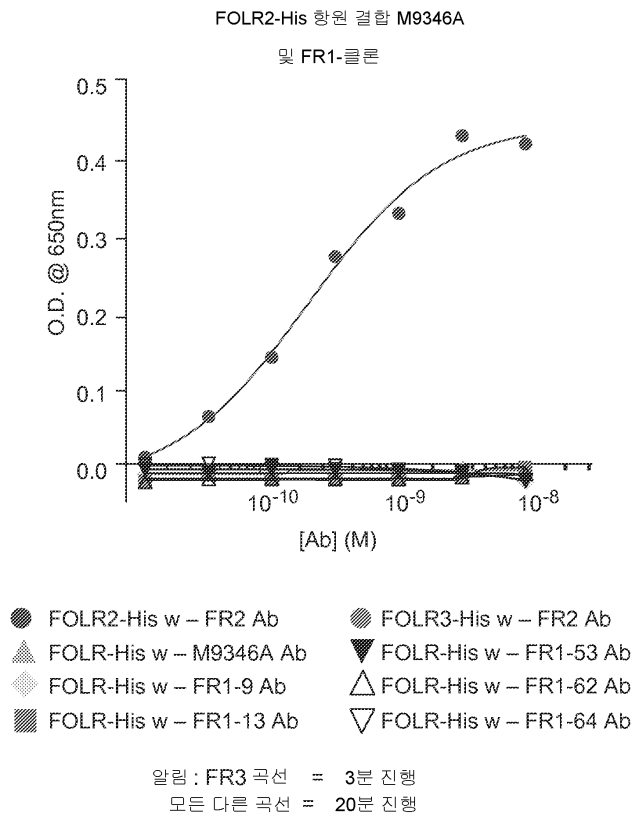
도면6a



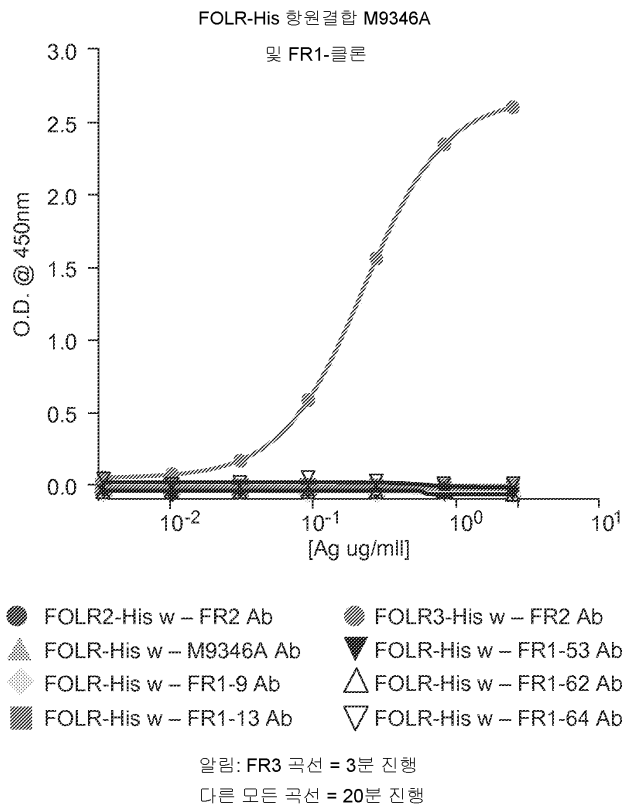
도면6b



도면7a

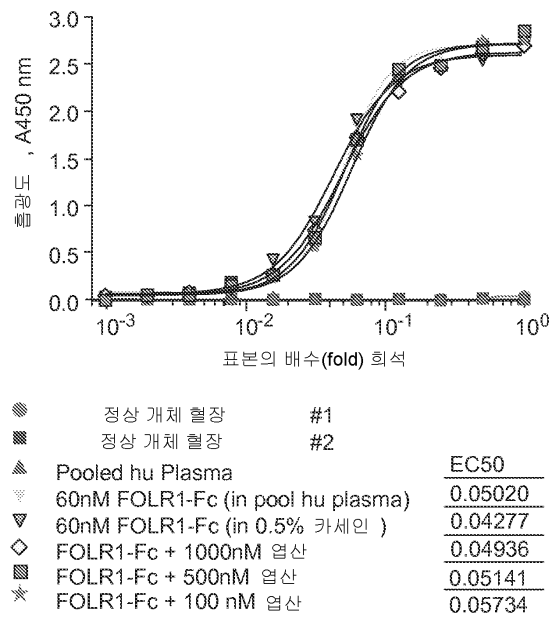


도면7b



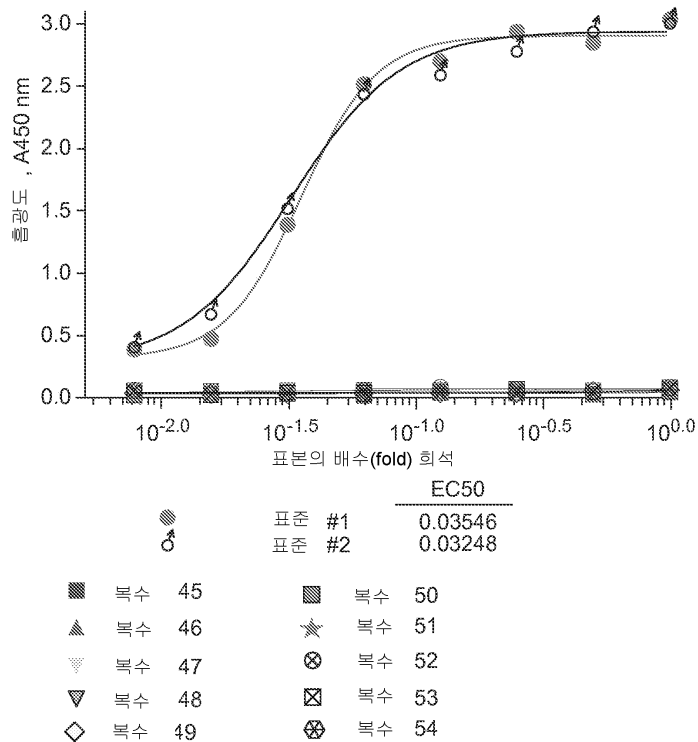
도면8

FR1-19 및 FR1-13의 결합상에서의 염산의 효과

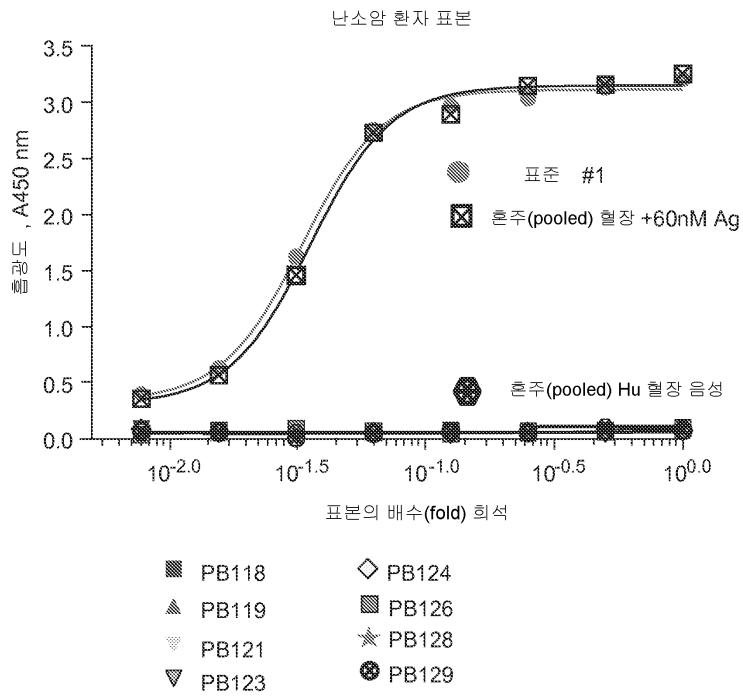


도면9

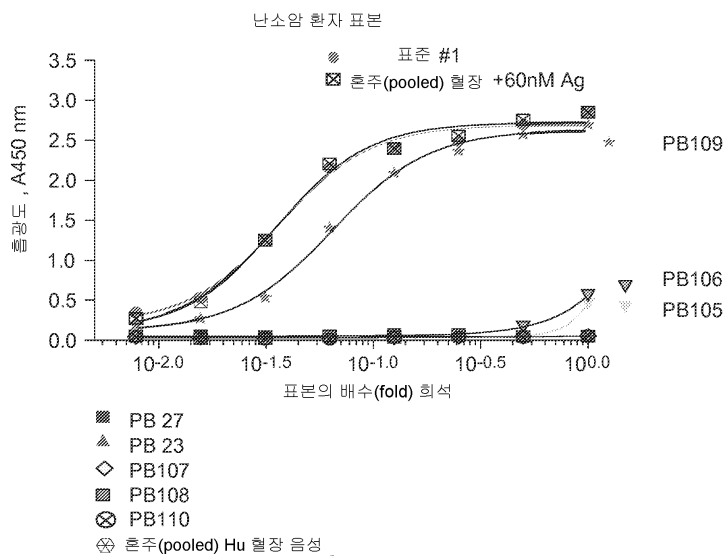
인간 복수(Ascites) 표본을 갖는 FOLR1 샌드위치 ELISA



도면10



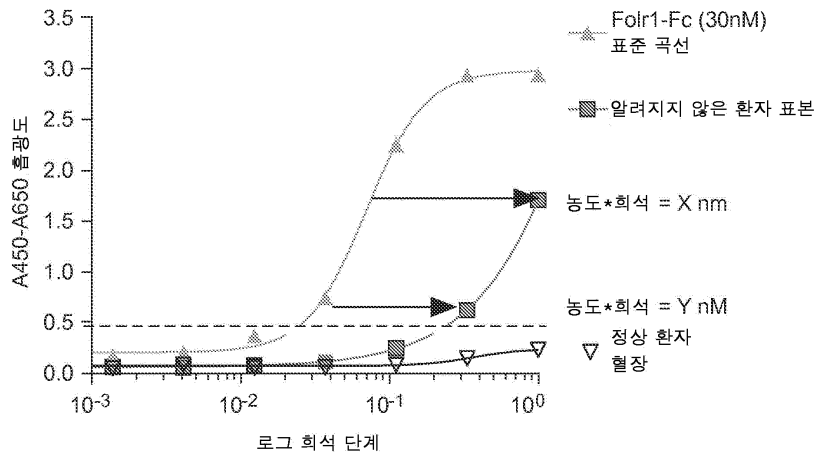
도면11



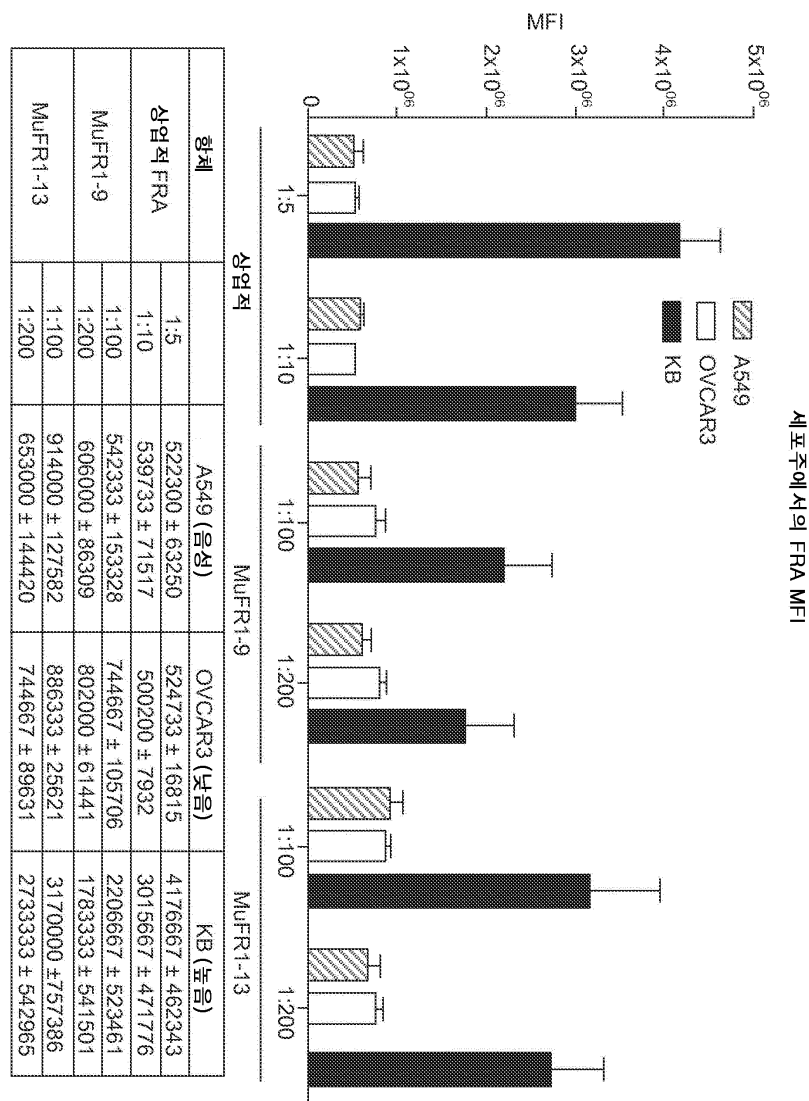
표본	표준					보관된 FcγR1-Fc	회수	%CV
	Y-값	로그 (x)	x	Conc	Dil 인자			
PB105	0.4536	-1.90938	0.01232	0.74 nM	1	0.74 nM	0.74 nM	N/a
PB106	0.5628	-1.82047	0.015119	0.91 nM	1	0.91 nM	0.91 nM	N/a

도면12

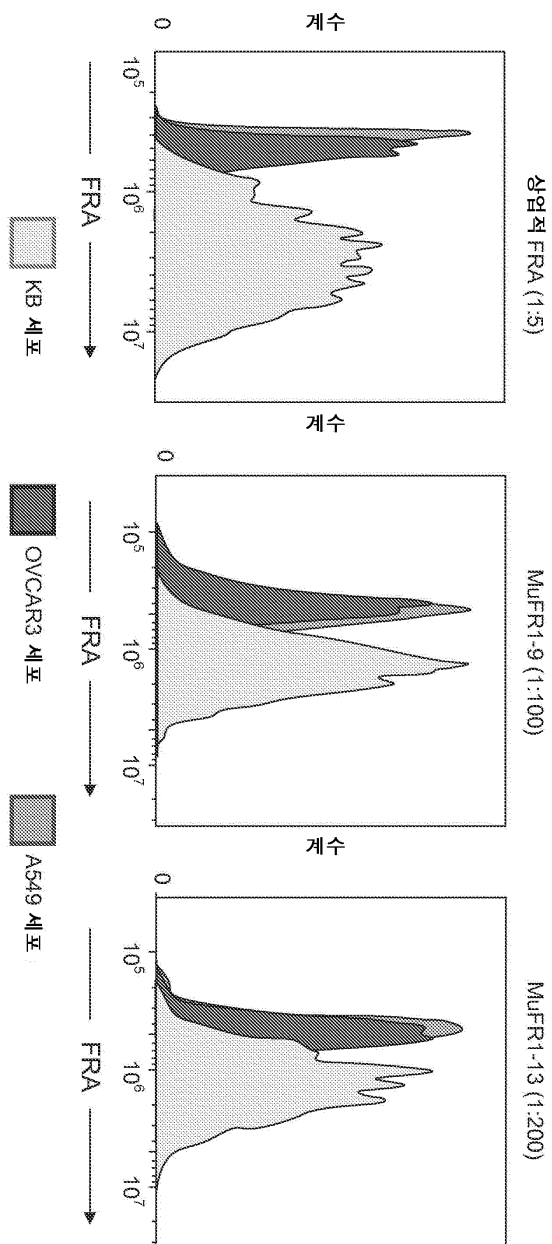
알려지지 않은 환자 표본의 제안된 산출:



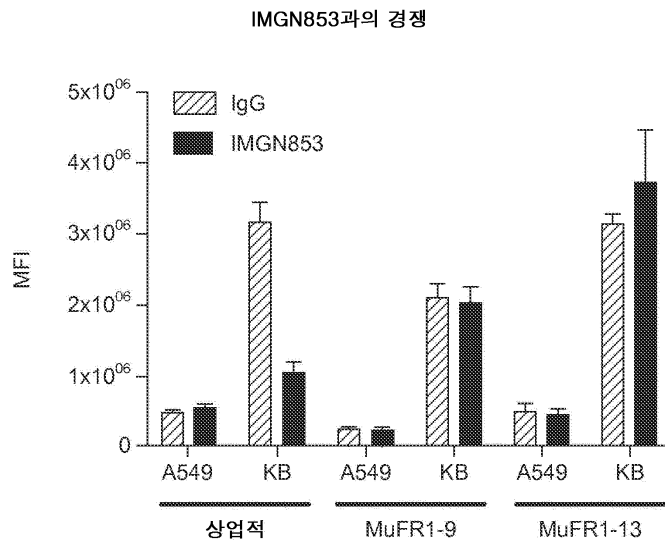
도면13



도면14



도면15



항체	세포	처리	
		IgG (MFI)	IMGN853 (MFI)
상업적 FRA	A549	458333 ± 36085	524333 ± 62307
	KB	3173333 ± 298124	1006333 ± 195297
MuFR1-9	A549	224667 ± 27936	221667 ± 32380
	KB	2076667 ± 202759	2010000 ± 225167
MuFR1-13	A549	459000 ± 129230	404667 ± 117689
	KB	3113333 ± 190117	3726667 ± 768339

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> TESTA, NATHAN E.
 CARRIGAN, CHRISTINA N.
 AB, OLGA
 TAVARES, DANIEL
 WOLF, BENI B.
- <120> Diagnostic Assays and Kits for Detection of Folate Receptor 1
- <130> 2921.037PC02/EKS/CLD
- <140> To be assigned
- <141> Herewith
- <150> 61/695,791
- <151> 2012-08-31

<150> 61/756,254

<151> 2013-01-24

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> muFR1-9 (VH-CDR1)

<400> 1

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-9 (VH-CDR2)

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-9 (VH-CDR3)

<400> 3

Glu Leu Thr Gly Thr Phe Ala Tyr

1 5

<210

> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-13 (VH-CDR1)

<400> 4

Arg Tyr Ser Val His

1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-13 (VH-CDR2)

<400> 5

Met Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Val Phe Lys Ser

1 5 10 15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-13 (VH-CDR3)

<400> 6

Phe Asp Gly Lys Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53 (VH-CDR1)

<400> 7

Asp Tyr Asp Ile Ser

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53 (VH-CDR2)

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53 (VH-CDR3)

<400> 9

Ser Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-62 (VH-CDR1)

<400> 10

Thr Tyr Thr Met His

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-62 (VH-CDR2)

<400> 11

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

1 5 10 15

Glu

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-62 (VH-CDR3)

<400> 12

Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Arg Pro Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-9 (VL-CDR1)

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn Leu His

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-9 (VL-CDR2)

<400> 14

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-9 (VL-CDR3)

<400> 15

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Gln Val Thr

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-13 (VL-CDR1)

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> muFR1-13 (VL-CDR2)

<400> 17

Tyr Ala Tyr Asn Arg Tyr Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-13 (VL-CDR3)

<400> 18

Gln Gln Asp His Ser Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53 (VL-CDR1)

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53 (VL-CDR2)

<400> 20

Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53 (VL-CDR3)

<400> 21

Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-62 (VL-CDR1)

<400> 22

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-62 (VL-CDR2)

<400> 23

Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-62 (VL-CDR3)

<400> 24

His Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5
 <210> 25
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> muFR1-9HCvar
 <400> 25
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Phe Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Leu Thr Gly Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> muFR1-13HCvar
 <400> 26
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr

20 25 30
 Ser Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Val Phe Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Asn Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Thr Phe Asp Gly Lys Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115
 <210> 27
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> muFR1-53HC
 <400> 27
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

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

100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> muFR1-62HC
 <400> 28

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

Lys Glu Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Arg Pro Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-9LCvar
 <400> 29

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Gln
 85 90 95
 Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 30

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-13LCvar

<400> 30

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Thr Gly

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser

65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp His Ser Ser Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53LC

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-62LC

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Ile Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile

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

 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 33
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> muFR1-9HC
 <400> 33
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

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

 Ala Lys Glu Leu Thr Gly Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys

130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160

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

 Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240
 Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
 245 250 255
 Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
 260 265 270
 Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

 Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
 290 295 300
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
 305 310 315 320
 Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
 325 330 335
 Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
 340 345 350

 Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro
 355 360 365
 Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
 370 375 380

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val
 385 390 395 400
 Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
 405 410 415

 Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
 420 425 430
 Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 34
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> muFR1-13HC
 <400> 34
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr

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

 85 90 95
 Thr Phe Asp Gly Lys Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
 130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr

180 185 190

Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser

195 200 205

Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile

210 215 220

Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn

225 230 235 240

Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp

245 250 255

Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp

260 265 270

Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn

275 280 285

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn

290 295 300

Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp

305 310 315 320

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro

325 330 335

Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala

340 345 350

Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys

355 360 365

Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile

370 375 380

Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp

385 390 395 400
Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys

 405 410 415
Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys

 420 425 430
Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile

 435 440 445
Ser Arg Ser Pro Gly Lys

450

<210> 35

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53HC

<400> 35

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr

 20 25 30
Asp Ile Ser Trp Val Leu Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45
Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Glu Arg Phe

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

 100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val

130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380
 Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly

 385 390 395 400
 Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu

 405 410 415
 Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn

 420 425 430
 His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

 435 440 445
 <210> 36
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><
 223> muFR1-62HC
 <400> 36
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Asn Pro Thr Ser Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Lys Glu Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Arg Pro Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

 Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255

 Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300
 Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

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

370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser
385 390 395 400
Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
405 410 415
Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430
His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 37

<211

> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-9LC

<400> 37

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Gln
85 90 95
Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala
100 105 110
Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser

115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
130 135 140
Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160
Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190
Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215
<210> 38
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> muFR1-13LC
<400> 38
Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Thr Gly
1 5 10 15
Asp Arg Phe Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30
Val Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Tyr Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp His Ser Ser Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

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

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-53LC

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> muFR1-62LC

<400> 40

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys His Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly

115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EcoMH2

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> n is A, C, G, or T

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> s is G or C

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> m is A or C

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> r is A or G
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> w is A or T
 <400> 41
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 42
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BamIGl
 <400> 42
 ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt ttggc 36

<210> 43
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SacIMK
 <220><221> misc_feature
 <223> (1)..(31)
 <220><221> misc_feature
 <223> (1)..(31)
 <220><221> misc_feature
 <223> (1)..(31)
 <220><221> misc_feature
 <223> (1)..(31)
 <220><221> misc_feature
 <223> (1)..(31)
 <400> 43
 ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a 31

<210> 44

<211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HindKL
 <400> 44
 tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc 46
 <210> 45
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EcoMH1
 <220><221> misc_feature
 <223> (1)..(31)
 <220><221> misc_feature
 <223> (1)..(31)
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(31)
 <223> n is A, C, G, or T
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> s is G or C
 <400> 45
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32
 <210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> huMov19 vHC
 <400> 46
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vLCv1.00

<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 Asn Ile Ser
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vLCv1.60

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 49

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu

245 250 255

Ser