

ÖZET**FOLR1 KANSER TERAPİSİNİN ETKİNLİĞİNİ ARTTIRMAK İÇİN YÖNTEMLER**

İnsan folat reseptörü 1'i hedef alan kanser terapilerinin başarısını iyileştirmek için yöntemler sağlanı. İlaveten, yöntemlerde yararlı olan reaktifleri içeren kitler sağlanı.

İSTEMLER

1. Bir süjede kanser terapisinde kullanılması için bir anti-Folat reseptörü 1 (FOLR1) antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada söz konusu süjeden alınan bir kanser örneğinde FOLR1 geninin veya proteininin bir artmış ekspresyonu, bir veya birden fazla referans örnekte boyama yoğunluğuna veya boyama tekdüzeliğine kıyasla bir FOLR1 eksprese eden kanser örneğinde boyama yoğunluğunu veya boyama tekdüzeliğini ayırt eden bir saptama yöntemi kullanılarak saptanmıştır, burada bir anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı ile kanser terapisinin etkinliği bu yolla artırılmıştır; burada, kanser terapisinde kullanılması için anti-FOLR1 antikoru aşağıdakileri içerir:

(i) SEQ ID NO: 3 amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken alanı(huMov19 vHC) ve SEQ ID NO: 4 amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken alanı(huMov19 vLCv1.00) veya

(ii) SEQ ID NO: 3 amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken alanı(huMov19 vHC) ve SEQ ID NO: 5 amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken alanı(huMov19 vLCv1.60); ve burada kanser terapisinde kullanılması için anti-FOLR1 immünokonjugatı bir anti-FOLR1 antikoru, bir bağlayıcı ve bir sitotoksin içerir, burada anti-FOLR1 immünokonjugatının anti-FOLR1 antikoru aşağıdakileri içerir:

(i) SEQ ID NO: 3 amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken alanı(huMov19 vHC) ve SEQ ID NO: 4 amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken alanı (huMov19 vLCv1.00) veya

(ii) SEQ ID NO: 3 amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken alanı(huMov19 vHC) ve SEQ ID NO: 5 amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken alanı (huMov19 vLCv1.60).

2. İstem 1'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat olup, burada kanser terapisinde kullanılması için anti-FOLR1 antikorunun hafif zincir değişken alanı SEQ ID NO: 5 amino asit dizisini (huMov19 vLCv1.60) içerir, özel olarak burada kanser terapisinde kullanılması için anti-FOLR1 antikoru (i) Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) ile PTA-10772 olarak depolanan plazmid tarafından şifrelenen ağır zincirin amino asit dizisi ile aynı amino asit dizisini içeren bir ağır zincir ve (ii) ATCC ile PTA-10774 olarak depolanan plazmid tarafından şifrelenen hafif zincirin amino asit dizisi ile aynı amino asit dizisini içeren bir hafif zincir içerir ve burada, anti-FOLR1 immünokonjugatının anti-FOLR1 antikorunun hafif zincir değişken alanı, SEQ ID NO: 5 amino asit dizisini (huMov19 vLCv1.60) içerir, özel olarak burada kanser terapisinde kullanılması için anti-FOLR1 immünokonjugatının anti-FOLR1 antikoru (i) Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) ile PTA-10772 olarak depolanan plazmid tarafından şifrelenen ağır zincirin amino asit dizisi ile aynı amino asit dizisini içeren bir ağır zincir ve (ii) ATCC ile PTA-10774 olarak depolanan plazmid tarafından şifrelenen hafif zincirin amino asit dizisi ile aynı amino asit dizisini içeren bir hafif zincir içerir.
3. İstem 1'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat olup, burada saptama yöntemi immünohistokimya (IHC), özel olarak burada söz konusu IHC, FOLR1 ekspresyonunun farklı düzeylerini ayırt edebilen kalibre edilmiş IHC'dir.
4. İstem 3'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat olup, burada saptama yöntemi fokal FOLR1 dağılımına (boyanmış hücrelerin < %25'i), heterojen FOLR1 dağılımına (boyanmış hücrelerin %25-75'i) veya homojen FOLR1 dağılımına (boyanmış hücrelerin > %75'i) sahip olan örnekler için boyama tekdüzeliğinin bir aralığı üretir.
5. İstem 1'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat olup, burada saptama yöntemi bir referans örneğine

kıyasla bir FOLR1 eksprese eden kanser örneğinde boyama yoğunluğunu ve boyama tekdüzeliğini ayrt eder.

- 5 6. İstem 5'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada kanser örneği IHC ile, özellikle bir formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüş örnek üzerinde IHC ile, FOLR1 ekspresyonu için heterojen veya homojen olan bir boyama tekdüzeliğine ve 1, 2, 3 veya 3+ olan bir boyama yoğunluğu skoruna sahiptir.
- 10 7. İstem 5'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada kanser örneği IHC yoluyla FOLR1 ekspresyonu için 1 veya daha büyük olan bir boyama yoğunluğu skoruna sahiptir, özel olarak
- 15 a) burada kanser örneği FOLR1 ekspresyonu için heterojen olan bir boyama tekdüzeliğine sahiptir;
- b) burada kanser örneği FOLR1 ekspresyonu için homojen olan bir boyama tekdüzeliğine sahiptir;
- 20 c) burada kanser örneğinin hücrelerinin %25-75'i FOLR1 ekspresyonu için boyanır; veya
- d) burada kanser örneğinin hücrelerinin %75'inden fazlası FOLR1 ekspresyonu için boyanır.
- 25 8. İstem 7'ye göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada kanser örneği IHC yoluyla FOLR1 ekspresyonu için 2 veya daha büyük olan bir boyama yoğunluğuna sahiptir, özel olarak
- 30 a) burada kanser örneği FOLR1 ekspresyonu için heterojen olan bir boyama tekdüzeliğine sahiptir;
- b) burada kanser örneği FOLR1 ekspresyonu için homojen olan bir boyama tekdüzeliğine sahiptir;
- c) burada kanser örneğinin hücrelerinin %25-75'i FOLR1 ekspresyonu için boyanır; veya

d) burada kanser örneğinin hücrelerinin %75'inden fazlası FOLR1 ekspresyonu için boyanır.

- 5 9. İstem 1'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada IHC manüel olarak veya bir otomatikleştirilmiş sistem kullanılarak gerçekleştirilir.
- 10 10. İstem 1'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada söz konusu referans örnek bir pozitif referans örnektir veya bir negatif referans örnektir, özel olarak burada söz konusu referans örnek hücreler, hücre peletleri veya doku içerir.
- 15 11. İstem 1'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada saptama yöntemi FOLR1 ekspresyonunu antikor BN3.2 ile saptamayır içerir.
- 20 12. İstem 1'e göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada süje aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir kansere sahiptir: ovaryan kanser, endometriyal kanser, peritoneumun kanseri veya akciğer kanseri.
- 25 13. İstemler 1 ila 12'den herhangi birine göre kullanılması için anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada anti-FOLR1 immünokonjugatının bağlayıcı sitede aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: bir yarılabilir bağlayıcı, bir yarılamayan bağlayıcı, bir hidrofilik bağlayıcı ve bir dikarboksilik asit temelli bağlayıcı.
özellikle, burada söz konusu bağlayıcı aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)pentanoat (SPP); N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)-2-sülfopentanoat (sülfo-SPP); N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)bütanoat (SPDB); N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)-2-sülfobütanoat (sülfo-SPDB); N-süksinimidil 4-(maleimidometil) sikloheksankarboksilat (SMCC); N-sülfosüksinimidil 4-(maleimidometil) sikloheksankarboksilat (sülfoSMCC); N-süksinimidil-4-(iyodoasetil)-
- 30

aminobenzoat (SIAB) ve N-süksinimidil-[(N-maleimidopropiyonamido)-tetraetilenglikol] ester (NHS-PEG4-maleimid).

14. İstem 13'e göre kullanılması için, anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat olup, burada anti-FOLR1 immünokonjugatın bağlayıcısı N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)-2 sülfobütanoatı (sülfo-SPDB'dir).

15. İstem 13'e göre kullanılması için, anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat olup, burada anti-FOLR1 immünokonjugatın sitotoksik ajan aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: bir maytansinoid, maytansinoid analogu, benzodiazepin, taksoid, CC-1065, CC-1065 analogu, duokarmisin, duokarmisin analogu, kalışeamisin, dolastatin, dolastatin analogu, auristatin, tomaymisin türevi ve leptomisin türevi veya ajanın bir ön-ilacı, özellikle, burada söz konusu sitotoksik ajan bir maytansinoiddir, özellikle, burada söz konusu sitotoksik ajan, N(2')-deasetil-N(2')-(3-merkapt-1-oksopropil)-maytansindir (DM1) veya N(2')-deasetil-N(2')-(4-merkapt-4-metil-1-oksopentil)-maytansindir (DM4).

16. İstem 15'e göre kullanılması için, anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat olup, burada anti-FOLR1 immünokonjugatın sitotoksik ajanı N(2')-deasetil-N(2')-(4-merkapt-4-metil-1-oksopentil)-maytansindir (DM4).

17. İstem 15'e göre kullanılması için, anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat olup, burada anti-FOLR1 immünokonjugatın bağlayıcısı N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)-2 sülfobütanoatı (sülfo-SPDB) ve burada anti-FOLR1 immünokonjugatın sitotoksik ajanı N(2')-deasetil-N(2')-(4-merkapt-4-metil-1-oksopentil)-maytansindir (DM4).

TARİFNAME

FOLR1 KANSER TERAPİSİNİN ETKİNLİĞİNİ ARTTIRMAK İÇİN YÖNTEMLER

İLGİLİ BAŞVURULARA ÇAPRAZ-REFERANS

5

Bu başvuru, 1 Nisan 2011'de dosyalanan, U.S. Provizyonel Başvuru No. 61/471,007'nin yararına talep etmektedir.

BULUŞUN ALT-YAPISI

10

Buluşun Sahası

Buluşun alanı genel olarak, insan folat reseptörü 1'in (FOLR1'in) aşırı-ekspresyonu ile karakterize edilen kanserlerin tedavisinin etkinliğini arttırma ile ilgilidir. Daha spesifik olarak, buluş kansere yatkın olan veya kanser tanısı almış olan hastaların daha etkili tedavisi ile ilgilidir, burada tümör hücreleri bir FOLR1 antagonisti, örneğin, bir FOLR1 immünokonjugatı ile bir gen ekspresyon analiz ile belirlendiği üzere FOLR1'i aşırı-eksprese eder.

20

Tekniğin Alt-Yapısı

Kanser, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl kanser tanısı almış bir milyonun üstünde insan ve 500.000 ölüm ile, gelişmiş dünyada ölümün önde gelen nedenlerinden biridir. Toplamda, her 3 insanda 1'inden fazlasının yaşamları boyunca kanserin bir kaç formunu geliştireceği tahmin edilir. -Meme, akciğer, kolorektal ve prostat- olan dördünün tüm yeni olguların yarısından fazlasına sebebiyet verdiği 200'den fazla farklı kanser tipi vardır (Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26).

30

Aynı zamanda Folat Reseptörü-alfa veya Folat Bağlama Proteini olarak da bilinen Folat Reseptörü 1 (FOLR1), hücrelerin plazma membranı üzerinde eksprese edilen bir N-glikosile edilmiş proteindir. FOLR1, folik asit için ve bir kaç indirgenmiş folik asit türevi için yüksek bir afiniteye sahiptir. FOLR1, fizyolojik folatın, 5-methitetrahidrofolatın, hücrelerin iç kısmına aktarmaya aracılık eder.

FOLR1, overyan kanserlerin büyük çoğunluğunda ve çok sayıda uterin, endometriyal, pankreatik, renal, akciğer ve meme kanserinde aşırı eksprese edilirken, normal dokularda FOLR1 ekspresyonu böbrek proksimal tübüllerindeki, akciğerin alveoler pnömositlerindeki, idrar kesesindeki, testislerdeki, koroid pleksustaki ve tiroitteki epitelyal hücrelerin apikal membran ile sınırlandırılır (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)). FOLR1'in bu ekspresyon paterni, bunu FOLR1'e yönlendirilmiş kanser terapisi için arzu edilebilir bir hedef haline getirir.

Ovaryan kanser ilerlemiş evreye kadar tipik olarak asemptomatik olduğundan, buna sıklıkla geç bir evrede tanı koyulur ve güncel olarak mevcut prosedürler, tipik olarak cerrahi tümör çıkarma ameliyatından sonra kemoterapötik ilaçlar ile tedavi edildiğinde bu kötü prognoza sahiptir (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)). Böylelikle, overyan kanserler için daha etkili terapötiklere yönelik karşılanmamış aşikar bir ihtiyaç vardır.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, tümör dokusunda FOLR1'in dinamik bir ekspresyon aralığının keşfine ve artırılmış FOLR1 ekspresyon düzeyleri olan tümörlerin anti-FOLR1 antikorları veya anti-FOLR1 immünokonjugatları ile tedaviye daha çok yanıt verdiği keşfine dayanır. Mevcut buluş avantajlı bir şekilde, terapötik ajanlar, yani, anti-FOLR1 antikorları veya anti-FOLR1 immünokonjugatları bir artırılmış FOLR1 ekspresyon düzeyine sahip olduğu bulunan hastalara uygulama ile tedaviye yanıt vermenin daha büyük bir olasılığına sahip olan hastalar için tedavisine izin verir.

Mevcut buluş, bir süjude kanser terapisinde kullanılması için bir anti-Folat reseptörü 1 (FOLR1) antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı olup, burada söz konusu süjeden alınan bir kanser örneğinde FOLR1 geninin veya proteininin bir artırılmış ekspresyonu, bir veya birden fazla referans örnekte boyama yoğunluğuna veya boyama tekdüzeliğine kıyasla bir FOLR1 eksprese eden kanser

örneğinde boyama yoğunluğunu veya boyama tekdüzeliğini ayırt eden bir saptama yöntemi kullanılarak saptanmıştır, burada bir anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat ile kanser terapisinin etkinliği bu yolla artırılmıştır;

burada, kanser terapisinde kullanılması için anti-FOLR1 antikoru aşağıdakileri içerir:

(i) SEQ ID NO: 3 amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken alanı (huMov19 vHC) ve SEQ ID NO: 4 amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken alanı (huMov19 vLCv1.00) veya

(ii) SEQ ID NO: 3 amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken alanı (huMov19 vHC) ve SEQ ID NO: 5 amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken alanı (huMov19 vLCv1.60); ve

burada kanser terapisinde kullanılması için anti-FOLR1 immünokonjugatı bir anti-FOLR1 antikoru, bir bağlayıcı ve bir sitotoksin içerir, burada anti-FOLR1 immünokonjugatın anti-FOLR1 antikoru aşağıdakileri içerir:

(i) SEQ ID NO: 3 amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken alanı (huMov19 vHC) ve SEQ ID NO: 4 amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken alanı (huMov19 vLCv1.00) veya

(ii) SEQ ID NO: 3 amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken alanı (huMov19 vHC) ve SEQ ID NO: 5 amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken alanı (huMov19 vLCv1.60).

Buluşun ilave uygulamaları, 2 ila 17 arasındaki istemler ile tanımlanır.

Mevcut buluş, bir Folat Reseptörü 1'i (FOLR1) hedef alan anti-kanser terapötikine olumlu bir şekilde yanıt verme eğiliminde olan bir süjeyi tanımlamak için bir yöntemi tarif eder, yöntem süjeden elde edilen bir doku örneğinde FOLR1 ekspresyonunu saptamayı içerir.

Mevcut buluş ayrıca, bir kanser terapisinin etkililiğinin olası artırılması için bir yöntemi de tarif eder, yöntem bir FOLR1'i hedef alan anti-kanser terapötikinin bir

terapötik olarak etkili dozunu bir süjeye uygulamayı içerir, burada süjeden elde edilen bir doku örneğinde FOLR1 ekspresyonunun arttırıldığı bulunmuştur.

Mevcut buluş ayrıca, bir düşük-dozlu kanser tedavisinin etkililiğini tahmin etmek için bir yöntem de tarif eder, yöntem bir FOLR1'i hedef alan anti-kanser terapötığının bir terapötik olarak etkili dozunu bir süjeye uygulamayı içerir, burada söz konusu süjenin bir örnek içinde arttırılmış FOLR1 ekspresyonuna sahip olduğu bulunmuştur.

- 10 Bir uygulamada, yöntemler ovaryan karsinoma, küçük hücreli-olmayan akciğer adenokarsinomuna (bronşiyoloalveoler karsinom dahil), renal karsinoma ve endometriyal karsinoma yöneliktir.

Bir uygulamada, FOLR1 ekspresyonunun kapsamı ve tekdüzeliği immünohistokimya (IHC), akış sitometrisi veya nükleik asit hibridizasyonu ile saptanır. Bir başka uygulamada, FOLR1 ekspresyonunun düzeyi immünohistokimya ile saptanır. IHC'nin sağlamayan örnekleri, FOLR1'in çeşitlilik gösteren düzeylerini ayırt eden IHC yöntemlerini ve kalibre edilmiş IHC yöntemlerini, örneğin, burada tarif edilenleri, içerir. FOLR1 ekspresyonu, bunlarla sınırlanmamak kaydıyla, burada tarif edilen skorlama yöntemlerini içeren, uygun bir skorlama sistemi kullanılarak skorlanabilir. Örneğin, FOLR1 ekspresyonu, boyama yoğunluğu için 0'ın en düşük boyama yoğunluğu düzeyi olduğu ve 3+'nın en yüksek boyama yoğunluğu düzeyi olduğu 0, 1, 2, 3 ve 3+ olan bir aralığı içeren bir kalibre edilmiş IHC yöntemi kullanılarak skorlanabilir. Alternatif veya ilave olarak, FOLR1 ekspresyonu fokal (boyanmış hücrelerin <%25'i) ile heterojen (boyanmış hücrelerin %25-75'i) ile homojen (boyanmış hücrelerin >%75'i) aralığında yer alan bir boyama tekdüzeliği içeren bir kalibre edilmiş IHC yöntemi kullanılarak skorlanabilir, burada fokal boyama en az tekdüze boyamadır ve homojen en tekdüze boyamadır.

30

İlave bir uygulamada, bir örnek (örneğin, bir tümör dokusu örneği) içinde FOLR1 ekspresyonu ölçülür ve bir veya birden fazla referans örneği ile karşılaştırılır ve bir süje tümöründen, ksenograft tümörden veya hücre hattından doku örneğindeki FOLR1 ekspresyonu bir veya birden fazla referans örneğiyle karşılaştırılır.

kapsamını ve tekdüzeliğini korele eden bir FOLR1 spesifik skora sahiptir. Çeşitli örneklerde, bir homojen boyama paterni ile bir düzey 1, 2, 3 veya 3+ FOLR1 boyama yoğunluğu olan bir doku örneğinin veya hücrenin artmış FOLR1 ekspresyonuna sahip olduğu düşünülür; heterojen veya fokal boyam paternleri ile bir düzey 3 FOLR1 boyama yoğunluğu olan bir doku örneğinin veya hücrenin artmış FOLR1 ekspresyonuna sahip olduğu düşünülür. Bir başka uygulamada, bir örnek içindeki FOLR1 ekspresyonu ölçülür ve bir karşılaştırılabilir boyama düzeyini tanımlamak için bir veya birden fazla referans örnek ile karşılaştırılır. Bir uygulamada, referans örnek, bir önceden tayin edilmiş IHC skoruna ve/veya bir önceden-belirlenmiş her hücre için antijen (veya ABC) sayısına sahiptir ve örnek dokusu için antijen veya ABC sayısı karşılaştırmaya göre belirlenebilir.

Bir uygulamada, bir örnek (örneğin, bir tümör dokusu örneği) içinde FOLR1 ekspresyonu ölçülür ve bir veya birden fazla kontrol örneği ile karşılaştırılır ve bir süje tümöründen, ksenograft tümörden veya hücre hattından doku örneğindeki FOLR1 ekspresyonu bir veya birden fazla kontrol örneğine kıyasla ekspresyonun kapsamını ve tekdüzeliğini korele eden bir FOLR1 spesifik skora sahiptir. Bir uygulamada, örnekteki FOLR1 ekspresyonu hiç FOLR1 ekspresyonu göstermeyen veya düşük düzeyde saptanabilir FOLR1 ekspresyonu gösteren bir negatif kontrol örneği ile karşılaştırılır. Bir başka uygulamada, örnekteki FOLR1 ekspresyonu artmış FOLR1 ekspresyonuna (düzey 1, 2, 3 veya 3+) sahip olan bir pozitif kontrol örneği ile karşılaştırılır. Bazı uygulamalarda, kontrol örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, Namalwa, SW2, SW620, T47D, IGROV-1, 300.19 FR1, HeLa veya KB hücrelerini, içerir. Özel uygulamalarda, kontrol örnekleri folat reseptörü ile transfekte edilmiş hücreleri (örneğin, 300.19 FR1) veya bu hücrelerden hücre pelletlerini içerir.

Bir uygulamada, FOLR1'i hedef alan anti-kanser terapötüğü, bir FOLR1 immünokonjugatdır. Bir uygulamada, immünokonjugat, bir anti-FOLR1 antikoru, bir bağlayıcı ve bir sitotoksin içerir.

İlave bir uygulamada, anti-FOLR1 antikoru, huMOV19'dur. Bir başka uygulamada, bağlayıcı bir yarılabılır bağlayıcıdan, bir yarılamayan bağlayıcıdan, bir hidrofilik bağlayıcıdan ve bir dikarboksilik asit temelli bağlayıcıdan oluşan gruptan seçilir. Bir

başka uygulamada, bağlayıcı aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)pentanoat (SPP) veya N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)-2-sülfopentanoat (sülfo-SPP); N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)bütanoat (SPDB) veya N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)-2-sülfobütanoat (sülfo-SPDB); N-süksinimidil 4-(maleimidometil) sikloheksankarboksilat (SMCC); N-sülfosüksinimidil 4-(maleimidometil) sikloheksankarboksilat (sülfoSMCC); N-süksinimidil-4-(iyodoasetil)-aminobenzoat (SIAB) ve N-süksinimidil-[(N-maleimidopropiyonamido)-tetraetilenglikol] ester (NHS-PEG4-maleimid). Bir başka uygulamada, bağlayıcı N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)-2-sülfobütanoat (sülfo-SPDB'dir). Bir başka uygulamada, sitotoksik ajan bir maytansinoidden, maytansinoid analogundan, benzodiazepinden, taksoidden, CC-1065'ten, CC-1065 analogundan, duokarmisinden, duokarmisin analogundan, kalikeamisinden, dolastatinden, dolastatin analogundan, auristatinden, tomaymisin türevinden ve leptomisin türevinden veya ajanın bir önilacından oluşan gruptan seçilir. Bir başka uygulamada, sitotoksik ajan bir maytansinoiddir. Bir başka uygulamada, sitotoksik ajan, N(2')-deasetil-N(2')-(3-merkapt-1-okso-1-propil)-maytansindir veya N(2)-deasetil-N2-(4-merkapt-4-metil-1-okso-1-pentil)-maytansindir. Bir başka uygulamada, sitotoksik ajan N(2')-deasetil-N2-(4-merkapt-4-metil-1-okso-1-pentil)-maytansindir (DM4). İlave bir uygulamada, immünokonjugat, HUMOV19 antikoru, sülfo-SPDB ve DM4 (IMGN853) içerir.

Buluş ayrıca, bir süjude FOLR1 ekspresyonunu ölçmek için bir FOLR1 saptama reaktifi ve kullanımı için talimatları içeren bir kiti de tarif eder. Bir uygulamada, FOLR1 saptama reaktifi, bir FOLR1 bağlama peptidini, proteinini veya bir moleküler probunu (yani, nükleik asidini) içerir. Bir başka uygulamada, FOLR1 saptama reaktifi, bir anti-FOLR1 antikorudur. Bir başka uygulamada, kit ilaveten, anti-FOLR1 antikorunu bağlayan bir sekonder antikor içerir. Bir uygulamada, antikor 0,5 ila 7,5 µg/ml, arzu edilebilir bir şekilde 0,9 ila 3,8 +/- 0,5 µg/ml aralığında olan bir konsantrasyonda dahil edilir. Çeşitli uygulamalarda, antikor 1,0 +/- 0,5 µg/ml, 1,5 +/- 0,5 µg/ml, 1,9 +/- 0,5 µg/ml, 2,5 +/- 0,5 µg/ml, 3,0 +/- 0,5 µg/ml, 3,5 +/- 0,5 µg/ml, 3,8 +/- 0,5 µg/ml veya en fazla 42 µg/ml olan bir konsantrasyonda dahil edilir. Bir başka uygulamada, antikor 0,9 ila 3,8 +/- 0,5 µg/ml aralığında bir nihai konsantrasyon elde etmek amacıyla seyreltmeler için talimatlar ile birlikte konsantre çözelti halinde dahil edilir. Bir başka uygulamada, kit

ilaveten, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir saptama reaktifi içerir: bir enzim, bir florofor, bir radyoaktif etiket ve bir lüminofor. Bir başka uygulamada, saptama reaktifi aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: biyotin, digoksinin, floresin, tritium ve rodamin.

5

Kit ayrıca, FOLR1 ekspresyonunu saptamak ve skorlamak için talimatlar da içerebilir. Kit ayrıca, kontrol ve referans örnekleri de içerebilir. Kontrol ve referans örneklerinin sınıflayıcı olmayan örnekleri, doku örneklerini, hücre pelletlerini veya hücreleri içerir. Kontrol ve referans örnekleri, doku kültürü hücre hatlarından (normal veya tümör), normal doku (normal kontrol) veya tümör dokular (pozitif kontrol) örneklerinden türetilir. Emsal hücre hatları, SW620, T47D, IGROV-1, HELA, KB, JEG-3 ve FOLR1'i eksprese eden bir ekspresyon vektörü ile kalıcı veya geçici bir şekilde transfekte edilmiş hücre hatları (örneğin, 300.19FR1) içerir. FOLR1 ekspresyonu saptama yöntemlerinde normal referans dokuları olarak kullanılabilen emsal dokular burada tarif edilir ve normal akciğeri, tükürük bezini ve pankreası içerir.

10

15

20

25

30

Buluş ayrıca, bir anti-FOLR1 antikoruna veya anti-FOLR1 immünokonjugatına büyük olasılıkla yanıt verecek olan bir kanseri tanımlamak için aşağıdakileri içeren bir yöntemi de tarif eder: (a) söz konusu kanserden hücreler içeren bir biyolojik örneği hücre yüzeyi üzerinde FOLR1 proteinini bağlayan bir ajan ile temas ettirme; (b) (a)'nın söz konusu biyolojik örneğinin hücre yüzeyi üzerinde FOLR1 proteinini bağlayan söz konusu ajanın bağlanmasını saptama; (c) adımlar (b)'nin söz konusu bağlanmasına bir skor tayin etme, burada söz konusu skor bir veya birden fazla referans örnek ile karşılaştırılmaya göre tayin edilir ve (d) adımlar (c)'deki söz konusu skoru bir referans dokunun veya hücrenin skoru ile karşılaştırma, burada söz konusu kanser FOLR1 düzeyi için bir normal-düzeyde veya düşük-düzeyde FOLR1 eksprese eden referans örneği için skora kıyasla daha büyük olan bir skor veya söz konusu kanser FOLR1 düzeyi için bir yüksek-düzeyde FOLR1 eksprese eden referans örnek için skora eşit veya bundan daha büyük olan bir skor, söz konusu kanserin bir anti-FOLR1 antikoruna veya anti-FOLR1 immünokonjugatına büyük olasılıkla yanıt verecek şekilde olduğunu tanımlar. Belirli uygulamalarda, kanser ovaryan kanserdir veya akciğer kanseridir.

Buluş ayrıca, bir tümörü bir anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat ile tedaviye duyarlı olduğu şeklinde tanımlamanın bir yöntemini de tarif eder, söz konusu yöntem aşağıdakileri içerir: (a) söz konusu tümörden elde edilen bir tümör dokusu örneğinde FOLR1 ekspresyonunun düzeyini ölçme, burada söz konusu ölçme bir veya birden fazla referans örnekte boyama yoğunluğuna veya boyama tekdüzeliğine kıyasla bir FOLR1 eksprese eden kanser örneğinde boyama yoğunluğunu veya boyama tekdüzeliğini ayırt eden bir saptama yönteminin kullanılması içerir; (b) söz konusu tümör dokusu örneği için bir FOLR1 boyama yoğunluğu skorunu belirleme ve (c) adı (b)'de belirlenen FOLR1 boyama yoğunluğu skorunu en az bir referans örnekte FOLR1 proteini ekspresyonunu ölçme ile belirlenmiş bir bağıllı değer ile karşılaştırma, burada söz konusu en az bir referans örnek, bir anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat ile tedaviye duyarlı olmayan bir dokudur, hücredir veya hücre peleti örneğidir ve burada söz konusu bağıllı değere kıyasla daha yüksek olan adı (b)'de belirlenen söz konusu örnek için bir FOLR1 boyama yoğunluğu skoru, söz konusu tümörü bir anti-FOLR1 antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugat ile tedaviye duyarlı olduğu şeklinde tanımlar. Belirli uygulamalarda, saptama yöntemi manüel olarak veya bir otomatikleştirilmiş sistem kullanılarak gerçekleştirilir. Bir uygulamada, saptama yöntemi, IHC'dir. Bir başka uygulamada, IHC, FOLR1 ekspresyonunun farklı düzeylerini ayırt edebilen kalibre edilmiş IHC'dir.

Buluş ayrıca, akciğer veya ovaryan kansere sahip olan bir süje için bir anti-FOLR1 antikoru veya bir anti-FOLR1 immünokonjugatı ile bir terapötik rejimi optimize etmenin bir yöntemini de tarif eder, söz konusu yöntem aşağıdakileri içerir: (a) söz konusu süjeden elde edilen söz konusu örneği hücre yüzeyi FOLR1'ini spesifik olarak bağlayan bir antikor ile temas ettirme; (b) bir veya birden fazla referans örnekte boyama yoğunluğuna ve boyama tekdüzeliğine kıyasla bir FOLR1 eksprese eden kanser örneğinde boyama yoğunluğunu veya boyama tekdüzeliğini ayırt edebilen bir saptama yöntemini kullanarak (a)'daki söz konusu antikorun söz konusu örnek içindeki söz konusu hücre yüzeyi FOLR1'ini bağlamasını ölçme ve söz konusu örneğe bir boyama skoru tayin etme ve (c) adı (b)'deki skor bir normal-düzeyde veya düşük-düzeyde FOLR1 eksprese eden referans örnek için skora kıyasla daha küçük veya bu skora eşit olduğunda bir anti-FOLR1 immünokonjugatın yüksek bir dozunu uygulama veya skor bir normal-düzeyde

veya düşük-düzeyde FOLR1 eksprese eden referans örnek için skora kıyasla daha büyük olduğunda bir anti-FOLR1 immünokonjugatın düşük bir dozunu uygulama.

Buluş ayrıca, bir süjeden elde edilen bir tümör dokusu örneğinde kanser hücreleri üzerinde hücre yüzeyi FOLR1'inin ekspresyonunu saptamanın bir yönteminide tarif eder, söz konusu yöntem aşağıdakileri içerir: (a) tümör dokusu örneği elde etme, burada söz konusu kanser örneği formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüştür; (b) söz konusu örneği hücre yüzeyi FOLR1'ini spesifik olarak bağlayan bir antikör ile temas ettirme; (c) bir veya birden fazla referans örnekte boyama yoğunluğuna ve boyama tekdüzeliğine kıyasla bir FOLR1 eksprese eden kanser örneğinde boyama yoğunluğunu veya boyama tekdüzeliğini ayırt edebilen bir saptama yöntemini kullanarak (b)'deki söz konusu antikörün söz konusu tümör dokusu örneği içindeki söz konusu hücre yüzeyi FOLR1'ini bağlamasının ölçme ve (d) söz konusu tümör dokusu örneğinde hücre yüzeyi FOLR1'ini boyama yoğunluğunun veya boyama tekdüzeliğinin düzeyi bir veya birden fazla referans örnek ile karşılaştırıldıktan sonra söz konusu FOLR1'e bir FOLR1 ekspresyon skoru tayin etme.

Buluş ayrıca, bir akciğer kanserine veya overan kansere sahip olan bir süjeyi bir düşük-dozlu anti-FOLR1 antikörü veya anti-FOLR1 immünokonjugatın tedavirejimine büyük olasılıkla yanıt vereceği şeklinde tanımlamanın bir yöntemini de tarif eder: (a) söz konusu overan kanserden veya akciğer kanserinden hücreler içeren bir biyolojik örneği hücre yüzeyi FOLR1 proteinini bağlayan bir ajan ile temas ettirme; (b) söz konusu ajanın (a)'nın söz konusu biyolojik örneğini bağlamasının saptama; (c) adın (b)'nin söz konusu bağlamasına bir skor tayin etme, burada söz konusu skor bir veya birden fazla referans örneği karşılaştırmaya dayanarak tayin edilir ve (d) adın (c)'deki söz konusu skor bir referans dokunun veya hücrenin skoru ile karşılaştırma, burada söz konusu overan kanser veya akciğer kanseri için bir normal-düzeyde veya düşük-düzeyde FOLR1 eksprese eden referans örnek için skora kıyasla daha büyük olan bir skor veya söz konusu overan kanser veya akciğer kanseri için bir yüksek-düzeyde FOLR1 eksprese eden referans örnek için skora eşit veya bu skora kıyasla daha büyük olan bir skor söz konusu overan kanserin veya akciğer kanserinin bir düşük-dozlu anti-FOLR1 antikörüne veya anti-FOLR1 immünokonjugatına büyük

olasılıkla yanlış verecek şekilde olduğunu tanımlar. Belirli uygulamada, yöntem ilaveten bir beşerileştirilmiş anti-FOLR1 antikorunun veya bir anti-FOLR1 immünokonjugatın bir terapötik olarak etkili miktarın söz konusu süjeye uygulamayı içerir.

5

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1. Manüel Boyama Yöntemi. Anti-FOLR1 antikorları transfekte edilmiş hücrelerde FOLR1 ekspresyonunu saptar. 300.19 hücre insan FOLR1'ini şifreleyen bir polinükleotid ile transfekte edilmiştir. FOLR1 proteini ekspresyonu, mürin antikor BN3.2 kullanılarak saptanmıştır Smith AE et al., Hybridoma (Larchmt). 2007 Oct;26(5):281-8.

10

Şekil 2. Manüel Boyama Yöntemi: Anti-FOLR1 antikorları FOLR1 ekspresyonunun farklı düzeylerini ayırt edebilir. Antikor BN3.2, çeşitli ksenograft hücrelerinde FOLR1 ekspresyonunu saptamak için kullanılmıştır. BN3.2 antikoru için saptama sınırı yaklaşık olarak 4000 her hücre için bağli antikordur (ABC).

15

Şekil 3. Manüel Boyama Yöntemi. Anti-FOLR1 antikorları doku örneklerinde FOLR1 ekspresyonunun farklı düzeylerini ayırt edebilir. BN3.2, ovaryan tümörlerde (A) aynı zamanda küçük hücreli-olmayan akciğer kanseri tümörlerinde (B) FOLR1 ekspresyonunu saptamak için kullanılmıştır.

20

Şekil 4. Manüel Boyama Yöntemi: Ovaryan tümörlerde ve NSCLC tümörlerinde tekdüze FOLR1 ekspresyonu. FOLR1 ekspresyonu ovaryan karsinomların çoğunda aynı zamanda test edilen akciğer adenokarsinomlarında ve bronşiyoloalveoler karsinomlarda yüksektir. Ovaryan karsinom örneklerinin büyük çoğunluğu, seröz ve endometrioid hücrelerinde en yüksek yoğunluklu boyamaya sahiptir. NSCLC tümörlerinde, en yüksek ABC değerleri, bronşiyoloalveoler karsinomda ve papiller adenokarsinomdan bulunmuştur.

25

Şekil 5. Manüel Boyama Yöntemi: FOLR1 ekspresyonu genel olarak, NSCLC hücrelerinin membran ile sınırlanmıştır. Yüksek çözünürlüklü mikroskop, FOLR1 boyamasının büyük çoğunluğunun NSCLC tümörlerinde membran ile sınırlandırıldığını ortaya çıkarmıştır.

30

Şekil 6. Manüel Boyama Yöntemi: FOLR1 ekspresyonu genel olarak, ovaryan kanser hücrelerinin membranları ile sınırlandırılır. Yüksek çözünürlüklü mikroskop, FOLR1 boyamasının büyük çoğunluğunun ovaryan tümörlerde membran ile sınırlandırıldığı ortaya çıkarmıştır.

Şekil 7. Bir KB ksenograft modelinde huMov19-hedefli konjugatların in vivo etkinliği. FOLR1'i hedef almayan huC242-SPDB-DM4'e (D) kıyasla FOLR1'i hedef alan yarılabilen konjugat huMov19-SPDB-DM4 (B) ve hedef almayan huC242-PEG4Mal-DM4'e (E) kıyasla yarılabilen konjugat huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C), SCID farelerine subkütan implante edilmiş KB hücrelerinin bir yerleşik ksenograft modeli kullanılarak test edilmiştir. FOLR1'i huMov19 ile hedef alma, ortalama tümör hacminde anlamlı düşüş ile sonuçlanmıştır.

Şekil 8. OVCAR-3 insan ovaryan karsinom ksenograftlarında IMGN853 tedavisinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi. Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da bir tek intravenöz IMGN853 enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, bir tek intravenöz PBS enjeksiyonu almıştır.

Şekil 9. IGROV-1 insan ovaryan karsinom ksenograftlarında IMGN853 tedavisinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi. Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da bir tek intravenöz IMGN853 enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, bir tek intravenöz PBS enjeksiyonu almıştır.

Şekil 10. OV-90 insan ovaryan karsinom ksenograftlarında IMGN853 tedavisinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi. Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da bir tek intravenöz IMGN853 enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, bir tek intravenöz PBS enjeksiyonu almıştır.

Şekil 11. SKOV-3 insan ovaryan karsinom ksenograftlarında IMGN853 tedavisinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi. Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da bir tek intravenöz IMGN853 enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, bir tek intravenöz PBS enjeksiyonu almıştır.

Şekil 12. KB insan servikal adenokarsinom ksenograftlarında IMGN853 tedavisinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi. Farelere 1,0, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da bir tek intravenöz IMGN853 enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, bir tek intravenöz PBS enjeksiyonu almıştır.

Şekil 13. Otomatikleştirilmiş Boyama Yöntemleri: IHC ve Akış Sitometrisi ile Hücre Hatlarında FOLR1 Ekspresyonunu gösteren Temsili Fotograflar ve

Histogramlar. SW620, T47D, Igrov-1, 300.19/FR1, HeLa ve KB hücrelerinin tümü, FOLR1 boyama yoğunluğu ve tekdüzeliği için skorlanmıştır. 300.19/FR1 ve KB 3 homo olarak skorlanırken, SW630 ve IGROV-1 hücreleri, 1-3 hetero olarak skorlanmıştır, T47D, 1-2 hetero olarak skorlanmıştır, HeLa, 2-3 hetero olarak skorlanmıştır.

Şekil 14. Otomatikleştirilmiş Boyama Yöntemleri: Seröz Ovaryan Kanserde Temsili FOLR1 Boyaması 3 homo, 2-3 homo, 2 homo ve 2 hetero boyama gösteren boyama paternleri, seröz ovaryan kanserden elde edilen doku kesitleri için IHC ile gösterilir.

Şekil 15. Otomatikleştirilmiş Boyama Yöntemleri: Endometrioid Ovaryan Kanserde Temsili FOLR1 Boyaması 3 homo, 2-3 homo, 3 fokal ve 1-2 hetero boyama gösteren boyama paternleri, endometrioid kanserden elde edilen doku kesitleri için IHC ile gösterilir.

Şekil 16. Otomatikleştirilmiş Boyama Yöntemleri: (bronşiyoloalveoler karsinomların dışında) Adenokarsinom Alt-Tipinin NSCLC'sinde Temsili FOLR1 Boyaması 3 homo, 2-3 homo, 2 hetero, 2 homo ve 1-2 hetero boyama gösteren boyama paternleri, küçük hücreli-olmayan akciğer kanserinden, adenokarsinom alt-tipinden, elde edilen doku kesitleri için IHC ile gösterilir.

Şekil 17. Otomatikleştirilmiş Boyama Yöntemleri: Endometriyal Adenokarsinomda Temsili FOLR1 Boyaması 3 hetero, 2 hetero ve 1 hetero boyama gösteren boyama paternleri, endometriyal adenokarsinomdan elde edilen doku kesitleri için IHC ile gösterilir.

Şekil 18. Otomatikleştirilmiş Boyama Yöntemleri: Renal Berrak Hücreli Karsinomda Temsili FOLR1 Boyaması 2 homo, 2 hetero ve 1 hetero boyama gösteren boyama paternleri renal hücre kanserinden elde edilen doku kesitleri için IHC ile gösterilir.

Şekil 19. IMGN853'ün in vitro sitotoksik aktivitesi. Beş FOLR1-pozitif hücre hattı (KB, IGROV-1, JEG-3, SKOV-3 ve OVCAR-3) ve iki FOLR1-negatif hücre hattı (Namalwa ve SW2), bunların IMGN853'ün sitotoksik etkilerine duyarlılığı için analiz edilmiştir. Hücreler IMGN853'e (düz çizgi) veya IMGN853 artı 0,5 µM konjuge edilmiş huMov19'a (M9346A) (kesikli çizgi) 5 gün boyunca maruz bırakılmıştır ve bunların sağ kalımı WST-8-temelli analiz ile belirlenmiştir. Temsili veriler gösterilir. Sağ kalan hücrelerinin

yüzdesi, IMGN853 konsantrasyonunun 10 tabanında logaritmasına karşı grafik haline getirilmiştir.

Şekil 20. FOLR1 ekspresyonu düzeyine kıyasla FOLR1-pozitif hücre hatları IMGN853'e duyarlı IMGN853'ün potensi ve özgülüğü, geniş bir FOLR1 ekspresyonu aralığı olan FOLR1-pozitif hücre hatlarına karşı analiz edilmiştir. Hücre hatları IMGN853 ile inkübe edilmiştir ve KB, Igrov-1 ve Jeg-3 IMGN853'e spesifik olarak duyarlı iken, konjuge edilmemiş huMov19 (M9346A) konjugatın azaltılmış aktivitesini göstermiştir. Skov-3 ve Ovcara-3, IMGN853'e duyarlı değildir ve konjuge edilmemiş huMov19 (M9346A) konjugatın aktivitesini değiştirmemiştir.

Şekil 21. Otomatikleştirilmiş Boyama Yöntemleri: FOLR1 için boyanmış Ovaryan Karsinom Ksenograft etkinlik modelleri. 1-3 hetero (Ovcara 3), 1-3 homo (Igrov 1), 1-2 hetero (Ov 90) ve negatif (SKOV 3) boyama gösteren boyama paternleri ovaryan kanser ksenograftlarından elde edilen doku kesitleri için IHC ile gösterilir.

Şekil 22. Otomatikleştirilmiş Boyama Yöntemleri: Fare Ksenograft Modelleri. NSCLC (A), Endometriyum Karsinom (B) ve Servikal Karsinom (C) Hücre Hatları için ksenograftlarda FOLR1 için boyama paternleri gösterilir. NSCLC örnekleri, 2-3 homo veya 2 homo boyama göstermiştir, endometriyum karsinom 2 hetero/3 fokal boyama göstermiştir ve servikal karsinom 3 homo boyama göstermiştir.

Şekil 23. Analiz kontrol dokuları otomatikleştirilmiş boyama kılavuzu. Negatif (özofagus 0) ve pozitif kontrol örnekleri (tükürük bezi 1-2 hetero, akciğer 2 homo, pankreas 3 homo) için boyama paternleri otomatikleştirilmiş IHC ile belirlendiği şekilde gösterilir.

Şekil 24. Tümör dokuları otomatikleştirilmiş boyama kılavuzu. Düzey 3, düzey 2 ve düzey 1 boyama için temsili boyama paternleri, otomatikleştirilmiş IHC ile belirlendiği üzere kontrol dokusu üzerinde gösterilir.

Şekil 25. Tümör dokuları otomatikleştirilmiş boyama kılavuzu. Düzey 3, düzey 2 ve düzey 1/negatif boyama için temsili boyama paternleri, otomatikleştirilmiş IHC ile belirlendiği üzere kontrol dokusu üzerinde gösterilir.

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, FOLR1'in aşırı ekspresyonu ile karakterize edilen kanserlerin tedavisinin etkinliğini veya bu tedaviye yanıtın olası artırılmasını için yöntemleri

5 tarif eder. Mevcut buluş, norma dokuya kıyasla tümör dokusunda FOLR1'in dinamik bir ekspresyon aralığının keşfine ve arttırılmış FOLR1 ekspresyon düzeyleri olan tümörlerin anti-FOLR1 antikoları veya anti-FOLR1 immünokonjugatları ile tedaviye daha çok yanıt verdiği keşfine dayanır. Ayrıca, otomatikleştirilmiş ve manuel yöntemler arasında dinamik duyarlılık ve saptama

10 aralıklarında farklılıklar da keşfettik. Buluşun yöntemlerini tatbik etmek için yararlı olan bir veya birden fazla reaktif içeren kitler ilaveten tarif edilir.

I. Tanımlar

15 Mevcut buluşun anlaşılmasını kolaylaştırmak için, çok sayıda terim ve ifade aşağıda tanımlanır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "insan folat reseptörü 1" veya "FOLR1" terimleri, aksi ifade edilmedikçe, herhangi bir natif insan FOLR1'ini ifade eder. "FOLR1" terimi,

20 "tam-boy", işlenmemiş FOLR1'i aynı zamanda FOLR1'in hücre içinde işlemeyen kaynaklanan herhangi bir formunu kapsar. Terim ayrıca, FOLR1'in doğal oluşumlu varyantları, örneğin, uç-birleştirme varyantları, allelik varyantları ve izoformları da kapsar. Burada tarif edilen FOLR1 polipeptitleri, çeşitli kaynaklardan, örneğin, insan dokusu tiplerinden veya bir başka kaynaktan, izole

25 edilebilir veya rekombinant veya sentetik yöntemler ile hazırlanabilir. FOLR1 dizilerinin örnekleri, bunlarla sınırlanmamak kaydıyla, P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1 ve NP_057936.1 NCBI referans numaraları ve SEQ ID NO.'ları 1'de ve 2'de gösterilenleri, içerir.

30 FOLR1'in "arttırılmış ekspresyonu" terimi, yüksek düzeylerde FOLR1 ekspresyonu içeren bir örneği ifade eder. Bir örnekte, FOLR1 ekspresyonu IHC ile ölçülür ve tanımlanan skorlar gösteren kontrollere (örneğin, kalibre edilmiş kontrollere) kıyasla bir boyama yoğunluğu skoru ve bir boyama tekdüzeliği skoru verilir (örneğin, yoğunluk, düzey 3 kalibre edilmiş kontrol ile karşılaştırılabilir olduğu 3'lük

bir yoğunluk skoru verilir veya yoğunluk, düzey 2 kalibre edilmiş kontrol ile karşılaştırılabilir olduğu 2'lik bir yoğunluk skoru verilir). Örneğin, immünohistokimya ile 1, 2, 3 veya 3+ daha büyük olan bir skor bir artmış FOLR1 ekspresyonunu gösterir. Heterojen veya homojen olan bir boyama tekdüzeliği ayrıca, artmış FOLR1 ekspresyonunun bir göstergesidir. Boyama yoğunluğu ve boyama tekdüzeliği skorları tek başına veya kombinasyon halinde kullanılabilir (örneğin, 2 homo, 2 hetero, 3 homo, 3 hetero, vb.). Bir başka örnekte, FOLR1 ekspresyonundaki bir artış kontrol değerlerine (örneğin, kanseri olmayan veya yükselmiş FOLR1 değerlerine sahip olmayan bir kanseri olan bir süjeden elde edilen bir dokudaki veya hücredeki ekspresyon düzeyine) kıyasla en az 2-katlık, en az 3-katlık veya en az 5-katlık bir artışın saptanması ile belirlenebilir.

Bir "referans örnek", bir test örneğinden buluşun yöntemlerinde elde edilen sonuçları korele etmek ve karşılaştırmak için kullanılabilir. Referans örnekleri hücreler (örneğin, hücre hatları, hücre peletleri) veya doku, olabilir. "Referans örnek" içindeki FOLR1 düzeyleri, FOLR1'in bir mutlak veya bağımlı miktar, bir miktar aralığı, bir minimum ve/veya maksimum miktar, bir ortalama miktar ve/veya bir medyan miktar olabilir. Buluşun tanısal yöntemleri, bir test örneğindeki FOLR1 ekspresyon düzeyleri ve bir "referans değer" arasındaki bir karşılaştırmayı içerir. Bazı uygulamalarda, referans değer, bir referans örnek içinde FOLR1'in ekspresyon düzeyidir. Bir referans değer, bir önceden belirlenmiş değer olabilir ve ayrıca test örnekleri ile paralel olarak test edilen referans örneklerden (örneğin, kontrol biyolojik örneklerinden) de belirlenebilir. Bir referans değer, bir tek kesim-değeri, örneğin, değerlerin bir medyanı veya ortalaması veya bir aralığı, örneğin, bir güven aralığı, olabilir. Referans değerler, bireylerin çeşitli alt-grupları, örneğin, kansere yatkın olan bireyler, erken ve geç evre kansere sahip olan bireyler, erkek ve/veya kadın bireyler veya kanser terapisi almakta olan bireyler, için oluşturulabilir. Normal referans örneklerinin veya değerlerinin ve pozitif referans örneklerinin veya değerlerinin örnekleri burada tarif edilir.

Bazı uygulamalarda, referans örnek, bir sağlıklı dokudan, özellikle kanserden etkilenmemiş bir karşılaştırmaya gelen dokudan, elde edilen bir örnektir. Referans örneklerinin bu tipleri, negatif kontrol örnekleri olarak ifade edilir. Diğer uygulamalarda, referans örnek, FOLR1 eksprese eden bir tümör dokusundan elde

edilen bir örnektir. Referans örneklerin bu tipleri, pozitif kontrol örnekleri olarak ifade edilir. Pozitif kontrol örnekleri ayrıca, FOLR1 ekspresyonunun düzeyi ile korele olan, tekdüzelik (homoya kıyasla hetero) ve/veya boyama yoğunluğunun derecesi (1, 2, 3, 3+) için bir karşılaştırmal endikatör olarak da kullanılabilir. Pozitif kontrol karşılaştırmal örnekleri ayrıca, dinamik bir boyama yoğunluğu veya tekdüzeliği aralığı gösteren kalibre edilmiş referans örnekler olarak da ifade edilir. Örnekler 1-9'da gösterildiği üzere, FOLR1-eksprese etmeyen referans örnekler, insan özofagus dokusunu içerir; düşük-düzeyde FOLR1 referans, tükürük bezi (özellikle interkalar kanallar) ve akciğer (özellikle respiratuvar epitelyum) dokusunu içerir ve yüksek-düzeyde FOLR1-eksprese eden doku, pankreas (özellikle duktal hücreleri) içerir. Hücre hatları için, düşük-düzeyde eksprese edenler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, OVCAR3'ü ve T47D'yi, içerir, orta-düzeyde eksprese edenler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, SW620'yi, IGROV-1'i, JEG3'ü, içerir ve yüksek-düzeyde eksprese edenler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, KB'yi ve IGROV1'i, içerir. Özel olarak arzu edilebilen pozitif yüksek-düzeyde FOLR1 referansı Folat Reseptörü 1 ile kalıcı veya geçici bir şekilde transfekte edilmiş bir hücre hattı (örneğin, 300.19/FR1). Özel bir kanser için, FOLR1'in uygun pozitif ve negatif referans düzeyleri, bir veya birden fazla uygun süjede FOLR1'in düzeylerini ölçme ile belirlenebilir ve bu tarz referans düzeyler süjelerin spesifik popülasyonlar için uygun hale getirilebilir (örneğin, bir referans düzey yaş-eşleşmeli olabilir, böylece belirli bir yaş grubunda bir özel hastalık hali, fenotip veya bunların yokluğu için belirli bir yaştaki süjelerden elde edilen örneklerdeki FOLR1 düzeyleri ve referans düzeyleri arasında karşılaştırmalar yapılabilir). Bu tarz referans düzeyleri ayrıca, biyolojik örneklerde FOLR1'in düzeylerini ölçmek için kullanılan spesifik teknikler (örneğin, immünoanalizler, vb.) için uygun hale de getirilebilir, burada FOLR1 düzeyleri kullanılan spesifik tekniğe bağlı olarak farklılık gösterebilir.

Burada "primer antikor" terimi, bir örnek dokusu içinde hedef protein antijenini spesifik olarak bağlayan bir antikoru ifade eder. Bir primer antikor genel olarak, bir immünohistokimyasal (IHC) prosedürde kullanılan birinci antikordur. Bir uygulamada, primer antikor, bir IHC prosedüründe kullanılan tek antikordur. Burada "sekonder antikor" terimi, bir primer antikor spesifik olarak bağlayan, böylece primer antikor ve eğer varsa bir müteakip reaktif arasında bir köprü

oluşturan bir antikoru ifade eder. Sekonder antikör genel olarak, bir immünohistokimyasal prosedürde kullanılan ikinci antikordur.

- Mevcut buluşun bir "örneği" veya "biyolojik örneği", biyolojik orijinlidir, spesifik uygulamalarda, örneğin, ökaryotik organizmalardan elde edilir. Tercih edilen uygulamalarda, örnek bir insan örneğidir, ancak hayvan örnekleri de buluşun tatbikinde kullanılabilir. Mevcut buluşta kullanımasında için bir örneğin sınırlayıcı olmayan kaynakları örneğin, solid dokuyu, biyopsi aspiratları, assitleri, sıvısal ekstraktları, kan, plazma, serumu, omurilik sıvısı, lenf sıvısı, cildin, respiratuvar, intestinal ve genitoüriner yolların dışsal bölümlerini, gözyaşları, tükürüğü, sütü, tümörleri, organları, hücre kültürlerini ve/veya hücre kültürü bileşenlerini, içerir. Mevcut buluş, genel olarak solid tümör örnekleri veya başka vücut sıvıları, örneğin, assitler, içeren kanser örnekleri için özellikle yararlıdır, burada mevcut malzemenin miktarı azdır. Bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, farklı hücre veya doku tiplerini karşılaştırmayarak, farklı gelişimsel evreleri karşılaştırmayarak ve hastalığın veya anormalliğin varlığını ve/veya tipini saptamayı veya belirlemeyi içeren yöntem FOLR1'in ekspresyonunun bir yönünü veya bir örneğin bir durumunu incelemek için kullanılabilir.
- Buradaki amaçlar için, bir doku örneğinin bir "kesiti", bir doku örneğinin bir tek parçası veya parçası, örneğin, bir doku örneğinden kesilen dokular veya hücrelerin ince bir dilimi (kesitini), ifade eder. Doku örneklerinin çoklu kesitlerinin alınabileceği ve mevcut buluşa göre analize tabi tutulabileceği anlaşıldır. Bazı olgularda, dokunun seçilen kısmı veya kesiti hücrelerin bir homojen popülasyonunu içerir. Diğer olgularda, seçilen kısım, dokuların bir bölgesini, örneğin, bir sınırlayıcı olmayan örnek olarak lümeni, içerir. Seçilen kısım, bir veya iki hücre kadar küçük olabilir veya örneğin, binlerce hücreyi temsil edebilir. Çoğu olguda, hücrelerin toplamı önemlidir ve buluş hücresel bileşenlerin saptanmasında kullanımasında için tarif edilmişken, yöntem ayrıca bir organizmanın hücresel-olmayan bileşenlerini örneğin, bir sınırlayıcı olmayan örnek olarak kan içinde çözünebilen bileşenleri) saptamak için de kullanılabilir.

"Korele etmek" veya "korele etme" ile, bir birinci analizin performansını ve/veya sonuçlarını bir ikinci analizin performansını ve/veya sonuçları ile, herhangi bir

şekilde, karşılaştırma kastedilir. Örneğin, bir kişi ikinci analizi yürütürken bir birinci analizin sonuçları kullanabilir ve/veya bir kişi bir ikinci analizin gerçekleştirilmesinin gerekip gerekmediğini belirlemek için bir birinci analizin sonuçları kullanabilir ve/veya bir birinci analizin sonuçları bir ikinci analizin sonuçları ile karşılaştırabilir. Bir uygulamada, FOLR1'in artmış ekspresyonu, bir FOLR1'i hedef alan anti-kanser terapisinin etkililiğinin artmış olması ile koreledir.

"Antikor" terimi, immünoglobülin molekülünün değişken bölgesi içindeki en az bir antijen tanıma yeri vasıtasıyla bir hedefi, örneğin, bir proteini, polipeptidi, peptidi, karbonhidratı, polinükleotidi, lipidi veya yukarıdakilerin kombinasyonlarını, tanıyan ve spesifik olarak bağlayan bir immünoglobülin molekülü anlamına gelir. Burada kullanıldığı şekliyle, "antikor" terimi, antikorlar arzu edilen biyolojik aktiviteyi gösterdiği sürece, aynen poliklonal antikorları, aynen monoklonal antikorları, antikor fragmanları (örneğin, Fab, Fab', F(ab')₂ ve Fv fragmanları), tek zincirli Fv (scFv) mutantları, multispesifik antikorlar, örneğin, en az iki aynen antikordan üretilen bispesifik antikorlar, kimerik antikorlar, beşerleştirilmiş antikorlar, insan antikorları, bir antikorun bir antijen belirleme kısmı içeren füzyon proteinlerini ve bir antijen tanıma yeri içeren herhangi bir başka modifiye edilmiş immünoglobülin molekülünü, kapsar. Bir antikor, sırasıyla alfa, delta, epsilon, gama ve mü olarak ifade edilen bunların ağır-zincir sabit alanları kimliğine göre, beş majör immünoglobülin sınıfı: IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM, veya bunların alt-sınıflarından (izotiplerinden) (örneğin, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 ve IgA2) herhangi birinden olabilir. Immünoglobülinlerin farklı sınıfları farklı ve iyi-bilinen alt-birim yapılarına ve üç boyutlu konfigürasyonlara sahiptir. Antikorlar, çöplak olabilir veya diğer moleküllere, örneğin, toksinlere, radyoizotoplara, vb. konjuge edilebilir.

Bir "bloke etme" antikoru veya bir "antagonist" antikor, bunun bağladığı antijenin, örneğin, FOLR1'in, biyolojik aktivitesini inhibe eden veya azaltan bir antikordur. Belirli uygulamalarda, bloke etme antikorları veya antagonist antikorlar antijenin biyolojik aktivitesini kayda değer ölçüde veya tamamen inhibe eder. Arzu edilebilir bir şekilde, biyolojik aktivite, %10, %20, %30, %50, %70, %80, %90, %95 veya hatta %100 azaltılır.

"Anti-FOLR1 antikor" veya "FOLR1'i bağlayan bir antikor" terimi, antikorun FOLR1'i hedef almada bir tanısal ve/veya terapötik ajan olarak yararlı olduğu bir şekilde FOLR1'i yeterli afinite ile bağlayabilen bir antikor ifade eder. Bir anti-FOLR1 antikorunun bir ilgili olmayan FOLR1-olmayan proteini bağlama derecesi, 5 örneğin, bir radyoimmünoanaliz (RIA) ile, ölçüldüğü üzere antikorun FOLR1'i bağlaması yaklaşık %10'undan daha azdır. Belirli uygulamalarda, FOLR1'i bağlayan bir antikor, $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ veya $\leq 0,1 \text{ nM}$ olan bir ayrılma sabitine (Kd) sahiptir. Anti-FOLR1 antikorları örnekleri, teknikte bilinir ve burada referans ile eklenmiş olan US Başvuru Yayın No. 2012/0009181'de 10 açıklanır.

"Antikor fragmanı" terimi, bir aynen antikorun bir kısmını ifade eder ve bir aynen antikorun antijenik belirleme değişken bölgelerini ifade eder. Antikor fragmanları örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, Fab, Fab', F(ab')₂ ve Fv 15 fragmanları, lineer antikorlar, tek zincirli antikorlar ve antikor fragmanlarından oluşturulan multispesifik antikorları içerir.

Bir "monoklonal antikor", bir tek antijenik belirleyicinin veya epitopun belirli spesifik tanıması ve bağlaması dahi edilen bir homojen antikor popülasyonunu ifade 20 eder. Bu, tipik olarak farklı antijenik belirleyicilere karşı yönlendirilmiş farklı antikorları içeren poliklonal antikorların tersi durumdur. "Monoklonal antikor" terimi, hem aynen hem de tam-boy monoklonal antikorları aynı zamanda antikor fragmanlarını (örneğin, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), tek zincirli (scFv) mutantları, bir antikor kısmı içeren füzyon proteinlerini ve bir antijen tanıma yeri içeren herhangi 25 bir başka modifiye edilmiş immünoglobülin molekülünü kapsar. Dahası, "monoklonal antikor", bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, hibridom, faj seleksiyonu, rekombinant ekspresyon ve transgenik hayvanlar ile olanları içeren, çok sayıda yol ile yapılan bu tarz antikorları ifade eder.

"Epitop" veya "antijenik belirleyici" terimi burada ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır ve bir antijenin bir özel antikor tarafından tanımlanabilen ve spesifik olarak bağlanabilen kısmını ifade eder. Antijen bir polipeptit olduğunda, epitoplar hem bitişik amino asitlerden hem de bir proteinin tersiyer katlanması ile yan yana getirilen bitişik-olmayan amino asitlerden oluşturulabilir. Bitişik amino asitlerden 30

oluşturulan epitoplar tipik olarak, proteini denatüre etme üzerine muhafaza edilirken, tersiyer katlanma ile oluşturulan epitoplar tipik olarak, proteini denatüre etme üzerine kaybedilir. Bir epitop, eşsiz bir uzaysal konformasyonda tipik olarak en az 3 ve daha genel olarak, en az 5 veya 8-10 amino asit içerir.

5

"Bağlama afinitesi" genel olarak, bir molekülün (örneğin, bir antikorun) bir tek bağlama yeri ve bunun bağlama partneri (örneğin, bir antijen) arasındaki kovalent-olmayan etkileşimlerin toplamının gücünü ifade eder. Aksi ifade edilmedikçe, burada kullanılan şekliyle, "bağlama afinitesi", bir bağlama çiftinin üyeleri (örneğin, antikor ve antijen) arasında 1:1'lik bir etkileşimi yansıtan içsel bağlama afinitesini ifade eder. Bir molekülün (X) bunun partneri (Y) için afinitesi genel olarak, ayrılma sabiti (K_d) ile temsil edilebilir. Afinite, burada tarif edilenleri içeren, teknikte bilinen yaygın yöntemler ile ölçülebilir. Düşük-afiniteli antikorlar genel olarak, antijeni yavaş bir şekilde bağlarken ve kolaylıkla ayrılma eğilimindeyken, yüksek-afiniteli antikorlar genel olarak antijeni daha çabuk bağlar ve daha uzun süre bağlanma eğilimindedir. Bağlama afinitesini ölçmenin, herhangi birinin mevcut buluşun amaçları için kullanılabildiği, çeşitli yöntemleri teknikte bilinir. Spesifik açıklayıcı uygulamalar, aşağıda tarif edilir.

10

15

20

25

Bağlama afinitesini ifade etmek için burada kullanılan "veya daha iyi", bir molekül ve bunun bağlama partneri arasında daha güçlü bir bağlamayı ifade eder. Burada kullanılan "veya daha iyi", daha küçük bir sayısal K_d değeri ile temsil edilen, daha güçlü bir bağlamayı ifade eder. Örneğin, bir antijen için "0,6 nM veya daha iyi" olan bir afiniteye sahip olan bir antikor, antijen için antikorun bağlama afinitesi, $<0,6$ nM'dir, yani, 0,59 nM'dir, 0,58 nM'dir, 0,57 nM'dir, vb. veya 0,6 nM'dan daha az olan herhangi bir değerdir.

30

Burada kullanılan şekliyle, "kayda değer ölçüde benzer" veya "kayda değer ölçüde aynı" ifadesi, (genel olarak, biri buluşun bir antikoru ile ilişkili ve diğeri bir referans/komparatör antikoru ile ilişkili olan) iki sayısal değer arasında benzerliğin yeterli bir şekilde yüksek bir derecesini gösterir, böylece teknikte uzmanlığı olan bir kişi söz konusu değerler (örneğin, K_d değerleri) ile ölçülen biyolojik karakteristiklerin bağlamı içinde çok az biyolojik ve/veya istatistiksel anlamı olan veya hiç biyolojik ve/veya istatistiksel anlamı olmayan iki değer arasındaki farkı

göz önünde bulunduracaktır. Söz konusu iki değer arasındaki fark, referans/komparatör antikor için değer bir fonksiyonu olarak yaklaşık %50'den daha azdır, yaklaşık %40'tan daha azdır, yaklaşık %30'dan daha azdır, yaklaşık %20'den daha azdır veya yaklaşık %10'dan daha azdır.

5

"İzole edilmiş" bir polipeptit, antikor, polinükleotid, vektör, hücre veya bileşim, doğada bulunmayan bir formda olan bir polipeptittir, antikordur, polinükleotiddir, vektördür, hücredir veya bileşimdir. İzole edilmiş polipeptitler, antikorlar, polinükleotidler, vektörler, hücre veya bileşimler, bunların doğada bulundukları bir formda artık bulunmadıkları bir dereceye kadar saflaştırılmış olanları içerir. Bazı uygulamalarda, izole edilmiş bir antikor, polinükleotid, vektör, hücre veya bileşim kayda değer ölçüde saftır.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, "kayda değer ölçüde saf", en az %50 saf (yani, kontaminantlardan yoksun), en az %90 saf, en az %95 saf, en az %98 saf veya en az %99 saf olan malzemeyi ifade eder.

15

Burada kullanıldığı şekliyle, "immünokonjugat" veya "konjugat" terimi, bir hücre bağlama ajanına (yani, bir anti-FOLR1 antikoruna veya bunun fragmanına) bağlı bir bileşimini veya bunun bir türevini ifade eder ve aşağıdaki bir jenerik formül ile tanımlanır: C-L-A, burada C = sitotoksin, L = bağlayıcı ve A = hücre bağlama ajanı veya anti-FOLR1 antikor veya antikor fragmanı. Immünokonjugatlar ayrıca, ters sıradaki jenerik formül ile de tanımlanabilir: A-L-C.

20

Bir "bağlayıcı", bir bileşimi, genel olarak bir ilaç, örneğin, bir maytansinoidi, bir hücre-bağlama ajanına, örneğin, bir anti FOLR1 antikoruna veya bunun bir fragmanına bir kararlı kovalent bir şekilde bağlayabilen herhangi bir kimyasal gruptur. Bağlayıcılar, bileşimin veya antikorun aktif kaldığı koşullarda altı asit-indüklü klevaja, üç indüklü klevaja, peptidaz-indüklü klevaja, esteraz-indüklü klevaja ve disülfid bağlı klevaja yatkın veya kayda değer ölçüde dirençli olabilir. Uygun bağlayıcılar teknikte iyi bilinir ve örneğin, disülfid grupları, tiyoeter grupları, asit labil grupları, foto-labil grupları, peptidaz labil grupları ve esteraz labil grupları içerir. Bağlayıcılar ayrıca, burada tarif edildiği ve teknikte bilindiği üzere yüklü bağlayıcıları ve bunların hidrofilik formlarını da içerir.

25

30

"Kanser" ve "kanserli" terimleri, memelilerde hücrelerin bir popülasyonunun regüle edilmemiş hücre büyümesi ile karakterize edildiği fizyolojik koşulu ifade eder veya tarif eder. Kanser örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, karsinomu, lenfomayla blastomu, sarkomu ve lösemi, içerir. Bu tarz kanserlerin daha özel örnekleri, skuamöz hücreli kanseri, küçük hücreli akciğer kanserini, küçük hücreli-olmayan akciğer kanserini, akciğerin adenokarsinomunu, akciğerin skuamöz karsinomunu, peritoneumun kanserini, hepatoselüler kanseri, gastrointestinal kanseri, pankreatik kanseri, gliyoblastomu, servikal kanseri, overyan kanseri, karaciğer kanserini, idrar kesesi kanserini, hepatomu, meme kanserini, kolon kanserini, kolorektal kanseri, endometriyal veya uterin karsinomunu, tükürük bezi karsinomunu, böbrek kanserini, karaciğer kanserini, prostat kanserini, vulval kanseri, tiroit kanserini, hepatik karsinomu ve baş ve boyun kanserlerinin çeşitli tiplerini içerir.

"Tümör" ve "neoplazm", benign (kanserli-olmayan) veya pre-kanserli lezyonları içeren maligne (kanserli) olan, aşırı hücre büyümesinden veya proliferasyonundan kaynaklanan herhangi bir doku kütleini ifade eder.

"Kanser hücresi", "tümör hücresi" terimleri ve dilbilgisel eş-değerleri, bir tümörden veya tümör hücresi popülasyonunun yansıyanı içeren hem tümörjenik-olmayan hücreleri hem de tümörjenik kök hücreleri (kanser kök hücrelerini) içeren, bir pre-kanserli lezyondan türetilen hücrelerin toplam popülasyonunu ifade eder. Burada kullanıldığı şekliyle, "tümör hücresi" terimi, bu tümör hücrelerini kanser kök hücrelerinden ayırt etmek için, yalnızca, yenilenme veya farklılaşma kapasitesinden yoksun olan bu tümör hücrelerini ifade ederken, "tümörjenik-olmayan" terimi ile modifiye edilecektir.

"Süje" terimi, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir özel tedavinin alınacak olan, insanlar, insan-olmayan primatlar, kemirgenleri ve benzerlerini içeren herhangi bir hayvanı (örneğin, bir memeliyi) ifade eder. Tipik olarak, "süje" ve "hasta" terimleri, bir insan süjeye atfen burada birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır.

Bir veya birden fazla ilave terapötik ajan "ile kombinasyon halinde" uygulama, simultane (eş-zamanlı) ve herhangi bir sıradaki sıralı uygulamayı içerir.

"Terapötik formülasyon" terimi, etken maddenin biyolojik aktivitesinin etkili olmasına izin vermek için bu tarz formda olan ve formülasyonun buna uygulanacağı bir süje için kabul edilemez bir şekilde toksik olan ilave bileşenler içermeyen bir preparasyonu ifade eder. Bu tarz formülasyon steril olabilir.

Burada açıklanmış üzere bir antikorun bir "etkili miktar", spesifik olarak ifade edilen bir amaç yerine getirmek için yeterli bir miktardır. Bir "etkili miktar", ifade edilen amaç ile ilişkili olarak, ampirik olarak ve rutin bir şekilde belirlenebilir.

"Terapötik olarak etkili miktar" terimi, bir antikorun veya başka ilacın bir süjede veya memelide bir hastalığa veya bozukluğa "tedavi etmek" için etkili olan bir miktarı ifade eder. kanser olgusunda, ilacın terapötik olarak etkili miktarı, kanser hücrelerinin sayısını azaltabilir; tümör boyutunu küçültebilir; periferik organların içine kanser hücresi infiltrasyonunu inhibe edebilir (yani, bir dereceye kadar yavaşlatabilir veya belirli bir uygulamada, durdurulabilir); tümör metastazını inhibe edebilir (yani, bir dereceye kadar yavaşlatabilir veya belirli bir uygulamada, durdurabilir); tümör büyümesini, bir dereceye kadar, inhibe edebilir ve/veya kanser ile ilişkili semptomların birini veya birden fazlasını bir dereceye kadar rahatlatır. Bakınız, buradaki "tedavi etme" tanımında ilacın büyümeyi önleyebildiği ve/veya var olan kanser hücrelerini öldürebildiği kadarıyla, bu sitostatik ve/veya sitotoksik olabilir. Belirli uygulamalarda, artırılmış FOLR1 düzeylerinin tanımlanması, daha yüksek dozajlar ile görülen ile aynı terapötik etkiyi sağlamak için FOLR1'i hedef alan terapötüğün azaltılmış miktarının uygulanmasına olanak sağlar. Bir "profilaktik olarak etkili miktar", arzu edilen profilaktik sonucu sağlamak için gerekli olan dozajlarda ve zaman periyotları boyunca etkili bir miktarı ifade eder. Tipik olarak, ancak zorunlu olmamak kaydıyla, bir profilaktik doz hastalıktan önce veya hastalığın erken bir evresinde süjelerde kullanıldığından, profilaktik olarak etkili miktar terapötik olarak etkili miktara kıyasla daha az olacaktır.

"Olumlu bir şekilde yanıt vermek" terimi genel olarak, bir süjede bir yararlı ihale neden olmayı ifade eder. Kanser tedavisi açısından, terim süje üzerinde bir

terapötik etki sağlamayı ifade eder. Kanserde pozitif terapötik etkiler çok say da yoldan ölçülebilir (Bakınız, W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). Örneğin, tümör büyümesi inhibisyonunun, moleküler belirteç ekspresyonunun, serum belirteç ekspresyonunun ve moleküler görüntüleme tekniklerinin tümü bir anti-kanser terapötığının terapötik etkinliğini değerlendirmek için kullanılabilir. NCI standartlarına göre, tümör büyümesi inhibisyonu açısından, $\leq \%42$ 'lik bir T/C, anti-tümör aktivitesinin minimum düzeyidir. $<\%10$ 'luk bir T/C'nin, $T/C (\%) = \text{Tedavi edilen medyan tümör hacmi} / \text{Kontrolün medyan tümör hacmi} \times 100$ ile, yüksek bir anti-tümör aktivitesi düzeyi olduğu düşünülür.

10

Burada kullanıldığında, "etiket" sözcüğü, bir "etiketlenmiş" antikör üretmek amacıyla antikora doğrudan veya dolaylı olarak konjuge edilen bir saptanabilen bileşiği veya bileşimi ifade eder. Etiket, kendi başına saptanabilen (örneğin, radyoizotop etiketler veya flüoresan etiketler) olabilir veya bir enzimatik etiket durumunda, bir substrat bileşiğinin veya bileşimin saptanabilir olan kimyasal değişimini katalizleyebilir.

15

Bir "kemoterapötik ajan", etki mekanizmasına bakılmaksızın, kanserin tedavisinde yararlı olan bir kimyasal bileşiktir. Kemoterapötik ajanların sınıfları bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, aşağıdakileri içerir: alkilleme ajanları, antimetabolitler, iğ zehir bitki alkaloidleri, sitotoksik/anti-tümör antibiyotikleri, topoizomeraaz inhibitörleri, antikörler, foto-duyarlılaştırıcılar ve kinaz inhibitörleri. Kemoterapötik ajanlar, "hedeflenmiş terapide" ve geleneksel kemoterapide kullanılan bileşikler içerir.

20

25

Terimler, örneğin, "tedavi etme" veya "tedavi" veya "tedavi etmek" veya "hafifletme" veya "hafifletmek", hem 1) tanımlanmış bir patolojik rahatsızlığı veya bozukluğun semptomlarını küreleyen, yavaşlatan, azaltan ve/veya tanımlanmış bir patolojik rahatsızlığı veya bozukluğun progresyonunu durduran terapötik tedbirleri hem de 2) bir hedeflenmiş patolojik rahatsızlığı veya bozukluğun gelişmesini önleyen ve/veya yavaşlatan profilaktik veya önleyici tedbirleri ifade eder. Böylelikle, tedaviye ihtiyacı olanlar, halihazırda bozukluğu olanlar, bozukluğa sahip olmaya yatkın olanlar ve bozukluğu önlenecek olanlar içerir. Belirli uygulamalarda, hasta aşağıdakilerin birini veya birden fazlasını gösterdiğinde, bir süje mevcut buluşun yöntemlerine göre kanser için başarılı bir

30

şekilde "tedavi edilir": her biri yeni ilaçların onayı için Ulusal Kansere Enstitüsü ve ABD Gıda ve İlaç Kurumu tarafından ayarlanan standartlar ile ölçüldüğü üzere, kaşekside azalma, sağ kalım süresinde artış, tümör progresyonu zamanında uzama, tümör kütlelerinde azalma, tümör yükünde azalma ve/veya tümör metastazı zamanında, tümör reküransı, tümör yanıtı, tam yanıt, parsiyel yanıt, kararlı hastalık, progresif hastalık, progresyonsuz sağ kalım (PFS), genel sağ kalım (OS) zamanında bir uzama. Bakır, Johnson et al., (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411.

10 Aynı zamanda "Tümör Progresyonu Zamanı" (YIP) olarak da ifade edilen "progresyonsuz sağ kalım" (PFS), kanserin büyümediği tedavi sırasındaki ve sonrasında zaman uzunluğunu gösterir. Progresyonsuz sağ kalım, hastaların bir tam yanıtı veya bir parsiyel yanıtı sahip olduğu zaman uzunluğunu aynı zamanda hastaların kararlı hastalığa sahip olduğu zaman uzunluğunu içerir.

15 "Hastalıklı sağ kalım" (DFS), hastanın hastalıklı kaldığı tedavi sırasındaki ve sonrasında zaman uzunluğunu ifade eder.

20 "Genel Sağ Kalım" (OS), naif veya tedavi edilmemiş bireylere veya hastalara kıyasla beklenen yaşam süresinde bir uzamayı ifade eder.

Mevcut açıklamada ve istemlerde kullanıldığı üzere, "bir", "biri" ve "bu" tekil formları, bağlam açık bir şekilde aksini ifade etmedikçe, çoğul formları içerir.

25 Uygulamalar burada "içeren" dili ile tarif edildiğinde, "oluşan" ve/veya "esas olarak oluşan" terimleri ile tarif edilen diğer şekilde benzer olan uygulamaların da sağlandığı anlaşılır.

30 Bir ifade, burada örneğin, "A ve/veya B", içinde kullanıldığı üzere "ve/veya" teriminin, hem "A ve B"yi, "A veya B"yi, "A"yı hem de "B"yi içermesi amaçlanır. Benzer şekilde, bir ifade, örneğin, "A, B ve/veya C", içinde kullanıldığı üzere "ve/veya" teriminin, aşağıdaki uygulamaların her birini kapsamaması amaçlanır: A, B ve C; A, B veya C; A veya C; A veya B; B veya C; A ve C; A ve B; B ve C; A (yalnızca); B (yalnızca) ve C (yalnızca).

II. Biyolojik örnekler

Biyolojik örnekler sıklıkla, bir fiksatif ile fikse edilir. Aldehit fiksatifleri, örneğin, formalin (formaldehit) ve glutaraldehit tipik olarak kullanılır. Diğer fiksasyon teknikleri, örneğin, alkol immersiyonu (Battifora ve Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095), kullanılarak fikse edilmiş doku örnekleri de uygundur. Kullanılan örnekler ayrıca, parafine de gömülebilir. Bir uygulamada, doku örnekleri hem formalin ile fikse edilir hem de parafine gömülür (FFPE). Bir başka uygulamada, FFPE bloku, FFPE çekirdek örneği için spesifik alan (alanlar) seçmek amacıyla analiz için bir veya birden fazla kısmı seçmeden önce hematoksin ile boyanır. Bu partikül numunelerinden doku blokları hazırlamanın yöntemleri, çeşitli prognostik faktörlerin önceki IHC çalışmalarında kullanılmıştır ve/veya bunlar teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinir (bakınız, örneğin, Abbondanzo et al., Am J Clin Pathol. 1990 May;93(5):698-702; Allred et al., Arch Surg. 1990 Jan;125(1):107-13).

Özet olarak, herhangi bir aynen organ veya doku makul bir şekilde küçük parçalara kesilebilir ve doku "fikse edilene" kadar çeşitlilik gösteren zaman periyotları boyunca çeşitli fiksatifler (örneğin, formalin, alkol, vb.) içinde inkübe edilebilir. Örnekler, vücuttan cerrahi olarak çıkarılan neredeyse herhangi bir aynen doku olabilir. Örnekler, histopatoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan ekipmana uyan makul bir şekilde küçük parçaya (parçalara) kesilebilir. Kesilen parçaların boyutu tipik olarak, bir kaç milimetre ile bir kaç santimetre aralığındadır.

III: Saptama Antikoru Konjugatları

Mevcut buluş ilaveten, bir saptama antikoru konjugat oluşturmak için en az bir ajana bağlı olan, FOLR1'e karşı genel olarak monoklonal tipte olan, antikolar sağlar. Tanısal olarak antikor moleküllerinin etkinliğini arttırmak amacıyla, bunu en az bir arzu edilen moleküle veya kısma bağlamak veya kovalent olarak bağlama veya bununla kompleks haline getirmek gelenekseldir. Bu tarz bir molekül veya kısım, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, en az bir raportör molekül, olabilir. Bir raportör molekül, bir analiz kullanılarak saptanabilen herhangi bir kısım olarak

tanımlanır. Antikorlara konjuge edilmiş raportör moleküllerin sınırlayıcı olmayan örnekleri, enzimleri, radyoaktif-etiketleri, haptenleri, flüoresan etiketleri, fosforesan molekülleri, kemilüminesan molekülleri, kromoforlar, lüminesan molekülleri, foto-afinite moleküllerini, renkli parçacıklar ve/veya ligandlar, örneğin, biyotini, içerir.

5

Yeterli selektivitesi, özgüllüğü veya afinitesi olan herhangi bir hücre bağlama ajanı (örneğin, bir antikör veya polipeptit) FOLR1 polipeptidinin saptanması için temel olarak kullanılabilir. Bu tarz özellikler, teknikte uzmanlaşmış olan kişiler tarafından bilinen geleneksel immünolojik tarama metodolojisi kullanılarak değerlendirilebilir.

10

Kanonik antijen bağlama yerlerine ek olarak, antikör molekülünde biyolojik aktif molekülleri bağlamak için yerler, antijeni bağlayabilen değişken alan içinde yer alan yerleri içerir. Buna ek olarak, değişken alan kendiliğinden antikör bağlamaya (Kang et al., 1988) dahil edilir ve anti-antikörler tarafından tanınan epitoplar (idiyotoplar) içerir (Kohler et al., 1989).

15

Protein bağlama (örneğin, antikör) konjugatları belirli örnekleri, protein bağlama ajanı (örneğin, antikörün) bir saptanabilen etikete bağlanmış konjugatlardır. "Saptanabilen etiketler", bunların spesifik fonksiyonel özelliklerinden ve/veya kimyasal karakteristiklerinden dolayı saptanabilen bileşiklerdir ve/veya elemanlardır, bunların kullanılması bunların eklendiği antikörün saptanması ve/veya arzu edildiğinde ilaveten kantifiye edilmesine olanak sağlar.

20

Çok sayıda uygun görüntüleme ajanı, bunların antikörlere eklenmesi için yöntemlerin olduğu gibi, teknikte bilinir (bakınız, örneğin, her biri burada referans ile eklenmiş olan U.S. Pat. No. 5,021,236; 4,938,948; ve 4,472,509). Kullanılan görüntüleme teknikleri, örneğin, paramanyetik iyonlar; radyoaktif izotoplar; florokromlar, NMR ile saptanabilen maddeler ve/veya X-ışını görüntüleme, olabilir.

25

Protein bağlama (örneğin, antikör) konjugatları olarak kullanılması için tasarlanan emsal flüoresan etiketler, örneğin, Alexa 350, Alexa 430, Alexa 488, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Dylight 488, Floresin İzotiyosiyanat, Yeşil flüoresan protein (GFP), HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, Fikoeritrin, REG, Rhodamine

30

Green, Rhodamine Red, tetrametil rodamin (TMR), Renographin, ROX, TAMRA, TET, Tetrametilrodamin, Texas Red ve bu etiketlerin türevlerini (yani, halojenlenmiş analoglar¹ konjuge etmek için izotiyosiyanat veya başka bağlayıcı² ile modifiye edilmiş hallerini, vb.), içerir. Bir emsal, radyoaktif-etiket, trityumdur.

5

Mevcut buluşta tasarlanan protein bağlama (örneğin, antikor) saptama konjugatlar³ in vitro kullanı⁴m için olanlar⁵ içerir, burada antikor bir sekonder bağlama ligandına ve/veya bir kromojenik substrat ile temas üzerine bir renkli ürün üretecek olan bir enzime (bir enzim etiketine) bağlanı⁶r. Uygun enzimlerin örnekleri üreaz⁷, alkalın fosfataz⁸, (yaban turpu) hidrojen peroksidad⁹ ve/veya glukoz oksidaz¹⁰ içerir. Tercih edilen sekonder bağlama ligandlar¹¹, biyotindir ve/veya avidin ve streptavidin bileşikleridir. Bu tarz etiketlerin kullanı¹²masında, teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinir ve örneğin, U.S. Pat. No. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 ve 4,366,241'de tarif edilir.

15

Azido gruplar¹³ içeren moleküller ayrıca, düşük yoğunluklu ultraviyole ışık ile üretilen reaktif nitren ara ürünleri yoluyla proteinlere kovalent bağlar oluşturmak için de kullanılabılır (Potter & Haley, 1983). Özel olarak, pürin nükleotidlerinin 2- ve 8-azido analoglar¹⁴ ham hücre ekstraktlar¹⁵ içinde nükleotid bağlama proteinlerini tanımlamak için yere yönlendirilmiş foto-problar olarak kullanılmıştır (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- ve 8-azido nükleotidleri ayrıca, saflaştırılmış proteinlerin nükleotid bağlama alanları¹⁶ haritalamak için de kullanılmıştır (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989 ve Dholakia et al., 1989) ve antikor bağlama ajanları¹⁷ olarak da kullanılabılır.

20

25

Bir antikorun bunun konjugat kısmına eklenmesi veya konjugasyonu için teknikte bir kaç yöntem bilinir. Bazı eklenme yöntemleri, örneğin, bir organik şelatlama ajanı¹⁸ örneğin, bir dietilentriaminpentaasetik asit anhidrit (DTPA); etilentriamintetraasetik asit; N-kloro-p-tolüensülfonamid ve/veya antikora eklenmiş tetrakloro-3 α -6 α -difenilglikoüril-3, kullanılarak bir metal şelat kompleksinin kullanılması¹⁹ içerir (her biri burada referans ile eklenmiş olan U.S. Pat. No. 4,472,509 ve 4,938,948). Monoklonal antikorlar ayrıca, bir kuplaj ajanı, örneğin, glutaraldehit veya periodat, varlığında bir enzim ile de reaksiyona sokulabilir.

30

Floresin belirteçleri olan protein bağlama (örneğin, antikor) konjugatları bu kuplaj ajanlarının varlığında veya bir izotiyosiyanat ile reaksiyon ile hazırlanır. U.S. Pat. No. 4,938,948'de örneğin, meme tümörlerini görüntüleme, monoklonal antikorlar kullanılarak başarı ve saptanabilen görüntüleme kısımlarını bağlayıcılar, örneğin, metil-p-hidroksibenzimidat veya N-süksinimidil-3-(4-hidroksifenil)-propiyonat, kullanılarak antikora bağlanır.

Antikor birleştirme yerini değiştirmeyen reaksiyon koşulları kullanılarak bir immünoglobülinin Fc bölgesine sülfidril grupları seçkif bir şekilde uygulama ile immünoglobülinlerin türevlendirilmesi tasarlanır. Bu metodolojiye göre üretilen antikor konjugatları, iyileştirilmiş uzun-ömürlülüğü, özgülüğü ve duyarlılığı göstermek için açıklanır (burada referans ile eklenmiş olan U.S. Pat. No. 5,196,066). Efektör veya raportör moleküllerin yere-spesifik eklenmesi, burada raportör veya efektör molekül Fc bölgesi içindeki bir karbonhidrat rezidüsüne konjuge edilir, de literatürde açıklanmıştır (O'Shannessy et al., 1987).

İmmünoglobülinler nüklidler, örneğin, tritium, ile radyoaktif olarak etiketlenebilir. Nano-altı parçacıklar (örneğin, yaklaşık 0,5 nm-40 nm'lik boyutlardaki) ve/veya Quantum Dots (Hayward, Calif) da kullanılır.

IV. Enzimler ve Substratlar (Kromojenler)

Substratların ve indikatörlerin kullanılması, örneğin, mesela, aşağıda sağlanan emsal uygulamalar, FOLR1'i saptanması için tasarlanmıştır.

Yaban turpu peroksidaz (HRP), ilk olarak hidrojen peroksit ile bir kompleks oluşturan ve akabinde bunun su ve atomik oksijen ile sonuçlanarak parçalanmasına neden olan bir enzimdir. Çok sayıda diğer enzim gibi, HRP ve bazı HRP-benzeri aktiviteler fazla miktarda substrat ile inhibe edilebilir. HRP ve fazla miktarda hidrojen peroksit arasında oluşturulan kompleks katalitik olarak inaktiftir ve bir elektron donörü (örneğin, kromojenik madde) yokluğunda, geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe edilir. Bu fazla miktarda hidrojen peroksittir ve endojen HRP aktivitelerinin söndürülmesine neden olan bir elektron donörü yokluğudur.

Analiz sistemlerinde kullanıldığında, HRP ayrıca, tanımlanmış bir substratı bunun aktive edilmiş kromojenine dönüştürmek, böylece bir renk değişimine neden olmak için de kullanılabilir. HRP enzimi bir antikora, proteine, peptide, polimere veya başka moleküle çok sayıda yöntem ile konjuge edilebilir. Bu tarz yöntemler 5 tekniğe bilinir. Glutaraldehid HRP ve antikor karışımını içeren bir çözeltiye ekleme, enzime kaynaşla birbirine konjuge edilmiş olan daha fazla antikor molekülü ile sonuçlanacaktır. İki-adımlı prosedürde, HRP ilk olarak bifonksiyonel reaktifler ile reaksiyona girer. İkinci evrede, yalnızca aktive edilmiş HRP, antikor ile karıştırılır, 10 bu çok daha etkili etiketleme ve polimerizasyon olmaması ile sonuçlanır. HRP ayrıca, iki-evreli glutaraldehit prosedürü kullanılarak (strept)avidine de konjuge edilir. Bu form, örneğin, LAB'n ve LSAB'n substrat olduğu prosedürlerde kullanılır. Bunun HRP enziminin epsilonamino grupları ile reaksiyona sokulmasından önce, biyotinin ilk olarak biyotinil-N-hidroksisüksinimid estere veya biyotin hidrazide 15 türevlendirilmesi gerektiğinden, biyotin ile konjugasyon ayrıca iki adım içerir.

3,3'-Diaminobenzidin (DAB), enzimler, örneğin, alkol veya başka organik çözücüler içinde yüksek bir derecede çözünmeyen bir kahverengi renkte son ürün üreten, HRP, için bir substrattır. DAB'ın oksidasyonu ayrıca, polimerizasyona da neden 20 olur, bu osmiyum tetroksit ile reaksiyona girme ve böylece bunun boyama yoğunluğunu ve elektron dansitesini (yoğunluğunu) artırma, yetisi ile sonuçlanır. Polimerize edilmiş DAB'ın optik dansitesini yoğunlaştırmak için kullanılan bir kaç metalden ve yöntemden, gümüş sülfid ile kombinasyon halinde altın klorürün en başarılı olduğu görülür.

3-Amino-9-etilkarbazol (AEC), enzimler, örneğin, HRP, için bir substrattır. Oksidasyon üzerine, alkolde çözünebilen bir gül-kırmızı renkte son ürün oluşturur. Bundan dolayı AEC ile işlenmiş numunelerin alkole veya alkolik 25 çözeltilere (örneğin, Harris hematoksiline) daldırılması gerekmez. Bunun yerine, bir sulu karşı-boyama ve gömme vasatı kullanılmasıdır. AEC ne yazık ki ilave oksidasyona yatkındır ve fazla miktarda ışığa maruz kaldığında, yoğunluk açısından solacaktır. Bundan dolayı, karanlıkta saklanması tavsiye edilir.

4-Kloro-1-naftol (CN), enzimler, örneğin, HRP, için bir substrattır ve bir mavi renkte son ürün olarak çöker. CN alkol ve diğer organik çözücüler içinde çözündüğünden, numunenin dehidrate edilmesi, alkaolik karşı-boyamalara maruz bırakılması veya organik çözücüler içeren gömme vasatları ile lamel ile örtülmesi gerekmez.

5 DAB'den farklı olarak, CN çökelme yerinden difüze olma eğilimindedir.

p-Fenilendiamin dihidroklorür/pirokatekol (Hanker-Yates reaktifi), enzimler, örneğin, HRP, için bir elektron donör substrattır ve alkol ve diğer organik çözücüler içinde çözünmeyen bir mavi-siyah reaksiyon ürünü verir. Polimerize edilmiş DAB'ye benzer olarak, bu reaksiyon ürünü osmike edilebilir. Çeşitlilik gösteren sonuçlar, immünoperoksidaz tekniklerinde Hanker-Yates reaktifi ile başarılmıştır.

15 Buzağı ince bağırsak alkalın fosfatazı (AP) (moleküler ağırlık 100 kD), P-O bağını kırma ile organik esterlerden fosfat grupları (hidroliz ile) uzaklaştırarak ve transfer eden bir enzimdir; özet olarak, bir ara ürün enzim-substrat bağlanıdır. AP için şef metal aktivatörleri, Mg^{++} , Mn^{++} ve Ca^{++} 'dir.

20 AP, etiketlenmemiş alkalın fosfataz anti-alkalın fosfataz (APAAP) prosedürünün yayınlamasına kadar, immünohistokimiyada kapsamlı bir şekilde kullanılmıdır. Bu prosedürde yararlanılan çözünebilir immün kompleksleri yaklaşık olarak 560 kD olan moleküler ağırlıklara sahiptir. PAP tekniklerine kıyasla APAAP prosedürünün majör avantajı, endojen peroksidaz aktivitesinden kaynaklanan müdahalenin olmamasıdır. PAP boyaması üzerinde endojen peroksidaz 25 aktivitesinin potansiyel dağılmasından dolayı, APAAP teknik, kan ve kemik iliği smearlerinde kullanılması için tavsiye edilir. Kemik, böbrek, karaciğer ve baz kan hücrelerinden endojen alkalın fosfataz aktivitesi, 5 mM'den daha etkili olduğunun bulunmuş olmasına rağmen, substrat çözeltisine 1 mM levamisol eklenmesi ile inhibe edilebilir. İntestinal alkalın fosfatazlar, levamisol ile yeterli bir şekilde inhibe 30 edilmez.

İmmünoalkalın fosfataz boyama yönteminde, enzim naftol fosfat esterleri (substrat) fenolik bileşiklere ve fosfatlara hidrolize eder. Fenoller, çözünmeyen, renkli azo boyalar üretmek için renksiz diazonyum tuzlarına (kromojene) kupre

edilir. Substratların ve kromojenlerin bir kaç farklı kombinasyonu başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Naftol AS-MX fosfat, bunun asit formuna veya sodyum tuzu olarak kullanılabilir.

- 5 Kromojenler Fast Red TR ve Fast Blue BB, sırasıyla bir parlak kırmızı veya mavi renkte son ürün üretir. Her ikisi de alkolik ve diğer organik çözücüler içinde çözünebilir, böylece sulu gömme vasatlarında kullanılması gerekir. Fast Red TR, boyama hücreleri smearler olduğunda, tercih edilir.
- 10 İlave emsal substratlar, naftol AS-BI fosfat, naftol AS-TR fosfat ve 5-bromo-4-kloro-3-indoksil fosfatı (BCIP) içerir. Diğer olası kromojenler, örneğin, Fast Red LB, Fast Garnet GBC, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) iyodonitrotetrazolyum Violet (INT) ve yapıların türevlerini, içerir.

15 V. İmmüno-saptama Yöntemleri

Mevcut buluş, biyolojik bileşenleri, örneğin mevcut buluş ile tasarlandığı üzere bir ligandı bağlamak, saflaştırmak, uzaklaştırmak, kantifiye etmek ve/veya başka durumda genel olarak saptamak için immüno-saptama yöntemleri ile ilgilidir.

- 20 Mevcut buluşa uygun şekilde hazırlanan antikolar, doğal-tip ve/veya mutant ligand proteinleri, polipeptitleri ve/veya peptitleri saptamak için kullanılabilir. Mevcut başvuru boyunca tarif edildiği üzere, doğal-tip ve/veya mutant ligand spesifik antikoların kullanılması tasarlanır. Bazı immüno-saptama yöntemleri, bir kaçından bahsetmek gerekirse, akış sitometrisini, enzime bağlı bağışıklık analizini (ELİZA), radyo-immünoanalizi (RIA), immüno-radyometrik analizi, floroimmünoanalizi, kemilüminesans analizi, biyolüminesans analizi ve Western blot'ı içerir. Çeşitli yararlı immüno-saptama yöntemlerinin adlarını bilimsel literatürde, mesela, örneğin, Doolittle M H ve Ben-Zeev O, Methods Mol Biol. 1999;109:215-37; Gulbis B ve Galand P, Hum Pathol. 1993 Dec;24(12):1271-85 ve De Jager R et al., Semin Nucl Med. 1993 Apr;23(2):165 -79, kaynaklarında, tarif edilmiştir.
- 30

Genel olarak, immüno-bağlama yöntemleri ligand proteinini, polipeptidini ve/veya peptidini içerdiğinden şüphelenilen bir örnek elde etmeyi ve örneği, durumuna göre, immüno-kompleksler oluşmasına izin vermek için etkili olan koşullar altında,

bir birinci ligand bağlama peptidi (örneğin, bir anti-ligand antikoru) ile temas ettirmeyi içerir.

Antijen saptama açısından, doku örneklerinin veya ekstraktların tercih edilmesine rağmen, analiz edilen biyolojik örnek bir doğal-tip veya mutant ligand protein-spesifik antijen içerdiğinden şüphelenilen herhangi bir örnek, örneğin, bir doku kesiti veya numune, bir homojenize edilmiş doku ekstraktı, biyopsi aspiratları, bir hücre, yukarıda doğal-tip veya mutant FOLR1-içeren bileşimlerin herhangi birinin ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması formları veya hatta kan ve/veya serumu içeren, doku ile temas eden hale gelen herhangi bir biyolojik sıvı olabilir.

Seçilen biyolojik örneği immün kompleksler (primer immün kompleksler) oluşmasına izin vermek için etkili koşullar altında ve yeterli bir zaman periyodu boyunca antikor ile temas ettirme genel olarak, antikor bileşimini örneğe basit bir şekilde ekleme ve karıştırmak, antikorların mevcut herhangi bir ligand proteini antijeni ile immün kompleksler oluşturmaları, yani mevcut herhangi bir ligand proteini antijenini bağlamaları için yeterli uzunluktaki bir zaman periyodu boyunca inkübe etme meselesidir. Bu süreden sonra, örnek-antikor bileşimi, örneğin, doku kesiti, ELİZA plakası, nokta blot veya western blot, genel olarak spesifik olmayan bir şekilde bağlanan herhangi bir antikor türünü uzaklaştırmak, böylece yalnızca primer immün kompleksler ile spesifik olarak bağlanan antikorların saptanmasına olanak sağlamak için, uygulanacaktır.

Genel olarak, immüno-kompleks oluşumunun saptanması teknikte iyi bilinir ve çok sayıda yaklaşımların uygulanması yoluyla başarılabılır. Bu yöntemler genel olarak, bir etiketin veya belirtecin, örneğin, radyo-aktif, flüoresan, biyolojik veya enzimatik etiketlerin herhangi birinin, saptanmasına dayanır. Bu tarz etiketlerin kullanılması ile ilgili U.S. Patentleri, U.S. Pat. No. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 ve 4,366,241'i içerir. Elbette, bir kişi, teknikte bilindiği üzere, bir sekonder bağlama ligandını, örneğin, bir sekonder antikorun ve/veya bir biyotin/avidin ligand bağlama düzenlemesinin kullanılması ile ilave avantajlar bulabilir.

Saptamada kullanılan anti-ligand antikorunun kendisi, bir saptanabilen etikete bağlanabilir, burada akabinde, bir kişi bu etiketi kolaylıkla saptayabilir, böylece bileşim içinde primer immün komplekslerin miktarının belirlenmesine olanak sağlayabilir. Alternatif olarak, primer immün kompleksler ile bağlanı hale gelen birinci antikor, antikor için bağlama afinitesine sahip olan bir ikinci bağlama ajanı vasıtasıyla saptanabilir. Bu durumlarda, ikinci bağlama ajanı bir saptanabilen etikete bağlanabilir. İkinci bağlama ajanının kendisi sıklıkla bir antikordur, böylelikle bu bir "sekonder" antikor veya bir polimer saptama sistemi olarak adlandırılabilir. Primer immün kompleksler, sekonder immün komplekslerin oluşmasına izin vermek için etkili koşullar altında ve yeterli bir zaman periyodu boyunca, etiketlenmiş, sekonder bağlama ajanı veya antikor/polimer saptama sistemi ile temas ettirilir. Sekonder immün kompleksler akabinde genel olarak spesifik olmayan bir şekilde bağlı olan herhangi bir etiketlenmiş sekonder antikoru veya ligandı uzaklaştırmak için yıkanılır ve akabinde, sekonder immün kompleksler içinde kalan etiket saptanır.

İlave yöntemler, bir iki-adımlı yaklaşım ile primer immün komplekslerin saptanmasını içerir. Antikor için bağlama afinitesine sahip olan bir ikinci bağlama ajanı, örneğin, bir antikor, yukarıda tarif edildiği üzere, sekonder immün kompleksler oluşturmak için kullanılır. Yıkamadan sonra, sekonder immün kompleksler, yine immün kompleksler (tersiyer immün kompleksler) oluşmasına izin vermek için etkili koşullar altında ve yeterli bir zaman periyodu boyunca, ikinci antikor için bağlama afinitesine sahip olan bir üçüncü bağlama ajanı veya antikoru ile temas ettirilir. Üçüncü ligand veya antikor, bir saptanabilen etikete bağlanır, böylece bu şekilde oluşturulan tersiyer immün komplekslerin saptanmasına olanak sağlar. Bu sistem, arzu edildiğinde, sinyal amplifikasyonu sağlayabilir.

Bir biyotinlenmiş monoklonal veya poliklonal antikor, hedef antijeni (antijenleri) saptamak için kullanılabilir ve akabinde bir ikinci adımlı antikoru kompleks haline getirilmiş biyotine eklenmiş biyotini saptamak için kullanılır. Bu yöntemde, test edilecek olan örnek ilk olarak, birinci adımlı antikoru içeren bir çözelti içinde inkübe edilir. Hedef antijen mevcut olduğunda, antikorların bazıları bir biyotinlenmiş antikor/antijen kompleksi oluşturmak için antijeni bağlar. Akabinde, antikor/antijen kompleksi, her bir adımda antikor/antijen kompleksine ilave biyotin

yerleri ekleme ile, sırasıyla streptavidin (veya avidin), biyotinlenmiş DNA ve/veya komplementer biyotinlenmiş DNA çözeltileri içinde inkübasyon ile çoğaltılır. Amplifikasyon adımları uygun bir amplifikasyon düzeyi elde edilene kadar tekrar edilir, bu noktada örnek biyotine karşı ikinci adım antikorunu içeren bir çözelti içinde inkübe edilir. Bu ikinci adım antikoru, örneğin, bir kromojen substratı kullanarak hitoenzimoloji ile antikor/antijen kompleksinin varlığını saptamak için kullanılan bir enzim ile olduğu şekilde, etiketlenir. Uygun amplifikasyon ile, makroskopik olarak görülebilen, bir protein bağlama (örneğin, antikor) konjugatı üretilir.

10

İmmüno-saptamanın bir başka bilinen yöntemi, immüno-PCR (Poymeraz Zincir Reaksiyonu) metodolojisinden avantaj sağlar. PCR yöntemi, antikoru salan bir düşük pH'lı veya yüksek tuzlu tampon ile yıkanan bir DNA/biyotin/streptavidin/antikor kompleksi kullanır. Elde edilen yıkama çözeltisi akabinde uygun kontroller ile uygun primerler ile bir PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için kullanılır. PCR'nin muazzam amplifikasyon kapasitesinden ve özgüllüğünden bir tek antijen molekülünü saptamak için yararlanılabilir. Bu tarz saptama, gerçek-zamanlı olarak gerçekleşebilir. Örneğin, kantitatif gerçek-zamanlı PCR kullanılması tasarlanabilir.

20

Çeşitli hastalık formları olan hastaların klinik tanısında ve/veya izlenmesinde, bir FOLR1 mutantının saptanması ve/veya bir normal süjeden elde edilen bir karşılaştırmalı biyolojik örnek içindeki düzeylere kıyasla, FOLR1'in düzeylerindeki bir değişim hastalıklı bir hastanın göstergesidir. Bununla birlikte, teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilindiği üzere, bu tarz bir klinik tanı izolasyondaki bu yöntemle göre yapılması zorunlu olmayacaktır. Teknike uzmanlığı olan kişiler, biyo-belirteçlerin, bir pozitif tanılamayı temsil eden, tiplerindeki ve/veya miktarlarındaki anlamlı farklılıklar ve/veya biyo-belirteçlerin düşük düzeyini ve/veya arka-plan değişimlerini ayırt etmeye gayet aşinadır. Gerçekte, arka-plana ekspresyon düzeyleri sıklıkla, bunun üstüne arttırılmış saptamanın anlamlı ve/veya pozitif olarak skorlanacağı bir "kesim-değeri" oluşturmak için kullanılır.

30

Bir uygulamada, FOLR1'in (immünohistokimya ile) immünolojik saptanması, hem yoğunluk hem de tekdüzelik (boyanmış hücrelerin yüzdesi-yalnızca membran) için

skorlanır. Yoğunluk için FOLR1 ekspresyonu için karşılaştırmalı ölçekler, 0 - Negatif, 0-1 - Çok Zayıf, 1 - Zayıf, 1-2 - Zayıf ila Orta, 2 - Orta, 2-3 - Orta ila Güçlü, 3 - Güçlü şeklinde koreledir. Kantitatif olarak, Skor 0, tümör hücrelerin membran boyamasının gözlenmemesini temsil eder. Bir Skor 1, tümör hücrelerin bir çok küçük/zar zor algılanabilen membran boyamasını temsil eder. Skor 2 için, tümör hücrelerinde bir orta-düzeyde membran boyaması gözlenir. Son olarak, Skor 3 veya 3+, tümör hücrelerin bir orta- ila güçlü-düzeyde membran boyamasını temsil eder. FOLR1 ekspresyonu için 0'lık veya 1'lik skoru olan örnekleri, FOLR1'i aşırı eksprese etmediği şeklinde karakterize edilebilirken, 2'lik veya 3'lük skoru olan örnekleri FOLR1'i aşırı eksprese ettiği şeklinde karakterize edilebilir. FOLR1'i aşırı eksprese eden örnekler ayrıca, her bir hücre için eksprese edilen FOLR1 moleküllerinin kopyalarının sayısına karşılık gelen immünohistokimyasal skorları ile de derecelendirilebilir ve biyokimyasal olarak belirlenebilmiştir: 0=0-10.000 kopya/hücre, 1=en az yaklaşık 200.000 kopya/hücre, 2=en az yaklaşık 500.000 kopya/hücre ve 3=en az yaklaşık 2.000.000 kopya/hücre. FOLR1 hücre membran boyama tekdüzeliği yüzdesi karşılaştırmalı ölçekler aşağıdaki şekilde koreledir: 0 - Negatif, Fokal - <%25, heterojen (hetero) - %25-75 ve homojen (homo) - >%75.

VI. Nükleik Asit Hibridizasyonu

İn situ hibridizasyon genel olarak, lamlara fikse edilmiş hücreler veya doku kesitleri üzerinde gerçekleştirilir. İn situ hibridizasyon, bir kaç geleneksel metodoloji ile gerçekleştirilebilir (Bakınız, örneğin, Leitch et al., In situ Hybridization: a practical guide, Oxford BIOS Scientific Publishers, Microscopy handbooks v. 27 (1994)). Bir in situ prosedürde, flüoresan boyalar (örneğin, bir Argon iyon lazeri ile uyarıldığında yeşil flüoresan ışık yayan floresin izotiyosiyanat (FITC)) hücre içinde bir hedef nükleotid dizisine komplementer olan bir nükleik asit dizisini etiketlemek için kullanılır. Hedef nükleotid dizisini içeren her bir hücre, etiketlenmiş probu bağlayacaktır, böylece hücrelerin kullanılabildiği spesifik florokromun eksitasyonu için uygun bir dalga boyundaki bir ışık kaynağına maruziyeti üzerine bir flüoresan sinyal üretecektir.

Hibridizasyon sertliğinin çeşitli dereceleri kullanılabilir. Hibridizasyon koşulları daha sert hale geldikçe, bir kararlı dubleksi oluşturmak ve idame ettirmek için prob ve

hedef aras ında daha büyük bir tamamlayıcılık derecesi gerekecektir. Sertlik sıcaklığı arttırma, tuz konsantrasyonunu düşürme veya formamid konsantrasyonunu yükseltme ile arttırılır. Dekstran sülfat ekleme veya bunun konsantrasyonunu yükseltme ayrıca, hibridizasyon oranını ve nihai sinyal yoğunluğunu arttırmak için etiketlenmiş probun etkili konsantrasyonunu da arttırabilir. Hibridizasyondan sonra, lamlar genel olarak hibridizasyon çözeltisi içinde bulunanlara benzer reaktifler içeren bir çözelti içinde gerekli olan sertliğe bağli olarak dakikalar ila saatler arasında çeşitlilik gösteren ykama zamanı ile yıkanır. Daha uzun veya daha sert yıkamalar tipik olarak, spesifik-olmayan arka-planı düşürür, ancak toplam duyarlılığı düşürme riskini ortaya koyar.

Nükleik hibridizasyon analizinde kullanılan proplar, RNA veya DNA oligonükleotidler veya polinükleotidler olabilir ve yalnızca doğal-oluşumu nükleotidler değil aynı zamanda bunların analogları, örneğin, digoksigenin dCTP, biyotin dCTP 7-azaguanozin, azidotimidin, inozin veya üridin, de içerebilir. Diğer yararlı proplar, örneğin, peptit proplar ve bunların analogları dallanmış gen DNA'sı, peptidomimetikleri, peptit nükleik asidini (PNA) ve/veya antikorlar içerir.

Proplar, söz konusu hedef nükleik asit dizisi için yeterli tamamlayıcığa sahip olmalıdır, böylece hedef nükleik asit dizisi ve prob arasında kararlı ve spesifik bağlama gerçekleşir. Kararlı hibridizasyon için gerekli olan homoloji derecesi, hibridizasyon vasatının ve/veya yıkama vasatının sertliği ile çeşitlilik gösterir. Tercihen, tamamen homolog proplar mevcut buluşta kullanılır, ancak teknikte uzmanlığı olan kişiler daha az ancak yeterli homoloji gösteren propların mevcut buluşta kullanılabileceğini kolaylıkla anlayacaktır (bakınız, örneğin, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)).

Proplar ayrıca, üretilebilir ve bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, in situ hibridizasyon, somatik hücre hibrit panelleri veya ayrılmış kromozomları benek blotları ile haritalamayı kromozomal bağlantı analizini, içeren bir kaç araç ile seçilebilir veya insan hücre hatlarından veya insan kromozomları içeren somatik hücre hibritlerinden ayrılmış kromozom kütüphanelerinden, radyasyon somatik hücre hibritlerinden, bir kromozom bölgesinin mikro-disseksiyonundan veya bir

bitişik YAC klonu gibi eşsiz bir kromozom lokusu veya başka uyum araçları için spesifik PCR primerleri ile tanımlanmış maya yapay kromozomlarından (YAC'lardan) klonlanabilir veya izole edilebilir. Problar bir plazmid, kozmid, YAC; Bakteriyel Yapay Kromozomlar (BAC'lar), viral vektör veya herhangi bir başka uygun vektör içine klonlanmış genomik DNA, cDNA veya RNA olabilir. Problar geleneksel yöntemler ile klonlanabilir veya sentezlenebilir. Klonlandığında, izole edilmiş prob nükleik asit fragmanları tipik olarak, bir vektör, örneğin, lamda faj, pBR322, M13 veya SP6 veya T7 promotörü içeren vektörler içine yerleştirilir ve bir bakteriyel konak içinde bir kütüphane olarak klonlanır [Bakın, örneğin, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)].

Problar tercihen, mesela, örneğin, bir floresan ile etiketlenir. Floresanların örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, nadir toprak şelatları (öropiyum şelatlarını), Texas Red'i, rodamini, floresini, dansili, Lissamine'i, umbelliferonu, fikoeritrini, fikosiyanini veya piyasada satılan floresanlar, örneğin, SPECTRUM ORANGE™ ve SPECTRUM GREEN™ ve/veya yukarıdakilerin herhangi birinin veya birden fazlasının türevlerini, içerir. Analizde kullanılan çoklu problar, birden fazla ayrılabilebilir floresan veya pigment renk ile etiketlenebilir. Bu renk farklılıkları spesifik probların hibridizasyon pozisyonlarını tanımlamak için bir araç sağlar. Dahası, uzaysal olarak ayrılmamış problar iki başka rengin (örneğin, kırmızı+yeşil=sarı) pigmentin (örneğin, mavi+sarı=yeşil) karıştırılmasından kaynaklanan farklı bir renkte ışık veya pigment ile veya bir anda yalnızca bir rengin geçmesine ayarlanmış bir filtre kullanılması ile tanımlanabilir.

Problar, teknikte uzmanlığı olan bir kişi tarafından bilinen geleneksel metodolojilerden yararlanarak, floresan ile doğrudan veya dolaylı olarak etiketlenebilir.

VII. Saptama Kitleri ve Bileşimler

Burada açıklanmış üzere mevcut buluşun tatbikinde kullanılması için kitler de buluş tarafından tarif edilir. Bu tarz kitler, her biri buluşun tatbikini desteklemek amacıyla, örneğin, halihazırda bir belirtece eklenmiş olan bir veya birden fazla

bağlama ajanını (antikoru) içeren, yöntemlerde yararlanılan (tipik olarak konsantre formda) bir veya birden fazla çeşitli reaktif içeren veya opsiyonel olarak bir bağlama ajanı bir antikora veya nükleik asit molekülüne kuple etmek için reaktifler (aynı zamanda belirtecini kendisi); tamponlar, uygun nükleotid trifosfatlar (örneğin, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP, ATP, CTP, GTP ve UTP), ters transkriptaz, DNA polimeraz, RNA polimeraz ve amplifikasyon ile nükleik asit moleküllerinin saptanmasında kullanılması için bir veya birden fazla dizi-spesifik veya dejenere primer ve/veya (opsiyonel olarak mikro-disseksiyon ile) izolasyon için reaktifler ve enstrümantasyon içeren, kaplar içerebilir. Mevcut buluşun bir ligand saptama yönteminde kit bileşenlerini tarif eden bir etiket veya indikatör veya kit bileşenlerinin kullanılması için bir dizi talimat da tipik olarak dahil edilecektir, burada talimatlar kitin veya bunun bileşenlerinin bir kullanma talimatı ve/veya ambalajlanması ile ilişkili olabilir.

Mevcut buluş, yukarıda tarif edilen immüno-saptama yöntemlerinde kullanılması için immüno-saptama kitlerini tarif eder. Antikorlar genel olarak doğal-tip ve/veya mutant proteinleri, polipeptitleri ve/veya peptitleri saptamak için kullanıldığından, antikorlar tercihen kite dahil edilecektir. Böylece, immüno-saptama kitleri, uygun kap araçları içinde, bir doğal-tip ve/veya mutant proteini, polipeptidi ve/veya peptidi bağlayan bir birinci antikor ve/veya opsiyonel olarak, bir immüno-saptama reaktifi ve/veya ilaveten opsiyonel olarak bir doğal-tip ve/veya mutant protein, polipeptit ve/veya peptit içerecektir.

Kitin immüno-saptama reaktifleri, belirli antikor ile ilişkili ve/veya belirli antikora bağlı olan saptanabilen etiket olanları içeren, çeşitli formları herhangi birini alabilir. Bir sekonder bağlama ligandı ile ilişkili ve/veya bir sekonder bağlama ligandına bağlı olan saptanabilen etiketler de tasarlanır. Emsal sekonder ligandlar, birinci antikor için bağlama afinitesine sahip olan sekonder antikorlardır veya polimerlerdir.

Mevcut kitlerde kullanılması için ilave uygun immüno-saptama reaktifleri, ikinci antikor için bağlama afinitesine sahip olan, bir saptanabilen etiket ile bağlı olan bir üçüncü antikor veya polimer ile birlikte, birinci antikor için bağlama afinitesine sahip olan bir ikinci antikor içeren iki-bileşenli reaktif içerir. Yukarıda bildirildiği

üzere, çok sayıda emsal etiket teknikle bilinir ve/veya bu tarz etiketlerin tümü mevcut buluş ile bağlantılı olarak uygun bir şekilde kullanılabilir.

- Kit ilaveten, bir saptama analizi için bir standart eğrisi hazırlamak amacıyla kullanılabildiği üzere, etiketlenmiş ve/veya etiketlenmemiş, doğal-tip ve/veya mutant proteinin, polipeptidin ve/veya peptidin uygun bir şekilde alikotlanmış bileşim içerebilir. Kitler, tam olarak konjuge edilmiş formda, ara ürünler formunda ve/veya kitin kullanıcısı tarafından konjuge edilecek olan ayrıksımlar olarak antikor-veya polimer-etiketli konjugatlar içerebilir. Kitin bileşenleri, sulu vasat içinde ve/veya liyofilize edilmiş form içinde ambalajlanabilir.

- Kitlerin kap araçları genel olarak, bunun içine antikorun yerleştirilebileceği ve/veya tercihen uygun bir şekilde alikotlanabileceği en az bir viyal, test tüpü, flask, şişe, enjektör ve/veya başka kap aracı içerecektir. Mevcut buluşun kitleri ayrıca tipik olarak, ticari ölçek için yakını bir sınırlanma içinde antikor, antijen ve/veya herhangi bir başka reaktif kabı içeren bir araç da içerecektir. Bu tarz kaplar, bunun içinde arzu edilen viyallerin muhafaza edildiği enjeksiyon ve/veya üfleme ile kalıplanmış plastik kaplar içerebilir.

- Kitler ilaveten, kanserin tedavisi için bir veya birden fazla terapötik ajan, örneğin, FOLR1 immünokonjugatı ve/veya bir kemoterapötik ajan, içerebilir.

- Kit ilaveten, bir süjude FOLR1 ekspresyonunu ölçmek için kullanılan, bir FOLR1 saptama ajanı ve kullanım için talimatlar içeren, bir FOLR1 saptama reaktifi içerebilir. Bir uygulamada, FOLR1 saptama reaktifi, bir FOLR1 bağlama peptidi, proteini veya bir moleküler probu (yani, nükleik asidi) içerir. Kit ilaveten, anti-FOLR1 antikorunu bağlayan bir sekonder antikor içerebilir. FOLR1-spesifik antikor, 0,5 ila 7,5 µg/ml, tercihen 0,9 ila 3,8 +/-0,5 µg/ml, olan bir konsantrasyonda dahil edilebilir. Antikor, 1,0 +/- 0,5 µg/ml, 1,5 +/- 0,5 µg/ml, 1,9 +/- 0,5 µg/ml, 2,5 +/- 0,5 µg/ml, 3,0 +/- 0,5 µg/ml, 3,5 +/- 0,5 µg/ml, 3,8 +/- 0,5 µg/ml veya en fazla 4,2 µg/ml olan bir konsantrasyonda dahil edilebilir. Antikor, 0,9 ila 3,8 +/- 0,5 µg/ml aralığında bir nihai konsantrasyon elde etmek amacıyla seyreltmeler için talimatlar ile birlikte konsantre çözelti halinde dahil edilebilir. Kit ilaveten, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir saptama reaktifi içerebilir: bir enzim, bir florofor, bir

radioaktif etiket ve bir lüminofor. Saptama reaktifi aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilebilir: biyotin, digoksinin, floresin, tritium ve rodamin.

Kit ayrıca, FOLR1 ekspresyonunu saptamak ve skorlamak için talimatlar da içerebilir. Kit ayrıca, kontrol ve referans örnekleri de içerebilir. Kontrol ve referans örneklerinin sunulmadığı olmayan örnekleri, normal (normal kontrol) veya tümör (pozitif kontrol) örneklerinden türetilen hücre pelletlerini veya doku kültürü hücre hatları içerir. Emsal hücre hatları, KB, NCI-H2110, Igrov-1, Ishikawa, Jeg-3, Skov-3, Hela, T47D, Caco2, SW620, OAW28, HCC827, Ovar-8 ve Ovar-3, Ov-90, FOLR1'i eksprese ettiği bilinen başka tümör hücresi hatları ve FOLR1'i eksprese eden bir ekspresyon vektörü ile kalıcı veya geçici bir şekilde transfekte edilmiş hücre hatları içerir. Pozitif kontrol dokuları için ilave örnekleri ayrıca, Örnekler 9-11'de de bulunabilir. Kit ayrıca, boyama yoğunluğu ve tekdüzeliği için pozitif ve normal referans örnekleri görsel olarak gösteren bir boyama kılavuzu da içerebilir. Bu tarz boyama kılavuzları, normal akciğerden, pankreastan ve/veya tükürük bezinden referans örnekleri ve standardize edilmiş skorları olan boyanmış tümörlere (örneğin, overan, akciğer, renal ve endometriyal kansere aynı zamanda Örnekler'de Şekiller 23-25'te tarif edilenlere) sahip olabilir.

VIII. FOLR1-bağlama ajanları

FOLR1'i bağlayan herhangi bir antikor, mevcut buluşun saptama yöntemlerinde kullanılabilir. Terapötik olarak etkili anti-FOLR1 antikorlarının örnekleri, US Başvuru Yayın No. US 2012/0009181'de bulunabilir. FOLR1 için tam-boy amino asit (aa) ve nükleotid (nt) dizileri teknikte bilinir ve ayrıca burada sırasıyla SEQ ID NO.'ları 1 ve 2 ile temsil edildiği şekilde sağlanır. FOLR1'in saptanması için bir spesifik olarak yararlı antikor, fare monoklonal anti-huFOLR1 klon BN3.2'dir (Leica # NCL-L-FRalpha). Bir terapötik olarak etkili anti-FOLR1 antikorunun bir örneği, huMov19'dur (M9346A). SEQ ID NO.'ları 3-5'in polipeptitleri sırasıyla, huMov19 (M9346A) ağır zincirinin değişken alanı ve değişken alan hafif zincir versiyonu 1.00'ü huMov19'un değişken alan hafif zincir versiyon 1.60'ü içerir. Belirli uygulamalarda, huMov19 (M9346A) antikor, Budapeşte Antlaşması şartları altında ve PTA-10772 ve PTA-10773 veya 10774 ATCC depo numaralarına sahip olan, 7 Nisan 2010'da, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110'da yer

alan, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) ile depolanmış plazmidler tarafından şifrelenir. Buluşun terapötik yöntemlerinde yararlı olan FOLR1 immünokonjugatların örnekleri aşağıda sağlanır.

5 IX.FOLR1 İmmünokonjugatlar

Mevcut buluş ayrıca, bir sitotoksine (ilaca) veya ö-ilaca bağlanmış veya konjuge edilmiş, burada açıklandığı üzere anti-FOLR1 antikorların, antikor fragmanların, fonksiyonel eş-değerleri, iyileştirilmiş antikorlar ve bunların yönlerini içeren konjugatların (aynı zamanda burada immünokonjugatlar olarak da ifade edilir) etkinliğini arttırmak için yöntemleri de tarif eder. Emsal FOLR1 immünokonjugatlar, US Başvuru Yayın No. US 2012/0009181'de bulunabilir. Buluşun bir özel olarak etkili terapötik immünokonjugatı, yukarıda tarif edilen huMov19 antikorudur.

15

Uygun ilaçlar veya ön-ilaçlar teknikte bilinir. Belirli uygulamalarda, ilaçlar veya ön-ilaçlar sitotoksik ajanlardır. Mevcut buluşun sitotoksik konjugatında kullanılan sitotoksik ajan bir hücrenin ölümü ile sonuçlanan veya hücre ölümünü indükleyen veya bir şekilde hücre viabilitesini azaltan herhangi bir bileşik olabilir ve örneğin, maytansinoidleri ve maytansinoid analogların, benzodiazepinleri, taksoidler, CC-1065 ve CC-1065 analogların, duokarmisinleri ve duokarmisin analogların, enediinleri, örneğin, kalikeamisinleri, dolastatini ve auristatinleri içeren dolastatin analoglarını, tomaymisin türevlerini, leptomisin türevlerini, metotreksatı, sisplatini, karboplatini, daunorubisini, doksorubisini, vinkristini, vinblastini, melfalanı, mitomisin C'yi, klorambusili ve morfolino doksorubisini, içerir. Belirli uygulamalarda, sitotoksik ajan, maytansinoidlerdir ve maytansinoid analoglardır.

25

İlaç veya ön-ilaç, örneğin, anti-FOLR1 antikoruna, örneğin, huMov19'a, veya bunun fragmanına bir disülfid bağ yoluyla bağlanabilir. Bağlayıcı molekül veya çapraz-bağlama ajanı anti-FOLR1 antikoru veya bunun fragmanı ile reaksiyona girebilen bir reaktif kimyasal grubu içerir. Belirli uygulamalarda, hücre-bağlama ajanı ile reaksiyon için reaktif kimyasal gruplar, N-süksinimidil esterlerdir ve N-sülfosüksinimidil esterlerdir. İlave olarak, bağlayıcı molekül bir reaktif kimyasal grup, belirli uygulamalarda, bir disülfid bağ oluşturmak için ilaç ile reaksiyona

30

- girebilen bir ditiyopiridil grubu içerir. Belirli uygulamalarda, bağlayıcı moleküller, örneğin, N-süksinimidil 3-(2-piridilditiyo) propiyonatı (SPDP) (bakınız, örneğin, Carlsson et al., Biochem. J., 173: 723-737 (1978)), N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)bütanoatı (SPDB) (bakınız, örneğin, U.S. Patent No. 4,563,304), N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo)2-sülfobütanoatı (sülfo-SPDB) (bakınız, US Yayın No. 20090274713), N-süksinimidil 4-(2-piridilditiyo) pentanoatı (SPP) (bakınız, örneğin, 341498-08-6 CAS Kayıt Numarası), 2-iminotiyolanı veya asetilsüksinik anhidridi, içerir.
- 10 Yarılamayan bağları olan antikor-maytansinoid konjugatları da hazırlanabilir. Bu tarz çapraz-bağlayıcılar, teknikte tarif edilir (bakınız, ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbook ve US Patent Başvuru Yayın No. 2005/0169933) ve bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, N-süksinimidil 4-(maleimidometil) sikloheksankarboksilat (SMCC), N-süksinimidil-4-(N-maleimidometil)-sikloheksan-
- 15 1-karboksi-(6-amidokaproatı), SMCC'nin bir "uzun zincirli" analogu (LC-SMCC), κ -maleimidoundekanoik asit N-süksinimidil esterini (KMUA), β -maleimidopropanoik asit N-süksinimidil esterini (BMPS), γ -maleimidobütirik asit N-süksinimidil esterini (GMBS), ϵ -maleimidokaproik asit N-hidroksisüksinimid esterini (EMCS), m-maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid esterini (MBS), N-(α -maleimidoasetoksi)-
- 20 süksinimid esterini (AMAS), süksinimidil-6-(β -maleimidopropiyonamido)hekzanoatı (SMPH), N-süksinimidil 4-(p-maleimidofenil)-bütiratı (SMPB) ve N-(p-maleimidofenil)izosiyanatı (PMPI), N-süksinimidil-4-(iyodoasetil)-aminobenzoatı (SIAB), N-süksinimidil iyodoasetatı (SIA), N-süksinimidil bromoasetatı (SBA) ve N-süksinimidil 3-(bromoasetamido)propiyonatı (SBAP), içerir. Belirli uygulamalarda,
- 25 antikor çapraz-bağlama reaktifleri, literatürde tarif edildiği üzere, 1-10 reaktif grup uygulamak için, örneğin, süksinimidil 4-(N-maleimidometil)-sikloheksan-1-karboksilat (SMCC), sülfo-SMCC, maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester (MBS), sülfo-MBS veya süksinimidil-iyodoasetat, ile modifiye edilir (Yoshitake et al., Eur. J. Biochem., 101:395-399 (1979); Hashida et al., J. Applied Biochem., 56-
- 30 63 (1984) ve Liu et al., Biochem., 18:690-697 (1979)).

Mevcut buluş yönleri tarif eder, burada yaklaşık 2 ila yaklaşık 8 ilaç molekülü ("ilaç yükü"), örneğin, maytansinoid, bir anti-FOLR1 antikoruna veya bunun fragmanına bağlıdır, konjugatın anti-tümör etkisi, aynı hücre bağlama ajanına bağlı ilaçların

- daha az veya daha fazla bir sayıdaki bir ilaç yüküne kıyasla çok daha fazla etkilidir. Burada kullanıldığı şekliyle, "ilaç yükü", bir hücre bağlama ajanına (örneğin, bir anti-FOLR1 antikoruna veya bunun fragmanına) eklenebilen ilaç moleküllerinin (örneğin, bir maytansinoidin) sayısını ifade eder. Bir hücre bağlama ajanına
- 5 eklenebilen ilaç moleküllerinin sayısının ortalama yaklaşık 2 ile yaklaşık 8 aralığında (örneğin, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1) olabilir. Belirli uygulamalarda, ilaç
- 10 N^{2'}-deasetil-N^{2'}-(3-merkapt-1-okso-propil)-maytansindir (DM1) veya N^{2'}-deasetil-N^{2'}-(4-merkapt-4-metil-1-okso-pentil) maytansindir (DM4). Böylelikle, belirli bir uygulamada, huMov19 antikoruna, DM1'e veya DM4'e konjuge edilir. FR-1-21 antikoruna, DM1'e veya DM4'e konjuge edilebilir. FR-1-48 antikoruna, DM1'e veya DM4'e konjuge edilir. FR-1-49 antikoruna, DM1'e veya DM4'e konjuge edilebilir. FR-
- 15 1-57 antikoruna, DM1'e veya DM4'e konjuge edilebilir. FR-1-65 antikoruna, DM1'e veya DM4'e konjuge edilebilir.

X. FOLR1 ekspresyonunun ve terapötik etkinliğin korelasyonu

- 20 Buluş, FOLR1'i hedef alan anti-kanser terapilerine yanıt vermesine yönelik arttırılmış bir olasılığı olan süjeleri tanımlamak için yöntem tarif eder. Buluş, kısmen, yükselmiş FOLR1 ekspresyon düzeylerinin FOLR1'i hedef alan anti-kanser terapötiklerinin etkinliği ile korele olduğu keşfine dayanır.
- 25 Hasta örneklerinin ve ksenograft modeller kullanılarak in vivo etkinliğe korelasyonunun değerlendirilmesi tedaviye yanıt vermesi daha olası olan süjeleri seçmek için ekspresyon analizinin gücünü gösterir. IHC, tümör hücreleri üzerinde FOLR1 ekspresyonu için bir skor sağlar: 0 (ekspresyon yok) ile 3+ (çok yüksek düzeylerde ekspresyon). Ksenograft modeller kullanılarak in vivo veriler, FOLR1
- 30 ekspresyonu için örnekleri 1, 2, 3 ve 3+ skorlama, tercihen, 2'lik, 3'lük veya 3+'lık bir skor, FOLR1 immünokonjugatların klinik olarak ilgili dozlarında FOLR1'i hedef alan anti-kanser terapilerine yanıt vermek için arttırılmış bir olasılığa sahiptir (örneğin, bir FOLR1 immünokonjugatının 5 mg/kg ksenograft dozu, hastalarda bir 185 mg/m²'ye yaklaşabilir). Böylelikle, yükselmiş bir FOLR1 skoruna sahip olan

bireylerin tanımlanması, bir klinik olarak ilgili dozajda yanıtı verebilen bireyleri tanımlamaya yardımcı olacaktır. Aşağıda daha detaylı olarak tarif edildiği üzere, FOLR1 terapötiklerine duyarlılık 2 veya daha yüksek olan FOLR1 skorlaması ile, özellikle düzey 3 skorlama ile, koreledir. Dahası FOLR1'in daha tekdüze düzeylerinin ekspresyonu terapötik yarar ile daha iyi korelasyon sağlar. Böylelikle, bir homojen boyama tekdüzeliği tercih edilir, ancak heterojen boyama tekdüzeliği olan artmış boyama yoğunluğunun kombinasyonları da artmış FOLR1 ekspresyonunun göstergesidir. Örneğin, 2 hetero'dan daha büyük olan skorlar bir FOLR1 terapötik ajan ile tedavi için bir hasta seleksiyon kriteridir.

10

FOLR1 ekspresyon analizi ayrıca, bir FOLR1'i hedef alan anti-kanser terapisinin azaltılmış düzeylerinin ("düşük-dozlu terapinin") anti-tümör yanıtlara neden olmada etkili olabildiği hastalar da tanımlanır. Teknikte anlaşıldığı üzere, bileşikler genel olarak, arzu edilen terapötik yanıtı başaran en küçük dozajda uygulanır. Bu spesifik olarak, klinik ve sıklıkla arzu edilmeyen yan etkilere neden olan terapötikler için önemlidir. Yükselmiş FOLR1 ekspresyon düzeyleri olan süljeleri tanıma yetisi, FOLR1'i hedef alan terapötüğün dozajını minimizasyonuna, böylece terapötik etkinliği idame ettirirken olası yan etkileri azaltmaya, olanak sağlar.

15

20

Burada gösterildiği üzere, 2 hetero veya daha büyük olan FOLR1 ekspresyon skorları anti-FOLR1 immünokonjugatlarına artmış yanıt verilebilirlik ile koreledir. Belirli uygulamalarda, artmış yanıt verilebilirlik, kaşekside azalmadığı, sağ kalım süresinde artıştır, tümör progresyonu zamanında uzamadır, tümör kütlelerinde azalmadığı, tümör yükünde azalmadığı ve/veya tümör metastazı zamanında, tümör reküransı, tümör yanıtı, tam yanıt, parsiyel yanıt, kararlı hastalık, progresif hastalık, progresyonsuz sağ kalım (PFS), genel sağ kalım (OS) zamanında bir uzamadır. Belirli uygulamalara, 2 hetero veya daha büyük olan FOLR1 ekspresyon skorları artan PFS, DFS veya OS ile koreledir.

25

30

Saptama yöntemlerinde ve referans/kontrol örneklerine korelasyonda kullanılması için kitler, kontrol (pozitif ve/veya negatif) veya referans örnekleri içerebilir. Pozitif kontrol veya pozitif referans örnekleri, doku kültürü hücre hatlarından, normal dokudan veya tümör dokusundan türetilebilir. Pozitif ve negatif referans örnekleri, SW620, T47D, IGROV-1, HeLa, KB, JEG-3'ü, diğer tümör hücresi hatlarını ve

FOLR1'i eksprese eden bir ekspresyon vektörü ile kalıcı veya geçici bir şekilde transfekte edilmiş hücre hatlarını içeren hücre hatlarından türetilir. Normal veya tümör dokusu örnekleri ve doku kültürü hücre hatlarında bir negatif kontrol referans örneği olarak kullanılabilir. İlave örnekler için, bakınız Örnekler 9-11 ve Şekiller 23-25.

XI. Farmasötik bileşimler ve terapötik yöntemler

FOLR1-bağlama ajanları (antikorlar, immünokonjugatlar ve polipeptitler dahil), bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, terapötik tedavi yöntemlerini, örneğin, kanserin tedavisini, içeren çeşitli uygulamalarda yararlıdır. Belirli uygulamalarda, ajanlar tümör büyümesini inhibe etmek, bir tümörün farklılaşmasını indüklemek, tümör hacmini azaltmak ve/veya tümörijenisitesini azaltmak için yararlıdır. Kullanım yöntemleri, in vitro, ex vivo veya in vivo yöntemleri olabilir. Belirli uygulamalarda, FOLR1-bağlama ajanı veya antikoru veya immünokonjugatu veya polipeptidi, bunun bağladığı insan FOLR1'in bir antagonistidir.

FOLR1-bağlama ajanı veya antagonisti (yani, huMov19 antikoru veya immünokonjugatı) ile tedavi edilen hastalık bir kanserdir. Belirli uygulamalarda, kanser FOLR1-bağlama ajanını (örneğin, antikorun) bağladığı folat reseptörü 1'i eksprese eden tümörler ile karakterize edilir.

Mevcut buluş, kanseri tedavi etmenin, bir FOLR1-bağlama ajanının bir terapötik olarak etkili miktarını bir süjeye (örneğin, tedaviye ihtiyacı olan bir süjeye) uygulanmasını içeren bir yöntemde kullanılması için bir anti-Folat reseptörü 1 (FOLR1) antikoru veya anti-FOLR1 immünokonjugatı sağlar. Belirli uygulamalarda, kanser kolorektal kanserden, pankreatik kanserden, akciğer kanserinden, overyan kanserden, karaciğer kanserinden, meme kanserinden, beyin kanserinden, böbrek kanserinden, prostat kanserinden, gastrointestinal kanserden, melanomdan, servikal kanserden, idrar kesesi kanserinden, gliyoblastomdan ve baş ve boyun kanserinden oluşan gruptan seçilen bir kanserdir. Belirli uygulamalarda, kanser overyan kanserdir. Belirli uygulamalarda, kanser akciğer kanseridir. Belirli uygulamalarda, süje bir insandır.

Mevcut buluş ilaveten, burada tarif edilen antikorları veya diğer ajanlar kullanarak tümör büyümesini inhibe etmek için yöntemleri tarif eder. Belirli uygulamalarda, tümör büyümesini inhibe etmenin yöntemi, hücreyi FOLR1-bağlama ajanı (örneğin, antikor) ile in vitro temas ettirmeyi içerir. Örneğin, FOLR1'i eksprese eden bir

5 ölümsüz hale getirilmiş hücre hattı veya bir kanser hücresi hattı buna tümör büyümesini inhibe etmek için antikorun veya başka ajanın eklendiği vasat içinde kültürlenir. Bazı uygulamalarda, tümör hücreleri bir hasta örneğinden, örneğin, mesela, bir doku biyopsisinden, plevral efüzyondan veya kan örneğinden izole edilir ve buna tümör büyümesini inhibe etmek için bir FOLR1-bağlama ajanının

10 eklendiği vasat içinde kültürlenir.

Bazı uygulamalarda, tümör büyümesini inhibe etmenin yöntemi, tümörü veya tümör hücrelerini FOLR1-bağlama ajanı (örneğin, antikor) ile in vivo temas ettirmeyi içerir. Belirli uygulamalarda, bir tümörü veya tümör hücresini bir FOLR1-

15 bağlama ajanı ile temas ettirme bir hayvan modelinde gerçekleştirilir. Örneğin, FOLR1-bağlama ajanları tümör büyümesini inhibe etmek için immün açından zayıflatılmış fareler (örneğin, MOD/SCID fareleri) içinde büyütülmüş olan bir veya birden fazla FOLR1'i eksprese eden ksenogreftlere uygulanabilir. Bazı

uygulamalarda, FOLR1-bağlama ajanı tümör büyümesini önlemek için hayvana

20 tümörjenik hücrelerin uygulanmasıyla aynı zamanda veya bundan kısa süre sonra uygulanır. Bazı uygulamalarda, FOLR1-bağlama ajanı tümörjenik hücrelerin belirtilen bir boyuta kadar büyümesinden sonra, bir terapötik olarak uygulanır.

Belirli uygulamalarda, tümör büyümesini inhibe etmenin yöntemi, bir süjeye bir

25 FOLR1-bağlama ajanının bir terapötik olarak etkili miktarını uygulamayı içerir. Belirli uygulamalarda, süje bir insandır. Belirli uygulamalarda, süje bir tümöre sahiptir veya uzaklaştırmış bir tümöre sahip olmuştur.

Belirli uygulamalarda, tümör, beyin tümöründen, kolorektal tümörden, pankreatik

30 tümörden, akciğer tümöründen, overyan tümörden, karaciğer tümöründen, meme tümöründen, böbrek tümöründen, prostat tümöründen, gastrointestinal tümörden, melanomdan, servikal tümörden, idrar kesesi tümöründen, gliyoblastomdan ve baş ve boyun tümöründen oluşan gruptan seçilen bir tümördür. Belirli uygulamalarda, tümör, bir overyan tümördür.

Belirli uygulamalarda, buluş bir FOLR1-bağlama ajanının düşük dozlarını kullanarak tümör büyümesini inhibe etmenin yöntemlerini tarif eder. Burada kullanılanı göre, "düşük doz" terimi, bir FOLR1-bağlama ajanının, terapötik etki üretmek için gerekli olan olağan veya geleneksel dozdan daha az olan, terapötik olarak etkili dozunu ifade eder.

Böylelikle, buluşlar huMov19 antikorunu ve immünokonjugatları kullanarak kanseri tedavi etmenin yöntemlerini sağlar. Belirli uygulamalarda, huMov19 immünokonjugatları huMov19-SPDB-DM4; huMov19-sülfo-SPP-DM1; huMov19-SPP-DM1 veya huMov19-PEG4-Mal-DM4'tür. Belirli bir uygulamada, huMov19 immünokonjugatları aynı zamanda IMG853 olarak da ifade edilen, huMov19-SPDB-DM4'tür.

Formülasyonlar, mevcut buluşun bir saflaştırılmış antikorunu veya ajanın bir farmasötik olarak kabul edilebilir vehikül (örneğin, taşıyıcı eksipiyan) ile birleştirme ile saklama ve kullanımı için hazırlanabilir (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). Uygun farmasötik olarak kabul edilebilir vehiküller, bunlarla sınırlanmamak kaydıyla, toksik-olmayan tamponlar, örneğin, fosfat, sitrat ve diğer organik asitleri; tuzlar, örneğin, sodyum klorürü; askorbik asidi ve metiyonini içeren antioksidanlar; koruyucular (örneğin, oktadesildimetilbenzil amonyum klorürü; hekzametonyum klorürü; benzalkonyum klorürü; benzetonyum klorürü; fenolü, bütili veya benzil alkolü; alkil parabenleri, örneğin, metil veya propil paraben; katekolü; resorsinolü; sikloheksanolü; 3-pentanolü ve m-kresolü); düşük moleküler ağırlıklı (örneğin, yaklaşık 10 amino asit rezidüsünden daha kısa olan) polipeptitleri; proteinleri, örneğin, serum albümini, jelatini veya immünoglobülinleri; hidrofilik polimerleri, örneğin, polivinilpirrolidonu; amino asitleri, örneğin, glisin, glutamini, asparajini, histidini, arjinini veya lizini; karbonhidratlar, örneğin, monosakkaritleri, disakkaritleri, glukozu, mannozu veya dekstrinleri; şelatlama ajanları, örneğin, EDTA'yı; şekerleri, örneğin, sükrozu, mannitolü, trehalozu veya sorbitolü; tuz-oluşturan karşıyonlar, örneğin, sodyumu; metal komplekslerini (örneğin, Zn-proteini komplekslerini) ve iyonik-olmayan sürfaktanları, örneğin, TWEEN'i veya polietilen glikolü (PEG), içerir.

Farmasötik bileşimler, lokal veya sistemik tedavi için çok sayıda yoldan uygulanabilir. Uygulama, topikal (örneğin, vajinal ve rektal aktarımı içeren muköz membranlara), örneğin, transdermal yamalar, merhemler, losyonlar, kremler, jeller, damlalar, süpozituarlar, spreyler, sınıklar ve tozlar; pulmoner (örneğin, nebülizör ile uygulamayabilen, tozlar ve aerosollerin inhalasyonu veya insuflasyonu, intratrakeal, intranazal, epidermal ve transdermal ile); oral veya intravenöz, intraarteriyel, subkutan, intraperitoneal veya intramüsküler enjeksiyonu veya infüzyonu içeren parenteral veya intrakraniyal (örneğin, intratekal veya intraventriküler) uygulama olabilir.

10

Buluşun bir antikoru veya immünokonjugatı bir farmasötik kombinasyon formülasyonu içinde veya kombinasyon terapisi olarak dozlam rejimi içinde anti-kanser özelliklere sahip olan bir ikinci bileşik ile birleştirilebilir. Farmasötik kombinasyon formülasyonunun veya dozlam rejiminin ikinci bileşiği tercihen, bunların birbirini advers bir şekilde etkilemeyeceği şekilde, kombinasyonun ADC'sine komplementer aktivitelere sahiptir. FOLR1-bağlama ajanı ve ikinci anti-kanser ajanı içeren farmasötik bileşimler de sağlanabilir.

15

Hastalığın tedavisi için, mevcut buluşun antikorunun veya ajanının uygun dozajı tedavi edilecek olan hastalığın tipine, hastalığın şiddetine ve seyrine, hastalığın yanıt verebilirliğine, antikorun veya ajanın terapötik veya önleyici amaçlar için uygulanıp uygulanmamasına, önceki terapiye, hastanın klinik öyküsüne ve tedavi eden hekimin yargısındaki tüm diğer şeylere bağlıdır. Antikor veya ajan bir kere, bir kaç gün ile bir kaç ay aralığında uzanan tedavilerin bir serisi boyunca veya bir kür etkisi olana kadar veya hastalığın halinin bir azalması (örneğin, tümör boyutunun düşüşü) başarılana kadar uygulanabilir. Optimal dozlama planlamaları hastanın vücudunda ilaç birikmesinin ölçümlerinden hesaplanabilir ve bir münferit antikorun veya ajanın bağlama potensine bağlı olarak çeşitlilik gösterecektir. Uygulamayamayan hekim, optimum dozajları, dozlama metodolojilerini ve tekrarlama sayılarını kolaylıkla belirleyebilir. Belirli uygulamalarda, dozaj, vücut ağırlığının kg'ı için 0.01 µg ile 100 mg aralığında ve günde, haftada, ayda veya yılda bir kere veya birden fazla kere verilebilir. Belirli uygulamalarda, antikor veya anti-FOLR1 immünokonjugatı iki haftada bir kere veya üç haftada bir kere verilir. Belirli uygulamalarda, antikorun veya immünokonjugatının dozajı, vücut ağırlığının kg'ı için

20

25

30

yaklaşık 0,1 mg ila yaklaşık 20 mg aralığındadır. Tedavi eden hekim, ilacın vücut sıvıları veya dokuları içinde ölçülen kalma zamanlarına ve konsantrasyonlarına dayanarak dozlama için tekrarlama sayılarını tahmin edebilir.

- 5 Kombinasyon terapisi, "sinerji" sağlayabilir veya birlikte kullanılan etken maddeler, bileşikler ayrı ayrı kullanmaktan kaynaklanan etkilerin toplamına kıyasla daha büyük olduğundaki etki olan "sinerjistik" etkiyi sağlayabilir. Bir sinerjistik etki, etken maddeler (1) birleştirilmiş, birim dozaj formülasyonu içinde birlikte-formüle edildiğinde ve eş-zamanlı olarak uygulandığında veya aktarıldığında; (2) ayrı formülasyon olarak alternatif halinde veya paralel olarak aktarıldığında veya (3) bazı başka rejimler ile yapıldığında, elde edilebilir. Alternatif terapi içinde aktarıldığında, bir sinerjistik etki bileşikler sıralı olarak, örneğin, ayrı enjektörler içinde farklı enjeksiyonlar ile, uygulandığında veya aktarıldığında elde edilebilir. Genel olarak, alternatif terapi sırasında, her bir etken maddenin etkili bir dozu, 15 sıralı olarak, yani, seri olarak, uygulanırken, kombinasyon terapisinde, iki veya daha fazla etken maddenin etkili dozajları birlikte uygulanır.

- 20 Mevcut açıklamaların uygulamaları ilaveten, mevcut açıklamaların belirli antikorlarının preparasyonunu ve mevcut açıklamaların antikorlarını kullanmak için yöntemleri detaylı bir şekilde tarif eden, aşağıdaki sıralanmış olmayan örneklerle atfen tanımlanabilir. Hem malzemelere hem de yöntemlere, çok sayıda modifikasyonun mevcut açıklamanın kapsamından ayrılmadan tatbik edilebileceği teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından anlaşılacaktır.

25 ÖRNEKLER

- Burada tarif edilen örneklerin ve uygulamaların yalnızca açıklayıcı amaçlar taşıdığı ve bunun ışığında çeşitli modifikasyonların veya değişimlerin teknikte uzmanlığı olan kişilere önerileceği ve bu başvuruya dahil edileceği anlaşılır.

30

Folat Reseptörü-1'in (FOLR1), ovaryan tümörlerde yaygın ekspresye edildiği ve beyin, meme, idrar kesesi, endometrioid, akciğer, pankreatik ve renal karsinomlarda yüksek ila orta düzeylerde ekspresye edildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, FOLR1'in ekspresyonu, normal dokularda sınırlandırılır ve böbreği,

akciğeri, koroid pleksusu, pankreası, memeyi, tiroidi, overi, prostatı ve akciğeri içerir.

- 5 Taze dondurulmuş doku homojenatları kullanılarak FOLR1'i kantifiye eden yöntemler bildirilmiştir. Tam doku homojenatları sitoplazmik-ililşkili ekspresyonu membran-ililşkili ekspresyondan ayırt edemez ve taze bir şekilde dondurulmuş örnekler klinik koşula uygun değildir. Bununla birlikte, formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüş (FFPE) rnekleri klinik hastalar için arşivlenmiştir.

10 rnek 1

Hücre rnekleri içinde FOLR1'in immünohistokimyasal boyaması - manüel yöntemler Formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüş hücre peletleri ve dokuları aşağıdaki boyama reaktifleri ve koşulları ile test örnekleri olarak kullanılmıştır.

15

IHC Antikorları

Test Maddesi

- fare monoklonal anti-huFOLR1 klonu BN3.2 (Leica # NCL-L-FRalpha)

ImmunoGen: Folat reseptörü alfa molekülünün dış alanının 189 amino asidine karşık gelen prokaryotik rekombinant protein

Kontrol Maddesi

- mulgG1 (Coulter) Klonu, Kat# 6602872

Sekonder Antikor

- Biyotinlenmiş at anti-fare (Vector, Kat# PK-6100) :

FFPE analiz koşulları

Adımlar	Koşul
Antijen Geri-Alımı	Borg (Biocare) pH 9,0
Bloke Etme Adımları	Avidin/Biyotin; peroksit
Test veya Kontrol	2,0 µg/mL

Ad mlar	Koşul
Maddesi	
Seyreltici	%2 at serumu içeren PBS
Sekonder Antikor	10 µg/mL
Saptama Sistemi*	Avidin-Biyotin-peroksidaz-Kompleksi; ABC Labs)
Kromojen	(Dako) DAB
DAB gelişme süresi	≥ 5 k

Formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüş (FFPE) hasta pvaryan tümör biyopsileri ve ovaryan ksenograft tümörleri mürin anti-FOLR1 antikoruna klonu BN3.2 (Leica, Kat #NC1-L-FRalpha) ve Coulter firmasından bir kontrol mulgG1 ile boyanmıştır. pH 9,5'lik tampon içinde antijen geri-alınması takiben, lamalar %2 at serum artı avidin ile bloke edilmiştir. Lamalar PBS içinde yıkanmıştır ve bağli sekonder antikoruna saptamak için oda sıcaklığında 60 dakika boyunca anti-FOLR1 veya kontrol mulgG1 antikoruna, akabinde biyotinlenmiş anti-fare IgG ile 30 dakika ve avidin-biyotin-peroksidaz kompleksi ile 40 dakika inkübe edilmiştir. DAB (3,3-diaminobenzidie tetrahidroklorür) ile 5 dakika boyunca inkübasyon renk sinyali ile sonuçlanmıştır. Lamalar hematoksilin ile karşı boyanmıştır.

FOLR1 boyama yoğunluğu ve dağılım paternleri, kontrol (spesifik-olmayan) IgG boyamasına göre skorlanmıştır. Yoğunluk, 0 ila 3 aralığında bir ölçek üzerinde skorlanmıştır (0 = boyama yok, 1 = zayıf, 2 = orta ve 3 = güçlü) ve dağılım fokal (boyanmış hücrelerin <%25'i), heterojen (boyanmış hücrelerin %25-75'i) ve homojen (boyanmış hücrelerin >%75'i) olarak skorlanmıştır.

FFPE örnekleri, aşağıda genel hatlarıyla özetlendiği üzere, tümör mikro dizilimlerinden yedi farklı tümörden elde edilen insan dokusu bloklarından türetilmiştir.

FFPE Test Örnekleri

İnsan Tümör Mikro Dizilimleri (TMAs)	Açıklama	Ticari Kaynak
•Karma tümör	33 kanser tipinden 96 çekirdek	Biomax Kat# MC961
•Ovaryan tümör	64 çekirdek	Biochain Kat# T8235725
•NSCLC	80 çekirdek	Biomax Kat# LC806
•Kolorektal karsinom	85 iki-kopya halinde çekirdek	Biomax Kat# BC000110
İnsan Doku Blokları	Sayı	Ticari Kaynak
•Meme Tümörü	4	
•Kolorektal Karsinom	4	
•Ovaryan Tümör	4	
•NSCLC	8	CHTN
•Pankreatik Tümör	1	
•Renal Tümör	8	
•SCCHN	14	

FOLR1 test maddesi, mürin anti-FOLR1 klonu BN3.2, huFOLR1 antijenini bağlama özgülüğünü belirlemek için test edilmiştir. Bildirilmiş IHC boyama yöntemleri kullanılarak, 300-19 FFPE kesitleri ve huFOLR1 (300-10/FOLR1) hücre peletleri ile transfekte edilmiş 300-19 boyanmıştır ve FOLR1 için değerlendirilmiştir. FOLR1 test maddesi spesifik olarak 300-19/FOLR1+ hücrelerini boyanmıştır ve 300-19 hücrelerinde boyama olmaması ile sonuçlanmıştır (şerhıyla, 3 homo ve negatif). Bu sonuçlar, klon BN3.2'nin huFOLR1 antijenini spesifik olarak hedef aldığı gösterir (Şekil 1).

BN3.2 antikoru ayrıca, doku örnekleri üzerinde FOLR1 ekspresyonunu saptamak için de kullanılmıştır. Her bir test ve kontrol maddesinin dokular ve hücre peletleri ile immüno-reaktivitesi danışman patolojist, Dr. David Dorfman, tarafından belirlenmiştir. Hücre peleti kontrolleri ilk olarak doku örneklerini takiben değerlendirilmiştir. Değerlendirilmiş her bir doku için, boyama yoğunluğunun ve boyama tekdüzeliğinin bir açıklaması bildirilmiştir. Boyama yoğunluğu skoru ve tekdüzeliği ölçekleri aşağıda tarif edilir. Değerlendirilen her bir doku örneği için bildirilen nihai skor, test maddesinin skoru eksi ilgili kontrol maddesinin skorudur. Her bir örnek için ABC düzeyi, boyama skorunu kalibre edilmiş hücre peleti kontrolleri ile karşılaştırma ile tahmin edilmiştir.

Yoğunluk (boyama miktarı)		Tekdüzelik (boyanmış hücrelerin sayısı)	
0	Negatif		
1	Zayıf	0	Negatif
2	Orta	Fokal	<%25
3	Güçlü	Heterojen (hetero)	%25-75
3+	Çok Güçlü	Homojen (homo)	>%75

Her hücre için bağlı antikorlar (ABC) değerleri, anti-FOLR1-Fikoeritrin, BD Quantibrite Beads, ve akış sitometrisi kullanılarak FOLR1-pozitif tümör hücresi hatları (KB, IGROV1, JEG3 ve OVCAR3) için belirlenmiştir ve bunların farklı ABC değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 2). Boyama koşulları FOLR1 için optimize edilmiştir, böylece FOLR1-pozitif tümör hücresi hatlarından hazırlanmış hücre peletleri IHC ile çeşitlilik gösteren boyama düzeyleri göstermiştir. OVCAR3 hücre peletinin boyaması düşük yoğunluklu (1-2) heterojen boyama gösterirken, KB hücre peleti, yüksek yoğunluklu çok güçlü (3+) homojen boyama göstermiştir, IGROV1 hücre peleti, güçlü (3) boyama göstermiştir, JEG3 hücre peleti, orta derecede (2-3) heterojen boyama göstermiştir. FOLR1 boyama yoğunluğu eğilimleri, bildirilen ABC değerlerine karşılık gelen hücre peletlerinden gözlenmiştir, burada OVCAR3 hücreleri 4.000 olan en düşük ABC değerini gösterirken, KB hücreleri 1.700.000 olan en yüksek ABC değerini göstermiştir, IGROV-1 hücreleri

260.000 olan sonraki en yüksek ABC değerini gösterilmiştir, JEG-3, 41.000 ABC olan daha düşük bir ABC değeri göstermiştir. Boyama sonuçları ve ilgili ABC değerleri aşağıdaki tabloda listelenir.

- 5 Hücre hatları ve ilgili hücre peletleri üzerinde huFOLR1 için ABC değerleri ve ilgili boyama sonuçları

Hücre Hattı	FOLR1	
	ABC	Skor
KB	1.700.000	3+ homo
IGROV1	260.000	3 homo
JEG3	41.000	2-3 hetero
OVCAR3	4.000	1-2 hetero

- 10 Capan-1, Jar, Hec-1-A, Hec-1-B, Ishikawa, NCI H292, BT474EEI, PA-1, OV-90, CaOv-4, CaOv-3, A2780, Ovcara-5, Ovcara-4, HCT-15, 786-O, NCI H838, NCI H522, NCI H2110, NCI H1734, NCI H228 ve FU.OV-3'ü içeren ilave hücre hatları test edilmiştir ve FOLR1 pozitif olduğu bulunmuştur, ancak FOLR1 ekspresyon düzeyleri ve anti-FOLR1 immünokonjugatın aktivitesine duyarlılık çeşitlilik göstermiştir. Referans amaçları için, tutarlı FOLR1 ekspresyonuna ve anti-FOLR1 immünokonjugatların duyarlılığına sahip olan hücre hatları tercih edilir.

15

- IHC yönteminin ovaryan karsinomlar ve küçük hücreli-olmayan akciğer kanseri (NSCLC) doku örneklerinde FOLR1 ekspresyonunu güvenilir bir şekilde saptayabilmesi özellikle önemlidir. Şekil 3'te gösterildiği üzere, FOLR1 ekspresyonu 2 hetero ila 3 homo aralığında skorlanmış olan ovaryan karsinom ve NSCLC örneklerinde güvenilir bir şekilde saptanabilmiştir. Bu örnekler için ABC değerleri, 2 hetero olarak skorlanmış örnekler için yaklaşık olarak 41.000 ila 3 homo olarak skorlanmış örnekler için 260.000'dan daha büyük değerler aralığında olmuştur. Şekil 4'te gösterildiği üzere, yüksek boyama yoğunluğu ve boyamanın tekdüzeliği de ovaryan karsinomlarda, akciğer adenokarsinomlarında ve bronşiyoloalveoler karsinomlarda da gözlenmiştir. Dahası NSCLC örneklerinde (Şekil 5) ve ovaryan karsinomlarda (Şekil 6) FOLR1 ekspresyonunun doku
- 20
- 25

örneklerinde ağırlıklı olarak membrana lokalize edildiği ilaveten bulunmuştur. Ekspresyon bundan çok sayıda örnek aynı zamanda farklı tümör örnekleri boyunca saptanmıştır. İlginç bir şekilde, kolorektal, meme veya küçük hücreli akciğer tümörlerinden elde edilen örneklerin hiç biri 2 heterodan daha büyük skorlanmamıştır.

Örnek 2

Bir KB ksenogreft modelinde benzer hedef-almayan konjugatlar ile karşılaştırma halinde huMov19-PEG4Mal-DM4 ve huMov19-SPDB-DM4 konjugatlarının in vivo etkinliği

Hedef-almayan huC242-SPDB-DM4'e kıyasla FOLR1'i hedef alan yarılabilen konjugat huMov19-SPDB-DM4 ve hedef-almayan huC242-PEG4Mal-DM4'e kıyasla yarılamayan konjugat huMov19-PEG4-Mal-DM4, SCID fareleri için subkütan implante edilmiş KB hücrelerinin (çok yüksek FOLR1 ekspresyonu, manüel IHC ile 3+ homozigot) bir yerleşik ksenogreft modeli kullanılarak test edilmiştir. Fareler vücut ağırlığına göre tedavi gruplarına randomize edilmiştir ve bunlara sırasıyla, hücre inokülasyonundan sonra gün 3'te tek başına (SPDB konjugatları ile veya hücre inokülasyonundan sonra günler 3'te, 10'da ve 17'de haftada üç kere bir konjugatın 5 ve 10 mg/kg'ile muamele edilmiştir. Farklı tedavi gruplarının medyan tümör hacmi Şekil 7'de grafik haline getirilir. huMov19-SPDB-DM4 veya huMov19-PEG4Mal-DM4 ile tedaviler PBS kontrolüne kıyasla medyan tümör hacminde bir düşüş ile sonuçlanmış iken, ilgili hedef-almayan konjugatın her biri ile tedaviler herhangi bir anlamlı etki üretmemiştir.

Örnek 3

OVCAR-3 insan ovaryan karsinom ksenogreftlerinde IMGN853 muamelesinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi

IMGN853'ün anti-tümör etkisi, ovaryan karsinomun bir yerleşik subkütan ksenogreft modelinde değerlendirilmiştir. SCID fareleri sağ yanlarına subkütan olarak enjekte edilen OVCAR-3 ovaryan karsinom hücreleri (1×10^7 hücre/hayvan) ile inoküle

edilmiştir. Tümörler yaklaşık 100 mm³ olan boyuta ulaştığında (tümör hücresi inokülasyonundan 21 gün sonra), fareler rastgele dört gruba bölünmüştür (gerçek grup için 6 hayvan). Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da IMGN853'ün bir tek intravenöz enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, PBS'nin bir tek intravenöz enjeksiyonunu almıştır. Tümör büyümesi, haftada iki kere tümör boyutunu ölçme ile izlenmiştir. Tümör boyutu formülü ile hesaplanmıştır: uzunluk x genişlik x yükseklik x $\frac{1}{2}$.

IMGN853, hem 2,5 hem de 5,0 mg/kg doz düzeylerinde (Şekil 8) tümör büyümesi inhibisyonu (T/C = %0) açısından OVCAR-3 tümörlerine karşı etkili aktiftir (manüel IHC yöntemleri kullanılarak 3'lük homozigot IHC skoru). 5,0 mg/kg'da IMGN853 ile muamele edilmiş 6/6 farede tam tümör regresyonları (CR) vardır. 2,5 mg/kg doz düzeyinde IMGN853 ile muamele edilmiş 6/6 farede parsiyel tümör regresyonları (PR) ve 4/6 farede CR vardır. IMGN853, 1,2 mg/kg doz düzeyinde aktiftir, bu 2/6 PR ve 1/6 CR ile, %18'lik bir T/C ile sonuçlanmıştır. NCI standartlarına göre, %10 ila %42 arasındaki T/C değerlerinin aktif olduğu düşünülür, %10'dan daha az olan T/C'nin etkili aktif olduğu düşünülür.

Örnek 4

IGROV-1 insan ovaryan karsinom ksenograftlarında IMGN853 muamelesinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi

IMGN853'ün anti-tümör etkisi, ovaryan karsinomun bir yerleşik subkütan ksenograft modelinde değerlendirilmiştir. SCID fareleri sağ yanlarına subkütan olarak enjekte edilen IGROV-1 ovaryan karsinom hücreleri (1×10^7 hücre/hayvan) ile inoküle edilmiştir. Tümörler yaklaşık 100 mm³ olan boyuta ulaştığında (tümör hücresi inokülasyonundan 7 gün sonra), fareler rastgele dört gruba bölünmüştür (gerçek grup için 6 hayvan). Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da IMGN853'ün bir tek intravenöz enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, PBS'nin bir tek intravenöz enjeksiyonunu almıştır. Tümör büyümesi, haftada iki kere tümör boyutunu ölçme ile izlenmiştir. Tümör boyutu formülü ile hesaplanmıştır: uzunluk x genişlik x yükseklik x $\frac{1}{2}$.

IMGN853, hem 2,5 hem de 5,0 mg/kg doz düzeylerinde IGROV-1 tümörlerine karşı hayli aktiftir (manüel yöntemler kullanılarak 3'lük homozigot IHC skoru), bu her iki doz düzeyi için de %5'lik T/C değeri ile sonuçlanmıştır (Şekil 9). Sırasıyla 2,5 ve 5,0 mg/kg gruplarında 5/6 ve 6/6 farede parsiyel tümör regresyonları vardır.

5 IMGN853, 1,2 mg/kg dozda inaktiftir (T/C = %47).

Örnek 5

10 OV-90 insan ovaryan karsinom ksenogreftlerinde IMGN853 muamelesinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi

IMGN853'ün anti-tümör etkisi, ovaryan karsinomun bir yerleşil subkütan ksenogreft modelinde değerlendirilmiştir. SCID fareleri sağ yanlarına subkütan olarak enjekte edilen OV-90 ovaryan karsinom hücreleri (1 x 10⁷ hücre/hayvan) ile inoküle edilmiştir. Tümörler yaklaşık 100 mm³ olan boyuta ulaştığında (tümör hücresi inokülasyonundan 13 gün sonra), fareler rastgele dört gruba bölünmüştür (her grup için 6 hayvan). Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da IMGN853'ün bir tek intravenöz enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, PBS'nin bir tek intravenöz enjeksiyonunu almıştır. Hayvanların bir kontrol grubu, aynı planlamada intravenöz olarak uygulanmış PBS almıştır. Tümör büyümesi, haftada iki kere tümör boyutunu ölçme ile izlenmiştir. Tümör boyutu formül ile hesaplanmıştır: uzunluk x genişlik x yükseklik x 1/2.

IMGN853, hem 2,5 hem de 5,0 mg/kg doz düzeylerinde OV-90 tümörlerine karşı hayli aktiftir (manüel yöntemler kullanılarak 3'lük hetero-homo IHC skoru), bu sırasıyla %36'lık ve 18'lik T/C değerleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 10). İki hayvan, 5,0 mg/kg grubunda parsiyel tümör regresyonlarına sahiptir; tedavi grupları arasında herhangi birinde başka tümör regresyonu yoktur. IMGN853, 1,2 mg/kg dozda inaktiftir (T/C = %77).

30

Örnek 6

SKOV-3 insan ovaryan karsinom ksenogreftlerinde IMGN853 muamelesinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi

IMGN853'ün anti-tümör etkisi, overyan karsinomun bir yerleşik subkütan ksenograft modelinde değerlendirilmiştir. SCID fareleri sağ yanlarına subkütan olarak enjekte edilen SKOV-3 overyan karsinom hücreleri (1×10^7 hücre/hayvan) ile inoküle edilmiştir. Tümörler yaklaşık 100 mm³ olan boyuta ulaştığında (tümör hücresi inokülasyonundan 26 gün sonra), fareler rastgele dört gruba bölünmüştür (her grup için 6 hayvan). Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da IMGN853'ün bir tek intravenöz enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, PBS'nin bir tek intravenöz enjeksiyonunu almıştır. Tümör büyümesi, haftada iki kere tümör boyutunu ölçme ile izlenmiştir. Tümör boyutu formül ile hesaplanmıştır: uzunluk x genişlik x yükseklik x $\frac{1}{2}$.

IMGN853, PBS kontrol grubuna paralel olarak IMGN853 ile muamele edilmiş tümörlerin büyümesi ile, tüm dozlarda SKOV-3 tümörlerine karşı hayli inaktiftir (manüel yöntemler kullanılarak 1-3'lük fokal IHC skoru) (Şekil 11). Gerçekleştirilmiş veri analizi yoktur ve çalışmada bu modelde IMGN853 inaktivitesine dayanarak erken sonlandırılmıştır.

Örnek 7

KB insan servikal adenokarsinom ksenograftlarında IMGN853 muamelesinin doz-yanıt anti-tümör aktivitesi

IMGN853'ün anti-tümör etkisi, bir yerleşik subkütan ksenograft servikal adenokarsinom modelinde değerlendirilmiştir. SCID fareleri sağ yanlarına subkütan olarak enjekte edilen KB servikal adenokarsinom hücreleri (1×10^7 hücre/hayvan) ile inoküle edilmiştir. Tümörler yaklaşık 100 mm³ olan boyuta ulaştığında (tümör hücresi inokülasyonundan 7 gün sonra), fareler rastgele dört gruba bölünmüştür (her grup için 6 hayvan). Farelere 1,2, 2,5 veya 5,0 mg/kg'da IMGN853'ün bir tek intravenöz enjeksiyonu ile muamele edilmiştir. Hayvanların bir kontrol grubu, PBS'nin bir tek intravenöz enjeksiyonunu almıştır. Tümör büyümesi, haftada iki kere tümör boyutunu ölçme ile izlenmiştir. Tümör boyutu formül ile hesaplanmıştır: uzunluk x genişlik x yükseklik x $\frac{1}{2}$.

IMGN853, hem 2,5 hem de 5,0 mg/kg doz düzeylerinde tümör büyümesi inhibisyonu açısından KB tümörlerine karşı hayli aktiftir (Şekil 12). 5,0 mg/kg'daki alt farenin alt 3 ve 2,5 mg/kg tedavi grubundaki alt farenin beşi CR'lere sahiptir ve çalışmanın sonuna (gün 120'ye) kadar tümörsüz kalmıştır. 1,0 mg/kg'lık doz, aktiftir, bu %37'lik bir T/C ile sonuçlanır, ancak burada parsiyel veya tam regresyonlar yoktur.

Örnek 8

10 Formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüş (FFPE) örneklerde FOLR1'in immünohistokimyasal boyaması - otomatikleştirilmiş yöntemler.

IHC boyama analizi, test maddesi olarak Novocastra FOLR1 antikorunu (Novocastra/Leica Kat # NCI-L-FRalpha, klon BN3.2) ve Leica Bond RX otomatikleştirilmiş boyama sistemi içeren IVD sınıfı reaktiflerini kullanır. Bağlı test veya kontrol maddesi, bir post primer reaktif (tavşan anti-fare IgG), akabinde bir polimer reaktif (keçi anti-tavşan polimeri) ve 3,3-Diaminobenzidin tetrahidroklorür (DAB) kromojenini içeren Leica Bond Refine saptama sistemi ile inkübasyon ile saptanmıştır. FFPE örnekleri, yukarıda genel hatlarıyla özetlendiği üzere (Leica seyrelticiyi FOLR1 içinde seyreltme ile hazırlanmış) primer antikorun belirtilmiş konsantrasyonu (konsantrasyonlar) ile boyanmıştır.

IHC Antikorları

Test maddesi ¹⁾	Folat Reseptörü Alfa (Novocastra/Leica Kat # NCI-L-FRalpha, Lot 159506), mürin, klon BN3.2, sıvı konsantre: 75 µg/mL
Kontrol maddesi ¹⁾	IgG1 (Beckman Coulter Kat.# 6602872, Lots2S7SPS04-23 ve 2S7SPS04-26) stok konsantrasyonu:1 mg/mL, mürin, klon 2T8-2F5

25 Leica Bond RX kullanılan FFPE Analiz Yöntemi

Adım¹⁾

Etki

Süre

Adım ¹⁾	Etki	Süre
Fırlama	Sıcaklık: 60°C	30 dakika
Mumundan Arındırma	Bond Mumdan Arındırma Çözültisi	Fikse Edilmiş
	%100 Etanol	Fikse Edilmiş
Antijen Geri-Alınım	Bond ER2	20 dakika
Endojen Peroksidaz Bloku	Peroksit (Refine kit bileşeni)	5 dakika
Test Maddesi	Leica seyreltici içinde 1,9 µg/mL FOLR1	15 dakika
Saptama	Post Primer Reaktif (Refine kit)	8 dakika
	Polimer (Refine kit)	8 dakika
	Karma DAB (Refine kit)	10 dakika
Karşı Boyama	Hematoksilin (Refine kit)	5 dakika

Boyanmış tüm örnekler değerlendirilmiştir ve skorlanmıştır. Kontrol örnekler ilk olarak değerlendirilmiştir, bunu test örnekleri (TMA'lardan tam kesitler ve münferit çekirdekler) izlemiştir. Değerlendirilen her bir tümör dokusu veya hücre peleti için, boyama yoğunluğunun bir açıklaması ve boyanan tümör hücrelerinin ilgili oranı bildirilmiştir. Membran ilişkili boyama her bir örnek için kaydedilmiştir. İki kopya halindeki skorlar bir hastadan değerlendirildiğinde, yalnızca daha yüksek skor analize dahil edilmiştir. Skor yalnızca sitoplazmik boyamayı tarif ettiğinde, nihai skor sıfır (0) olarak bildirilmiştir. Yoğunluk ve tekdüzelik, aşağıda tabloda genel hatlarıyla tarif edildiği şekilde her bir örnek için verilmiştir. Boyama yoğunluğu ve dağılım paternleri, (spesifik-olmayan) kontrol IgG boyamasına kıyasla skorlanmıştır. Yoğunluk 0 ila 3 aralığındaki bir ölçek (0 = boyama yok, 1 = zayıf, 2 = orta ve 3 = güçlü) üzerinde skorlanmıştır ve dağılım, fokal (boyanmış hücrelerin <%25'i), heterojen (boyanmış hücrelerin %25-75'i) ve homojen (boyanmış

hücrelerin >%75'i) olarak skorlanmıştır. Normal dokuda, yoğunluğu ve oranı hesaplanırken yalnızca tanımlanmış alt-yapılar değerlendirilmiştir.

Yoğunluk ve Tekdüzelik Ölçekleri'nden Oluşan IHC Skorlama Sistemi

Yoğunluk (boyanım parlaklığı)

Gözlenen Yoğunluk	Yoğunluk Kategorisi	Bildirilen Yoğunluk
0	Negatif	0
0-1	Çok Zayıf	1
1	Zayıf	
1-2	Zayıf ila Orta	2
2	Orta	
2-3	Orta ila Güçlü	3
3	Güçlü	

Tekdüzelik (boyanmış hücrelerin yüzdesi-yalnızca membran)

0	Negatif
Fokal	<%25
Heterojen (hetero)	%25-75
Homojen (homo)	>%75

5

FFPE tümör örnekleri, yukarıda genel hatlarıyla özetlendiği üzere, tümör mikrodizilimlerinden aynı zamanda yedi farklı tümörden insan dokusu bloklarından türetilmiştir.

10

FFPE Test Örnekleri: TMA'lar

Anatomik Tedarikçi	Katalog #	Kod	Her Hasta için	Hastaların Toplam Çekirdeklerin #'sı
Yer			Sayı	
Böbrek	Pantomics KIC1501	P-T-	2	69

Anatomik Tedarikçi Yer	Katalog #	Kod	Her Hasta için Çekirdeklerin Sayısı	Hastaların Toplam #'sı
		ARR- KID- 122711- 1		
Akciğer	Pantomics LUC1501	P-T- ARR- LNG- 122711- 1	2	70
Akciğer	Tristar 69571059/TA1249	P-T- ARR- OVA- 122711- 1	1	110
Over	Biochain T8235725-5	P-T- ARR- OVA- 122111- 1	1	62
Over	Pantomics OVC1501	P-T- ARR- OVA- 122711- 1	2	70
Over	Tristar 69571091/TA1322	P-T- ARR- OVA-	2	96

Anatomik Tedarikçi	Katalog #	Kod	Her Hasta için	Hastaların Toplam
Yer			Çekirdeklerin #'sı	Sayı
		010912-1		
Uterus (Endometriyum)	Pantomics EMC1501	P-T-ARR-EME-122711-1	2	70
Çeşitli	Pantomics MTU481	P-T-ARR-122711-1	1	48

FFPE Test Örnekleri: Tam Kesitler

Organ	Kod	Kaynak	Tanım (Kaynak Belgelemesi uyarınca)
Over	1	Bilinmiyor	endometroid adenokarsinomu
	2	Proteogenex	endometroid adenokarsinomu
	3	CHTN	adenokarsinom, endometriod özellikleri ile karışım, seröz ve berrak
	4	CHTN	adenokarsinom, karma papiller ile yüksek grad, seröz, endometrioid ve berrak hücre alanları
	5	CHTN	seröz papiller adenokarsinom
	6	Proteogenex	seröz adenokarsinom
	7	Proteogenex	seröz papiller adenokarsinom
	8	Proteogenex	seröz papiller adenokarsinom

Organ	Kod	Kaynak	Tanım (Kaynak Belgelemesi uyarınca)
	9	CHTN	seröz papiller adenokarsinom
	10	Proteogenex	seröz papiller adenokarsinom
Lung	1	CHTN	adenokarsinom, kötü bir şekilde farklılaşmış
	2	CHTN :	adenokarsinom, asiner, bronşiyoloalveoler özellikler ile iyi farklılaşmış
	3	CHTN	adenokarsinom, müsinöz özellikler
	4	CHTN	adenokarsinom
	5	CHTN	adenokarsinom
	6	CHTN	adenokarsinom (bronşiyoloalveoler) karsinom
	7	CHTN	adenokarsinom
	8	CHTN	adenokarsinom, berrak hücre özellikleri ile orta derecede farklılaşmış
	9	CHTN	adenokarsinom
	10	CHTN	skuamöz hücreli karsinom

- Hücreler (tümör hücreleri veya transfekte edilmiş hücreler) formalin ile fikse edilmiştir ve parafine gömülmüştür (FFPE). FFPE hücre peleti örneklerinin çeşitlilik gösteren FOLR1 ekspresyonu aralıkları sergilediği akış sitometrisi ile gösterilmiştir
- 5 ve normal insan dokuları pozitif ve negatif kontrolleri karakterize etmek için ve özgüllük analizi için bu çalışmada kullanılmıştır. Çeşitlilik gösteren FOLR1 düzeyleri gösteren hücre peletleri ve ilgili skorlar aşağıda bildirilir. Hücre peletlerinde boyama skorları ve ilgili FOLR1 ekspresyon düzeyleri (kalibre edilmiş akış sitometrisi ile belirlenmiş, her hücre için bağış antikor, ABC) arasında zayıf bir
- 10 korelasyon vardır. Örneğin, 1-3'lük bir hetero skor, sırasıyla 40.098 ve 565.481 ABC değerleri gösteren SW620 ve IGROV-1 için verilir. İlave olarak, 1,5 milyonluk bir ABC değeri gösteren Hela hücreleri 2-3'lük bir hetero skor ile sonuçlanmış iken, 830.003 ABC gösteren 300.19/FR1 3'lük bir daha yüksek hetero skor vermiştir.

1,9 µg/mL'lik bir Test Maddesi Konsantrasyonunda Hücre Peletleri için Nihai
Skorlar

Hücre Hattı	^a ABC Değeri	Boyama Skoru
SW620	40.098	1-3 hetero
T47D	97.576	1-2 hetero
IGROV-1	565.481	1-3 hetero
300.19/FR1	830.003	3 homo
HELA	1.500.587	2-3 hetero
KB	4.000.000	3 homo

^a Bildirilen ABC Değeri, hücre popülasyonunda her hücre için bağli antikorlar ın bir ortalamas ı ve aşağı daki şekilde belirlenmiştir: 1,0 x 10⁻⁸ M'lık bir anti-FOLR1-PE (1:1) konsantrasyonu, akış sitometrisi yöntemleri ve Quantibrite™ Beads (BD Biosciences) kullanılarak ilgili hücre hattı üzerinde ABC değerlerini belirlemek için kullanılmıştır.

10 Akış sitometrisi histogramları, her hücre için bağli anti-FOLR1'in sayısına (FOLR1 ekspresyon düzeyine) karşı hücrelerin dağılımını temsil eder. Hem histogramlar hem de ilgili IHC boyama sonuçları, bu hücre hatlarının her birinin hücrelerin geniş bir FOLR1 ekspresyon aralığı na sahip olan bir heterojen popülasyonunu içerdiğini gösterir. Hem bir tekdüze akış sitometrisi histogramı hem de IHC boyama skoru

15 gösteren 300.19/FR1 hücre hattı istisnadı. Bu veriler, FOLR1'in daha tekdüze bir düzeyini eksprese eden her bir hücre hattının ABC değerleri ve ilgili boyama skorları arasında daha iyi bir korelasyon sağlayabileceğini öne sürer. Analizin tüm FOLR1-pozitif hücre peleti kontrollerinde pozitif boyama göstermesine rağmen, bu hücre peletlerinin çoğundan elde edilen boyama skorları ve ilgili FOLR1

20 ekspresyon düzeyleri arasında zayıf bir korelasyon vardır. Bundan dolayı, bu gruptan hücre peletleri yüksek düzeyde-, orta düzeyde- ve düşük düzeyde-eksprese eden kontroller olarak tanımlanamaz. Hücre hatlarında IHC ve akış sitometrisi ile FOLR1 ekspresyonunu gösteren ilgili fotoğraflar ve histogramlar ŞEKİL 13'te gösterilir.

Analiz koşullarını belirlemek için, test ve kontrol maddesinin seyreltmelerinin bir aralığı duyarlılığın uygun bir düzeyini gösteren koşulları seçmek için test etmiştir. Deneyler FOLR1-pozitif hücre peletlerini içeren FFPE örneklerinin bir paneli ve FOLR1 pozitif ve negatif normal dokulardan (adrenal (korteks/medulla), memeden (kanallar ve lobüller/bağ dokular), fallop tüpünden (yüzey epitelyumu/kas duvarı), böbrekten (tübüller/ glomerüller), akciğerden (tip I/II pnömositler/interalveoler bağ dokular), pankreastan (kanallar/ Langerhans adacıkları), tükürük bezinden (kanallar/stroma), ciltten (ekrin bezler/epidermis), mideden (yüzey epitelyumu/sub-mukoza)) ve tümör dokularının tam kesitlerinden (10 ovaryan tümör örneği ve 10 akciğer tümörü örneği) oluşan bir TMA üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek test maddesi konsantrasyonlarının bir seri seyreltmesi (0,25, 0,5, 0,9, 1,9, 3,8 ve 7,5 µg/mL) veya 1,9 µg/mL veya 3,8 µg/mL olan kontrol maddesi konsantrasyonu ile boyanmıştır. Her bir seyreltme için bağlı boyama yoğunlukları optimal seyreltmeyi tanımlamak amacıyla her bir örnek için karşılaştırılmıştır. Optimal seyreltme için kriterler, 1) izotip kontrol ile boyanan örneklerde arka-plan boyamaya neden olmayan, 2) test maddesi ile boyanan negatif doku kontrollerinde boyamaya neden olmayan ve 3) söz konusu endikasyonu temsil eden test örnekleri (ovaryan tümör, endometriyal tümör, NSCLC tümörü ve böbrek tümörü FFPE dokuları) arasında membran-ilişkili FOLR1 ekspresyonunun çeşitlilik gösteren düzeylerini birbirinden ayırt eden bir seyreltmedir. Değerlendirilen test maddesinin beş seyreltmesinden, 1,9 µg/mL'lik konsantrasyon, Leica Bond RX otomatikleştirilmiş protokolleri (Fluorescence ve Mumundan Arındırma Protokolü, 20 dakikalık protokol için ER2 kullanılan HIER ve Ekstra Durulamalar ile-boyama protokolü IHC F) kullanılan boyama sonuçlarında en iyi dinamik aralığı göstermiştir.

Örnek 9

Analiz-otomatikleştirilmiş boyama yöntemlerinin dinamik aralığını karakterize eden kontrollerin tanımlanması ve karakterizasyonu

Kalite kontrolleri: İnsan normal tükürük bezi, akciğer ve pankreas, boyama prosedürünün beklendiği şekilde gerçekleştiğini doğrulamak için her bir analizde kullanılacak olan pozitif doku kontrolleri olarak tanımlanmıştır. İnsan normal

özofagusu, bir negatif kontrol olarak tanımlanmıştır. Bu kontroller aşağıda olduğu şekilde karakterize edilmiştir: analizin dinamik aralığının kapsayan kontrolleri oluşturmak için, analizin dinamik aralığının göstermesi beklenen bir kaç FOLR1 pozitif ve negatif normal doku örneğinden oluşan bir doku mikro-dizilimi (TMA) optimizasyon ve validasyon fazları sırasında bir analiz doğrulama kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu TMA'da tanımlanmış yapıları olan dört normal doku, aşağıda olduğu üzere uygun analiz kontrolleri olarak tanımlanmıştır: normal insan akciğerinin respiratuvar epitelyumu (2'lik homo skor); normal insan pankreasın kanalları (3'lük homo apikal skor); normal insan tükürük bezinin interkalar kanalları (1-2'lik heteroskor) ve normal insan özofagusu (0'lık skor). Toplamda 4 analiz yürütmesi üzerinden, bu TMA'dan tanımlanmış uygun analiz kontrolleri özdeş sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar, seçilmiş kontrollerin tutarlı sonuçlar verdiğini ve analizin dinamik aralığının kapsadığını gösterir.

15 Analizin Dinamik Aralığının Kapsayan Kontroller Olarak Tanımlanmış Normal Dokularındaki Yapılar

Normal Organ	Sub-yapı	Boyama Skoru (kontrol maddesi)	Boyama Skoru (test maddesi)
Özofagus	Tüm yapılar	0 (negatif)	0 (negatif)
Tükürük Bezi	İnterkalar kanalları	0 (negatif)	1-2 hetero
Akciğer	Respiratuvar Epitelyum	0 (negatif)	2 homo
Pankreas	Kanallar	0 (negatif)	3 homo apikal

Apikal boyama, polarize tekdüze-olmayan membran boyama olarak tanımlanır.

20 Örnek 10

Otomatikleştirilmiş boyama yönteminin performans analizi.

Bu analizin hedeflenen kullanımı spesifik olarak, ovaryan, endometriyal, NSCLC ve böbrek FFPE tümör dokularında membran-ilişkili FOLR1 ekspresyonunun (optimal dinamik aralığının) çeşitlilik gösteren düzeylerini ve çeşitlilik gösteren tekdüzeliğini aydınlatmak için yeniden-üretilebilir bir şekilde ve uygun duyarlılıkla FOLR1'i saptamaktır. Bundan dolayı özgüllük, yeniden-üretilebilirlik ve duyarlılık performans kriterleri olarak düşünülmüştür.

Çalışma analizinin özgüllüğü ve duyarlılığı normal doku boyamasının önceden bildirilen sonuçlar için çalışma analizi ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen boyama sonuçları FFPE normal dokusu ile Scorer et al 2010 (A Full Immunohistochemical Evaluation of a Novel Monoclonal Antibody to Folate Receptor-alpha. The Novocastra Journal of Histopathology, REAGENTS: 2010(3):8-12, aynı antikor klonu BN3.2'yi tarif eder) ve taze dondurulmuş normal doku (ImmunoGen Report IMH28-003) üzerinde IMG853 (huMov19 (M9346A) antikor) kullanılan Doku Çapraz Reaktivite (TCR) çalışmasından elde edilen karşılaştırmalı boyama sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Her bir yöntemden elde edilen boyama sonuçlarının karşılaştırılması Scorer analizinin en az duyarlı olması çalışma analizinin (IMH28-011) ara düzeyde duyarlılığa sahip olması ve TCR çalışma yönteminin en duyarlı olması ile, farklılık gösteren bağışıklık duyarlılıkları ile üç analizin genel olarak benzer normal doku boyama profilleri gösterdiğini gösterir. Yalnızca iki daha duyarlı yöntemde (çalışma analizi ve TCR analizi) bazı yapılar pozitif boyama göstermiştir. Aynı zamanda çalışma analizinde ve TCR yönteminde de pozitif olmayan, Scorer tarafından kullanılan en az duyarlı olan analizde pozitif boyamanın örnekleri yoktur. Bu sonuçlar, çalışma analizinin özgüllüğünün ve duyarlılığının normal dokularda FOLR1 ekspresyonunun değerlendirilmesi için uygun olduğunu gösterir.

Çalışma analizinin özgüllüğü ve duyarlılığı ovaryan, endometriyal, NSCLC ve böbrek tümörlerinden oluşan tümör TMA'larının bir panelini (analizin amaçlanan klinik kullanımının temsili olan bir örnek kümesini) boyama ve değerlendirme ile ilaveten karakterize edilmiştir. Pozitif boyama, beklediği üzere negatif veya pozitif olan stroma, kan damarları, lenfositler ve normal organ dokusu boyamasını içeren normal bitişik doku bileşenleri ile tümör dokusunu tutarlı bir şekilde lokalize etmiştir. Ovaryan karsinomun veya NSCLC'nin her bir alt-tipi için, farklı

tedarikçilerden TMA'lar arasında boyama skorlarının dağılımı, benzer bir skor dağılımı göstermiştir; bu, bu yöntemin çeşitli fiksasyon ve işleme koşullarına duyarlı olmadığını öne sürer. Dağılım paternleri TMA'lar arasında benzer olduğundan, farklı dizilimlerden veriler birleştirilmiştir ve skorlar kategorize edilmiştir. Her bir alt-tip için 20 veya daha fazla örnek içeren tümör alt-tiplerinin bu skorların bir özeti aşağıdaki tablolarda listelenir. Bu tablolarda özetlendiği üzere, skorların dinamik bir aralığı her bir tümör tipi için bildirilir ve bu analizin ovaryan, endometriyal, NSCLC ve böbrek FFPE tümör dokularında membran-ilişkili FOLR1 ekspresyonunun çeşitlilik gösteren düzeylerini ve çeşitlilik gösteren tekdüzeliğini ayırt etmek için uygun duyarlılık gösterdiğini gösterir. Seröz ovaryan, endometroid ovaryanın, NSCLC'nin, endometriyal karsinomun ve renal berrak hücreli karsinomun temsili fotoğrafları Şekiller 14-18'de sağlanırlar. Örneğin, bir boyama kılavuzunda veya tan sal kitte yararlı olan ilave temsili fotoğraflar Şekiller 23-25'te gösterilir. Bu çalışmalar, analizin spesifik olduğunu ve bir tan sal veya eşlik eden tan sal reaktif olarak kullanılması için uygun duyarlılığa sahip olduğunu gösterir.

Ovaryan Tümörlerin Baskın Alt-Tipleri için Boyama Skorlarının Özeti

<u>Alt-Tip</u>	Örnek (%) Sayıları						
	Toplam	≥ 3	≥ 2	≥ 1	1-3	Herhangi	Negatif
		hetero ^a	hetero ^a	hetero ^a	fokal bir	Pozitiflik	

Endometrioid	35	15	18	20	6	26	9
---------------------	----	----	----	----	---	----	---

<u>Alt-Tip</u>	Örnek Sayıları (%)						
	Toplam	≥ 3	≥ 2	≥ 1	1-3	Herhangi	Negatif
		hetero ^a	hetero ^a	hetero ^a	fokal bir	Pozitiflik	

	(100)	(43)	(51)	(57)	(17)	(74)	(26)
--	-------	------	------	------	------	------	------

Müsinöz	29	2	4	5	0	5	24
----------------	----	---	---	---	---	---	----

	(100)	(7)	(14)	(17)	(0)	(17)	(83)
--	-------	-----	------	------	-----	------	------

Seröz	129	44	92	92	8	100	29
--------------	-----	----	----	----	---	-----	----

Alt-Tip	Örnek (%) Sayısı					
	Toplam	≥ 3	≥ 2	≥ 1	1-3	Herhangi Negatif
		hetero^a	hetero^a	hetero^a	fokal bir	Pozitiflik
	(100)	(34)	(71)	(71)	(6)	(78)
						(22)

ⁱ⁾Fokal boyama paternleri dahil edilmemiştir

NSCLC Tümörleri için Boyama Skorları Özeti

Tip	Alt-Tip	Örnek Sayısı (%)						
		Toplam	≥ 3	≥ 2	≥ 1	1-3	Herhangi Negatif	Pozitiflik
			hetero^a	hetero^a	hetero^a	fokal bir	Pozitiflik	Pozitiflik
Adenokarsinom	Tümü^b	67	17	39	42	5	47	20
		(100)	(25)	(58)	(63)	(7)	70	30
	Belirtilmiş	7	2	5	5	0	5	2
	Bronşiyoloalveoller	(100)	(29)	(71)	(71)	(0)	(71)	(29)
Skumöz hücreli karsinom	Tümü	74	1	4	6	6	12	62
		(100)	(1)	(5)	(8)	(8)	(16)	(84)

ⁱ⁾ Fokal boyama paternleri dahil edilmemiştir

Belirtilmiş bronşiyoloalveoler karsinom örnekleri dışında tüm adenokarsinom örnekleri, dahil edilmiştir.

Endometriyumun Adenokarsinomu ve Böbreğin Berrak Hücreli Tümörleri için Boyama Skorları Özeti

<u>Tümör/Alt-tip</u>	<u>Örnek Sayısı (%)</u>						
	Toplam	≥ 3 hetero a	≥ 2 hetero a	≥ 1 hetero a	1-3 fokal	Herhang i bir Pozitifli k	Negati f
Endometriyum/Aden o-karsinom	58 (100)	5 (9)	23 (40)	30 (52)	10 (17)	40 (69)	18 (31)
Böbrek/Berrak hücre	34 (100)	0 (0)	9 (26)	23 (68)	6 (18)	29 (85)	5 (15)

Fokal boyama paternleri dahil edilmemiştir

Çalışma analizinin kesinliği, ovaryan, NSCLC veya böbrek tümörünün üç FFPE
 5 tümör dokusu örnekleri kullanılarak analizin intra-yürütme ve inter-yürütme
 yeniden-üretilebilirliğini değerlendirme ile araştırılmıştır, burada her bir örnek bir
 yüksek, orta veya düşük skor gösterir. İntra-yürütme yeniden-üretilebilirliği için, her
 biri bir akciğer, ovaryan ve renal tümör kesiti içeren dokuz lam Leica Bond RX
 üzerindeki rastgele dokuz lokasyona yerleştirilmiştir. İnter-yürütme yeniden-
 10 üretilebilirliği için, aynı örnekten kesitler içeren üç lam üç farklı gün boyanmıştır.
 Hem intra-yürütme hem de inter-yürütme yeniden-üretilebilirlik deneylerinden tüm
 lamalar değerlendirilmiştir ve her bir temsili örnek için eş-değer boyama sonuçları
 göstermiştir: akciğer tümörü (yüksek: 3 homo), ovaryan tümör (orta: 2 hetero) ve
 renal tümör (düşük: 1-2 hetero). Bu veriler, düşük, orta ve yüksek ekspresyon
 15 düzeyi ile doku tipleri üstünde yeniden-üretilebilirlik göstermiştir.

Örnek 11

IHC ile ≥ 2 heterojen olan bir FOLR1 ekspresyon skoru, IMG853 ile tedavi
 20 için bir hasta seleksiyon kriteridir.

Tümör hücresi hatlarında FOLR1-ekspresyon düzeyleri, bir antikor-PE konjugat (FR1-24-PE) ve QuantiBRITE sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Üç ovaryan karsinom hücre hattı (Igrov-1, Skov-3 ve Ovcara-3), bir koryokarsinom hücre hattı Jeg-3 ve bir servikal karsinom hücre hattı KB çalışmaya dahil edilmiştir. Güvenilir ABC değerleri elde etmek için, bir antikor-PE konjugat ile bağlama deneyleri bir satüre etme konsantrasyonunda (tüm mevcut bağlama yerlerinin konjugat tarafından meşgul edildiği konsantrasyonda) gerçekleştirilmelidir. FR1-24-PE konjugat için bu tarz konsantrasyonu belirlemek amacıyla, çeşitli FOLR1 ekspresyonu olan FOLR1-pozitif hücre hatları bir paneli üzerinde bağlama deneyleri gerçekleştirdik. Hücreler buz üzerinde iki saat boyunca FR1-24-PE konjugatının geniş bir konsantrasyon aralığı ile inkübe edilmiştir, FACS tamponu (%1 BSA ile PBS) ile yıkanmıştır, PBS içinde %1 formaldehit ile fikse edilmiştir ve bir FACSCalibur akış sitometresi üzerinde analiz edilmiştir. 1×10^{-8} M'lik bir konsantrasyonda, konjugat test edilen tüm Igrv-1, Jeg-3, Skov-3, Ovcara-3 ve KB hücre hatlarında hücre yüzeyi bağlama yerlerini satüre etmiştir. Bunu takip eden bağlama ABC-deneylerinde, FR1-24-PE konjugat 1×10^{-8} M'lik konsantrasyonda kullanılmıştır. Her bir örnek üç kopya halinde analiz edilmiştir; her bir hücre hattı üzerinde bir kaç bağımsız deney gerçekleştirilmiştir. En yüksek ekspresyon, $4.000.000 \pm 300.000$ 'lik yaklaşık ABC değeri ile KB hücreleri üzerinde bulunmuştur, bunu sırasıyla 400.000 ± 85.000 'lik ve 150.000 ± 75.000 'lik ABC değerleri olan Igrv-1 ve Jeg-3 hücre hatları izlemiştir. İki hücre hattı Skov-3 ve Ovcara-3, düşük FOLR1 ekspresyonuna, sırasıyla, 20.000 ± 10.000 'lik ve 7.000 ± 4.000 'lik ABC değerine, sahiptir. ABC değerlerinde deneyden deneye anlamlı bir varyasyon, Jeg-3 hücreleri için gözlenmiştir, burada ABC-değerleri 40.000 ila 300.000 arasında çeşitlilik göstermiştir. Diğer analiz edilmiş hücre hatlarından elde edilen ABC değerleri daha az değişken olduğundan (aşağıdaki tabloya bakınız), bu değişkenlik büyük olasılıkla analiz değişkenliğinden daha ziyade hücre hattının bazı biyolojik özelliklerini yansıtmıştır.

Hücre hattı	ABC (Ortalama $\pm$ SD, n) ¹⁾	Deneyden Deneye Varyasyon	
		Kayıtlı En Yüksek ABC	Kayıtlı En Düşük ABC

Hücre hattı	ABC (Ortalama $\pm$ SD, n) ¹⁾	Deneyden Deneye Varyasyon	
		Kayıtlı En Yüksek ABC	Kayıtlı En Düşük ABC
KB	4.000.000 $\pm$ 300.000, 4	4.500.000	3.800.000
Igrov-1	400.000 $\pm$ 85.000, 5	480.000	280.000
Jeg-3	150.000 $\pm$ 75.000, 14	260.000	40.000
Skov-3	20.000 $\pm$ 10.000	28.000	10.000
Ovcar-3	7.000 $\pm$ 4.000	10.000	4.000

¹⁾ SD - Standart sapma; n - bağımsız deneylerin sayısı

ABC değerleri, FR1-24 PE-etiketli antikor ile bir FACS temelli analiz ve QuantiBRITE sistemi ile belirlenmiştir. Ortalama $\pm$ Standart Sapma (SD) bağımsız deneyler için hesaplanmıştır.

IMGN853'ün potensi ve özgüllüğü, geniş bir FOLR1 ekspresyon aralığı olan FOLR1-pozitif hücre hatlarına karşı analiz edilmiştir (hücre hatlarının ABC değerleri, yukarıda sağlanmıştır). Buna ek olarak, FOLR1-negatif hücre hatları 5 Namalwa ve SW2 deneylere dahil edilmiştir. IMGN853, sırasıyla 0,10 $\pm$ 0,01 nM'lık, 0,50 $\pm$ 0,07 nM'lık ve 1,00 $\pm$ 0,05 nM'lık IC₅₀ değerleri ile, yüksek FOLR1 ekspresyonu olan KB (4.000.000 $\pm$ 300.000 ABC), Igrov-1 (400.000 $\pm$ 85.000 ABC) ve Jeg-3 (150.000 $\pm$ 75.000 ABC) hücrelerine karşı hayli sitotoksiktir. Modifiye edilmemiş huMov19 (M9346A) antikorunun (0,5 μ M) fazla bir miktar konjugatın potensini göze çarpan bir şekilde tipik spesifik-olmayan düzeylere (10 ila 20-kat) 10 düşürdüğünden, üç hücre hattının tümüne karşı hücre-öldürme aktivitesi FOLR1-bağımlıdır. IMGN853, düşük-düzeyde FOLR1 eksprese eden Skov-3 ve Ovcar-3 hücrelerine (sırasıyla, 20.000 $\pm$ 10.000 ve 7.000 $\pm$ 4.000 ABC) karşı ve 2 nM'dan daha büyük olan IC₅₀ değerlerine sahip olan FOLR1-negatif hücreler Namalwa'ya 15 ve SW2'y karşı yalnızca marjinal olarak aktiftir. huMov19 (M9346A) ile bloke etme bunu etkilemediğinden, IMGN853'ün bu hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivitesi düşüktür ve FOLR1-bağımlı değildir. Bakınız, Şekiller 19 ve 20.

- Fare ksenogreft tümör modellerinden hazırlanan FFPE örnekleri, yukarıda tarif edilen optimize edilmiş ve valide edilmiş analiz kullanılarak FOLR1 pozitifliği için değerlendirilmiştir. Kontrol maddesi ile boyanmış herhangi bir ksenogreft örneğinin
- 5 tümör hücrelerinde boyama görülmemiştir. Aşağıdaki hücre hatlarından türetilen FFPE fare ksenogreft dokularında aşağıdaki boyama paternlerini göstermiştir: Igrov-1, KB ve NCI-H2110, düzey 3 yoğunluklu homojen boyama paternleri göstermiştir; Ishikawa ve Ovcara 3, düzey 3 yoğunluklu heterojen boyama paternleri göstermiştir; LXFA737, düzey 2 yoğunluklu homojen boyama paternleri göstermiştir; OV-90,
- 10 düzey 2 yoğunluklu heterojen paternler göstermiştir ve SKOV3, negatiftir. Tümör ksenogreftlerinin temsili fotoğraflar, Şekiller 21'de ve 22'de sağlanmıştır.

Parental Hücre Hattı veya Tümör Fragmanı	Hastalık Endikasyonu	Nihai Skor	Boyama kategorisi
IGROV-1	Ovaryan kanser	1-3 homo 1-3 homo 1-3 homo	3 homo
Ishikawa	Endometriyum kanseri	2-3 hetero 1-2 hetero/3 fokal 2 hetero/3 fokal 2 hetero/3 fokal	3 hetero
KB	Servikal kanser	3 homo 3 homo	3 homo
LXFA737	NSCLC	2 homo 2 homo	2 homo
NCI-H2110	NSCLC	2-3 homo	3 homo

Parental Hücre Hattı veya Tümör Fragmanı	Hastalık Endikasyonu	Nihai Skor	Boyama kategorisi
		2 homo	
OV-90	Ovaryan kanser	1-2 hetero	2 hetero
		Negatif ^a	
OVCAR3	Ovaryan kanser	1-3 hetero	3 hetero
		1-3 hetero	
SKOV-3	Ovaryan kanser	Negatif	Negatif
		Negatif	

Bir boyama eşik-değeri (≥ 2 heterojen), hem minimal bir ekspresyon düzeyi (boyama yoğunluğu) hem de minimum boyama dağılımı (FOLR1 eksprese eden tümör hücrelerinin yüzdesi) gerektirir. Preklinik veriler, ovaryan karsinomda bu eşik-değeri için doğrulama sağlar. ≥ 2 heterojen IHC skorları olan fare ksenograft tümör örnekleri IMGN 853'e in vivo duyarlılık gösterir. Fare ksenograft ovaryan tümör modellerinden hazırlanan FFPE örnekleri yukarıda tarif edilen optimize edilmiş ve valide edilmiş analiz kullanılarak FOLR1 pozitifliği için değerlendirilmiştir. İki ovaryan karsinom ksenograft modeli OVCAR-3 ve IGROV-1, düzey 3 yoğunluklu bir heterojen veya homojen boyama paterni göstermiştir. OV-90 ovaryan karsinom hücrelerinden türetilen ksenograft model düzey 2 yoğunluklu bir heterojen boyama paterni göstermiştir; Skov-3 ovaryan karsinom modeli, FOLR1-negatiftir. IMGN853, düzey 3 FOLR1 yoğunluklu iki ovaryan modelde hayli aktiftir ve düzey 2 FOLR1 yoğunluklu OV-90 modelinde aktiftir. SKOV-3 modelinde aktivite gözlenmemiştir. Ksenograft modeller ayrıca, akciğer, endometriyum ve servikal tümörleri içeren diğer hastalık endikasyonları için de değerlendirilmiştir ve aktivite ve FOLR1 boyama skorları arasında korelasyonları saptanmasına rağmen, ilave örneklerin test edilmesi gerekir.

FOLR1 ekspresyonu düzeyine karşı ovaryan tümör ksenograft modellerinin IMGN853'e duyarlılığı

Ksenogreft İn vivo aktivite (5 mg/kg IMGN853, tek doz)		Yoğunluk skoru, dağılımı
OVCAR3	Hayli aktif	3 homojen
IGROV-1	Hayli aktif	3 homojen
OV-90	Aktif	2 homojen
SKOV-3	İnaktif	Negatif

FOLR1 ekspresyonu düzeyine karşı diğer tümör ksenogreft modellerinin IMGN853'e duyarlılığı

Ksenogreft	Tümör tipi	İn vivo aktivite (5 mg/kg IMGN853, tek doz)	Yoğunluk skoru, dağılımı
NCI-H2110	NSCLC	Hayli aktif	3 homojen
Ishikawa	endometriyum	İnaktif	2 homojen
KB	Servikal	Hayli aktif	3 homojen

5

DİZİLER

SEQ ID NO: 1 - insan folat reseptörü 1

MAQRMTIQILLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTFLNVCMNAKHUKFKPGPEDKLIHQCR
PWRKNAACCSINUSQLAHKDVSYLRYFNWNLCGEMAPACKRIHQDTCLYFCSPNLGPWI
QQVDQSWRKERVLENVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCESNWEKGNWWTNGENKCAVGA
ACQPIHLYEPIPIVLCNEIWIHSYKVSNSYSGSGRGTQMIWTDPAQGNPNFVAKLYAAAM
SGAGPWAAWPFLESLAFLMLWLLS

10

SEQ ID NO:2 - insan folat reseptörü 1 nükleik asit dizisi

[illegible]

SEQ ID NO:3 - huMov19 vHC

5

QVQLVQSGATFVVKPGASVKISC KASGYIFTGTEMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTEY
NOKIQGKATLTVDKSSNTAHMPLLSLSIDEAVFYCTRYDGSRAMDYWGQGTFVIVSS

SEQ ID NO:4 - huMov19 vLCv1.00

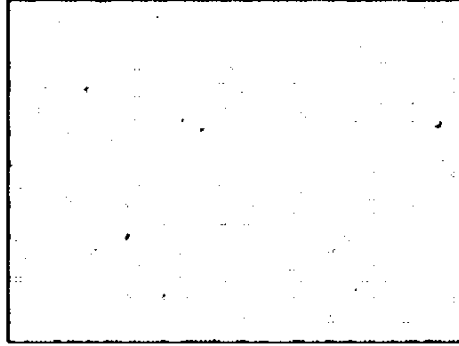
10

DIIVLTQSPISLAVSLQQLPAHSCKASQSYSEAGTSEMIHWYEQKPGQCPRLILYRASNI EAGV
 PDRI SGSGSKITDFTLNISPVEAIDAAITYCQOSRELPYTFGGGTKLEIKR

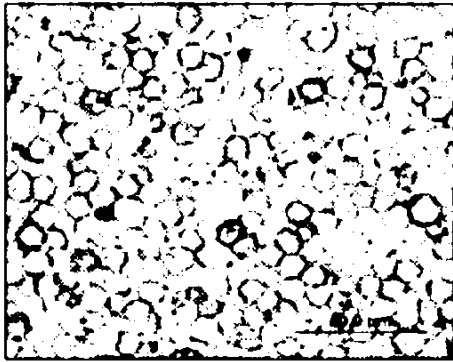
SEQ ID NO:5 - huMov19 vLCv1.60

DIYLTQSFSLAVSLGQPAHSCKASQSVSEAGTSLMHWYUOKPGQQPRLLIYRASNI EAGV
PDRFSGSGSKTDEFLDSPVEALDAATY YCOQSRELYPTYTGGGIKLEIKR

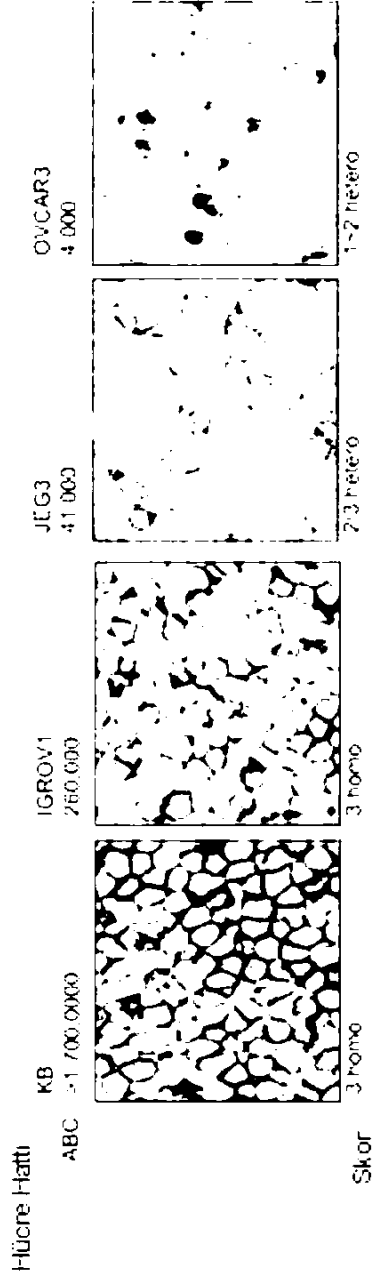
A. 300-19 hücreleri



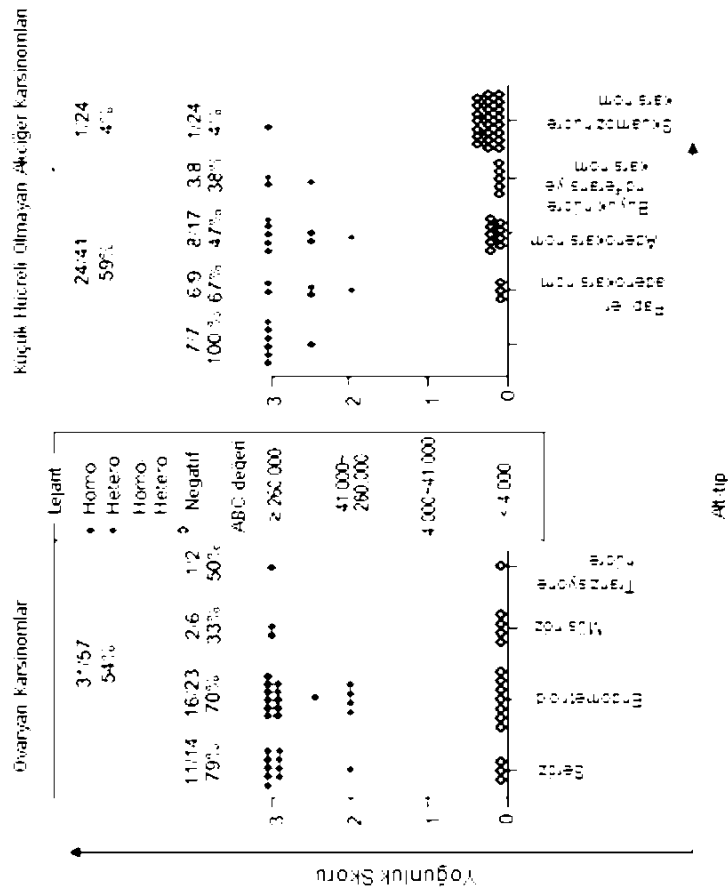
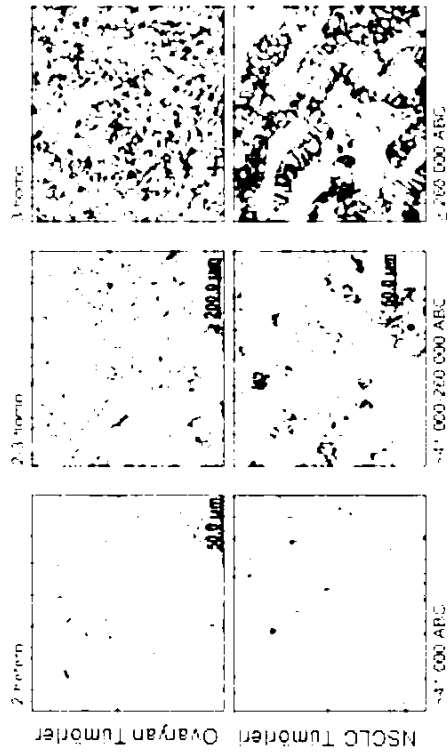
B. FOLR1 ile transfecte edilmiş 300-19 hücreleri

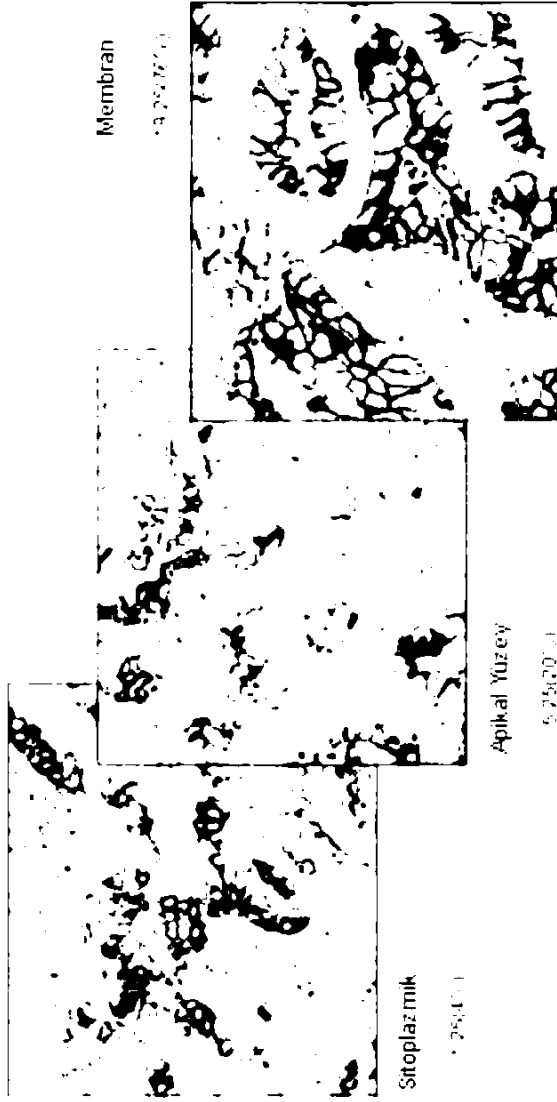


ŞEKİL 1

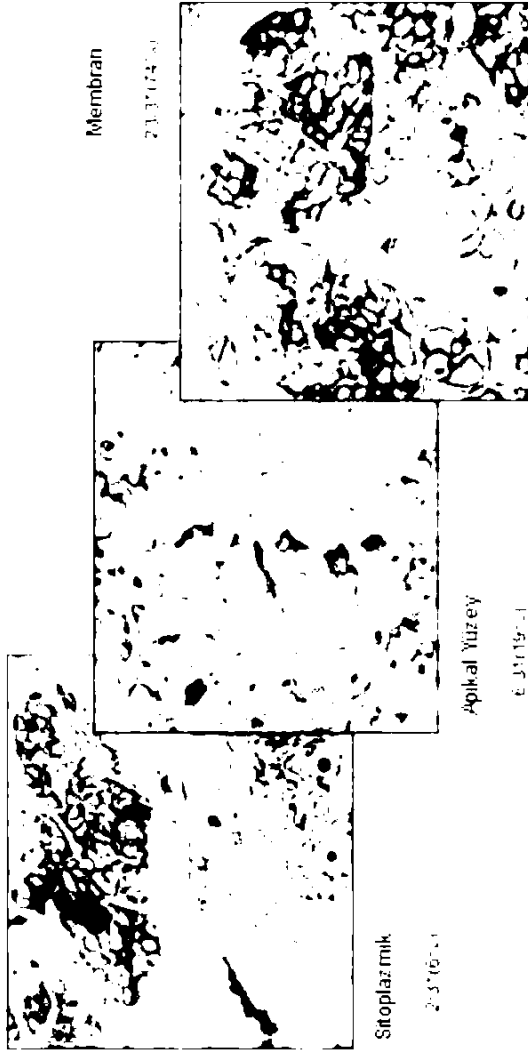


ŞEKİL 2

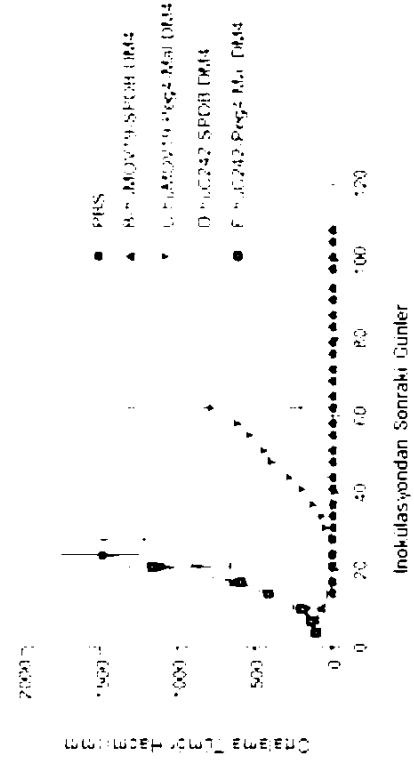




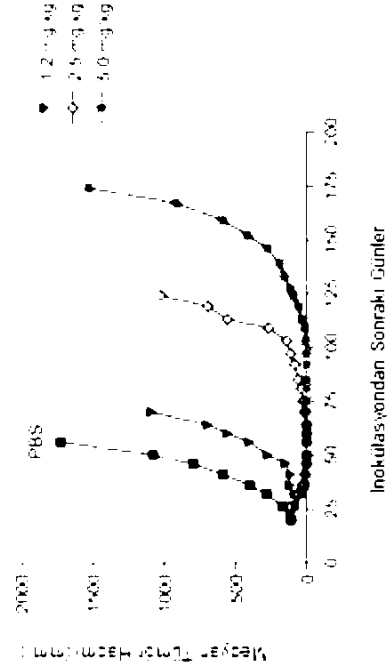
ŞEKİL 5



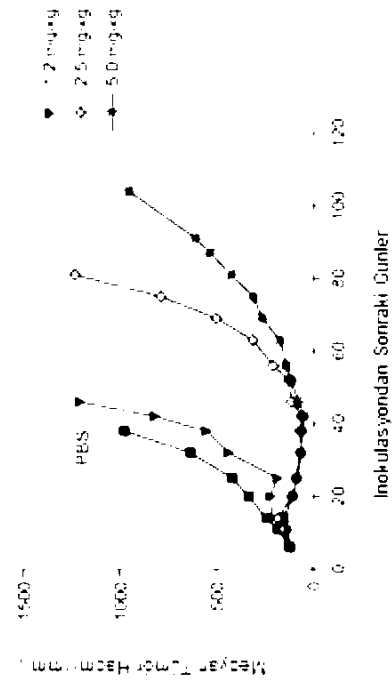
ŞEKİL 6



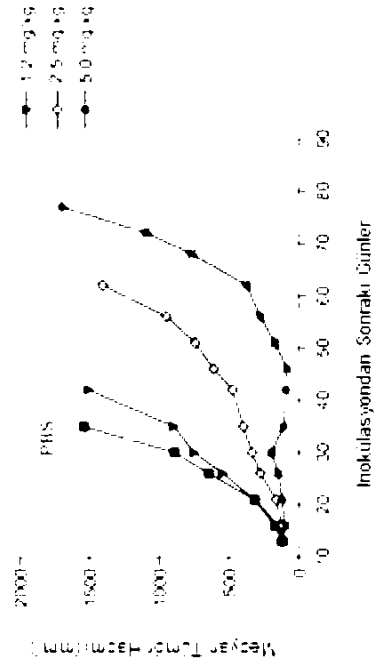
ŞEKİL 7



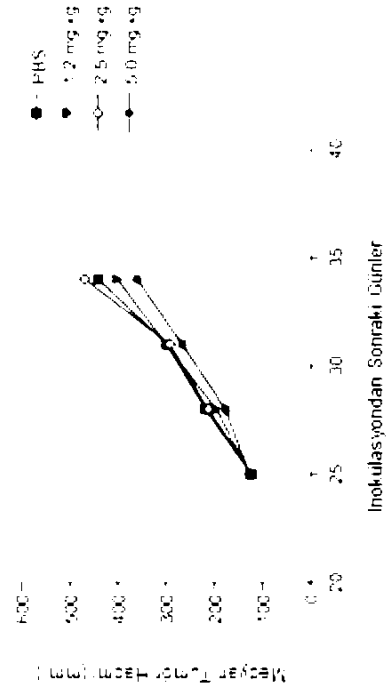
ŞEKİL 8



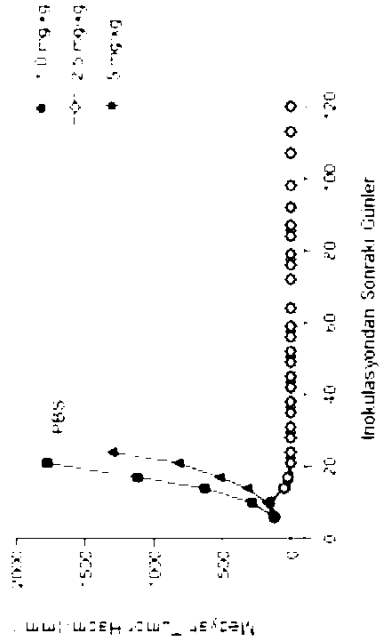
ŞEKİL 9



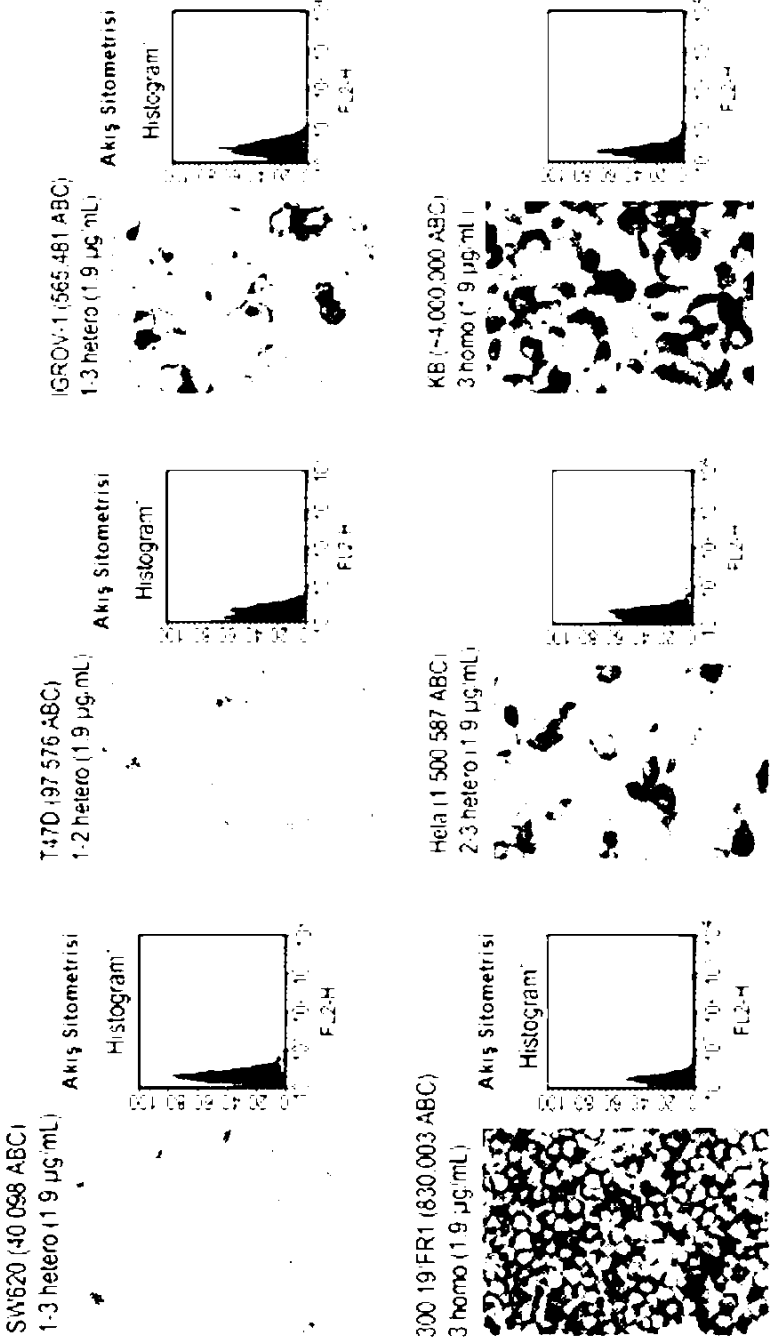
ŞEKİL 10



ŞEKİL 11



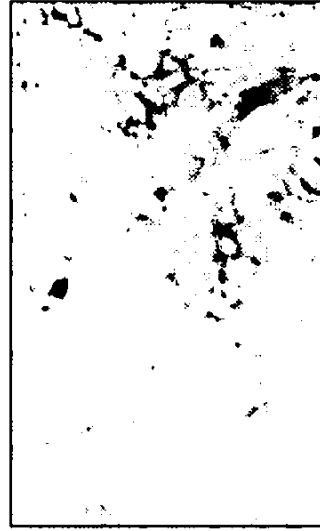
ŞEKİL 12



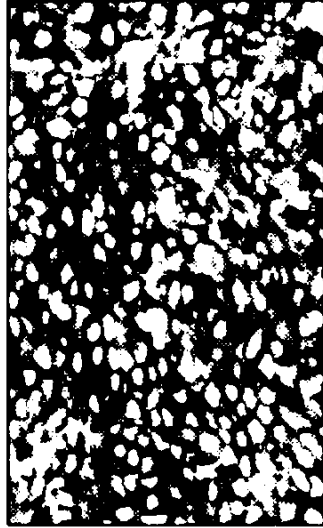
ŞEKİL 13



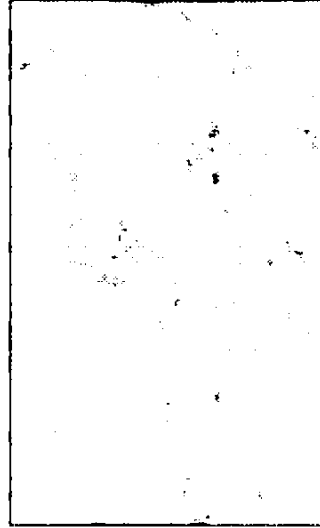
2-3 homo (çekirdek G03, Pantomics)



2 hetero (çekirdek D08, Pantomics)



3 homo (çekirdek H13, Pantomics)

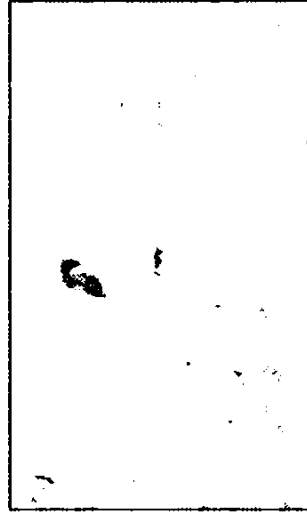


2 homo (çekirdek A07, Pantomics)

ŞEKİL 14



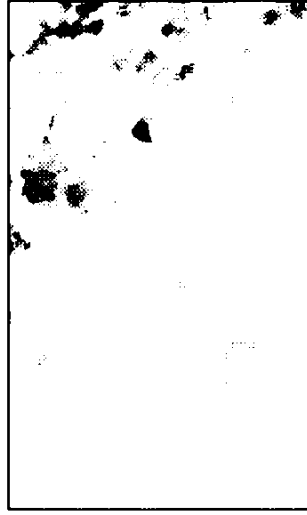
2-3 homo (P-T-OVA-032610-1)



1-2 hetero (çekirdek G14, Pantomics)



3 homo (çekirdek A12, Pantomics)

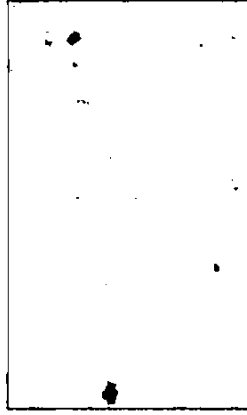


3 fokal (çekirdek E11, Pantomics)

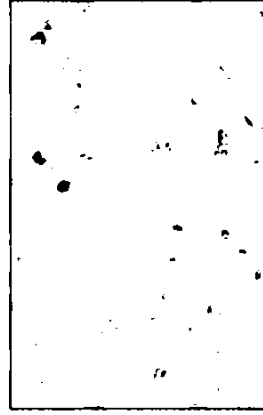
ŞEKİL 15



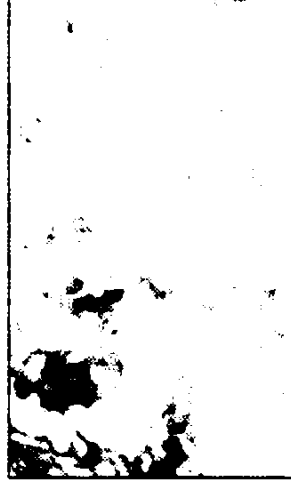
3 homo (çekirdek F03, Pantomics)



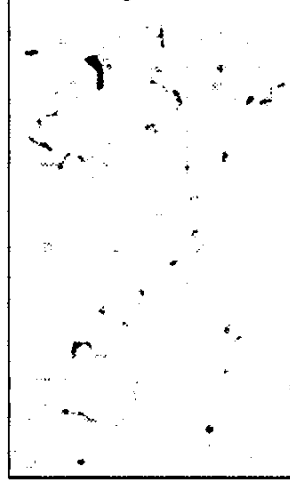
2 hetero (çekirdek 29, Pantomics)



1-2 hetero (çekirdek H15, Pantomics)

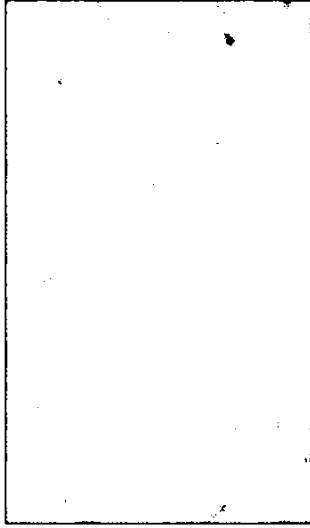


2-3 homo (çekirdek J05, Pantomics)

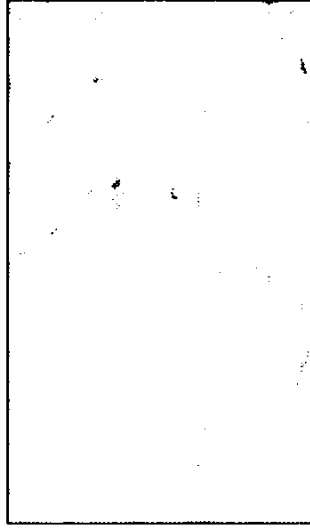


2 homo apikal (çekirdek G10, Pantomics)

ŞEKİL 16



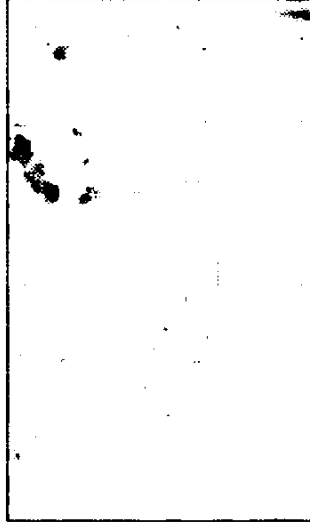
2 hetero (çekirdek G08, Pantomics)



1 hetero (çekirdek I11, Pantomics)

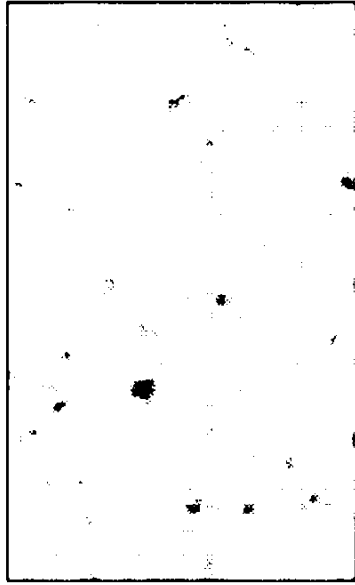


3 hetero (çekirdek I04, Pantomics)

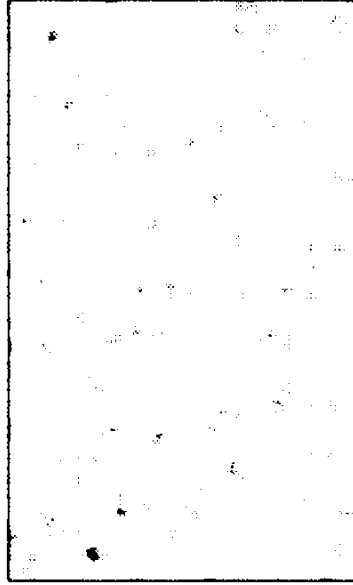


2 hetero (çekirdek G10, Pantomics)

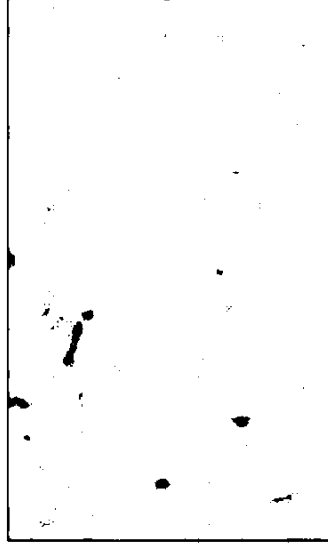
ŞEKİL 17



2 homo (çekirdek C05, Pantomics)

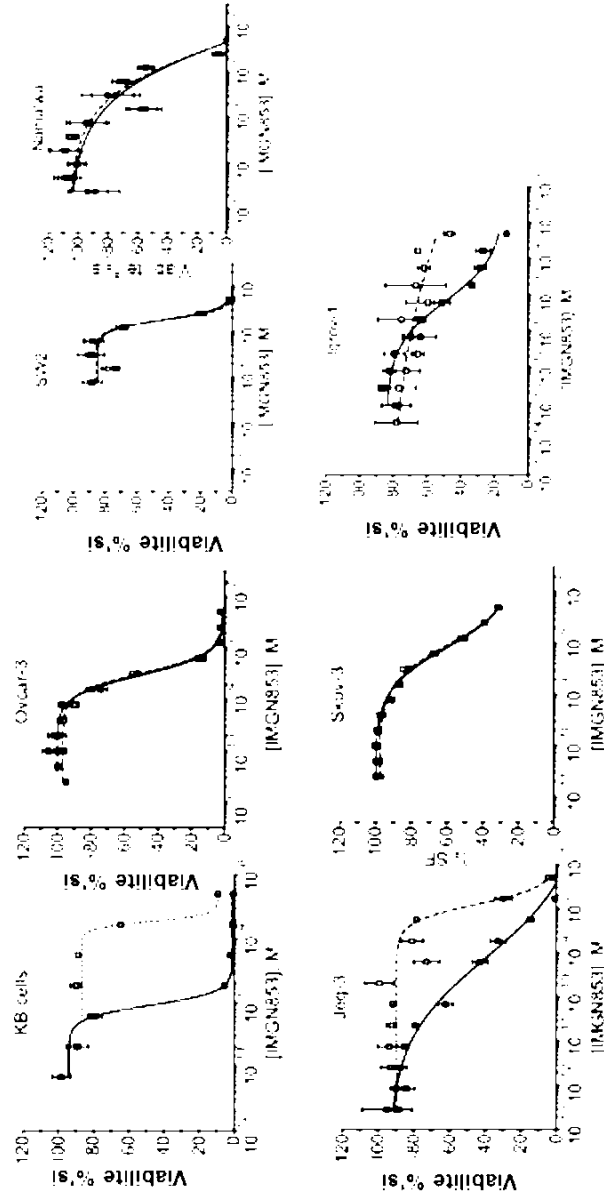


1 hetero (çekirdek E05, Pantomics)

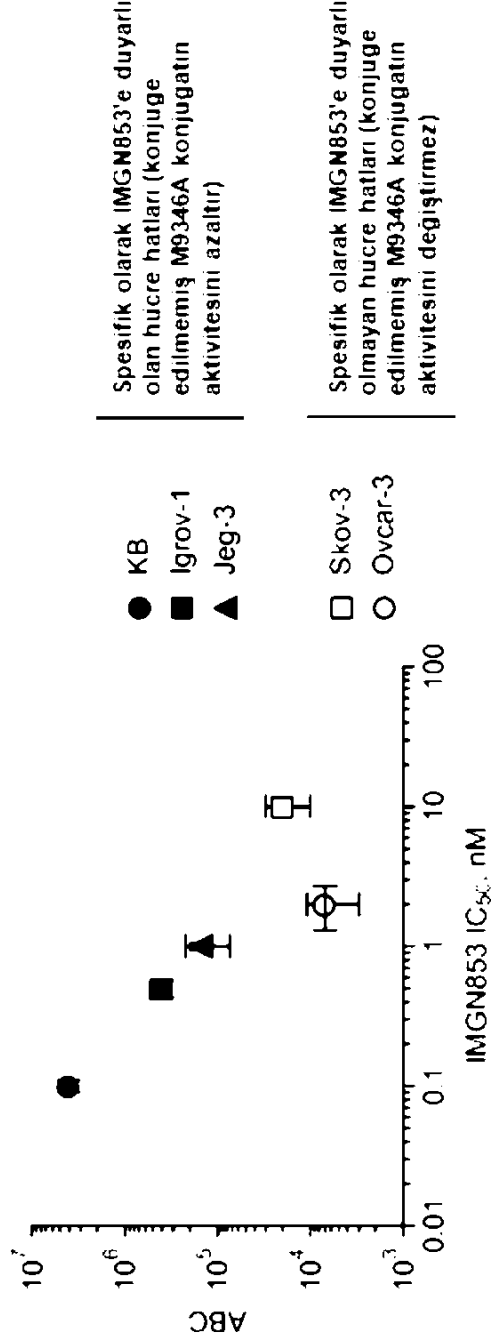


2 hetero (çekirdek G02, Pantomics)

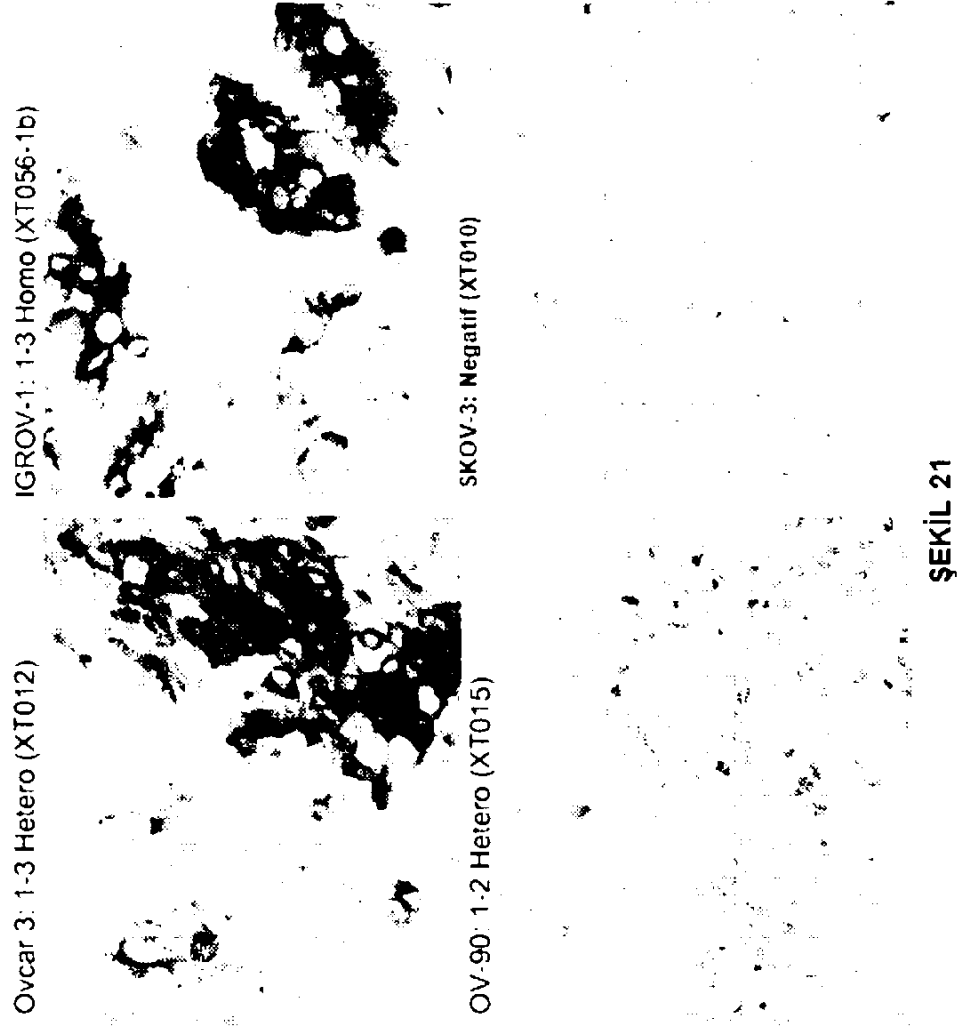
ŞEKİL 18

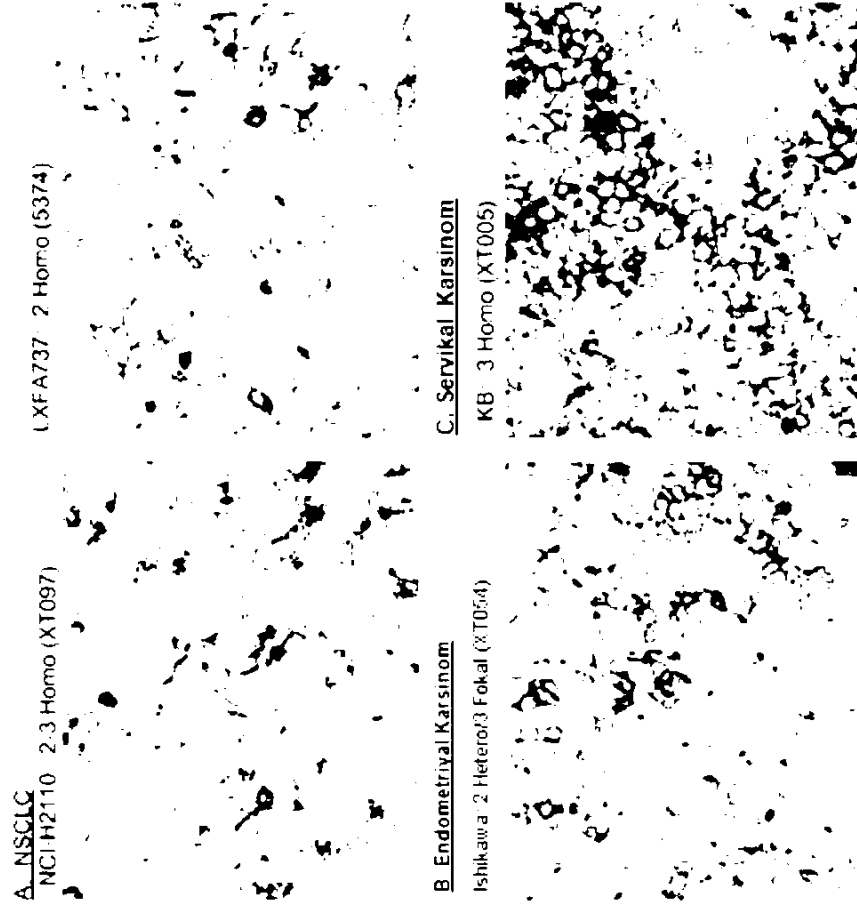


ŞEKİL 19



ŞEKİL 20





ŞEKİL 22

Tükürük Bezi, Interkalär Kanallar: 1-2 Hetero

Ozofagus, 0 (negatif)



Pankreas, Kanallar: 3 Homo

Akciğer, Respiratuvar Epitelyum: 2 Homo

ŞEKİL 23

Düzey 3 Yoğunluk		
	Ovaryan Seröz Adenokarsinom, 3 homo	Akciğer Adenokarsinomu, 3 homo
Düzey 2 Yoğunluk		
	Renal Berrak Hücreli Karsinom, 2 homo	Ovaryan Seröz Adenokarsinom, 1-2 hetero
Düzey 1 Yoğunluk		
	Renal Berrak Hücreli Karsinom, 1 hetero	Renal Berrak Hücreli Karsinom, 0-1 homo

ŞEKİL 24

		Ovaryan Seröz Kistadenokarsinom, 1-3 homo
Düzey 3 Yoğunluk		Ovaryan Seröz Kistadenokarsinom, 2-3 hetero
		Renal Berrak Hücreli Karsinom, 1-2 homo
Düzey 2 Yoğunluk		Renal Berrak Hücreli Karsinom, 0-1 hetero
Düzey 1 Yoğunluk ve FOLR1 Negatif		Akciğer Adenokarsinomu, negatif boyama, 0

ŞEKİL 25