



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월17일

(11) 등록번호 10-2489185

(24) 등록일자 2023년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57492 (2013.01)
A61K 47/6809 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2021-7021056(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년03월30일
심사청구일자 2021년08월03일
(85) 번역문제출일자 2021년07월05일
(65) 공개번호 10-2021-0088746
(43) 공개일자 2021년07월14일
(62) 원출원 특허 10-2020-7010226
원출원일자(국제) 2012년03월30일
심사청구일자 2020년05월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/031544
(87) 국제공개번호 WO 2012/135675
국제공개일자 2012년10월04일
(30) 우선권주장
61/471,007 2011년04월01일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2008500025 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 12 항

(73) 특허권자
이뮤노젠 아이엔씨
미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830
(72) 발명자
캐리건 크리스티나 엔
미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 다트머스 스트리트 53에이
화이트먼 캐서린 알
미국 01887 매사추세츠주 윌밍턴 쇼컨 애비뉴 512
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

심사관 : 이수진

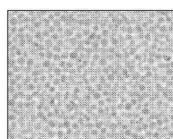
(54) 발명의 명칭 FOLR1 암 치료의 효능을 증가시키기 위한 방법

(57) 요약

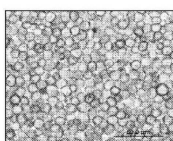
인간 엽산 수용체 1을 표적으로 하는 암 요법의 성공을 향상시키기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법에서 유용한 시약을 포함하는 키트가 추가로 제공된다.

대표도 - 도1

A. 300-19 세포



B. FOLR1으로 전달감염된 300-19 세포



(52) CPC특허분류

A61K 47/6817 (2017.08)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6857 (2017.08)
A61K 47/6869 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/28 (2013.01)

(72) 발명자

페인 질리언

미국 02468 매사추세츠주 웨이번 오크베일 로드 21

레드 샤론

미국 01803 매사추세츠주 벌링턴 세븐 스프링스 레
인 18에이

(56) 선행기술조사문헌

JP2009521206 A
JP2010503386 A
US20060239910 A1
US20090081710 A1
US20090087849 A1
US20100055034 A1
Leslie et al, Cancer Research (1994), vol 54,
no. 9, pp. 2448-2455.
Kalli et al, Gynecologic Oncology (2008), vol.
108, no. 3, pp. 619-626.
Bueno R et al, Journal of Thoracic and
Cardiovascular Surgery (2001), vol. 121, no.
2, pp. 225-233.
Mariangela Figini et al, Cancer Immunology
Immunotherapy, vol. 58, no. 4, pp. 531-546.

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 난소암 치료에 사용하기 위한 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체로서,

면역접합체는, 하나 이상의 참조 샘플에서 염색 세기 및 염색 균일성을 구별하는 면역조직화학 (IHC) 검출 방법을 사용하여 대상체로부터의 종양 샘플 내 세포의 25% 이상에서 2 또는 그 초과 FOLR1 염색 세기 점수가 검출된 때, 상기 대상체에 투여되기 위한 것이고,

면역접합체는 식 (A) - (L) - (C) 를 갖고, 여기서:

(A) 는 FOLR1 에 특이적으로 결합하는 안티-FOLR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, (L) 은 링커를 포함하고, (C) 는 세포독성 약물을 포함하고, (L) 은 (A) 를 (C) 에 연결시키고,

참조 샘플은 세포, 세포 펠렛 또는 조직을 포함하는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, (A) 는, (i) GYFMN 의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:6) 을 포함하는 중쇄 (HC) CDR1, RIHPYDGDTFYNQKFQG 의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:7) 을 포함하는 HC CDR2, 및 YDGSRAMDY 의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:8) 을 포함하는 HC CDR3; 및 (ii) KASQSVSFAGTSLMH 의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:9) 을 포함하는 경쇄 (LC) CDR1, RASNLEA 의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:10) 을 포함하는 LC CDR2, 및 QQSREYPYT 의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:11) 을 포함하는 LC CDR3 을 포함하는, FOLR1 에 특이적으로 결합하는 안티-FOLR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고,

(C) 는 메이탄시노이드를 포함하는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 링커가 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체: N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP) 또는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트 (설포-SPP); N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB) 또는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트 (설포-SPDB); N-석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (SMCC); N-설포석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (설포SMCC); N-석신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB); 및 N-석신이미딜-[(N-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글라이콜] 에스테르 (NHS-PEG4-말레이마이드).

청구항 4

제 1 항에 있어서, 세포독성 약물이 메이탄시노이드, 메이탄시노이드 유사체, 벤조디아제핀, 탁소이드, CC-1065, CC-1065 유사체, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 유사체, 칼리키아마이신, 돌라스타틴, 돌라스타틴 유사체, 아우리스타틴, 토마이마이신 유도체, 및 렘토마이신 유도체 또는 그 제제의 전구약물로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, IHC 는 자동 시스템을 사용하여 수행되는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터의 종양 샘플 내 세포의 75% 초과에서 2 또는 그 초과 염색 세기 점수가 검출되는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 7

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터의 종양 샘플 내 세포의 25% 이상에서 3 의 염색 세기 점수가 검출되는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터의 종양 샘플 내 세포의 75% 초과에서 3 의 염색 세기 점수가 검출되는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 9

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 샘플은 포르말린-고정 파라핀 포매된 것인, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 10

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 참조 샘플은 음성 참조 샘플인, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 검출 방법은, FOLR1 에 특이적으로 결합하는 검출 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 FOLR1 발현을 검출하는 것을 포함하고, 검출 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 효소, 형광단, 방사선 표지, 및 발광단으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 검출 시약을 추가로 포함하는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 검출 시약이 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레신, 트리톱, 및 로다민으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항염산 수용체 1 (안티-FOLR1) 면역접합체.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 교차 참조

[0002]

본원은 본원에 참조로 인용된 2011년 4월 1일자로 출원된 미국 가출원 번호 61/471,007을 우선권으로 주장한다.

[0003]

발명의 배경

[0004]

발명의 분야

[0005]

본 발명의 분야는 일반적으로 인간 염산 수용체 1 (FOLR1)의 과발현에 의해 특성화된 암의 치료 효능을 증가시키는 것에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 암에 민감하거나 암으로 진단받은 환자의 더 효과적인 치료에 관한 것이며, 여기서 종양 세포는 FOLR1 길항제, 예를 들면, FOLR1 면역접합체와 함께 유전자 발현 검정에 의해 결정된 바와 같이 FOLR1을 과발현시킨다.

배경 기술

[0006]

암은, 암으로 진단받은 사람이 백만 명이 넘는 정도로 선진국에서 사망의 주요 원인 중의 하나이며, 미국 단독으로는 매년 500,000명이 암으로 사망한다. 종합적으로, 3명 중의 한 명 초과의 사람이 그들의 일생동안 일부 형태의 암에 걸릴 것이라고 추측된다. 200 초과의 상이한 유형의 암이 존재하며, 이들 중 네 가지 - 유방, 폐,

결장직장, 및 전립선 - 가 모든 신규 사례의 절반 이상을 차지한다 (Jemal 등, 2003, *Cancer J. Clin.* 53:5-26).

- [0007] 엽산 수용체-알파, 또는 폴레이트 결합 단백질로도 공지된 엽산 수용체 1 (FOLR1)은 세포의 원형질막에서 발현되는 N-글라이코실레이트화 단백질이다. FOLR1은 엽산 및 몇 개의 환원된 엽산 유도체에 대해 높은 친화도를 갖는다. FOLR1은 세포 내부로 생리 폴레이트, 5-메틸테트라하이드로폴레이트의 전달을 매개한다.
- [0008] FOLR1은 대다수의 난소암, 뿐만 아니라 많은 자궁암, 자궁내막암, 췌장암, 신장암, 폐암, 및 유방암에서 과발현되는 반면, 정상 조직에서의 FOLR1의 발현은 신장 근위 세관, 폐의 폐포 폐세포, 방광, 고환, 맥락막 신경얼기, 및 갑상선에서 상피 세포의 첨단 막(apical membrane)에 제한된다 (Weitman SD, 등, *Cancer Res* 52: 3396-3401 (1992); Antony AC, *Annu Rev Nutr* 16: 501-521 (1996); Kalli KR, 등 *Gynecol Oncol* 108: 619-626 (2008)). 이러한 FOLR1의 발현 패턴은 FOLR1-지향적 암 치료에 대한 바람직한 표적이 되게 한다.
- [0009] 난소암은 전형적으로 진단된 단계가 될 때까지 증상이 없기 때문에, 종종 후기 단계에서 진단되고 현재 이용가능한 기술, 전형적으로 외과적 용적 축소 후 화학치료 약물로 처리할 때 예후가 불량하다 (von Gruenigen V 등, *Cancer* 112: 2221-2227 (2008); Ayhan A 등, *Am J Obstet Gynecol* 196: 81 e81-86 (2007); Harry VN 등, *Obstet Gynecol Surv* 64: 548-560 (2009)). 따라서, 난소암을 위한 더 효과적인 치료제에 대한 충족되지 못한 분명한 의학적 요구가 존재한다.
- [0010] 발명의 요약
- [0011] 본 발명은 종양 조직 중 FOLR1의 동적 범위의 발현의 발견 및 증가된 수준의 FOLR1 발현을 갖는 종양은 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 의한 치료에 대해 더 반응성이 있다는 발견을 기반으로 한다. 본 발명은 유익하게는 치료제, 즉, 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체를 증가된 발현 수준의 FOLR1을 갖는 것으로 발견된 환자에게 투여하여 치료에 상응하는 더 큰 가능성을 갖는 환자의 치료를 허용한다.
- [0012] 본 발명은 엽산 수용체 1 (FOLR1) 표적 항암 치료에 유리하게 하는 성향이 있는 대상체를 확인하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체로부터의 조직 샘플에서 FOLR1 발현을 검출하는 것을 포함한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 암 치료의 효율성의 가능성을 증가시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 치료적 효과적인 용량의 FOLR1 표적 항암 치료를 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 대상체로부터의 조직 샘플에서 FOLR1 발현은 증가된 것으로 발견되었다.
- [0014] 본 발명은 또한, 저용량 암 치료의 효율성을 예측하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 치료적 효과적인 용량의 FOLR1 표적 항암 치료를 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 대상체는 샘플에서 FOLR1의 증가된 발현을 갖는 것으로 발견되었다.
- [0015] 일 구현예에서, 방법은 난소 암종, 비-소세포 폐 선암종 (세기관지폐포 암종 포함), 신장 암종, 및 자궁내막암종에 관한 것이다.
- [0016] 일 구현예에서, FOLR1 발현의 정도 및 균일성은 면역조직화학 (IHC), 유세포측정, 또는 핵산 하이브리드화에 의해 검출된다. 또 하나의 구현예에서, FOLR1 발현의 수준은 면역조직화학에 의해 검출된다. IHC의 비제한 예는 가변 수준의 FOLR1 및 보정된 IHC 방법, 예컨대 본원에 기재된 것을 구별하는 IHC 방법을 포함한다. FOLR1 발현은 본원에 기재된 평점 방법을 비제한적으로 포함하는 적절한 평점 시스템을 사용하여 점수가 매겨질 수 있다. 예를 들면, FOLR1 발현은 염색 세기에 대해 0, 1, 2, 3, 및 3+의 범위를 포함하는 보정된 IHC 방법을 사용하여 점수가 매겨질 수 있고, 0은 염색 세기의 최저 수준이고 3+는 염색 세기의 최고 수준이다. 대안적으로 또는 또한, FOLR1 발현은 초점 (염색된 세포의 <25%)로부터, 이질 (염색된 세포의 25-75%), 균일한 (염색된 세포의 >75%)로의 범위인 염색 균일성을 포함하는 보정된 IHC 방법을 사용하여 점수를 매겨질 수 있고, 여기서 초점 염색은 가장 적은 균일한 염색이고 동질 염색은 가장 균일한 염색이다.
- [0017] 추가 구현예에서, 샘플 (예를 들면, 종양 조직 샘플) 중 FOLR1 발현이 측정되고 1 이상의 참조 샘플과 비교되고 대상체 종양, 이종이식 종양, 또는 세포주로부터의 조직 샘플 중 FOLR1 발현은 1 이상의 참조 샘플과 비교하여 발현의 정도 및 균일성과 상관된 FOLR1 특정 점수를 갖는다. 다양한 예에서, 동질 염색 패턴에 의한 수준 1, 2, 3 또는 3+ FOLR1 염색 세기를 갖는 조직 샘플 또는 세포는 증가된 FOLR1 발현을 갖는 것으로 간주되고; 이질 또는 초점 염색 패턴에 의한 수준 3 FOLR1 염색 세기를 갖는 조직 샘플 또는 세포는 증가된 FOLR1 발현을 갖는 것으로 간주된다. 또 하나의 구현예에서 샘플 중 FOLR1 발현은 측정되고 필적하는 수준의 염색을 확인하기 위해 1 이상의 참조 샘플과 비교된다. 일 구현예에서, 참조 샘플은 전-할당된 IHC 점수 및/또는 전-결정된 항원 / 세포

(또는 ABC) 수를 가지며 샘플 조직에 대한 항원 또는 ABC 수는 비교를 기반으로 결정될 수 있다.

- [0018] 일 구현예에서, 샘플 (예를 들면, 종양 조직 샘플) 중 FOLR1 발현은 측정되고 1 이상의 대조군 샘플과 비교되고 대상체 종양, 이종이식 종양, 또는 세포주로부터의 조직 샘플 중 FOLR1 발현은 1 이상의 대조군 샘플과 비교하여 발현의 정도 및 균일성과 상관된 FOLR1 특정 점수를 갖는다. 일 구현예에서, 샘플 중 FOLR1 발현은, 검출가능 FOLR1 발현이 없거나 적은 것을 실증하는 음성 대조군 샘플과 비교된다. 또 하나의 구현예에서, 샘플 중 FOLR1 발현은 증가된 FOLR1 발현 (수준 1, 2, 3 또는 3+)을 갖는 양성 대조군 샘플과 비교된다. 일부 구현예에서, 대조군 샘플은 비제한적으로 하기를 포함한다: Namalwa, SW2, SW620, T47D, IGROV-1, 300.19 FR1, HeLa, 또는 KB 세포. 특별한 구현예에서, 대조군 샘플은 세포, 또는 엽산 수용체 (예를 들면, 300.19 FR1)로 전달감염된 세포로부터의 세포 펠렛을 포함한다.
- [0019] 일 구현예에서, FOLR1 표적 항암 치료제는 FOLR1 면역접합체이다. 일 구현예에서, 면역접합체는 안티-FOLR1 항체, 링커, 및 세포독소를 포함한다.
- [0020] 추가 구현예에서, 안티-FOLR1 항체는 huMOV19이다. 또 하나의 구현예에서, 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: 절단가능 링커, 비-절단가능 링커, 친수성 링커, 및 디카복실산 기반 링커. 또 하나의 구현예에서, 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP) 또는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트 (설포-SPP); N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB) 또는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트 (설포-SPDB); N-석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (SMCC); N-설포석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (설포SMCC); N-석신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB); 및 N-석신이미딜-[(N-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글라이콜] 에스테르 (NHS-PEG4-말레이마이드). 또 하나의 구현예에서, 링커는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트 (설포-SPDB). 또 하나의 구현예에서, 세포독성 약물은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: 메이탄시노이드, 메이탄시노이드 유사체, 벤조디아제핀, 탁소이드, CC-1065, CC-1065 유사체, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 유사체, 칼리키아마이신, 돌라스타틴, 돌라스타틴 유사체, 아우리스타틴, 토마이마이신 유도체, 및 렘토마이신 유도체 또는 그 제제의 전구약물. 또 하나의 구현예에서, 세포독성 약물은 메이탄시노이드. 또 하나의 구현예에서, 세포독성 약물은 N(2')-데아세틸-N(2')-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 또는 N(2')-데아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-마이탄신. 또 하나의 구현예에서, 세포독성 약물은 N(2')-데아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-마이탄신 (DM4)이다. 추가 구현예에서, 면역접합체는 항체 HUMOV19, 설포-SPDB, 및 DM4 (IMGN853)을 포함한다.
- [0021] 본 발명은 또한, FOLR1 검출 시약, 및 사용 지침을 포함하는, 대상체에서 FOLR1 발현을 측정하는 키트에 관한 것이다. 일 구현예에서, FOLR1 검출 시약은 FOLR1 결합 펩타이드, 단백질 또는 분자 프로브 (즉 핵산)을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, FOLR1 검출 시약은 안티-FOLR1 항체이다. 또 하나의 구현예에서, 키트는 추가로, 안티-FOLR1 항체에 결합하는 2차 항체를 포함한다. 일 구현예에서 항체는 0.5 내지 7.5 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게 0.9 내지 3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함된다. 다양한 구현예에서, 항체는 1.0 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.5 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.9 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 3.5 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 또는 최대 4.2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함된다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 0.9 내지 3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도를 달성하기 위해 희석 지침을 함께 농축된 용액에 포함된다. 또 하나의 구현예에서, 키트는 추가로, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 검출 시약을 포함한다: 효소, 형광단, 방사선 표지, 및 발광단. 또 하나의 구현예에서, 검출 시약은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레신, 트립톤, 및 로다민.
- [0022] 키트는 또한, FOLR1 발현의 검출 및 평점에 대한 지침을 포함한다. 키트는 또한, 대조군 또는 참조 샘플을 포함한다. 대조군 또는 참조 샘플의 비제한 예는 조직 샘플, 세포 펠렛 또는 세포를 포함한다. 대조군 또는 참조 샘플은 조직 배양 세포주 (정상 또는 종양), 정상 조직 (정상 대조군) 또는 종양 조직 (양성 대조군) 샘플로부터 유래될 수 있다. 예시적인 세포주는 SW620, T47D, IGROV-1, HELA, KB, JEG-3, 및 세포주를 포함하고, 이는 FOLR1 (예를 들면, 300.19FR1)을 발현시키는 발현 벡터로 안정되게 또는 일시적으로 전달감염된다. FOLR1 발현 검출 방법 중 정상 참조 조직으로 사용될 수 있는 예시적인 조직은 본원에 기재된 것이고 정상 폐, 타액선, 및 췌장을 포함한다.
- [0023] 본 발명은 또한, 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 반응할 것 같은 암을 확인하는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 상기 암으로부터의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 세포 표면

상의 FOLR1 단백질에 결합하는 제제와 접촉시키는 단계; (b) (a)의 상기 생물학적 샘플의 세포 표면 상의 FOLR1 단백질에 결합하는 상기 제제의 결합을 검출하는 단계; (c) 단계 (b)의 상기 결합에 점수를 배정하는 단계로서, 상기 점수는 1 이상의 참조 샘플에 대한 비교를 기반으로 배정되는 단계; 및 (d) 단계 (c)의 상기 점수를 참조 조직 또는 세포의 점수와 비교하는 단계로서, 여기서 상기 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 더 큰 암 FOLR1 수준의 점수 또는 상기 높은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수와 같거나 더 큰 암 FOLR1 수준의 점수는 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 반응하는 것처럼 상기 암을 확인하는 단계. 어떤 구현예에서, 암은 난소암 또는 폐암이다.

[0024] 본 발명은 또한 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 의한 치료에 민감한 종양을 확인하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 상기 종양으로부터 얻은 종양 조직 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 측정하는 단계로서, 여기서 상기 측정은 1 이상의 참조 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 검출 방법의 사용을 포함하는 단계; (b) 상기 종양 조직 샘플에 대해 FOLR1 염색 세기 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 결정된 FOLR1 염색 세기 점수를 적어도 하나 참조 샘플에서 FOLR1 단백질 발현을 측정하여 결정된 상대적인 값과 비교하는 단계로서, 여기서 상기 적어도 하나 참조 샘플은 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 의한 치료에 민감하지 않는 조직, 세포, 또는 세포 펠렛 샘플이고, 여기서 상기 상대적인 값보다 더 높은 단계 (b)에서 결정된 상기 샘플의 FOLR1 염색 세기 점수 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 의한 치료에 대해 민감한 것처럼 상기 종양을 확인하는 단계. 어떤 구현예에서, 검출 방법은 수작업으로 또는 자동 시스템을 사용하여 수행된다. 일 구현예에서, 검출 방법은 IHC이다. 또 하나의 구현예에서, IHC는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있는 보정된 IHC이다.

[0025] 본 발명은 또한, 폐암 또는 난소암이 있는 대상체에 대해 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체로 치료 계획을 최적화하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 상기 대상체로부터의 샘플을 세포 표면 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계; (b) 1 이상의 참조 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 검출 방법을 사용하여 상기 샘플에서 상기 (a)의 항체의 상기 세포 표면 FOLR1에의 결합을 측정하는 단계 및 염색 점수를 상기 샘플에 배정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 점수가 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수 이하일 때 고용량의 안티-FOLR1 면역접합체를 투여하거나 또는 상기 점수가 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수 초과일 때 저용량의 안티-FOLR1 면역접합체를 투여하는 단계.

[0026] 본 발명은 또한, 대상체로부터의 종양 조직 샘플에서 암 세포에 대한 세포 표면 FOLR1의 발현을 검출하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 종양 조직 샘플을 얻는 단계로서, 여기서 상기 암 샘플은 포르말린-고정 파라핀 포매된 것인 단계; (b) 상기 샘플을 세포 표면 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계; (c) 1 이상의 참조 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 검출 방법을 사용하여 상기 종양 조직 샘플에서 상기 (b)의 항체의 상기 세포 표면 FOLR1에의 결합을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 종양 조직 샘플 내지 1 이상의 참조 샘플에서 세포 표면 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성의 수준을 비교한 후 FOLR1 발현 점수를 상기 FOLR1에 배정하는 단계.

[0027] 본 발명은 또한, 저용량 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체 치료 계획에 반응할 것처럼 폐암 또는 난소암이 있는 대상체를 확인하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 상기 난소암 또는 폐암으로부터의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 세포 표면 FOLR1 단백질에 결합하는 제제와 접촉시키는 단계; (b) 상기 (a)의 생물학적 샘플에 대한 상기 제제의 결합을 검출하는 단계; (c) 단계 (b)의 상기 결합에 점수를 배정하는 단계로서, 상기 점수는 1 이상의 참조 샘플에 대한 비교를 기반으로 배정되는 단계; 및 (d) 단계 (c)의 상기 점수를 참조 조직 또는 세포의 점수와 비교하는 단계로서, 여기서 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 더 큰 상기 난소암 또는 폐암 FOLR1 수준의 점수 또는 높은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수와 같거나 더 높은 상기 난소암 또는 폐암 FOLR1 수준의 점수는 저용량 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 반응하는 것처럼 상기 난소암 또는 폐암을 확인하는 단계. 어떤 구현예에서, 상기 방법은 추가로, 치료적 유효량의 인간화 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체를 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0028] 구체적으로, 본 발명은 이하의 발명을 포함한다.

[0029] (1) 항염산제 수용체 1 (FOLR1) 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 의한 암 치료의 효능을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 암이 있는 대상체에게 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체를 투여하는 것을 포함

하고, 여기서 상기 대상체로부터의 암 샘플 중 증가된 발현의 FOLR1 유전자 또는 단백질은 1 이상의 참조 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 검출 방법을 사용하여 검출된 방법.

- [0030] (2) (1) 에 있어서, 상기 검출 방법은 면역조직화학 (IHC)인 방법.
- [0031] (3) (1) 또는 (2) 에 있어서, 상기 IHC는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있는 보정된 IHC인 방법.
- [0032] (4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 방법은 낮은 세포 표면 FOLR1 발현, 중간체 FOLR1 세포 표면 발현, 또는 높은 FOLR1 세포 표면 발현을 갖는 샘플에 대해 염색 세기의 범위를 생성하는 방법.
- [0033] (5) (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 방법은 참조 샘플과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플 중 염색 세기 및 염색 균일성을 구별하는 방법.
- [0034] (6) (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 있어서, 상기 암 샘플은 면역조직화학에 의한 FOLR1 발현에 대해 1 초과인 염색 세기 점수를 갖는 방법.
- [0035] (7) (6) 에 있어서, 상기 암 샘플은 면역조직화학에 의한 FOLR1 발현에 대해 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수를 갖는 방법.
- [0036] (8) (7) 에 있어서, 상기 암 샘플은 포르말린 고정 파라핀 포매된 샘플에 대해 면역조직화학에 의한 FOLR1 발현에 대해 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수를 갖는 방법.
- [0037] (9) (6) 내지 (8) 중 어느 하나에 있어서, 상기 암 샘플은 균질한 FOLR1 발현에 대해 염색 균일성을 갖는 방법.
- [0038] (10) (6) 내지 (8) 중 어느 하나에 있어서, 상기 암 샘플은 FOLR1에 대한 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수 및 이질 또는 균질한 염색 균일성을 갖는 방법.
- [0039] (11) (2) 내지 (10) 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역조직화학은 수작업으로 수행되는 방법.
- [0040] (12) (2) 내지 (10) 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역조직화학은 자동 시스템을 사용하여 수행되는 방법.
- [0041] (13) (1) 내지 (12) 중 어느 하나에 있어서, 상기 참조 샘플은 양성 참조 샘플 또는 음성 참조 샘플인 방법.
- [0042] (14) (1) 내지 (13) 중 어느 하나에 있어서, 상기 참조 샘플은 세포, 세포 펠렛, 또는 조직을 포함하는 방법.
- [0043] (15) (1) 내지 (14) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 방법은 FOLR1 발현을 세포 표면 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체로 검출하는 것을 포함하는 방법.
- [0044] (16) (15) 에 있어서, 상기 항체는 항체 huMov19 (M9346A)인 방법.
- [0045] (17) (15) 또는 (16) 에 있어서, 상기 항체는 효소, 형광단, 방사선 표지, 및 발광단으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 검출 시약을 추가로 포함하는 방법.
- [0046] (18) (17) 에 있어서, 상기 검출 시약은 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레신, 트립토판, 및 로다민으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.
- [0047] (19) (15) 내지 (18) 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체의 농도는 약 0.9 내지 약 3.8 $\mu\text{g/ml}$ 인 방법.
- [0048] (20) 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체; 용기; 및 항체 또는 면역접합체는 IHC에 의해 측정된 2, 3, 또는 3+의 수준에서 FOLR1의 발현에 의해 특성화된 암을 치료할 수 있다는 것을 나타내는 포장내 삽입물 또는 표지를 포함하는 제조 물품.
- [0049] (21) (20) 에 있어서, 상기 IHC는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있는 보정된 IHC인 제조 물품.
- [0050] (22) (20) 또는 (21) 에 있어서, 상기 암으로부터의 암 샘플은 포르말린 고정 파라핀 포매된 샘플에 대해 면역조직화학에 의한 FOLR1 발현에 대해 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수를 갖는 제조 물품.
- [0051] (23) (20) 내지 (22) 중 어느 하나에 있어서, 상기 암으로부터의 암 샘플 FOLR1에 대한 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수 및 이질 또는 균질한 염색 균일성을 갖는 제조 물품.
- [0052] (24) (20) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역조직화학은 수작업으로 수행되는 제조 물품.
- [0053] (25) (20) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역조직화학은 자동 시스템을 사용하여 수행되는 제조

물품.

- [0054] (26) (20) 내지 (25) 중 어느 하나에 있어서, 상기 FOLR1 면역접합체는 안티-FOLR1 항체, 링커, 및 세포독소를 포함하는 제조 물품.
- [0055] (27) (26) 에 있어서, 상기 안티-FOLR1 항체는 huMov19 (M9346A)인 제조 물품.
- [0056] (28) (26) 또는 (27) 에 있어서, 상기 링커는 절단가능 링커, 비-절단가능 링커, 친수성 링커, 및 디카복실산 기반 링커로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제조 물품.
- [0057] (29) (28) 에 있어서, 상기 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제조 물품: N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP) 또는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트 (설포-SPP); N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB) 또는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트 (설포-SPDB); N-석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (SMCC); N-설포석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (설포SMCC); N-석신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB); 및 N-석신이미딜-[(N-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글라이콜] 에스테르 (NHS-PEG4-말레이마이드).
- [0058] (30) (29) 에 있어서, 상기 링커는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트 (설포-SPDB)인 제조 물품.
- [0059] (31) (26) 내지 (30) 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포독성 약물은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제조 물품: 메이탄시노이드, 메이탄시노이드 유사체, 벤조디아제핀, 탁소이드, CC-1065, CC-1065 유사체, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 유사체, 칼리키아마이신, 돌라스타틴, 돌라스타틴 유사체, 아우리스타틴, 토마이마이신 유도체, 및 렙토마이신 유도체 또는 그 제제의 전구약물.
- [0060] (32) (31) 에 있어서, 상기 세포독성 약물은 메이탄시노이드인 제조 물품.
- [0061] (33) (32) 에 있어서, 상기 세포독성 약물은 N(2')-테아세틸-N(2')-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 또는 N(2')-테아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-마이탄신인 제조 물품.
- [0062] (34) (33) 에 있어서, 상기 세포독성 약물은 N(2')-테아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-마이탄신 (DM4)인 제조 물품.
- [0063] (35) (26) 내지 (34) 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역접합체는 항체 huMov19 (M9346A), 설포-SPDB, 및 DM4 (IMGN853)를 포함하는 제조 물품.
- [0064] (36) 항진단에서 사용하기 위한 컷과 안티-FOLR1 항체 및 요법에서 사용하기 위한 인간화 안티-FOLR1 항체 또는 인간화 안티-FOLR1 항체를 포함하는 안티-FOLR1 면역접합체를 포함하는 병용 진단 및 약제학적 키트.
- [0065] (37) (36) 에 있어서, 상기 진단 항체는 IHC에 의해 FOLR1 발현을 검출할 수 있는 키트.
- [0066] (38) (37) 에 있어서, 상기 IHC는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있는 보정된 IHC인 키트.
- [0067] (39) (38) 에 있어서, 상기 보정된 IHC는 낮은 세포 표면 FOLR1 발현, 중간체 세포 표면 FOLR1 발현, 또는 높은 세포 표면 FOLR1 발현을 갖는 샘플에 대해 염색 세기의 범위를 생성하는 키트.
- [0068] (40) (36) 내지 (39) 중 어느 하나에 있어서, 상기 보정된 IHC 참조 샘플과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플 중 염색 세기 및 염색 균일성을 구별하는 키트.
- [0069] (41) (36) 내지 (40) 중 어느 하나에 있어서, 1 이상의 참조 샘플을 추가로 포함하는 키트.
- [0070] (42) (41) 에 있어서, 상기 참조 샘플은 양성 참조 샘플 또는 음성 참조 샘플인 키트.
- [0071] (43) (41) 또는 (42) 에 있어서, 상기 참조 샘플은 세포, 세포 펠렛, 또는 조직을 포함하는 키트.
- [0072] (44) (36) 내지 (43) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 항체는 효소, 형광단, 방사선 표지, 및 발광단으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 검출 시약을 추가로 포함하는 키트.
- [0073] (45) (44) 에 있어서, 상기 검출 시약은 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레신, 트리톱, 및 로다민으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 키트.
- [0074] (46) (36) 내지 (45) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 항체의 농도는 약 0.9 내지 약 3.8 $\mu\text{g/ml}$ 인 키트.

- [0075] (47) (36) 내지 (46) 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간화 안티-FOLR1 항체는 huMov19 (M9346A)인 키트.
- [0076] (48) (36) 내지 (47) 중 어느 하나에 있어서, 상기 안티-FOLR1 면역접합체는 안티-FOLR1 항체, 링커, 및 세포독소를 포함하는 키트.
- [0077] (49) (48) 에 있어서, 상기 안티-FOLR1 항체는 huMov19 (M9346A)인 키트.
- [0078] (50) (48) 또는 (49) 에 있어서, 상기 링커는 절단가능 링커, 비-절단가능 링커, 친수성 링커, 및 디카복실산 기반 링커로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 키트.
- [0079] (51) (50) 에 있어서, 상기 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 키트: N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP) 또는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트 (설포-SPP); N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB) 또는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트 (설포-SPDB); N-석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (SMCC); N-설포석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (설포SMCC); N-석신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB); 및 N-석신이미딜-[(N-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글라이콜] 에스테르 (NHS-PEG4-말레이마이드).
- [0080] (52) (51) 에 있어서, 상기 링커는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트 (설포-SPDB)인 키트.
- [0081] (53) (48) 내지 (52) 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포독소는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 키트: 메이탄시노이드, 메이탄시노이드 유사체, 벤조디아제핀, 탁소이드, CC-1065, CC-1065 유사체, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 유사체, 칼리키아마이신, 돌라스타틴, 돌라스타틴 유사체, 아우리스타틴, 토마이마이신 유도체, 및 렙토마이신 유도체 또는 그 제제의 전구약물.
- [0082] (54) (53) 에 있어서, 상기 세포독성 약물은 메이탄시노이드인 키트.
- [0083] (55) (54) 에 있어서, 상기 세포독성 약물은 N(2')-테아세틸-N(2')-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 또는 N(2')-테아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-마이탄신인 키트.
- [0084] (56) (55) 에 있어서, 상기 세포독성 약물은 N(2')-테아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-마이탄신 (DM4)인 키트.
- [0085] (57) (48) 내지 (56) 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역접합체는 항체 huMov19 (M9346A), 설포-SPDB, 및 DM4 (IMG853)를 포함하는 키트.
- [0086] (58) 세포 표면 FOLR1에 특이적으로 결합하는 안티-FOLR1 항체, 면역조직화학용 시약, 및 참조용 1 이상의 표준화 대조군을 포함하는 진단 키트로서, 상기 표준화 대조군은 세포, 세포 펠렛, 또는 포르말린 고정 파라핀 포매된 조직 샘플을 포함하고, 상기 1 이상의 표준화 대조군은 비-FOLR1 발현, 저-FOLR1 발현, 또는 높은 FOLR1 발현 세포, 세포 펠렛, 또는 조직으로부터 유래하는 진단 키트.
- [0087] (59) (58) 에 있어서, 상기 저-FOLR1 발현은 대조군은 타액선 조직, 폐 조직, OVCAR3 세포, 및 T47D 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 키트.
- [0088] (60) (58) 에 있어서, 상기 높은-FOLR1 발현은 대조군은 췌장 조직, KB 세포, IGROV1 세포, 및 엽산 수용체 1로 인정되게 또는 일시적으로 전달감염된 세포주로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 키트.
- [0089] (61) (60) 에 있어서, 상기 엽산 수용체 1로 인정되게 또는 일시적으로 전달감염된 세포주는 300.19/FR1인 키트.
- [0090] (62) 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 반응할 것 같은 암을 확인하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 방법:
- [0091] (a) 상기 암으로부터의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 세포 표면 상의 FOLR1 단백질에 결합하는 제제와 접촉시키는 단계;
- [0092] (b) (a)의 상기 생물학적 샘플의 세포 표면 상의 FOLR1 단백질에 결합하는 상기 제제의 결합을 검출하는 단계;
- [0093] (c) 단계 (b)의 상기 결합에 점수를 배정하는 단계로서, 상기 점수는 1 이상의 참조 샘플에 대한 비교를 기반으로 배정되는 단계; 및
- [0094] (d) 단계 (c)의 상기 점수를 참조 조직 또는 세포의 점수와 비교하는 단계로서, 여기서 상기 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 더 큰 암 FOLR1 수준의 점수 또는 상기 높은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수와

같거나 더 큰 암 FOLR1 수준의 점수는 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 반응하는 것처럼 상기 암을 확인하는 단계.

- [0095] (63) (62) 에 있어서, 상기 암은 난소암 또는 폐암인 방법.
- [0096] (64) 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 의한 치료에 민감한 종양을 확인하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 방법:
- [0097] (a) 상기 종양으로부터 얻은 종양 조직 샘플에서 FOLR1 발현의 수준을 측정하는 단계로서, 여기서 상기 측정은 1 이상의 참조 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 검출 방법의 사용을 포함하는 단계;
- [0098] (b) 상기 종양 조직 샘플에 대해 FOLR1 염색 세기 점수를 결정하는 단계; 및
- [0099] (c) 단계 (b)에서 결정된 FOLR1 염색 세기 점수를 적어도 하나 참조 샘플에서 FOLR1 단백질 발현을 측정하여 결정된 상대적인 값과 비교하는 단계로서, 여기서 상기 적어도 하나 참조 샘플은 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 의한 치료에 민감하지 않는 조직, 세포, 또는 세포 펠렛 샘플이고, 여기서 상기 상대적인 값보다 더 높은 단계 (b)에서 결정된 상기 샘플의 FOLR1 염색 세기 점수 안티-FOLR1 항체, 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 의한 치료에 대해 민감한 것처럼 상기 종양을 확인하는 단계.
- [0100] (65) (62) 내지 (64) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 방법은 수작업으로 또는 자동 시스템을 사용하여 수행되는 방법.
- [0101] (66) (65) 에 있어서, 상기 검출 방법은 자동인 방법.
- [0102] (67) (62) 내지 (66) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 방법은 IHC인 방법.
- [0103] (68) (67) 에 있어서, 상기 IHC는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있는 보정된 IHC인 방법.
- [0104] (69) (62) 내지 (68) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 방법은 낮은 세포 표면 FOLR1 발현, 중간체 세포 표면 FOLR1 발현, 또는 높은 세포 표면 FOLR1 발현을 갖는 샘플에 대해 염색 세기의 범위를 생성하는 방법.
- [0105] (70) (62) 내지 (69) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 방법은 참조 샘플과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플 중 염색 세기 및 염색 균일성을 구별하는 방법.
- [0106] (71) (62) 내지 (70) 중 어느 하나에 있어서, 상기 샘플은 면역조직화학에 의한 FOLR1 발현에 대해 1 초과 염색 세기 점수를 갖는 방법.
- [0107] (72) (71) 에 있어서, 상기 샘플은 면역조직화학에 의한 FOLR1 발현에 대해 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수를 갖는 방법.
- [0108] (73) (72) 에 있어서, 상기 샘플은 포르말린 고정 파라핀 포매된 샘플에 대해 면역조직화학에 의한 FOLR1 발현에 대해 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수를 갖는 방법.
- [0109] (74) (62) 내지 (73) 중 어느 하나에 있어서, 상기 샘플은 균질한 FOLR1 발현에 대해 염색 균일성을 갖는 방법.
- [0110] (75) (62) 내지 (74) 중 어느 하나에 있어서, 상기 샘플은 FOLR1에 대한 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수 및 이질 또는 균질한 염색 균일성을 갖는 방법.
- [0111] (76) (62) 내지 (75) 중 어느 하나에 있어서, FOLR1 발현의 수준은 세포 표면 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 측정되는 방법.
- [0112] (77) (76) 에 있어서, 상기 항체는 항체 huMov19 (M9346A)인 방법.
- [0113] (78) (62) 내지 (77) 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 효소, 형광단, 방사선 표지, 및 발광단으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 검출 시약을 추가로 포함하는 방법.
- [0114] (79) (78) 에 있어서, 상기 검출 시약은 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레신, 트리톱, 및 로다민으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.
- [0115] (80) (62) 내지 (79) 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체의 농도는 약 0.9 내지 약 3.8 $\mu\text{g/ml}$ 인 방법.
- [0116] (81) 폐암 또는 난소암이 있는 대상체에 대해 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체로 치료계획을 최적

화하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 방법:

- [0117] (a) 상기 대상체로부터의 샘플을 세포 표면 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계;
- [0118] (b) 1 이상의 참조 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 검출 방법을 사용하여 상기 샘플에서 상기 (a)의 항체의 상기 세포 표면 FOLR1에의 결합을 측정하고 염색 점수를 상기 샘플에 배정하는 단계; 및
- [0119] (c) 상기 단계 (b)의 점수가 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수 이하일 때 고용량의 안티-FOLR1 면역 접합체를 투여하거나 또는 상기 점수가 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수 초과일 때 저용량의 안티-FOLR1 면역접합체를 투여하는 단계.
- [0120] (82) 대상체로부터의 종양 조직 샘플에서 암 세포에 대한 세포 표면 FOLR1의 발현을 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 방법:
- [0121] (a) 종양 조직 샘플을 얻는 단계로서, 여기서 상기 암 샘플은 포르말린-고정 과라핀 포매된 것인 단계;
- [0122] (b) 상기 샘플을 세포 표면 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계;
- [0123] (c) 1 이상의 참조 샘플 중 염색 세기 또는 염색 균일성과 비교하여 FOLR1 발현 암 샘플에서 염색 세기 또는 염색 균일성을 구별하는 검출 방법을 사용하여 상기 종양 조직 샘플에서 상기 (b)의 항체의 상기 세포 표면 FOLR1에의 결합을 측정하는 단계; 및
- [0124] (d) 상기 종양 조직 샘플 내지 1 이상의 참조 샘플에서 세포 표면 FOLR1 염색 세기 또는 염색 균일성의 수준을 비교한 후 FOLR1 발현 점수를 상기 FOLR1에 배정하는 단계.
- [0125] (83) 저용량 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체 치료 계획에 반응할 것처럼 폐암 또는 난소암이 있는 대상체를 확인하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 방법:
- [0126] (a) 상기 난소암 또는 폐암으로부터의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 세포 표면 FOLR1 단백질에 결합하는 제제와 접촉시키는 단계;
- [0127] (b) 상기 (a)의 생물학적 샘플에 대한 상기 제제의 결합을 검출하는 단계;
- [0128] (c) 단계 (b)의 상기 결합에 점수를 배정하는 단계로서, 상기 점수는 1 이상의 참조 샘플에 대한 비교를 기반으로 배정되는 단계; 및
- [0129] (d) 단계 (c)의 상기 점수를 참조 조직 또는 세포의 점수와 비교하는 단계로서, 여기서 정상 또는 낮은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수보다 더 큰 상기 난소암 또는 폐암 FOLR1 수준의 점수 또는 높은 FOLR1 발현 참조 샘플의 점수와 같거나 더 높은 상기 난소암 또는 폐암 FOLR1 수준의 점수는 저용량 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체에 반응하는 것처럼 상기 난소암 또는 폐암을 확인하는 단계.
- [0130] (84) (82)에 있어서, 상기 암은 난소암 또는 폐암인 방법.
- [0131] (85) (81) 내지 (84) 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출 방법은 낮은 FOLR1 발현, 중간체 FOLR1 발현, 또는 높은 FOLR1 발현을 갖는 샘플에 대해 염색 세기의 범위를 생성하는 방법.
- [0132] (86) (85)에 있어서, 상기 샘플은 FOLR1 발현에 대해 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수를 갖는 방법.
- [0133] (87) (81) 내지 (85) 중 어느 하나에 있어서, 상기 샘플은 균질한 FOLR1 발현에 대해 염색 균일성을 갖는 방법.
- [0134] (88) (87)에 있어서, 상기 샘플은 FOLR1에 대한 2, 3, 또는 3+의 염색 세기 점수 및 이질 또는 균질한 염색 균일성을 갖는 방법.
- [0135] (89) (81) 내지 (88) 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 수작업으로 수행되는 방법.
- [0136] (90) (81) 내지 (88) 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 자동 시스템을 사용하여 수행되는 방법.
- [0137] (91) (81) 내지 (90) 중 어느 하나에 있어서, 상기 참조 샘플은 양성 참조 샘플 또는 음성 참조 샘플인 방법.
- [0138] (92) (81) 내지 (91) 중 어느 하나에 있어서, 상기 참조 샘플은 세포, 세포 펠렛, 또는 조직을 포함하는 방법.
- [0139] (93) (81) 내지 (92) 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제 또는 항체는 효소, 형광단, 방사선 표지, 및 발광단으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 검출 시약을 추가로 포함하는 방법.

- [0140] (94) (93) 에 있어서, 상기 검출 시약은 바이오틴, 디콕시제닌, 플루오레신, 트리튬, 및 로다민으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.
- [0141] (95) (81) 내지 (94) 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제 또는 항체의 농도는 약 0.9 내지 약 3.8 $\mu\text{g/ml}$ 인 방법.
- [0142] (96) (81) 내지 (95) 중 어느 하나에 있어서, 치료적 유효량의 인간화 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체를 상기 대상체에 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

도면의 간단한 설명

- [0143] 도 1. 수동 염색 방법: 안티-FOLR1 항체는 전달감염된 세포에서 FOLR1 발현을 검출한다. 300.19 세포는 인간 FOLR1을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 전달감염되었다. FOLR1 단백질 발현은 컷과 항체 BN3.2를 사용하여 검출되었다. *Smith AE 등, Hybridoma (Larchmt). 2007 Oct;26(5):281-8.*
- 도 2. 수동 염색 방법: 안티-FOLR1 항체는 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있다. 항체 BN3.2는 다양한 이종이식 세포에서 FOLR1 발현을 검출하기 위해 사용되었다. BN3.2 항체에 대한 검출 한계는 결합된 대략 4000 항체 / 세포 (ABC)였다.
- 도 3. 수동 염색 방법: 안티-FOLR1 항체는 조직 샘플에서 상이한 수준의 FOLR1 발현을 구별할 수 있다. BN3.2는 난소 종양 (A), 뿐만 아니라 비-소세포 폐암 종양 (B) 모두에서 FOLR1 발현을 검출하기 위해 사용되었다.
- 도 4. 수동 염색 방법: 난소 및 NSCLC 종양에서 균질한 FOLR1 발현. FOLR1 발현은 많은 난소 암종, 뿐만 아니라 시험된 폐 선암종 및 세기관지폐포 암종에서 높았다. 대다수의 난소 암종 샘플은 장액 또는 자궁내막모양 세포에서 최고 세기 염색을 가졌다. NSCLC 종양에서, 최고 ABC 값은 세기관지폐포 암종 및 유두상 선암종에서 발견되었다.
- 도 5. 수동 염색 방법: FOLR1 발현은 일반적으로 NSCLC 세포의 막으로 국한되었다. 높은 분할 현미경관찰법은, 대다수의 FOLR1 염색이 NSCLC 종양에서 막으로 제한된다는 것을 나타내었다.
- 도 6. 수동 염색 방법: FOLR1 발현은 일반적으로 난소 암 세포의 막으로 국한되었다. 높은 분할 현미경관찰법은, 대다수의 FOLR1 염색이 난소 종양에서 막으로 제한된다는 것을 나타내었다.
- 도 7. KB 이종이식 모델에서 huMov19-표적화된 콘주게이트의 생체내 효능. 비-FOLR1 표적 huC242-SPDB-DM4 (D)와 비교한 FOLR1 표적 절단가능 콘주게이트 huMov19-SPDB-DM4 (B), 및 비표적 huC242-PEG4Mal-DM4 (E)와 비교한 비-절단가능 콘주게이트 huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C)는 SCID 마우스에 피하 이식된 KB 세포의 확립된 이종이식 모델을 사용하여 시험되었다. huMov19에 의한 FOLR1의 표적화로 평균 종양 용적에서 유의미한 감소가 있었다.
- 도 8. OVCAR-3 인간 난소 암종 이종이식에서 IMG853 처리의 용량-반응 항종양 활성. 마우스는 1.2, 2.5 또는 5.0 mg/kg 에서 IMG853의 단일 정맥내 주사로 처리되었다. 동물의 대조군 그룹은 PBS의 단일 정맥내 주사를 수용했다.
- 도 9. IGROV-1 인간 난소 암종 이종이식에서 IMG853 처리의 용량-반응 항종양 활성. 마우스는 1.2, 2.5 또는 5.0 mg/kg 에서 IMG853의 단일 정맥내 주사로 처리되었다. 동물의 대조군 그룹은 PBS의 단일 정맥내 주사를 수용했다.
- 도 10. OV-90 인간 난소 암종 이종이식에서 IMG853 처리의 용량-반응 항종양 활성. 마우스는 1.2, 2.5 또는 5.0 mg/kg 에서 IMG853의 단일 정맥내 주사로 처리되었다. 동물의 대조군 그룹은 PBS의 단일 정맥내 주사를 수용했다.
- 도 11. SKOV-3 인간 난소 암종 이종이식에서 IMG853 처리의 용량-반응 항종양 활성. 마우스는 1.2, 2.5 또는 5.0 mg/kg 에서 IMG853의 단일 정맥내 주사로 처리되었다. 동물의 대조군 그룹은 PBS의 단일 정맥내 주사를 수용했다.
- 도 12. KB 인간 자궁경부 선암종 이종이식에서 IMG853 처리의 용량-반응 항종양 활성. 마우스는 1.0, 2.5 또는 5.0 mg/kg에서 IMG853의 단일 정맥내 주사로 처리되었다. 동물의 대조군 그룹은 PBS의 단일 정맥내 주사를 수용했다.
- 도 13. 자동 염색 방법: IHC 및 유세포측정에 의해 세포주 중 FOLR1 발현을 묘사하는 대표적인 사진 및 히스토

그램. SW620, T47D, Igrov-1, 300.19/FR1, HeLa, 및 KB 세포 모두는 FOLR1 염색 세기 및 균일성에 대해 점수가 매겨졌다. SW630 및 IGROV-1 세포는 1-3 헤테로로 점수가 매겨졌고, T47D는 1-2 헤테로로 점수가 매겨졌고, HeLa는 2-3 헤테로로 점수가 매겨졌고, 한편 300.19/FR1 및 KB는 3 호모로 점수가 매겨졌다.

도 14. 자동 염색 방법: 장액 난소암에서 대표적인 FOLR1 염색. 3 호모, 2-3 호모, 2 호모, 및 2 헤테로 염색을 실증하는 염색 패턴은 IHC에 의해 장액 난소암으로부터 조직 섹션에 대해 보여진다.

도 15. 자동 염색 방법: 자궁내막모양 난소암에서 대표적인 FOLR1 염색. 3 호모, 2-3 호모, 3 초점, 및 1-2 헤테로 염색을 실증하는 염색 패턴은 IHC에 의해 자궁내막암으로부터 조직 섹션에 대해 보여진다.

도 16. 자동 염색 방법: 선암종 하위유형 (세기관지폐포 암종 제외)의 NSCLC에서 대표적인 FOLR1 염색. 3 호모, 2-3 호모, 2 헤테로, 2 호모, 및 1-2 헤테로 염색을 실증하는 염색 패턴은 IHC에 의해 선암종 하위유형인 비-소 세포 폐암로부터 조직 섹션에 대해 보여진다.

도 17. 자동 염색 방법: 자궁내막 선암종에서 대표적인 FOLR1 염색. 3 헤테로, 2 헤테로, 및 1 헤테로 염색을 실증하는 염색 패턴은 IHC에 의해 자궁내막 선암종으로부터 조직 섹션에 대해 보여진다.

도 18. 자동 염색 방법: 신장 투명 세포 암종에서 대표적인 FOLR1 염색. 2 호모, 2 헤테로, 및 1 헤테로 염색을 실증하는 염색 패턴은 IHC에 의해 신장 세포암으로부터 조직 섹션에 대해 보여진다.

도 19. 시험관내 IMGN853의 세포독성 활성. 5 FOLR1-양성 세포주 (KB, IGROV-1, JEG-3, SKOV-3 및 OVCAR-3) 및 2개의 FOLR1-음성 세포주 (Namalwa 및 SW2)는 IMGN853의 세포독성 효과에 대한 그의 민감도에 대해 분석되었다. 세포는 IMGN853 (실선) 또는 IMGN853 플러스 0.5 μ M 비콘주게이트화 huMov19 (M9346A) (파선)에 5 일 동안 노출되었고, 세포 생존은 WST-8-기반 검정에 의해 결정되었다. 대표적인 데이터가 보여진다. 생존 세포의 퍼센트는 IMGN853의 농도의 베이스 10 로그에 대항하여 플롯팅되었다.

도 20. IMGN853 대 FOLR1 발현의 수준에 대한 FOLR1-양성 세포주의 민감도. IMGN853의 효능 및 특이성은 광범위한 FOLR1 발현을 갖는 FOLR1-양성 세포주에 대항하여 분석되었다. 세포주는 IMGN853 및 KB, Igrov-1와 함께 인 큐베이팅되었고, Jeg-3는 IMGN853에 대해 특이적으로 민감하였고, 한편, 비콘주게이트화 huMov19 (M9346A)는 콘주게이트의 감소된 활성을 보여주었다. Skov-3 및 OvcAR-3는 IMGN853에 대해 민감하지 않았고 비콘주게이트화 huMov19 (M9346A)는 콘주게이트의 활성을 변화시키지 않았다.

도 21. 자동 염색 방법: FOLR1에 대해 염색된 난소 암종 이중이식 효능 모델. 1-3 헤테로 (OvcAR 3), 1-3 호모 (IgroV 1), 1-2 헤테로 (Ov 90) 및 음성 (SKOV 3)를 실증하는 염색 패턴은 IHC에 의해 난소암 이중이식으로 부터 조직 섹션에 대해 보여진다.

도 22. 자동 염색 방법: 마우스 이중이식 모델. NSCLC (A), 자궁내막 암종 (B) 및 자궁경부 암종 (C) 세포주에 대한 이중이식에서 FOLR1의 염색 패턴이 보여진다. NSCLC 샘플은 2-3 호모 또는 2 호모 염색으로 실증되었고, 자궁내막 암종은 2 헤테로/3 초점 염색으로 실증되었으며, 자궁경부 암종은 3 호모 염색으로 실증되었다.

도 23. 검정 대조군 조직 자동 염색 가이드. 음성 (식도 0) 및 양성 대조군 샘플 (타액선 1-2 헤테로, 폐 2 호모, 췌장 3 호모)에 대한 염색 패턴은 자동 IHC에 의해 결정된 바와 같이 보여진다.

도 24. 종양 조직 자동 염색 가이드. 수준 3, 수준 2, 및 수준 1 염색에 대한 대표적인 염색 패턴은 자동 IHC에 의해 결정된 바와 같이 대조군 조직에 대해 보여진다.

도 25. 종양 조직 자동 염색 가이드. 수준 3, 수준 2, 및 수준 1/음성 염색에 대한 대표적인 염색 패턴은 자동 IHC에 의해 결정된 바와 같이 대조군 조직에 대해 보여진다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0144]

본 발명은 FOLR1의 과발현에 의해 특성화된 암의 치료 효능을 증가시키거나 상기 암 치료에 대한 반응 가능성을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은, 정상 조직과 비교하여 종양 조직에서 동적 범위의 FOLR1 발현의 발견, 및 FOLR1 발현 수준이 증가된 종양이 안티-FOLR1 항체 또는 안티-FOLR1 면역접합체로의 치료에 더 반응한다는 발견을 기초로 한다. 본 발명자들은 또한 자동 방법 및 매뉴얼 방법 사이에 동적 범위의 검출 및 감도에서의 차이를 발견했다. 본 발명의 방법을 실시하는데 유용한 1 이상의 시약을 포함하는 키트를 추가로 제공한다.

[0145]

I. 정의

- [0146] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 수많은 용어들 및 어구들을 하기에 정의한다.
- [0147] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어들 "인간 염산 수용체 1" 또는 "FOLR1"은, 달리 지시되지 않으면, 임의 원상태 인간 FOLR1을 나타낸다. 용어 "FOLR1"은 "전체길이", 가공되지 않은 FOLR1 뿐만 아니라 세포 내에서의 가공으로부터 초래된 임의 형태의 FOLR1을 포함한다. 또한, 상기 용어는 FOLR1의 천연 생성 변이체, 예를 들면, 스플라이스 변이체, 대립유전자 변이체 및 동형체를 포함한다. 본원에 기재된 FOLR1 폴리펩타이드는 다양한 공급원, 예컨대 인간 조직 유형 또는 또 하나의 공급원으로부터 분리될 수 있거나 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. FOLR1 서열의 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: NCBI 참조 번호 P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1, 및 NP_057936.1, 및 서열번호: 1 및 2에서 보여주는 것들.
- [0148] 용어 FOLR1의 "증가된 발현"은 높은 수준의 FOLR1 발현을 함유하는 샘플을 나타낸다. 일 예에서, FOLR1 발현은 IHC에 의해 측정되고 규정된 점수를 나타내는 대조군 (예를 들면, 보정 대조군)과 비교하여 염색 세기 점수 또는 염색 균일성 점수가 주어진다 (예를 들면, 세기가 수준 3 보정 대조군에 필적하는 경우 3의 세기 점수가 시험 샘플에 주어지거나 또는 세기가 수준 2 보정 대조군에 필적하는 경우 2의 세기가 시험 샘플에 주어진다). 예를 들면, 면역조직화학에 의해 1, 2, 3, 또는 3+ 또는 그 초과인 점수는 FOLR1의 증가된 발현을 지시한다. 이질하거나 동질한 염색 균일성도 또한 증가된 FOLR1 발현을 지시한다. 염색 세기 및 염색 균일성 점수는 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다 (예를 들면, 2 호모, 2 헤테로, 3 호모, 3 헤테로, 등). 또 하나의 예에서, FOLR1 발현의 증가는 대조군 값 (예를 들면, 높은 FOLR1 값을 갖지 않는 암을 포함하지 않거나 포함하는 대상체로부터의 조직 또는 세포에서의 발현 수준)에 비해 적어도 2-배, 적어도 3-배, 또는 적어도 5-배 증가의 검출에 의해 결정될 수 있다.
- [0149] "참조 샘플"은 시험 샘플로부터 본 발명의 방법에서 얻은 결과와 상관관계를 보여주고 비교하는데 사용될 수 있다. 참조 샘플은 세포 (예를 들면, 세포주, 세포 펠렛) 또는 조직일 수 있다. "참조 샘플" 중의 FOLR1 수준은 FOLR1의 절대 또는 상대적인 양, 양의 범위, 최소 및/또는 최대 양, 평균 양, 및/또는 중간 양일 수 있다. 본 발명의 진단 방법은 시험 샘플 및 "참조 값"에서의 FOLR1의 발현 수준 사이의 비교를 포함한다. 일부 구현예에서, 참조 값은 참조 샘플에서의 FOLR1의 발현 수준이다. 참조 값은 미리 결정된 값일 수 있고 또한 시험 샘플과 병행하여 시험된 참조 샘플 (예를 들면, 생물학적 대조군 샘플)로부터 결정될 수 있다. 참조 값은 단일 컷오프 값, 예컨대 중간값 또는 평균값 또는 값의 범위, 예컨대 신뢰 구간일 수 있다. 참조 값은 다양한 아그룹의 개인, 예컨대 암에 걸리기 쉬운 개인, 초기 또는 후기 단계 암을 갖는 개인, 남성 및/또는 여성 개인, 또는 암 치료가 진행중인 개인에 대해 확립될 수 있다. 정상 참조 샘플 또는 값 및 양성 참조 샘플 또는 값의 예는 본원에 기재되어 있다.
- [0150] 일부 구현예에서, 참조 샘플은 건강한 조직, 특히 암에 감염되지 않은 상응하는 조직으로부터의 샘플이다. 이들 유형의 참조 샘플을 음성 대조군 샘플로서 통칭한다. 다른 구현예에서, 참조 샘플은 FOLR1을 발현시키는 종양 조직으로부터의 샘플이다. 이들 유형의 참조 샘플을 양성 대조군 샘플로서 통칭한다. 양성 대조군 샘플은 또한 FOLR1 발현 수준과 관련된 균일성(헤테로 대 호모) 및/또는 염색 세기의 정도 (1, 2, 3, 3+)에 대한 비교 인디케이터로서 사용될 수 있다. 양성 대조군 비교 샘플은 또한 염색 세기 또는 균일성의 동적 범위를 입증하는 보정 참조 샘플로서 통칭된다. 실시예 1-9에서 보여주는 바와 같이, FOLR1-비발현 참조 샘플은 인간 식도 조직을 포함하고; 낮은 FOLR1 참조는 타액선 (특히 사이판) 및 폐 (특히 호흡 상피) 조직을 포함하고; 높은 FOLR1-발현 조직은 췌장 (특히 도관 세포)을 포함한다. 세포주에 있어서, 낮은 발현자 (expressor)는 비제한적으로 OVCAR3 및 T47D를 포함하고, 보통 발현자는 비제한적으로 SW620, IGROV-1, JEG3을 포함하고, 높은 발현자는 비제한적으로 KB 및 IGROV1을 포함한다. 특히 바람직한 양성 높은 FOLR1 참조는 염산 수용체 1 (예를 들면, 300.19/FR1)로 안정되게 또는 일시적으로 전달감염된 세포주이다. 특정한 암에 대한 FOLR1의 적절한 양성 및 음성 참조 수준은 1 이상의 적절한 대상체에서 FOLR1의 수준을 측정함으로써 결정될 수 있고, 그와 같은 참조 수준은 대상체의 특정 집단에 맞춰질 수 있다 (예를 들면, 참조 수준은 연령-일치될 수 있어서 특정 연령의 대상체로부터의 샘플에서의 FOLR1 수준과 특정 연령 그룹에서 특정한 질환 상태, 표현형, 또는 이의 결핍에 대한 참조 수준간에 비교될 수 있다). 그와 같은 참조 수준은 또한 생물학적 샘플에서 FOLR1의 수준을 측정하는데 사용되는 특정 기술 (예를 들면, 면역검정 등)에 맞춰질 수 있으며, 여기서 FOLR1의 수준은 사용된 특정 기술을 토대로 상이할 수 있다.
- [0151] 본원의 용어 "일차 항체"는 조직 샘플 중의 표적 단백질 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 나타낸다. 일차 항체는 일반적으로 면역조직화학 (IHC) 절차에 사용되는 제1 항체이다. 일 구현예에서, 일차 항체는 IHC 절차에서만 사용되는 항체이다. 본원의 용어 "2차 항체"는 일차 항체에 특이적으로 결합하고, 이로써 일차 항체 및 차후 시약 (존재하는 경우) 사이에 다리를 형성하는 항체를 나타낸다. 2차 항체는 일반적으로 면역조직화학 절차에

사용되는 제2 항체이다.

- [0152] 본 발명의 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 생물학적 기원이고, 특정 구현예에서, 예컨대 원핵 유기체로부터의 생물학적 기원이다. 바람직한 구현예에서, 샘플은 인간 샘플이지만, 동물 샘플이 또한 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 샘플의 비제한 공급원은 예를 들면 고형 조직, 생검 흡인물, 복수, 유체 추출물, 혈액, 혈장, 혈청, 척수액, 림프 유체, 피부의 외부 섹션, 기도, 장관, 및 비뇨생식기, 눈물, 타액, 밀크, 종양, 기관, 세포 배양물 및/또는 세포 배양 구성요소를 포함한다. 본 발명은, 일반적으로 고형 조직 샘플, 또는 다른 체액 예컨대 복수를 포함하는 암 샘플에 대해 특히 유용하며, 여기서 이용가능한 물질의 양은 적다. 본 방법은, 비제한적으로 상이한 유형의 세포들 또는 조직들을 비교하고, 상이한 발달 단계들을 비교하고, 질환 또는 비정상 존재 및/또는 유형을 검출하거나 결정함을 포함하는, FOLR1의 발현 측면 또는 샘플의 상태를 시험하는데 사용될 수 있다.
- [0153] 본원의 목적을 위해, 조직 샘플의 "섹션"은 조직 샘플의 단일 부분 또는 피스, 예를 들면, 조직 샘플로부터 조직 또는 세포 절단의 박막 슬라이스를 나타낸다. 조직 샘플의 다중 섹션이 채취되고 본 발명에 따르는 분석에 적용될 수 있음을 이해한다. 일부 경우에, 조직의 선택된 부분 또는 섹션은 세포의 동질 모집단을 포함한다. 다른 경우에, 선택된 부분은 조직의 영역, 예를 들면, 비제한 예로서, 내강을 포함한다. 선택된 부분은 하나의 세포 또는 2개의 세포만큼 작을 수 있거나, 예를 들면 수천개의 세포를 나타낼 수 있다. 대개의 경우, 세포의 수집은 중요하고, 본 발명이 세포 성분의 검출에 사용하기 위해 기재되어 있는 반면, 본 방법은 유기체의 비-세포 성분 (예를 들면, 비제한 예로서, 혈액 중의 가용성 성분)을 검출하는데 또한 사용될 수 있다.
- [0154] "상관 관계가 있다" 또는 "상관 관계가 있는"은, 어떤 식으로든, 제1 분석의 성능 및/또는 결과를 제2 분석의 성능 및/또는 결과와 비교하는 것을 의미한다. 예를 들면, 제1 분석의 결과를 제2 분석을 수행하는데 사용할 수 있고/있거나 제1 분석의 결과를 제2 분석이 수행되어야 하는지를 판단하는데 사용될 수 있고/있거나 제1 분석의 결과를 제2 분석의 결과와 비교할 수 있다. 일 구현예에서, FOLR1의 증가된 발현은 FOLR1-표적 항암 치료의 효율성의 증가된 가능성과 상관 관계가 있다.
- [0155] 용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내의 적어도 1 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 또는 상기한 것들의 조합을 인지하고 이에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는, 항체가 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 온전한 폴리클로날 항체, 온전한 모노클로날 항체, 항체 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편), 단일 사슬 Fv (scFv) 돌연변이체, 다중특이적 항체 예컨대 적어도 2 온전한 항체로부터 생성된 이중특이적 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정부를 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 항체는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤라고 통칭되는 그의 중쇄 불변 도메인의 동일성을 기초로 하여, 임의의 5 주요 클래스의 면역글로불린 중의 하나일 수 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 또는 그것의 서브클래스 (아이소타입) (예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2). 상이한 클래스의 면역글로불린은 상이하고 잘 공지된 서브유닛 구조 및 3차원 배치를 갖는다. 항체는 다른 분자 예컨대 독소, 방사능동위원소 등에 노출되거나 콘주게이트화될 수 있다.
- [0156] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그것이 결합하는 항원, 예컨대 FOLR1의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 어떤 구현예에서, 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 바람직하게, 생물학적 활성은 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 100%만큼 감소된다.
- [0157] 용어 "안티-FOLR1 항체" 또는 "FOLR1에 결합하는 항체"는 FOLR1과 충분한 친화도로 결합할 수 있어서 FOLR1을 표적화하는 진단제 및/또는 치료제로서 유용한 항체를 나타낸다. 관련되지 않은, 비-FOLR1 단백질에 대한 안티-FOLR1 항체의 결합 정도는, 예를 들면, 방사선면역검정 (RIA)에 의해 측정될 때, FOLR1에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 어떤 구현예에서, FOLR1에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 의 해리 상수 (K_d)를 갖는다. 안티-FOLR1 항체의 예는 당해분야에 공지되어 있고, 본원에 참조로 인용된 미국 출원 공보 번호 2012/0009181에 개시되어 있다.
- [0158] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부를 나타내고, 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 나타낸다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 선형 항체, 단일 사슬 항체, 및 항체 단편들로 형성된 다중특이적 항체

- [0159] "모노클로날 항체"는 단일 항원 결정기, 또는 에피토프의 매우 높은 특이적 인지 및 결합에 관여된 동질 항체 모집단을 나타낸다. 이것은 폴리클로날 항체와 대조적으로 상이한 항원 결정기로 유도하는 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 것이다. 용어 "모노클로날 항체"는 온전한 및 전체길이 모노클로날 항체 둘 모두를 포함할 뿐만 아니라 항체 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬 (scFv) 돌연변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 또한, "모노클로날 항체"는 비제한적으로 하이브리도마, 파아지 선택, 재조합 발현, 및 이식유전자 동물을 포함하는 임의의 수의 방법으로 제조된 그와 같은 항체를 나타낸다.
- [0160] 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며 특정한 항체를 인식하고 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 부위를 나타낸다. 항원이 폴리펩타이드인 경우, 에피토프는 인접 아미노산, 및 단백질의 3차 접힘에 의해 병치된 비인접 아미노산 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성시 보존되는 반면에, 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성시 손실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간 구조 내에 적어도 3, 통상 적어도 5 또는 8-10 아미노산을 포함한다.
- [0161] "결합 친화도"는 일반적으로 분자의 단일 결합 부위 (예를 들면, 항체) 및 그의 결합 파트너 (예를 들면, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 나타낸다. 달리 지시되지 않으면, 본원에서 사용된 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍의 멤버들 (예를 들면, 항체 및 항원)간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 나타낸다. 분자 X의 그것의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_d)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하여 당해분야에서 통상 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원과 서서히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면에, 높은-친화도 항체는 일반적으로 항원과 더 빠르게 결합하고 오랫동안 결합을 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당해분야에 공지되어 있고, 이중 어느 것은 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 특정 설명적인 구현예가 하기 기재된다.
- [0162] "또는 더 나은"은 본원에 사용되는 경우 분자 및 그의 결합 파트너 간의 더 강한 결합을 나타내는 결합 친화도를 나타낸다. "또는 더 나은"은 본원에 사용되는 경우, 더 낮은 수치 K_d 값을 나타내면서, 더 강한 결합을 나타낸다. 예를 들면, "0.6 nM 또는 더 나은"의 항원에 대한 친화도를 갖는 항체의 경우, 항원에 대한 항체의 친화도는 <0.6 nM, 즉 0.59 nM, 0.58 nM, 0.57 nM 등 또는 0.6 nM 미만의 임의의 값이다.
- [0163] 본원에서 사용된 바와 같이, 어구 "실질적으로 유사한," 또는 "실질적으로 동일한"은 2개의 수치 값들 (일반적으로 하나는 본 발명의 항체와 연관되고 다른 하나는 참조/비교용 항체와 연관된다)간에 충분히 높은 유사도를 나타내어서 당해분야의 숙련가는 두 값들 간의 차이가 상기 값들 (예를 들면, K_d 값)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락 내에서 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 없거나 없는 것으로 생각한다. 상기 두 값들 간의 차이는 참조/비교용 항체에 대한 값의 함수로서 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 또는 약 10% 미만이다.
- [0164] "단리된" 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 자연에서 발견되지 않는 형태의 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물이다. 단리된 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포 또는 조성물은 그들이 더 이상 자연에서 발견되는 형태가 아닌 정도로 정제된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 단리된 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 실질적으로 순수하다.
- [0165] 본원에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 순수한"은 적어도 50% 순수한 (즉, 오염물질이 없는), 적어도 90% 순수한, 적어도 95% 순수한, 적어도 98% 순수한, 또는 적어도 99% 순수한 물질을 나타낸다.
- [0166] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역접합체" 또는 "콘주게이트"는 세포 결합제 (즉, 안티-FOLR1 항체 또는 그의 단편)에 연결되고 일반식: C-L-A (여기서 C = 세포독소, L = 링커, 및 A = 세포 결합제 또는 안티-FOLR1 항체 또는 항체 단편이다)에 의해 정의된 화합물 또는 그의 유도체를 나타낸다. 면역접합체는 역순: A-L-C의 일반식으로도 정의될 수 있다.
- [0167] "링커"는 안정한, 공유 방식으로 화합물, 통상 약물, 예컨대 메이탄시노이드를 세포-결합제 예컨대 안티 FOLR1 항체 또는 그의 단편에 연결할 수 있는 임의의 화학 모이어티이다. 링커는 화합물 또는 항체가 활성인 채로 유지되는 조건하에 산-유도 절단, 광-유도 절단, 펩티다아제-유도 절단, 에스테라아제-유도 절단, 및 디설파이드 결합 절단에 민감하거나 실질적으로 내성일 수 있다. 적당한 링커는 당해분야에 잘 공지되어 있고 예를 들면 하기를 포함한다: 디설파이드 그룹, 티오에테르 그룹, 산 불안정한 그룹, 광불안정한 그룹, 펩티다아제 불안정한

그룹 및 에스테라아제 불안정한 그룹. 링커는 또한 본원에 기재되고 당해분야에 공지된 바와 같이 하전된 링커, 및 그것의 친수성 형태를 포함한다.

[0168] 용어들 "암" 및 "암이 있는"은 세포 모집단이 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유 동물에서의 생리학 적 조건을 나타내거나 기재한다. 암의 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병. 그와 같은 암의 더 특정 예는 편평상피 세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평상피 암종, 복막암, 간세포 암, 위장 암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부 암, 갑상선암, 간 암종 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.

[0169] "종양" 및 "신생물"은 양성 (암이 없는) 또는 전암 병변을 포함하는 악성 (암이 있는)의, 과도한 세포 성장 또는 증식을 유발하는 조직의 임의의 매스를 나타낸다.

[0170] 용어들 "암 세포," "종양 세포," 및 문법적 동등물은, 종양 세포 모집단의 별크를 포함하는 비-종양유발성 세포, 및 종양유발성 줄기세포 (암 줄기세포) 둘 모두를 포함하는, 종양 또는 전암 병변으로부터 유도된 세포의 총 모집단을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "종양 세포"는 암 줄기세포로부터 이들 종양 세포를 구별하기 위해 재생하고 분화하는 능력이 부족한 종양 세포만을 나타내는 경우 용어 "비-종양유발성"으로 변형 될 것이다.

[0171] 용어 "대상체"는 특정한 치료의 수용자가 되는, 비제한적으로 인간, 비-인간 영장류, 설치류 등을 포함하는 동물 (예를 들면, 포유동물)을 나타낸다. 전형적으로, 용어들 "대상체" 및 "환자"는 인간 대상체와 관련하여 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0172] 1 이상의 추가 치료제와 "조합된" 투여는 임의의 순서로 동시 (병행) 및 연속 투여를 포함한다.

[0173] 용어 "약제학적 제형"은 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이게 하는 그와 같은 형태로 존재하고 제형이 투여 되는 대상체에게 허용되지 않게 독성인 부가적 성분을 함유하지 않는 제제를 나타낸다. 그와 같은 제형은 멸균 될 수 있다.

[0174] 본원에 개시된 바와 같이 항체의 "효과적인 양"은 구체적으로 언급된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "효과적인 양"은 언급된 목적과 관련하여 실험적으로 그리고 일상적인 방식으로 측정될 수 있다.

[0175] 용어 "치료적 유효량"은 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애를 "치료하기에" 효과적인 항체 또는 다른 약물의 양을 나타낸다. 암의 경우에, 치료적으로 유효량의 약물은 암 세포의 수를 감소시키고/시키거나; 종양 크기를 감소시키고/시키거나; 말초 기관 내로 암 세포 침윤을 억제 (즉, 어느 정도 저하 및 어떤 구현에서, 정지)하고/하거나; 종양 전이를 억제 즉, 어느 정도 저하 및 어떤 구현에서, 정지)하고/하거나; 종양 성장을 어느 정도로 억제하고/하거나; 암과 관련된 1 이상의 증상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. "치료하는"에 대한 본원의 정의를 참고한다. 약물이 존재하는 암 세포의 성장을 예방하고/하거나 존재하는 암 세포를 사멸할 수 있는 정도 까지, 그것은 세포정지 및/또는 세포독성일 수 있다. 어떤 구현예에서, 증가된 FOLR1 수준의 입증은 더 높은 용량에서보여주는 바와 동일한 치료 효과를 달성하기 위해 감소된 양의 FOLR1-표적 요법제의 투여를 고려한다. "예방적으로 효과적인 양"은 원하는 예방 결과를 달성하기 위해 필요한 기간 동안 원하는 예방 결과를 달성하기 위한 용량에서 효과적인 양을 나타낸다. 전형적으로 그러나 필연적이지는 않게, 예방 용량이 질환의 초기 단계 전에 또는 초기 단계에 대상체에게 사용되기 때문에, 예방적으로 효과적인 양은 치료적 유효량 미만일 것이다.

[0176] 용어 "유리하게 반응하다"는 일반적으로 대상체에서 유리한 상태를 유발하는 것을 나타낸다. 암 치료에 대해서, 상기 용어는 대상체에게 치료 효과를 제공하는 것을 나타낸다. 암에서 양성 치료 효과는 수많은 방식으로 측정 될 수 있다 (참고, W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). 예를 들면, 종양 성장 억제, 분자 마커 발현, 혈청 마커 발현, 및 분자 이미징화 기술이 모두 항암 치료제의 치료 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 종양 성장 억제에 대해서, NCI 표준에 따라, $T/C \leq 42\%$ 는 최소 수준의 항종양 활성이다. $T/C < 10\%$ 는 고려된 높은 항종양 활성 수준이고, 여기서 $T/C (\%) = \text{치료된 종양의 중간 종양 용적} / \text{대조군의 중간 종양 용적} \times 100$ 이다.

[0177] 단어 "표지"는 본원에 사용되는 경우 "표지된" 항체를 생성하도록 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 콘주게이 트화된 검출가능 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 표지는 그것만으로도 검출가능할 수 있거나 (예를 들면 방사능동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉매할 수 있다.

- [0178] "화학요법제"는 작용 기전과 무관하게 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 클래스는 비제한적으로 하기를 포함한다: 알킬화제, 항대사물질, 방추체 독 식물성 알칼로이드, 세포독성/항종양 항생제, 토포이소머라제 억제제, 항체, 광민감제, 및 키나아제 억제제. 화학요법제는 "표적 요법" 및 종래의 화학요법에 사용된 화합물을 포함한다.
- [0179] 용어들 예컨대 "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하기 위한" 또는 "경감하는" 또는 "경감하기 위한"은 1) 진단된 병리적 상태 또는 장애를 치유하고/하거나, 저하시키고/저하시키거나 이의 증상을 경감시키고/시키거나 이의 진행을 멈추는 치료적 조치, 2) 표적화된 병리적 상태 또는 장애를 방지하고/하거나 이의 발달을 저하시키는 예방적 또는 방지적 조치 둘 모두를 나타낸다. 따라서, 치료가 필요한 대상은 장애를 이미 갖는 대상; 장애를 갖기 쉬운 대상; 장애가 방지되어야 하는 대상을 포함한다. 어떤 구현예에서, 신규 약물의 승인을 위한 국립 암 연구소 및 미국 식품의약품안전청에 의한 표준 세트에 의해 각각 측정된 바와 같이, 대상체는 환자가 하기 중의 1 이상을 나타내는 경우 본 발명의 방법에 따라서 암이 성공적으로 "치료된다": 악액질의 감소, 생존 시간의 증가, 종양 진행까지의 시간의 연장, 종양 매스 감소, 종양 크기(tumor burden)의 감소 및/또는 종양 전이까지의 시간, 종양 재발까지의 시간, 종양 반응, 완전한 반응, 부분 반응, 안정한 질환, 진행 질환, 무진행 생존율(PFS), 전체 생존율(OS)의 연장. 참조 Johnson 등, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411.
- [0180] "종양 진행까지의 시간" (YIP)이라고도 통칭되는 "무진행 생존율" (PFS)은 암이 성장하지 않는 치료 동안 및 치료 후의 시간의 길이를 나타낸다. 무진행 생존율은 환자가 완전한 반응 또는 부분 반응을 경험했던 시간의 양, 뿐만 아니라 환자가 안정한 질환을 경험했던 시간의 양을 포함한다.
- [0181] "무병 생존율" (DFS)은 환자가 질환이 없이 유지되는 치료 동안 및 치료 후 시간의 길이를 나타낸다.
- [0182] "전체 생존율" (OS)은 투약받은 적이 없거나 미치료된 개인 또는 환자와 비교하여 기대 수명이 연장됨을 나타낸다.
- [0183] 본 명세서 및 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 ("a," "an," 및 "the")는 달리 문맥에서 분명히 지시되지 않는 한 복수 형태를 포함한다.
- [0184] 구현예들이 언어 "포함하는"과 함께 본원에 기재되는 경우는 언제나, "~으로 이루어진" 및/또는 "~으로 필수적으로 이루어진"의 용어들로 기재된 다른 유사한 양태들도 또한 제공됨을 이해한다.
- [0185] 본원에 어구 예컨대 "A 및/또는 B"에 사용된 바와 같이 용어 "및/또는"은 "A 및 B," "A 또는 B," "A", 및 "B" 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, 어구 예컨대 "A, B, 및/또는 C"에 사용된 바와 같이 용어 "및/또는"은 각각 하기 구현예들을 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).
- [0186] II. 생물학적 샘플
- [0187] 생물학적 샘플은 종종 고정제로 고정된다. 알데하이드 정착액 예컨대 포르말린 (포름알데하이드) 및 글루타르알데하이드가 전형적으로 사용된다. 다른 고착 기술 예컨대 알코올 함침 (Battifora 및 Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095)을 사용하여 고정된 조직 샘플이 또한 적당하다. 사용된 샘플을 또한 파라핀에 포매할 수 있다. 일 구현예에서, 조직 샘플 모두는 포르말린-고정되고 파라핀-포매 (FFPE)된다. 또 하나의 구현예에서, FFPE 블록은 FFPE 코어 샘플에 대한 특정 영역(들)을 선택하기 위한 분석을 위한 1 이상의 부분을 선택하기 전에 헤마톡실린 및 에오신 염색된다. 이들 미립자 시료로부터의 조직 블록의 제조 방법은 다양한 예후 인자의 이전 IHC 연구에서 사용되었고/되었거나 당해분야의 숙련자에게 잘 공지되어 있다 (참고, 예를 들면, Abbondanzo 등, Am J Clin Pathol. 1990 May;93(5):698-702; Allred 등, Arch Surg. 1990 Jan;125(1):107-13).
- [0188] 간단히 말해서, 임의의 온전한 기관 또는 조직은 상당히 작은 피스로 절단되고 조직이 "고정"될 때까지 가변적 기간 동안 다양한 정착액 (예를 들면 포르말린, 알코올 등)에서 인큐베이션할 수 있다. 샘플은 사실상 신체로부터 수술로 제거된 임의의 온전한 조직일 수 있다. 샘플을 조직병리 실험실에서 일상적으로 사용되는 장비에 맞도록 알맞게 작은 피스(들)로 절단할 수 있다. 절단 피스의 크기는 전형적으로 수 밀리미터 내지 수 센티미터의 범위이다.
- [0189] III. 검출 항체 콘주게이트
- [0190] 본 발명은 추가로 검출 항체 콘주게이트를 형성하기 위해 적어도 하나의 물질로 연결된 일반적으로 모노클로날 유형의 FOLR1에 대한 항체를 제공한다. 진단제로서 항체 분자의 효능을 증가시키기 위해, 적어도 하나의 원하는

분자 또는 모이어티와 연결하거나 공유 결합하거나 복합체화하는 것이 통상적이다. 그와 같은 분자 또는 모이어티는, 비제한적으로, 적어도 1 리포터 분자일 수 있다. 리포터 분자는 검정을 사용하여 측정될 수 있는 임의의 모이어티로서 정의된다. 항체에 콘주게이트화된 리포터 분자의 비제한적 예는 효소, 방사표지, 합텐, 형광 표지, 인광 분자, 화학발광 분자, 발색단, 발광 분자, 광친화성 분자, 착색된 입자 및/또는 리간드, 예컨대 바이오틴을 포함한다.

[0191] 충분한 선택성, 특이성 또는 친화도를 갖는 임의의 세포 결합제 (예를 들면, 항체 또는 폴리클로날 항체)는 FOLR1 폴리클로날 항체의 검출을 위한 기준으로서 이용될 수 있다. 그와 같은 특성은 당해분야의 숙련자에게 공지된 종래의 면역학적 스크리닝 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 정준 항원 결합 부위 이외에 항체 분자 중의 생물학적 활성 분자에 결합하는 부위는 항원과 결합할 수 있는 가변 도메인에 존재하는 부위를 포함한다. 또한, 가변 도메인은 항체 자가-결합에 관여하고 (Kang 등, 1988), 안티-항체에 의해 인식된 에피토프 (이디오토프)를 함유한다 (Kohler 등, 1989).

[0192] 단백질 결합 (예를 들면, 항체) 콘주게이트의 특정 예는 단백질 결합제 (예를 들면, 항체)가 검출가능 표지에 연결된 콘주게이트이다. "검출가능 표지"는 그의 특이적 기능적 특성, 및/또는 화학 특징으로 인해 검출될 수 있는 화합물 및/또는 요소이며, 상기 표지의 사용은 그들이 부착된 항체가 검출되도록 하고/하거나 원하는 경우 추가로 정량화되게 한다.

[0193] 많은 적절한 조영제가, 항체에 대한 그의 부착을 위한 방법과 같이, 당해분야에 공지되어 있다 (참고, 예를 들면, 미국 특허 번호 5,021,236; 4,938,948; 및 4,472,509, 각각은 본원에 참조로 인용됨). 사용된 이미지화 모이어티는 예를 들면 상자성 이온; 방사선 동위원소; 형광색소; NMR-검출가능 물질; 및/또는 X-선 이미지화 모이어티일 수 있다.

[0194] 단백질 결합 (예를 들면, 항체) 콘주게이트로서 사용하기 위해 고려된 예시적인 형광 표지는 예를 들면 Alexa 350, Alexa 430, Alexa 488, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-RGG, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 캐스케이드 Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Dylight 488, 플루오레신 이소티오시아네이트, 녹색 형광 단백질 (GFP), HEX, 6-JOE, 오레곤 그린 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 퍼시픽 블루, 피코에리트린, REG, 로다민 그린, 로다민 레드, 테트라메틸 로다민 (TMR), 레노그라핀, ROX, TAMRA, TET, 테트라메틸로다민, 텍사스 레드, 및 이들 표지들의 유도체들 (즉, 콘주게이팅을 위한 이소티오시아네이트 또는 다른 링커로 변형된 할로젠화 유사체 등)을 포함한다. 예시적인 방사표지는 트리튬이다.

[0195] 본 발명에 고려되는 단백질 결합 (예를 들면, 항체) 검출 콘주게이트는 시험관내 사용을 위한 것들을 포함하며, 여기서 상기 항체는 색원체 기질과 접촉시 유색 생성물을 생성할 것인 2차 결합 리간드 및/또는 효소 (효소 태그)와 연결된다. 적당한 효소의 예는 요소분해효소, 알칼리성 인산분해효소, (홀스래디쉬) 수소 페록시다아제 및/또는 글루코오스 옥시다제를 포함한다. 바람직한 2차 결합 리간드는 바이오틴 및/또는 아비딘 및 스트렙타비딘 화합물이다. 그와 같은 표지의 사용은 당해분야의 숙련자에게 잘 공지되어 있고 예를 들면, 각각이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 번호 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 및 4,366,241에 기재되어 있다.

[0196] 아지도 그룹을 함유하는 분자는 또한 저장도 자외선 광에 의해 생성된 반응성 니트렌 중간체를 통해 단백질과 공유 결합을 형성하도록 사용될 수 있다 (Potter & Haley, 1983). 특히, 퓨린 뉴클레오타이드의 2- 및 8-아지도 유사체는 조 세포 추출물에서 뉴클레오타이드 결합 단백질을 식별하기 위해 위치지향적 광프로브로서 사용되었다 (Owens & Haley, 1987; Atherton 등, 1985). 2- 및 8-아지도 뉴클레오타이드는 정제된 단백질의 뉴클레오타이드 결합 도메인을 맵핑하기 위해 사용되었고 (Khatoun 등, 1989; King 등, 1989; 및 Dholakia 등, 1989), 항체 결합제로서 사용될 수 있다.

[0197] 항체의 그것의 콘주게이트 모이어티에 대한 부착 또는 콘주게이션을 위한 몇 개의 방법이 당해분야에 공지되어 있다. 일부 부착 방법은, 예를 들면, 항체에 부착된, 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물 (DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔설포아마이드; 및/또는 테트라클로로-3 α -6 α -디페닐글라이쿠릴-3과 같은 유기 킬레이트제를 이용한 금속 킬레이트 착물의 사용을 포함한다 (각각 본원에 참조로 인용된 미국 특허 번호 4,472,509 및 4,938,948). 모노클로날 항체는 또한 커플링제 예컨대 글루타르알데하이드 또는 퍼아이드의 존재하에 효소와 반응시킬 수 있다. 플루오레신 마커와의 단백질 결합 (예를 들면, 항체) 콘주게이트는 이들 커플링제의 존재하에 제조되거나 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조된다. 미국 특허 번호 4,938,948에서, 예를 들면 유방 종양의 이미지화는 모노클로날 항체를 사용하여 달성되며, 검출가능 이미지화 모이어티는 링커 예컨대 메틸-p-하이드록시벤즈이미네이트 또는 N-석신이미딜-3-(4-하이드록시페닐)-프로피오네이트를 사용

하여 항체에 결합된다.

- [0198] 다른 구현예에서, 항체 결합 부위를 변경시키지 않는 반응 조건을 사용하여 면역글로불린의 Fc 영역에 설프히드릴 그룹을 선택적으로 도입함에 의한 면역글로불린의 유도체화가 고려된다. 본 방법에 따라 생산된 항체 콘주게이트는 개선된 지속성, 특이성 및 민감도를 나타내는 것으로 개시되어 있다 (본원에 참조로 인용된 미국 특허 번호 5,196,066). 효과기 또는 리포터 분자 (여기서 상기 리포터 또는 효과기 분자는 Fc 영역에서 탄수화물 잔기에 콘주게이트화된다)의 부위 특이적 부착도 또한 문헌 (O'Shannessy 등, 1987)에 개시되었다.
- [0199] 본 발명의 다른 구현예에서, 면역글로불린은 핵종 예컨대 트리튬으로 방사표지된다. 추가 구현예에서, 나노금 입자 (예컨대 크기 약 0.5 nm-40 nm) 및/또는 양자점 (Hayward, Calif.)이 이용된다.
- [0200] IV. 효소 및 기질 (발색제)
- [0201] 기질 및 인디케이터의 사용은, 예를 들면, 하기 제공된 예시적인 구현예와 같이 FOLR1의 검출에 고려된다.
- [0202] 홀스래디쉬 페록시다아제 (HRP)는 먼저 과산화수소와 복합체를 형성한 다음 그것을 분해하도록 해 물 및 원자 산소를 초래하는 효소이다. 많은 다른 효소와 같이, HRP 및 일부 HRP-유사 활성은 과잉 기질에 의해 억제될 수 있다. HRP 및 과잉 과산화수소 사이에 형성된 복합체는 촉매적으로 불활성이고, 전자 공여체 (예를 들면 색원체 물질)의 부재하에 가역적으로 억제된다. 과잉 과산화수소 및 전자 공여체의 부재는 내인성 HRP 활성의 켄칭을 유발한다.
- [0203] 검정 시스템에 사용되는 경우, HRP는 또한 규정된 기질을 그것의 활성화된 발색제로 전환시켜, 이에 따라 색상 변화를 유발하도록 사용될 수 있다. HRP 효소는 수많은 방법에 의해 항체, 단백질, 펩타이드, 폴리머, 또는 다른 분자에 콘주게이트화될 수 있다. 그와 같은 방법은 당해분야에 공지되어 있다. HRP 및 항체의 혼합물을 함유하는 용액에 글루타르알데하이드를 첨가하면 효소에서보다 더 많은 서로 콘주게이트화된 항체 분자를 초래할 것이다. 2-단계 절차에서, HRP를 우선 이작용기 시약과 반응시킨다. 제2 단계에서, 단지 활성화된 HRP만이 항체와 혼합되어 훨씬 더 효율적인 표지가 생성되고 중합이 일어나지 않는다. HRP는 또한 2-단계 글루타르알데하이드 절차를 사용하여 (스트렙트)아비딘에 콘주게이트화된다. 이 형태는 예를 들면 LAB 및 LSAB가 기질인 절차에서 사용된다. 바이오틴과의 콘주게이션은 또한 2 단계를 포함하며, 먼저 바이오틴을 바이오틴-N-하이드록시석신 이마이드 에스테르 또는 바이오틴 하이드라자이드로 유도시켜야 하고, 그 다음 그것을 HRP 효소의 앵글로아미노 그룹과 반응시킬 수 있다.
- [0204] 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB)은 알코올 및 다른 유기 용매에 매우 불용성인 갈색 최종 생성물을 생성하는 효소 예컨대 HRP에 대한 기질이다. DAB의 산화는 또한 중합을 유발하여 오스뮴 테트라옥사이드와 반응하는 능력을 초래하며, 이에 따라 그것의 염색 세기 및 전자 밀도를 증가시킨다. 중화된 DAB의 광학 밀도를 증대하기 위해 사용되는 몇 개의 금속 및 방법 중에, 은 설파이드와 조합된 금 클로라이드가 가장 성공적인 것으로 나타났다.
- [0205] 3-아미노-9-에틸카바졸 (AEC)은 효소 예컨대 HRP에 대한 기질이다. 산화시, 알코올 가용성인 로즈 레드 최종 생성물을 형성한다. 따라서, AEC로 가공된 시료는 알코올 또는 알코올성 용액 (예를 들면, 해리스의 헤마톡실린)에 침지되지 않아야 한다. 대신에, 수성 대조염색 및 봉입제 (mounting medium)가 사용되어야 한다. AEC는 불행하게도 추가 산화에 민감하고, 과도한 광에 노출됐을 때, 세기가 약해질 것이다. 따라서, 암흑에서 보관하는 것이 추천된다.
- [0206] 4-클로로-1-나프톨 (CN)은 효소 예컨대 HRP에 대한 기질이고 청색 최종 생성물로서 침전된다. CN이 알코올 및 다른 유기 용매에 가용성이기 때문에, 시료는 탈수되거나 알코올성 대조염색에 노출되거나 유기 용매를 함유하는 봉입제로 커버슬립(coverslip)되지 않아야 한다. DAB와 달리, CN은 침전 위치로부터 널리 퍼지는 경향이 있다.
- [0207] *p*-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드/피로카테콜 (헥커-에이즈 시약)은 효소 예컨대 HRP에 대한 전자 공여체 기질이고, 알코올 및 다른 유기 용매에 불용성인 검색 반응 생성물을 제공한다. 중합화된 DAB와 같이, 이 반응 생성물은 오스뮴산으로 염색될 수 있다. 다양한 결과가 면역페록시다아제 기술에서 헥커-에이즈 시약으로 달성되었다.
- [0208] 송아지 창자 알칼리성 인산분해효소 (AP) (분자량 100 kD)는 유기 에스테르로부터 P-0 결합의 파괴에 의해 포스페이트 그룹을 (가수분해에 의해) 제거하고 전달하는 효소이고; 중간체 효소-기질 결합이 잠시 형성된다. AP를 위한 최고 금속 활성화제는 Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ 및 Ca⁺⁺이다.
- [0209] AP는 비표지된 알칼리성 인산분해효소안티알칼리성 인산분해효소 (APAAP) 절차가 발표될 때까지 면역조직화학에

서 광범위하게 사용되지 않았다. 이 절차에 사용되는 가용성 면역 복합체는 대략 560 kD의 분자량을 갖는다. PAP 기술과 비교하여 APAAP 절차의 주요 이점은 내인성 페록시다아제 활성화에 의해 유발되는 간섭의 결핍이다. PAP 염색시 내인성 페록시다아제 활성화의 잠재적 방해 때문에, APAAP 기술이 혈액 및 골수 도말시 사용하는 것이 추천된다. 골, 신장, 간 및 일부 백혈구로부터의 내인성 알칼리성 인산분해효소 활성화는, 5 mM 레바미솔이 더 효과적인 것으로 발견되었더라도, 1 mM 레바미솔을 기질 용액에 부가하여 억제될 수 있다. 장 알칼리성 인산분해효소는 레바미솔에 의해 적절하게 억제되지 않는다.

[0210] 면역알칼리성 인산분해효소 염색 방법에서, 효소는 나프톨 포스페이트 에스테르 (기질)를 페놀성 화합물 및 포스페이트로 가수분해한다. 페놀은 무색 디아조늄 염 (색원체)에 커플링되어 불용성 유색의 아조 염료를 생성한다. 기질 및 색원체의 몇 개의 상이한 조합이 성공적으로 사용되었다.

[0211] 나프톨 AS-MX 포스페이트는 그것의 산 형태로 또는 나트륨염으로서 사용될 수 있다. 색원체 패스트 레드 TR 및 패스트 블루 BB는 각각 밝은 적색 또는 청색 최종 생성물을 생성한다. 둘 모두가 알코올성 및 다른 유기 용매에 가용성이어서, 수성 봉입제가 사용되어야 한다. 패스트 레드 TR이 세포 도말표본 염색시 바람직하다.

[0212] 부가적 예시적인 기질은 나프톨 AS-BI 포스페이트, 나프톨 AS-TR 포스페이트 및 5-브로모-4-클로로-3-인독실 포스페이트 (BCIP)를 포함한다. 다른 가능한 색원체는, 예를 들면, 패스트 레드 LB, 패스트 가넷 GBC, 니트로 블루 테트라졸륨 (NBT) 아이오도니트로테트라졸륨 바이올렛 (INT), 및 상기 구조들의 유도체를 포함한다.

[0213] V. 면역검출 방법

[0214] 또 추가의 구현예에서, 본 발명은 생물학적 성분 예컨대 본 발명에 의해 고려된 리간드에 결합, 그것을 정제, 제거, 정량화 및/또는 달리 일반적으로 검출하는 면역검정 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 준비된 항체는 야생형 및/또는 돌연변이체 리간드 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 검출하기 위해 이용될 수 있다. 본원 전체에 기재된 바와 같이, 야생형 및/또는 돌연변이체 리간드 특이적 항체의 사용이 검토된다. 일부 면역검출 방법은 몇 개를 언급하도록 유세포측정, 효소 연결된 면역흡수 검정 (ELISA), 방사선면역검정 (RIA), 면역방사계수법, 플루오로면역검정, 화학발광 검정, 생물발광 검정, 및 웨스턴 블랏을 포함한다. 다양한 유용한 면역검출 방법의 단계는 하기 예의 과학 문헌에 기재되었다: Doolittle M H 및 Ben-Zeev O, Methods Mol Biol. 1999;109:215-37; Gulbis B 및 Galand P, Hum Pathol. 1993 Dec;24(12):1271-85; 및 De Jager R 등, Semin Nucl Med. 1993 Apr;23(2):165-79, 각각은 참고로 포함되어 있다.

[0215] 일반적으로, 면역결합 방법은 리간드 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 포함할 것 같은 샘플을 얻고 면역복합체의 형성을 허용하는데 효과적인 조건 하에서 경우에 따라 상기 샘플을 본 발명에 따른 제1 리간드 결합 펩타이드 (예를 들면, 안티-리간드 항체)와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0216] 항원 검출에 관하여, 분석된 생물학적 샘플은 야생형 또는 돌연변이체 리간드 단백질-특이적 항원, 예컨대 조직 절편 또는 시료, 균질화된 조직 추출물, 생검 흡인물, 세포, 임의의 상기 야생형 또는 돌연변이체 FOLR1-함유 조성물의 분리/정제된 형태, 또는 혈액 및/또는 혈청을 포함하는, 조직과 접촉된 임의의 생체액을 포함할 것 같은 임의의 샘플일 수 있지만, 조직 샘플 또는 추출물이 바람직하다.

[0217] 효과적인 조건 하에서 그리고 면역 복합체 (일차 면역 복합체)의 형성을 허용하는데 충분한 기간 동안 선택된 생물학적 샘플을 항체와 접촉시키는 것은 일반적으로, 항체 조성물을 샘플에 간단히 부가하고, 존재하는 임의의 리간드 단백질 항원을 갖는, 즉 그 항원에 결합하는 면역 복합체를 항체가 형성하는데 충분한 기간 동안 상기 혼합물을 인큐베이팅하는 일이다. 이 시간 후, 샘플-항체 조성물, 예컨대 조직 절편, ELISA 플레이트, 닷 블랏 또는 웨스턴 블랏은, 일반적으로 임의의 비특이적으로 결합된 항체 종을 제거하기 위해 세정될 것이고, 상기 종은 검출될 일차 면역 복합체 내에 특이적으로 결합된 항체만을 허용한다.

[0218] 일반적으로, 면역착물 형성의 검출은 당해기술에 잘 공지되어 있고 수많은 접근법의 적용을 통해 달성될 수 있다. 이들 방법은 일반적으로 표지 또는 마커, 예컨대 임의의 방사성, 형광, 생물학적 및 효소 태그의 검출을 기반으로 한다. 그와 같은 표지에 관한 미국 특허를 하기를 포함한다: 미국 특허 번호 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 및 4,366,241, 각각은 참고로 포함되어 있다. 물론, 당해기술에 공지된 바와 같이 2차 결합 리간드 예컨대 제2 항체 및/또는 바이오틴/아비딘 리간드 결합 배열의 사용을 통해 부가적 이점을 발견할 수 있다.

[0219] 검출에 이용된 안티-리간드 항체는 검출가능 표지에 자체 연결될 수 있고, 여기서 그 다음 이 표지를 간단히 검출할 수 있고, 이로써 조성물 중 일차 면역 복합체의 양이 측정되도록 한다. 대안적으로, 일차 면역 복합체 내에 결합되는 제1 항체는 항체에 대한 결합친화도를 갖는 제2 결합제에 의해 검출될 수 있다. 이들 경우에, 제2

결합체는 검출가능 표지에 연결될 수 있다. 제2 결합체 자체는 종종 항체이고, 따라서 이는 "2차" 항체, 또는 폴리머 검출 시스템으로 불릴 수 있다. 일차 면역 복합체는 효과적인 조건 하에서 그리고 2차 면역 복합체의 형성을 허용하는데 충분한 기간 동안에 표지된, 2차 결합체, 또는 항체/폴리머 검출 시스템과 접촉된다. 그 다음 2차 면역 복합체는 일반적으로 임의의 비특이적으로 결합된 표지된 2차 항체 또는 리간드를 제거하기 위해 세정되고, 그 다음 2차 면역 복합체 중 잔여 표지가 검출된다.

[0220] 추가 방법은 2-단계 접근법에 의한 일차 면역 복합체의 검출을 포함한다. 제2 결합체, 예컨대 항체에 대해 결합 친화도를 갖는 항체는, 상기에서 기재된 바와 같이 2차 면역 복합체를 형성하도록 사용된다. 세정 후, 2차 면역 복합체는, 또 효과적인 조건 하에서 그리고 면역 복합체 (3차 면역 복합체)의 형성을 허용하는데 충분한 기간 동안에, 제2 결합체, 또는 제2 항체에 대해 결합 친화도를 갖는 항체와 접촉된다. 제3 리간드 또는 항체는 검출 가능 표지에 연결되고, 이는 그렇게 형성된 3차 면역 복합체의 검출을 허용한다. 이러한 시스템은, 필요하다면 신호 증폭을 위해 제공될 수 있다.

[0221] 또 하나의 구현예에서, 바이오티닐화된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체는 표적 항원(들)을 검출하기 위해 사용되고, 그 다음 제2 단계 항체는 복합 바이오틴에 부착된 바이오틴을 검출하기 위해 사용된다. 그 방법에서 시험될 샘플은 먼저, 제1 단계 항체를 포함하는 용액에서 인큐베이션된다. 표적 항원이 존재하면, 항체의 일부는 항체와 결합하여 바이오티닐화된 항체/항원 복합체를 형성한다. 그 다음, 항체/항원 복합체는 스트렙타비딘 (또는 아비딘), 바이오티닐화된 DNA, 및/또는 상보적 바이오티닐화된 DNA의 연속적인 용액에서 인큐베이션에 의해 증폭되고, 각 단계는 부가적 바이오틴 부위를 항체/항원 복합체에 부가한다. 증폭 단계는, 적당한 수준의 증폭이 달성될 때까지 반복되고, 그 지점에서 샘플은 바이오틴에 대하여 제2 단계 항체를 포함하는 용액에서 인큐베이션된다. 이러한 제2 단계 항체는, 예를 들면 색원체 기질을 사용하는 조직효소화학에 의해 항체/항원 복합체의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있는 효소로 표지된다. 적당한 증폭과 함께, 거시적으로 보이는 단백질 결합 (예를 들면, 항체) 콘주게이트가 생산될 수 있다.

[0222] 면역검출의 다른 공지된 방법은 면역-PCR (폴리머라제 사슬 반응) 방법론의 이점을 취한다. PCR 방법은 항체를 방출하는 낮은 pH 또는 높은 염 완충액으로 세정된 DNA/바이오틴/스트렙타비딘/항체 복합물을 사용한다. 그 다음, 수득한 세정액은 적절한 대조군과 함께 적당한 프라이머와의 PCR 반응을 사용하기 위해 사용될 수 있다. 특이한 구현예에서, PCR의 막대한 증폭 능력 및 특이성은 단일 항원 분자를 검출하기 위해 이용될 수 있다. 그와 같은 검출은 실시간으로 일어날 수 있다. 예를 들면, 정량적 실시간 PCR의 사용이 검토된다.

[0223] 다양한 형태의 질환을 갖는 환자의 임상 진단 및/또는 모니터링에서, FOLR1 돌연변이체의 검출, 및/또는 FOLR1 수준의 변경은, 정상 대상체로부터의 상응하는 생물학적 샘플의 수준과 비교하여 질환이 있는 환자를 나타낸다. 그러나, 당해분야의 숙련가에게 공지된 바와 같이, 그와 같은 임상 진단은 단리에서 이 방법을 기초로 행해질 필요가 있는 것은 아니다. 당해분야의 숙련가는 긍정적 확인, 및/또는 바이오마커의 낮은 수준 및/또는 배경 변화를 나타내는 바이오마커의 유형 및/또는 양에서 유의미한 차이를 구별하는데 아주 익숙하다. 확실히, 배경 발현 수준은, 증가된 검출이 유의미한 및/또는 양성으로 점수를 매긴 상기 "컷-오프"를 형성하기 위해 종종 사용된다.

[0224] 일 구현예에서, FOLR1의 (면역조직화학에 의한) 면역학적 검출은 세기 및 균일성 (염색된 세포 - 막 단독의 퍼센트) 둘 모두에 대해 점수가 매겨진다. 세기에 대한 FOLR1 발현의 비교 척도는 하기와 같은 상관성이 있다: 0 - 음성, 0-1 - 아주 약한, 1 - 약한, 1-2 - 약한 내지 보통, 2 - 보통, 2-3 - 보통 내지 강한, 3 - 강한. 정량적으로, 점수 0은, 막 염색이 종양 세포에서 관찰되지 않는다는 것을 나타낸다. 점수 1은 종양 세포에서 흐릿한/거의 없는 인지가능 막 염색을 나타낸다. 점수 2에 대해, 보통 막 염색은 종양 세포에서 관찰된다. 마지막으로, 점수 3 또는 3+는 종양 세포에서 보통 내지 강한 막 염색을 나타낸다. FOLR1 발현에 대해 0 또는 1 점수를 갖는 샘플은 FOLR1를 과발현시키지 않는 것으로 특성화될 수 있고, 반면에 2 또는 3 점수를 갖는 샘플은 FOLR1를 과발현시키는 것으로 특성화될 수 있다. FOLR1를 과발현시키는 샘플은 발현된 FOLR1 분자의 복제물의 수 / 세포에 상응하는 면역조직화학 점수에 의해 또한 평가될 수 있고, 생화학적으로 결정되었다: 0=0-10,000 복제물/세포, 1=적어도 약 200,000 복제물/세포, 2=적어도 약 500,000 복제물/세포, 및 3=적어도 약 2,000,000 복제물/세포. FOLR1 퍼센트 세포막 염색 균일성에 대한 비교 척도는 하기와 같은 상관성이 있다: 0 - 음성, 초점 - <25%, 이질 (헤테로) - 25-75%, 및 동질 (호모) - >75%.

[0225] VI. 핵산 하이브리드화

[0226] 원위치 하이브리드화는 슬라이드에 고정된 세포 또는 조직 세척 상에서 일반적으로 수행된다. 원위치 하이브리드화는 몇 개의 종래의 방법론에 의해 수행될 수 있다 (참고 예를 들면 Leitch 등 원위치 하이브리드화: 실시

가이드, Oxford BIOS Scientific Publishers, 현미경관찰법 핸드북 v. 27 (1994)). 하나의 원위치 절차에서, 형광 염료 (예컨대 아르곤 이온 레이저에 의해 여기될 때 녹색 형광을 내는 플루오레신 이소티오시아네이트 (FITC))는 세포 중 표적 뉴클레오타이드 서열에 대해 상보적인 핵산 서열 프로브를 표지하기 위해 사용된다. 표적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 각 세포는 표지된 프로브에 결합할 것이고, 이로써 사용된 특이적 형광색소의 여기에 적절한 파장의 광원에 대한 세포의 노출시 형광 신호를 산출한다.

[0227] 다양한 정도의 하이브리드화 긴축이 이용될 수 있다. 하이브리드화 조건이 더 엄격해짐에 따라, 더 큰 정도의 상보성이 안정한 듀플렉스를 형성하고 유지하기 위해 프로브와 표적 사이에 필요하다. 긴축은, 온도를 상승시키고, 염 농도를 낮게 하거나 포름아마이드 농도를 상승시킴으로써 증가된다. 텍스트란 설페이트를 부가하거나 그의 농도를 상승시키는 것은 하이브리드화 및 극한 신호 세기의 속도를 증가시키기 위해 효과적인 농도의 표지된 프로브를 또한 증가시킬 수 있다. 하이브리드화 후, 슬라이드는 필요한 긴축에 따라 분 내지 시간으로 변하는 세정 시간과 함께 하이브리드화 용액에서 발견된 것과 유사한 시약을 일반적으로 포함하는 용액에서 세정된다. 더 긴 또는 그 초과 엄격한 세정은 전형적으로 비특이적 배경을 낮게 하지만 전체 민감도를 감소시키도록 한다.

[0228] 핵 하이브리드화 분석에서 사용된 프로브는 RNA 또는 DNA 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고 천연 생성 뉴클레오타이드 뿐만 아니라 그의 유사체, 예컨대 디옥시제닌 dCTP, 바이오틴 dCTP 7-아자구아노신, 아지도티미딘, 이노신, 또는 우리딘을 그 예로 함유할 수 있다. 다른 유용한 프로브는 펩타이드 프로브 및 그의 유사체, 분지형 유전자 DNA, 펩타이드모사체, 펩타이드 핵산 (PNA) 및/또는 항체를 그 예로 포함한다.

[0229] 프로브는 관심 표적 핵산 서열에 대해 충분한 상보성을 가져야 하고 이로써 안정한 및 특이적 결합은 표적 핵산 서열 및 프로브 사이에서 일어난다. 안정한 하이브리드화에 필요한 상동성의 정도는 하이브리드화 배지 및/또는 세정 매질의 긴축과 함께 변한다. 바람직하게는, 완전히 상동 프로브는 본 발명에서 이용되지만, 당해분야의 숙련가는, 적지만 충분한 상동성을 나타내는 프로브가 본 발명에서 사용될 수 있다는 것을 쉽게 인식할 것이다 (참고 예를 들면 Sambrook, J. Fritsch, E. F. Maniatis, T. Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)).

[0230] 프로브는 또한 원위치 하이브리드화, 체세포 하이브리드 패널, 또는 분급한 염색체의 스팟 블롯에 의한 맵핑; 염색체 결합 분석을 비제한적으로 포함하는 몇 개의 수단에 의해 생성 및 선택될 수 있거나; 인간 염색체를 갖는 인간 세포주 또는 체세포 하이브리드로부터의 분급한 염색체 라이브러리, 방사선 체세포 하이브리드, 염색체 영역의 현미해부로부터, 또는 독특한 염색체 유전자자리 또는 다른 적당한 수단 예컨대 인접한 YAC 클론에 대해 특이적인 PCR 프라이머에 의해 확인된 효모 인공 염색체 (YACs)로부터 클로닝되고 단리될 수 있다. 프로브는 플라스미드, 파아지, 코스미드, YAC, 박테리아 인공 염색체 (BACs), 바이러스 벡터, 또는 임의의 다른 적당한 벡터에서 클로닝된 게놈 DNA, cDNA, 또는 RNA일 수 있다. 프로브는 클로닝되거나 종래의 방법으로 화학적으로 합성될 수 있다. 클로닝될 때, 단리된 프로브 핵산 단편은 벡터, 예컨대 람다 파아지, pBR322, M13, 또는 SP6 또는 T7 프로모터를 함유하는 벡터로 전형적으로 삽입되고 박테리아 숙주에서 라이브러리로서 클로닝된다. [참조 예를 들면 Sambrook, J. Fritsch, E. F. Maniatis, T. Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)].

[0231] 프로브는 바람직하게는 예를 들면 형광단으로 표지된다. 형광단의 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: 희토 킬레이트 (유로퓸 킬레이트), 텍사스 레드, 로다민, 플루오레신, 단실, 리스사민, 엠벨리페론, 파이코코리테린, 파이코시아닌, 또는 상업적으로 이용가능한 형광단, 그와 같은 SPECTRUM ORANGE™ 및 SPECTRUM GREEN™ 및/또는 상기 중 어떤 하나 이상의 유도체. 검정에 사용된 다중 프로브는 하나 초과의 구별할 수 있는 형광 또는 색소 색상으로 표지될 수 있다. 이들 색상 차이는 특정 프로브의 하이브리드화 위치를 확인하기 위한 수단을 제공한다. 또한, 공간적으로 분리되지 않은 프로브는 2개의 다른 색상 (예를 들면, 밝은 적색 + 녹색=황색) 색소 (예를 들면, 청색+황색=녹색)을 혼합하여 얻은 상이한 색상 라이트 또는 색소에 의해 또는 따로따로 하나의 색상만을 통과시키는 필터 세트를 사용하여 확인될 수 있다.

[0232] 프로브는 당해분야의 숙련자에게 공지된 종래의 방법론을 사용하여 형광단으로 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있다.

[0233] VII. 검출 키트 및 조성물

[0234] 본 명세서에 개시된 본 발명의 실시에서 사용하기 위한 키트가 또한 본 발명에 의해 제공된다. 그와 같은 키트는 용기를 포함할 수 있고, 이들 각각은 예를 들면, 마커에 이미 부착된 1 이상의 결합체 (항체)를 포함하는, 방법에 이용되는 1 이상의 다양한 시약 (전형적으로 농축된 형태로), 또는 임의로, 결합체를 항체 또는 핵산 분

자 (뿐만 아니라 마커 자체)에 결합시키기 위한 시약; 완충액, 적절한 뉴클레오타이드 트리포스페이트 (예를 들면 dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP, ATP, CTP, GTP 및 UTP), 역전사효소, DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 및 증폭에 의해 핵산 분자의 검출에 사용하기 위한 1 이상의 서열-특이적 또는 퇴보한 프라이머; 및/또는 본 발명의 실시를 지지하기 위한 (임의로 현미해부에 의해) 단리용 시약 및 기기장치를 갖는다. 본 발명의 리간드 검출 방법에서 키트 구성요소를 기재하는 라벨 또는 인디케이터, 또는 그 구성요소의 사용 지침이 또한 전형적으로 포함될 것이고, 여기서 상기 지침은 포장내 삽입물 및/또는 키트 또는 그의 구성요소의 패키징과 연관될 수 있다.

[0235] 또 추가의 구현예에서, 본 발명은 상기 기재된 면역검출 방법과 함께 사용하기 위한 면역검출 키트에 관한 것이다. 항체는 야생형 및/또는 돌연변이체 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 검출하기 위해 일반적으로 사용되기 때문에, 항체는 키트에 포함되는 것이 바람직할 것이다. 따라서 면역검출 키트는, 적당한 용기 수단 내에, 야생형 및/또는 돌연변이체 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드에 결합하는 제1 항체, 및/또는 임의로, 면역검출 시약 및/또는 추가 임의로, 야생형 및/또는 돌연변이체 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 포함할 것이다.

[0236] 키트의 면역검출 시약은 주어진 항체와 연관되고/거나 연결된 검출가능 표지를 포함하는 다양한 형태 중 어느 하나를 취할 것이다. 2차 결합 리간드와 연관되고/거나 그것에 부착된 검출가능 표지가 또한 고려된다. 예시적인 2차 리간드는 제1 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 2차 항체 또는 폴리머이다.

[0237] 본 키트에 사용하기 위한 추가 적당한 면역검출 시약은 검출가능 표지에 연결된 제2 항체, 제3 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 제3 항체 또는 폴리머와 함께, 제1 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 제2 항체를 포함하는 2-성분 시약을 포함한다. 상기에서 언급한 바와 같이, 수많은 예시적인 표지는 당해분야에 공지되어 있고/거나 또는 그와 같은 표지는 본 발명과 관련하여 적당하게 이용될 수 있다.

[0238] 키트는, 검출 검정에 대한 표준 곡선을 준비하기 위해 사용될 수 있는 바와 같이 표지 및/또는 비표지 여부에 관계없이, 야생형 및/또는 돌연변이체 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 폴리펩타이드의 적당하게 분주된 조성물을 추가로 포함할 수 있다. 키트는 완전 콘주게이트화 형태로, 중간체의 형태로, 및/또는 키트의 사용자에게 의해 콘주게이트화될 별도의 모이어티로서 항체- 또는 폴리머-표지 콘주게이트를 함유할 수 있다. 키트의 구성요소는 수성 매체 및/또는 동결건조된 형태로 포장될 수 있다.

[0239] 키트의 용기 수단은 일반적으로 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 및/또는 다른 용기 수단을 포함할 것이고, 이것 내에 항체가 위치하고/거나 바람직하게는, 적당하게 분주된다. 본 발명의 키트는 항체, 항원을 함유하는 수단, 및/또는 시판용 근접 간헐에서 임의의 다른 시약 용기를 또한 전형적으로 포함할 것이다. 그와 같은 용기는 사출 및/또는 블로우-성형 플라스틱 용기를 포함할 수 있고 이것 내에 원하는 바이알이 보유된다.

[0240] 키트는 암의 치료용 1 이상의 치료제, 예컨대 FOLR1 면역접합체 및/또는 화학요법제를 추가로 포함할 수 있다.

[0241] 키트는 FOLR1 검출 시약을 포함하는 대상체, 및 사용 지침에서 FOLR1 발현을 측정하기 위해 사용된 FOLR1 검출 시약을 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, FOLR1 검출 시약은 FOLR1 결합 펩타이드, 단백질 또는 분자 프로브 (즉 핵산)를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, FOLR1 검출 시약은 안티-FOLR1 항체. 또 하나의 구현예에서, 키트는 추가로, 안티-FOLR1 항체에 결합하는 2차 항체를 포함한다. 일 구현예에서 FOLR1-특이적 항체는 0.5 내지 7.5 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.9 내지 3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함된다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 1.0 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.5 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.9 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 3.5 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 또는 최대 4.2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함된다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 0.9 내지 3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도를 달성하기 위해 희석용 지침과 함께 농축된 용액 내에 포함된다. 또 하나의 구현예에서, 키트는 추가로, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 검출 시약을 포함한다: 효소, 형광단, 방사선 표지, 및 발광단. 또 하나의 구현예에서, 검출 시약은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레신, 트립톤, 및 로다민.

[0242] 키트는 또한, FOLR1 발현의 검출 및 평점에 대한 지침을 포함한다. 키트는 또한, 대조군 또는 참조 샘플을 포함한다. 대조군 또는 참조 샘플의 비제한 예는 정상 (정상 대조군) 또는 종양 (양성 대조군) 샘플로부터 유래된 세포 펠렛 또는 조직 배양 세포주를 포함한다. 예시적인 세포주는 하기를 포함한다: KB, NCI-H2110, Igrov-1, Ishikawa, Jeg-3, Skov-3, Hela, T47D, Caco2, SW620, OAW28, HCC827, Ovar-8, 및 Ovar-3, Ov-90, FOLR1를 발현시키는 것으로 공지된 다른 종양 세포주, 및 FOLR1를 발현시키는 발현 벡터로 안정되게 또는 일시적으로 전

달감염된 세포주. 양성 대조군 조직이 부자적 예는 또한 실시예 9-11에 발견될 수 있다. 키트는 염색 세기 및 균일성에 대한 양성 및 정상 참조 샘플을 시각적으로 묘사한 염색 가이드를 또한 포함할 수 있다. 그와 같은 염색 가이드는 정상 폐, 췌장, 및/또는 타액선으로부터의 참조 샘플, 및 표준화 점수를 갖는 염색된 종양을 가질 수 있다 (예를 들면, 난소, 폐, 신장, 및 자궁내막 암, 뿐만 아니라 실시예들 및 도 23-25에서 기재된 것들)

[0243] VIII. FOLR1-결합제

[0244] FOLR1에 결합하는 항체는 본 발명의 검출 방법에서 사용될 수 있다. 치료적으로 효과적인 안티-FOLR1 항체의 예는 참고로 본 명세서에 포함되는 있는 US 출원 공보 번호 US 2012/0009181에서 발견될 수 있다. FOLR1에 대한 전체길이 아미노산 (aa) 및 뉴클레오타이드 (nt) 서열은 당해분야에 공지되어 있고 서열번호: 1 및 2 각각에 의해 나타난 바와 같이 본원에서 또한 제공된다. FOLR1의 검출을 위한 구체적으로 유용한 항체는 마우스 모노클로날 안티-huFOLR1 클론 BN3.2 (Leica # NCL-L-FR알파)이다. 치료적 효과적인 안티-FOLR1 항체의 예는 huMov19 (M9346A)이다. 서열번호: 3-5이 폴리펩타이드는 huMov19 (M9346A)의 중쇄의 가변 도메인, 및 가변 도메인 경쇄 버전 1.00, huMov19의 가변 도메인 경쇄 버전 1.60 각각을 포함한다. huMov19 (M9346A) 항체는, (a) GYFMN (SEQ ID NO:6) 을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDITFYNQKFQG (SEQ ID NO:7) 을 포함하는 중쇄 CDR2; 및 YDGSRAMDY (SEQ ID NO:8) 을 포함하는 중쇄 CDR3; 및 (b) KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:9) 을 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA (SEQ ID NO:10) 을 포함하는 경쇄 CDR2; 및 QQSREYPYT (SEQ ID NO:11) 을 포함하는 경쇄 CDR3 을 포함한다. 어떤 구현예에서, huMov19 (M9346A) 항체는 부다페스트 조약의 조항 하에서 및 ATCC 수탁 번호 PTA-10772 및 PTA-10773 또는 10774를 갖는 미국 종균 협회 (ATCC) (위치 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 on April 7, 2010)에 수탁된 플라스미드에 의해 인코딩된다. 본 발명의 치료 방법에서 유용한 FOLR1 면역접합체의 예는 하기에서 제공된다.

[0245] IX. FOLR1 면역접합체

[0246] 본 발명은 콘주게이트 (면역접합체로 칭함)의 효능을 증가시키는 방법을 또한 포함하고, 상기 콘주게이트는 안티-FOLR1 항체, 항체 단편, 기능적 동등물, 개선된 항체 및 본원에서 기재된 그의 측면을 포함하고, 이는 세포 독소 (약물) 또는 전구약물에 연결되거나 접합된다. 예시적인 FOLR1 면역접합체는 참고로 본 명세서에 포함되어 있는 US 출원. 공보 번호 US 2012/0009181에서 발견될 수 있다. 본 발명의 특히 효과적인 치료 면역접합체는 상기 기재된 huMov19 항체를 포함한다.

[0247] 적당한 약물 또는 전구약물은 당해기술에 공지되어 있다. 어떤 구현예에서, 약물 또는 전구약물은 세포독성 약물이다. 본 발명의 세포독성 콘주게이트에서 사용된 세포독성 약물은 세포의 사멸로 되거나, 세포 사멸을 유도하거나, 일부 방식에서 세포 생존력을 감소시키는 임의의 화합물일 수 있고, 그 예는 하기를 포함한다: 메이탄시노이드 및 메이탄시노이드 유사체, 벤조디아제핀, 탁소이드, CC-1065 및 CC-1065 유사체, 듀오카르마이신 및 듀오카르마이신 유사체, 엔디인, 예컨대 칼리키아마이신, 돌라스타틴 및 아우리스타틴을 포함하는 돌라스타틴 유사체, 토마이마이신 유도체, 랩토마이신 유도체, 메토크세이트, 시스플라틴, 카보플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로르암부실 및 모폴리노 독소루비신. 어떤 구현예에서, 세포독성 약물은 메이탄시노이드 및 메이탄시노이드 유사체이다.

[0248] 약물 또는 전구약물은, 예를 들면, 디설파이드 결합을 통해 안티-FOLR1 항체, 예컨대 huMov19, 또는 그의 단편에 연결될 수 있다. 링커 분자 또는 가교결합체는 안티-FOLR1 항체 또는 그의 단편과 반응할 수 있는 반응성 화학 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포-결합제와의 반응에 대한 반응성 화학 그룹은 *N*-석신이미딜 에스테르 및 *N*-설포석신이미딜 에스테르이다. 부가적으로 링커 분자는 디설파이드 결합을 형성하기 위해 반응성 화학 그룹, 어떤 구현예에서 약물과 반응할 수 있는 디티오피리딜 그룹을 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커 분자는 예를 들면 하기를 포함한다: *N*-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (참고, 예를 들면, Carlsson 등, *Biochem. J.* 173: 723-737 (1978)), *N*-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB) (참고, 예를 들면, 미국 특허 번호 4,563,304), *N*-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)2-설포부타노에이트 (설포-SPDB) (참고 US 공보 번호 20090274713), *N*-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오) 펜타노에이트 (SPP) (참고, 예를 들면, CAS 등록번호 341498-08-6), 2-이미노티올란, 또는 아세틸석신 무수물.

[0249] 비-절단가능 결합을 갖는 항체-메이탄시노이드 콘주게이트가 또한 제조될 수 있다. 그와 같은 크로스링커는 당해기술에 기재되어 있고 (참고 ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbook 및 US 특허 출원 공보 번호 2005/0169933), 비제한적으로 하기를 포함한다: *N*-석신이미딜 4-(말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실레이트 (SMCC), SMCC (LC-SMCC)의 "장쇄" 유사체인 *N*-석신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실-(6-아미도카프로에이트), κ -말레이미도운데카노산 *N*-석신이미딜 에스테르 (KMUA), β -말레이미도프로판산 *N*-석

신이미딜 에스테르 (BMPS), γ -말레이미도부티르산 *N*-석신이미딜 에스테르 (GMBS), ϵ -말레이미도카프로산 *N*-하이드록시석신이마이드 에스테르 (EMCS), *m*-말레이미도벤조일-*N*-하이드록시석신이마이드 에스테르 (MBS), *N*-(α -말레이미도아세톡시)-석신이마이드 에스테르 (AMAS), 석신이미딜-6-(β -말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트 (SMPH), *N*-석신이미딜 4-(*p*-말레이미도페닐)-부티레이트 (SMPB), 및 *N*-(*p*-말레이미도페닐)이소시아네이트 (PMPI), *N*-석신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB), *N*-석신이미딜 아이오도아세테이트 (SIA), *N*-석신이미딜 브로모아세테이트 (SBA), 및 *N*-석신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP). 어떤 구현예에서, 항체는 문헌에 기재된 바와 같이 1-10개의 반응성 그룹을 도입하기 위해 가교결합 시약 예컨대 석신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 설폰-SMCC, 말레이미도벤조일-*N*-하이드록시석신이마이드 에스테르 (MBS), 설폰-MBS 또는 석신이미딜-아이오도아세테이트로 변형된다 (Yoshitake 등, Eur. J. Biochem. 101:395-399 (1979); Hashida 등, J. Applied Biochem. 56-63 (1984); 및 Liu 등, Biochem. 18:690-697 (1979)).

[0250] 본 발명은, 약 2 내지 약 8개의 약물 분자 ("약물 부하"), 예를 들면, 메이탄시노이드가 안티-FOLR1 항체 또는 그의 단편에 연결된 측면을 포함하고, 콘주게이트의 항종양 효과는 동일한 세포 결합체에 연결된 약물의 더 적은 또는 더 많은 수의 약물 부하와 비교하여 훨씬 더 유용하다. "약물 부하"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 세포 결합체 (예를 들면, 안티-FOLR1 항체 또는 그의 단편)에 부착될 수 있는 약물 분자 (예를 들면, 메이탄시노이드)의 수를 의미한다. 일 측면에서 세포 결합체에 부착될 수 있는 약물 분자의 수는 평균 약 2 내지 약 8 (예를 들면, 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)일 수 있다. 어떤 구현예에서, 약물은 N^2' -데아세틸- N^2' -(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 (DM1) 또는 N^2' -데아세틸- N^2' -(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸) 마이탄신 (DM4)이다. 따라서, 어떤 구현예에서, 항체 huMov19는 DM1 또는 DM4에 접합된다. 또 하나의 구현예에서, 항체 FR-1-21는 DM1 또는 DM4에 접합된다. 또 하나의 구현예에서, 항체 FR-1-48은 DM1 또는 DM4에 접합된다. 또 하나의 구현예에서, 항체 FR-1-49는 DM1 또는 DM4에 접합된다. 또 하나의 구현예에서, 항체 FR-1-57은 DM1 또는 DM4에 접합된다. 또 하나의 구현예에서, 항체 FR-1-65는 DM1 또는 DM4에 접합된다.

[0251] X. FOLR1 발현 및 치료 효능의 상관관계

[0252] 어떤 구현예에서, 본 발명은 FOLR1 표적 항암 요법에 상용하는 증가된 가능성을 갖는 대상체를 확인하는 방법을 제공한다. 발명은, 높은 FOLR1 발현 수준이 FOLR-1 표적 항암 치료제의 효능과 상관된다는 발견에 부분적으로 기반으로 한다.

[0253] 이중이식 모델을 사용하는 생체내 효능에 대한 환자 샘플 및 상관관계의 평가는 치료에 더 반응할 것 같은 대상체를 선택하기 위해 발현 분석의 파워를 실증한다. IHC는 종양 세포에 대한 FOLR1 발현의 점수를 제공한다: 0 (발현 없음) 내지 3+ (아주 높은 수준의 발현). 이중이식 모델을 사용하는 생체내 데이터는, FOLR1 발현에 대한 샘플 평균 점 1, 2, 3, 또는 3+, 바람직하게는 2, 3, 또는 3+의 점수가, 임상적으로-관련 용량의 FOLR1 면역결합체 (예를 들면, FOLR1 면역결합체의 5 mg/kg 이중이식 용량은 환자에서 대략 185 mg/m²일 수 있다)에서 FOLR-1-표적화된 항암 요법에 상응하기 위해 증가된 가능성을 갖는다는 것을 실증한다. 따라서, 높은 FOLR1 점수를 갖는 개인의 입증은 임상적으로 관련 복용량에 반응하는 개인을 확인하는데 도움이 된다. 이하에서 더 상세히 기재된 바와 같이, FOLR1 치료제에 대한 민감도는 FOLR1 평균점의 2 또는 그 초과, 특히 수준 3 평균점과 상관된다. 또한, 더 균일한 수준의 FOLR1의 발현은 더 나은 상관관계를 치료 이점에 제공한다. 따라서, 동질 염색 균일성이 바람직하지만, 증가된 염색 세기와 이질 염색 균일성과의 조합은 증가된 FOLR1 발현을 또한 나타낸다. 예를 들면, 2 초과 헤테로의 점수는 FOLR1 치료제에 의한 치료의 환자 선택 기준이다.

[0254] FOLR1 발현 분석은, 감소된 수준의 FOLR1 표적 항암 치료 ("저용량 요법")가 항종양 반응을 야기하는데 효과적일 수 있는 환자를 또한 확인한다. 당해분야에서 인식된 바와 같이, 화합물은 원하는 치료 반응을 달성하는 최소 복용량으로 일반적으로 투여된다. 이것은 임상, 및 종종 원하지 않는, 부작용을 야기하는 치료제에 대해 구체적으로 중요하다. 높은 FOLR1 발현 수준을 갖는 대상체를 인정하는 능력은 FOLR-1 표적 치료의 복용량의 최소화를 허용하고, 따라서 가능한 부작용을 감소시키고, 한편 치료 효능을 유지한다.

[0255] 본 명세서에서 보여진 바와 같이, 2 헤테로 또는 그 초과 FOLR1 발현 점수는 안티-FOLR1 면역결합체에 증가된 반응성과 상관된다. 어떤 구현예에서, 증가된 반응성은 악액질, 생존 시간의 증가, 종양 진행까지의 시간의 신

장, 종양 질량의 감소, 종양 적하의 감소 및/또는 종양 전이까지의 시간의 연장, 종양 재발까지의 시간, 종양 반응, 완전한 반응, 부분 반응, 안정한 질환, 진행성 질환, 무진행 생존 (PFS), 또는 전체 생존 (OS)이다. 어떤 구현예에서, 2 헤테로 또는 그 초과 FOLR1 발현 점수는 증가된 PFS, DFS, 또는 OS와 상관된다.

[0256] 참조/대조군 샘플에 대한 검출 방법 및 상관관계에서 사용하기 위한 키트는 대조군 (양성 및/또는 음성) 또는 참조 샘플을 포함할 수 있다. 양성 대조군 또는 양성 참조 샘플은 조직 배양 세포주, 정상 조직 또는 종양 조직으로부터 유래될 수 있다. 양성 및 음성 참조 샘플은 SW620, T47D, IGROV-1, HeLa, KB, JEG-3, 다른 종양 세포주, 및 FOLR1를 인코딩하는 발현 벡터로 안정되게 또는 일시적으로 전달감염된 세포주를 포함하는 세포주로부터 유래될 수 있다. 정상 또는 종양 조직 샘플 및 조직 배양 세포주는 음성 대조군 참조 샘플로서 또한 사용될 수 있다. 부가적 샘플에 대해, 참고 실시예 9-11 및 도 23-25.

[0257] XI. 약제학적 조성물 및 치료 방법

[0258] FOLR1-결합체 (항체, 면역접합체, 및 폴리클로날을 포함)은 치료적 처리 방법, 예컨대 암의 치료를 비제한적으로 포함하는 다양한 적용에서 유용하다. 어떤 구현예에서, 제제는 종양 성장을 억제하고, 분화를 유도하고, 종양 용적을 감소시키고/거나 종양의 종양유발성을 감소시키는데 유용하다. 사용 방법은 시험관내, 생체외, 또는 생체내 방법일 수 있다. 어떤 구현예에서, FOLR1-결합체 또는 항체 또는 면역접합체, 또는 폴리클로날은, 이것이 결합하는 인간 FOLR1의 길항제이다.

[0259] 어떤 구현예에서, FOLR1-결합체 또는 길항제 (예를 들면, huMov19 항체 또는 면역접합체)로 치료된 질환은 암이다. 어떤 구현예에서, 암은, FOLR1-결합체 (예를 들면, 항체)가 결합하는 염산 수용체 1을 발현시키는 종양에 의해 특성화된다.

[0260] 본 발명은 치료적 유효량의 FOLR1-결합체를 대상체 (예를 들면, 치료가 필요한 대상체)에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 암은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 암이다: 결장직장암, 췌장암, 폐암, 난소암, 간암, 유방암, 뇌암, 신장 암, 전립선암, 위장 암, 흑색종, 자궁경부암, 방광암, 교모세포종, 및 두경부암. 어떤 구현예에서, 암은 난소암이다. 어떤 구현예에서, 암은 폐암이다. 어떤 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0261] 본 발명은 항체 또는 본원에 기재된 다른 제제를 사용하여 종양 성장을 억제하는 방법을 추가로 제공한다. 어떤 구현예에서, 종양 성장을 억제하는 방법은 세포를 시험관내에서 FOLR1-결합체 (예를 들면, 항체)와 접촉시키는 것을 포함한다. 예를 들면, FOLR1를 발현시키는 불멸화된 세포주 또는 암 세포주는 종양 성장을 억제하기 위해 항체 또는 다른 제제에 부착된 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 종양 세포는 환자 샘플 예를 들면, 조직 생검, 늑막 삼출, 또는 혈액 샘플로부터 분리되고 종양 성장을 억제하기 위해 FOLR1-결합체를 부가한 배지에서 배양된다.

[0262] 일부 구현예에서, 종양 성장의 억제 방법은 종양 또는 종양 세포를 생체내에서 FOLR1-결합체 (예를 들면, 항체)와 접촉시키는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 종양 또는 종양 세포를 FOLR1-결합체와 접촉시키는 것은 동물 모형에서 착수된다. 예를 들면, FOLR1-결합체는 종양 성장을 억제하기 위해 면역결핍된 마우스 (예를 들면 NOD/SCID 마우스)에서 성장된 1 이상의 FOLR1s을 발현시키는 이종이식에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, FOLR1-결합체는 종양 성장을 방지하기 위해 종양유발성 세포의 동물에의 도입과 동시에 또는 직후에 투여된다. 일부 구현예에서, FOLR1-결합체는, 종양유발성 세포가 명시된 크기로 성장한 후 치료제로서 투여된다.

[0263] 어떤 구현예에서, 종양 성장의 억제 방법은 대상체에게 치료적으로 유효량의 FOLR1-결합체를 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 대상체는 인간이다. 어떤 구현예에서, 대상체는 종양을 가지거나 제거된 종양을 가졌다.

[0264] 어떤 구현예에서, 종양은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 종양이다: 뇌종양, 결직장 종양, 췌장 종양, 폐 종양, 난소 종양, 간 종양, 유방 종양, 신장 종양, 전립선 종양, 위장 종양, 흑색종, 자궁경부 종양, 방광 종양, 교모세포종, 및 두경부 종양. 어떤 구현예에서, 종양은 난소 종양.

[0265] 어떤 구현예에서, 본 발명은 저용량의 FOLR1-결합체를 사용하여 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 용어 "저용량"은 본원에 사용된 바와 같이 치료 효과를 생성하는데 필요한 통상적인 또는 종래의 용량 미만인 치료적으로 효과적인 용량의 FOLR1-결합체를 의미한다.

[0266] 따라서, 어떤 구현예에서 본 발명은 huMov19 항체 및 면역접합체를 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, huMov19 면역접합체는 하기이다: huMov19-SPDB-DM4; huMov19-설폰-SPP-DM1; huMov19-SPP-

DM1; 또는 huMov19-PEG4-Mal-DM4. 어떤 구현예에서, huMov19 면역접합체는 huMov19-SPDB-DM4이고 이는 통칭 IMGN853이다.

[0267] 어떤 구현예에서, 제형은 본 발명의 정제된 항체 또는 제제를 약제학적으로 허용가능한 비히클 (예를 들면 담체, 부형제)와 조합하여 보관 및 사용을 위해 준비된다 (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). 적당한 약제학적으로 허용가능한 비히클 는 비제한적으로 하기를 포함한다: 비독성 완충액 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 염 예컨대 나트륨 클로라이드; 아스코르브 산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예를 들면 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 폴리펩타이드 (예를 들면 약 10개 미만의 아미노산 잔기); 단백질 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 탄수화물 예컨대 모노사카라이드, 디사카라이드, 글루코오스, 만노오스, 또는 텍스트린; 킬레이트제 예컨대 EDTA; 당류 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들면 Zn-단백질 복합체); 및 비-이온성 표면활성제 예컨대 TWEEN 또는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG).

[0268] 본 발명의 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 치료를 위해 임의의 수의 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 하기 일 수 있다: 국소 (예컨대 질 및 직장 전달을 포함하는 점막에 대해) 예컨대 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 물약, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말; 폐 (예를 들면, 네블라이저에 의한 것을 포함하는 분말 또는 에어로졸의 흡인 또는 흡입제에 의해; 기관내, 비강내, 진피 및 경피); 경구; 또는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내 (예를 들면, 척추강내 또는 뇌실내) 투여를 포함하는 비경구.

[0269] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 항암 특성을 갖는 제2 화합물과 함께 약제학적 조합 제형, 또는 병용 요법으로서 투여 처방계획과 병용될 수 있다. 약제학적 조합 제형 또는 투여 처방계획의 제2 화합물은 바람직하게는 조합의 ADC에 대해 상보적 활성을 가지며, 이로써 그 활성은 서로 반대로 작용하지 않는다. FOLR1-결합제 및 제2 항암제를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 제공된다.

[0270] 질환의 치료를 위해, 본 발명의 항체 또는 물질의 적절한 용량은 치료될 질환의 유형, 중증도 및 질환의 과정, 질환의 반응성, 항체 또는 물질이 치료 또는 예방 목적을 위해 투여되지는 여부, 앞선 요법, 환자의 임상 이력에 의존적이며, 이들 모두 치료 의사의 재량에 있다. 항체 또는 물질은 1회 또는 며칠 내지 수 개월 지속되는 일련의 치료에 걸쳐, 또는 치료가 효과가 있거나 질환 상태의 감퇴가 달성 (예를 들면 종양 크기의 감소)될 때까지 투여될 수 있다. 최적의 투여 계획은 환자의 신체에서의 약물 축적을 측정함으로써 계산될 수 있고 개별 항체 또는 물질의 상대적 효능에 의존하여 가변적일 것이다. 투여 의사는 최적 용량, 투여 방법 및 반복율을 용이하게 결정할 수 있다. 어떤 구현예에서, 용량은 체중 1kg당 0.01 µg 내지 100 mg이고, 1일, 매주, 매달 또는 매년 1회 이상 주어질 수 있다. 어떤 구현예에서, 항체 또는 다른 FOLR1-결합제는 2주당 1회 또는 3주당 1회 제공된다. 어떤 구현예에서, 항체 또는 다른 FOLR1-결합제의 용량은 체중 1kg당 약 0.1 mg 내지 약 20 mg이다. 치료 의사는 체액 또는 조직에서 측정된 약물의 체류 시간 및 농도를 토대로 투여의 반복율을 측정할 수 있다.

[0271] 병용 요법은 "시너지"를 제공하고 "상승작용"을 증명할 수 있다, 즉, 활성 성분들이 함께 사용됐을 때 달성된 효과는 화합물들을 별도로 사용함으로써 초래되는 효과의 합보다 더 크다. 상승 효과는 활성 성분이 (1) 공동-제형화되고 조합된 단위 용량 제형으로 동시에 투여되거나 전달되거나; (2) 개별 제형으로서 교대로 또는 동시에 전달되거나; (3) 일부 다른 처방계획에 의해 전달될 때 달성될 수 있다. 교대 요법으로 전달될 때, 상승 효과는, 예를 들면, 별도 주사기로 상이하게 주사함에 의해 화합물이 순차적으로 투여되거나 전달될 경우 달성될 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안, 각 활성 성분의 효과적인 용량은 순차적으로, 즉 연속으로 투여되는 반면, 병용 요법에서는, 2 이상 활성 성분들의 효과적인 용량이 함께 투여된다.

[0272] 본 개시내용의 구현예는 본 개시내용의 어떤 항체의 제조 및 본 개시내용의 항체를 사용하는 방법을 상세히 기재하는 하기 비제한 실시예를 참조하여 추가로 정의될 수 있다. 물질 및 방법 둘 모두에 대한 많은 변형이 본 개시내용의 범위로부터 벗어나지 않고 실시될 수 있음이 당해분야의 숙련가에게 분명할 것이다.

[0273] 실시예

[0274] 본원에 기재된 실시예 및 구현예가 단지 설명 목적이며 그것에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당해분야의 숙련가에게 시사될 것이며 본원의 정신 및 영역 내에 포함되어야 함을 이해한다.

[0275] 엽산 수용체-1 (FOLR1)은 난소 종양에서 매우 높게 발현되고 뇌, 유방, 방광, 자궁내막모양, 폐, 췌장, 및 신장 암종에서 높은 수준 내지 보통 수준으로 발현되는 것으로 보고되었다. 그러나, FOLR1의 발현은 정상 조직에 제한되고 신장, 폐, 맥락막 신경절기, 췌장, 유방, 갑상선, 난소, 전립선, 및 폐를 포함한다.

[0276] 새로 냉동된 조직 동질물을 사용하여 FOLR1을 정량화하는 방법이 보고되었다. 전체의 조직 동질물은 막-연관된 발현으로부터 세포질을 구별할 수 없고 새로 냉동된 샘플은 임상 환경에서 잘 받아들여지지 않는다. 그러나, 포르말린 고정 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플은 병상에서의 환자에 대해 달성될 수 있다.

[0277] 실시예 1

[0278] 세포 샘플 중의 FOLR1의 면역조직화학 염색 - 매뉴얼 방법 포르말린 고정 파라핀 포매된 세포 펠렛 및 조직을 하기 염색 시약 및 조건과 함께 시험 샘플로서 사용했다.

IHC 항체

FFPE 검정 조건

시험 물품
■ 마우스 모노클로날 안티-huFOLR1 클론 BN3.2 (Leica # NCL-L-FR 알파)
이뮤노젠: 엽산 수용체 알파 분자의 외부 도메인의 189 개의 아미노산에 상응하는 원핵 재조합 단백질
대조군 물품
■ muIgG1 (Coulter) 클론, Cat# 6602872
2 차 항체
■ 바이오틴화된 말 안티-마우스 (벡터, Cat# PK-6100)

단계	조건
항원 회수	Borg (Biocare) pH 9.0
차단 단계	아비딘/아이오틴; 퍼옥사이드
시험 또는 대조군 물품	2.0 µg/mL
희석제	2% 말 혈청을 함유하는 PBS
이차 항체	10 µg/mL
검출 시스템 *	아비딘-바이오틴-퍼옥시다제-복합물; ABC (벡터 랩)
발색제	DAB (Dako)
DAB 발단 시간	≥ 5 분

[0279]

[0280] 포르말린 고정 파라핀 포매된 (FFPE) 환자 난소 종양 생검 및 난소 이종이식 종양을 컷과 안티-FOLR1 항체 클론 BN3.2, (Leica, Cat #NCL-L-FR알파) 및 대조 muIgG1 (Coulter)로 염색했다. pH 9.5 완충액에서 항원 회수 후, 슬라이드를 2% 말 혈청 + 아비딘으로 차단했다. 슬라이드를 PBS에서 세척하고 안티-FOLR1 또는 대조 muIgG1 항체로 60분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 그 다음 바이오틴화된 안티-마우스 IgG로 30분 그리고 아비딘-바이오틴-퍼옥시다아제 복합체로 40분 인큐베이션하여 결합된 2차 항체를 검출했다. DAB (3,3-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드)와 5분 동안 인큐베이션하여 색 신호를 초래했다. 슬라이드를 헤마톡실린으로 대조염색했다.

[0281] FOLR1 염색 세기 및 분포 패턴을 대조 IgG 염색 (비-특이적)과 비교하여 평점했다. 세기는 0 내지 3의 척도로 평점했고 (0 = 무염색, 1 = 약한 염색, 2 = 보통 염색 및 3 = 강한 염색) 분포를 국소 (염색된 세포 <25%), 이질 (염색된 세포 25-75%) 및 동질 (염색된 세포 >75%)로서 평점했다.

[0282] FFPE 샘플은 종양 마이크로 어레이, 뿐만 아니라 아래에 요약한 바와 같이 7 상이한 종양으로부터의 인간 조직 블록들로부터 유래했다.

[0283] FFPE 시험 샘플

인간 종양 마이크로 어레이 (TMAs)	설명	상업적 공급원
■혼합된 종양	암의 33 개 유형으로부터 96 개의 코아	Biomax Cat# MC961
■난소 종양	64 개의 코아	Biochain Cat# T8235725
■NSCLC	80 개의 코아	Biomax Cat# LC806
■결직장 암종	85 개의 복제 코아	Biomax Cat# BC000110
인간 조직 블록	수	상업적 공급원
■유방 종양	4	CHTN
■결직장 암종	4	
■난소 종양	4	
■NSCLC	8	
■췌장 종양	1	
■신장 종양	8	
■SCCHN	14	

[0284]

[0285] FOLR1 시험 물품인, 췌장과 안티-FOLR1 클론 BN3.2를 huFOLR1 항원에 대한 결합 특이성을 결정하기 위해 시험했다. 보고된 IHC 염색 방법을 사용하여, 300-19 및 huFOLR1 (300-10/FOLR1)로 전달감염된 300-19 세포 펠렛들의 FFPE 섹션을 염색하고 FOLR1에 대해 평가했다. FOLR1 시험 물품은 300-19/FOLR1+ 세포를 특이적으로 염색시키고 300-19 세포에서 무염색으로 회복했다 (각각 3 호모 및 음성). 이들 결과는 클론 BN3.2가 huFOLR1 항원을 특이적으로 표적한다는 것을 실증한다. (도 1).

[0286] BN3.2 항체는 또한 조직 샘플에서 FOLR1 발현을 검출하는데 사용되었다. 각 시험 및 대조군 물품과 조직 및 세포 펠렛과의 면역반응성은 고문 병리학자, 도프만 데이빗 박사에 의해 결정되었다. 세포 펠렛 대조군을 우선 조직 샘플에 이어 평가했다. 평가된 각 조직에 대해, 염색 세기 및 염색 균일성에 대한 설명이 보고되었다. 염색 세기 점수 및 균일성 척도는 하기 기재되어 있다. 평가된 각 조직 샘플에 대한 최종 보고된 점수는 시험 물품 점수 - 각각의 대조군 물품 점수이다. 각 샘플에 대한 ABC 수준은 염색 점수를 교정된 세포 펠렛 대조군과 비교하여 추측했다.

세기 (염색의 양)		균일성 (염색된 세포의 수)	
0	음성		
1	약함	0	음성
2	보통	초점	<25%
3	강한	이질 (헤테로)	25-75%
3+	아주 강한	동질 (호모)	>75%

[0287]

[0288] 세포당 결합된 항체 (ABC) 값을 안티-FOLR1-피코에리티린, BD 퀀티브라이트 비즈(Quantibrite Beads), 및 유세포측정을 사용하여 FOLR1-양성 종양 세포주 (KB, IGROV1, JEG3, 및 OVCAR3)에 대해 측정했고, ABC 값들이 상이함을 나타냈다. (도 2). 염색 조건은 FOLR1에 대해 최적화되어 FOLR1-양성 종양 세포주로부터 제조된 세포 펠렛이 IHC에 의해 다양한 수준의 염색 세기를 보여주었다. KB 세포 펠렛은 높은 세기로 매우 강한 (3+) 동질 염색을 나타냈고, IGROV1 세포 펠렛은 강한 (3) 염색을 나타냈고, JEG3 세포 펠렛은 보통 (2-3) 이질 염색을 나타냈던 반면, OVCAR3 세포 펠렛의 염색은 낮은 세기 (1-2) 이질 염색을 나타냈다. 세포 펠렛으로부터 관찰된 FOLR1 염색 세기 추세는 보고된 ABC 값에 상응하며, 여기서 KB 세포는 1,700,000의 최고 ABC 값을 나타냈고, IGROV-1 세포는 260,000의 다음의 최고 ABC 값을 나타냈고, JEG-3은 더 낮은 ABC 값 또는 41,000 ABC를 나타냈던 반면, OVCAR3 세포는 4,000의 최저 ABC 값을 나타냈다. 염색 결과 및 각각의 ABC 값은 하기 표에 기재되어 있다.

[0289] 세포주 및 각각의 세포 펠렛에서 huFOLR1에 대한 ABC 값 및 각각의 염색 결과.

세포주	FOLR1	
	ABC	점수
KB	1,700,000	3+ 동질
IGROV1	260,000	3 호모
JEG3	41,000	2-3 헤테로
OVCAR3	4,000	1-2 헤테로

[0290]

[0291]

하기를 포함하는 부가적 세포주: Capan-1, Jar, Hec-1-A, Hec-1-B, Ishikawa, NCI H292, BT474EEI, PA-1, OV-90, CaOv-4, CaOv-3, A2780, Ovcav-5, Ovcav-4, HCT-15, 786-O, NCI H838, NCI H 522, NCI H2110, NCI H1734, NCI H228, 및 FU. OV-3은 시험되었고 FOLR1 양성인 것으로 발견되었지만 안티-FOLR1 면역접합체 활성화에 대한 FOLR1 발현 수준 및 민감도는 변했다. 참조 목적을 위해, 안티-FOLR1 면역접합체에 대한 일관된 FOLR1 발현 및 민감도를 갖는 세포주가 바람직하다.

[0292]

IHC 방법이 난소 암종 및 비-소세포 폐암 (NSCLC) 조직 샘플에서 FOLR1 발현을 신뢰할 수 있게 검출할 수 있었다는 것이 특히 중요했다. 도 3에서 보여주는 바와 같이, FOLR1 발현은 2 헤테로 내지 3 호모로 평점된 난소 암종 및 NSCLC 샘플에서 신뢰할 수 있게 검출될 수 있었다. 이들 샘플에 대한 ABC 값은 2 헤테로로 평점된 샘플에 대해 대략 41,000, 내지 3 호모로 평점된 샘플에 대해 260,000 초과의 범위였다. 도 4에서 보여주는 바와 같이, 높은 염색 세기 및 염색의 균일성을 또한 난소 암종, 폐 선암종, 및 세기관지폐포 암종에서 관찰했다. 또한, NSCLC 샘플에서의 FOLR1의 발현 (도 5) 및 난소 암종에서의 FOLR1의 발현 (도 6)이 조직 샘플에서 막에 주로 집중되어 있다는 것을 추가로 발견하였다. 발현을 동일한 종양 샘플, 뿐만 아니라 상이한 종양 샘플로부터 다중 샘플에 걸쳐 검출했다. 흥미롭게도, 결장직장, 유방, 또는 소세포 폐 종양으로부터의 샘플 중의 어느 것도 2 헤테로 초과로 평점되지 않았다.

[0293]

실시예 2

[0294]

KB 이중이식 모델에서 유사한 비-표적 콘주게이트와 비교된 huMov19-PEG4Mal-DM4 및 huMov19-SPDB-DM4 콘주게이트의 생체내 효능

[0295]

비-표적 huC242-SPDB-DM4와 비교된 FOLR1-표적 절단가능 콘주게이트 huMov19-SPDB-DM4, 및 비-표적 huC242-PEG4Mal-DM4와 비교된 비-절단가능 콘주게이트 huMov19-PEG4-Mal-DM4를 SCID 마우스 내로 피하 이식된 KB 세포의 확립된 이중이식 모델을 사용하여 시험했다 (최고 FOLR1 발현, 매뉴얼 IHC에 의한 3+ 동질접합). 마우스를 체중에 따라 치료 그룹으로 무작위화하고 각각 5 및 10 mg/kg의 콘주게이트로 세포 접종한 후 3일에 단독으로 (SPDB 콘주게이트), 또는 3, 10, 및 17일에 매주 3회 치료했다. 상이한 치료 그룹들의 중간 종양 용적을 도 7에 플롯팅한다. huMov19-SPDB-DM4, 또는 huMov19-PEG4Mal-DM4로의 치료는 PBS 대조군과 비교하여 중간 종양 용적이 감소했던 반면, 각각의 비-표적 콘주게이트로의 치료는 어떠한 유의미한 효과도 생성하지 않았다.

[0296]

실시예 3

[0297]

OVCAR-3 인간 난소 암종 이중이식편에서 IMG853 치료의 용량-반응 항종양 활성

[0298]

IMG853의 항종양 효과를 난소 암종의 확립된 피하 이중이식 모델에서 평가했다. SCID 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하로 주사되는 OVCAR-3 난소 암종 세포 (1×10^7 세포/동물)로 접종되었다. 종양이 약 100 mm³의 크기에도달했을 때 (종양 세포 접종 후 21일), 마우스를 무작위로 4 그룹으로 나누었다 (그룹당 6 동물). 마우스를 1.2, 2.5 또는 5.0 mg/kg에서의 IMG853의 단일 정맥내 주사로 치료했다. 대조군 그룹의 동물은 PBS의 단일 정맥내 주사를 투여받았다. 종양 크기를 주당 2회 측정함으로써 종양 성장을 모니터링했다. 종양 크기를 식: 길이 x 폭 x 높이 x $\frac{1}{2}$ 을 사용하여 계산했다.

[0299]

IMG853은 2.5 및 5.0 mg/kg 용량 수준 둘 모두에서 종양 성장 억제 (T/C = 0 %)의 측면에 있어서 OVCAR-3 종양에 대해 고활성이었다 (매뉴얼 IHC 방법을 사용하여 3 호모접합의 IHC 점수) (도 8). 5.0 mg/kg의 IMG853으로 치료된 6/6 마우스에서 완전한 종양 퇴화 (CR)가 있었다. 2.5 mg/kg 용량 수준의 IMG853으로 치료된 6/6 마

우스에서 부분 종양 퇴화 (PR)가 있었고, 2.5 mg/kg 용량 수준의 IMG853으로 치료된 4/6 마우스에서 CR이 있었다. IMG853은 1.2 mg/kg 용량 수준에서 2/6 PR 및 1/6 CR로 활성이었고, T/C는 18%였다. NCI 표준에 따라, 10% 내지 42% 범위의 T/C 값은 활성인 것으로 고려되며, 10% 미만의 T/C는 고활성인 것으로 고려된다.

[0300] 실시예 4

[0301] IGROV-1 인간 난소 암종 이종이식편에서 IMG853 치료의 용량-반응 항종양 활성.

[0302] IMG853의 항종양 효과를 난소 암종의 확립된 피하 이종이식 모델에서 평가했다. SCID 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하로 주사되는 IGROV-1 난소 암종 세포 (1×10^7 세포/동물)로 접종되었다. 종양이 약 100 mm³의 크기에 도달했을 때 (종양 세포 접종 후 7일), 마우스를 무작위로 4 그룹으로 나누었다 (그룹당 6 동물). 마우스를 1.2, 2.5 또는 5.0 mg/kg의 IMG853의 단일 정맥내 주사로 치료했다. 대조군 그룹의 동물은 PBS의 단일 정맥내 주사를 투여받았다. 종양 크기를 주당 2회 측정함으로써 종양 성장을 모니터링했다. 종양 크기를 식: 길이 x 폭 x 높이 x $\frac{1}{2}$ 을 사용하여 계산했다.

[0303] IMG853은 2.5 및 5.0 mg/kg 용량 수준에서 IGROV-1 종양에 대해 고활성이었고 (매뉴얼 방법에 의해 3 호모접합의 IHC 점수), 둘 모두의 용량 수준에서 T/C 값은 5%였다 (도 9). 각각 2.5 및 5.0 mg/kg 그룹에서 5/6 및 6/6 마우스에서 부분 종양 퇴화가 있었다. IMG853은 1.2 mg/kg 용량에서 불활성이었다 (T/C = 47%).

[0304] 실시예 5

[0305] OV-90 인간 난소 암종 이종이식편에서 IMG853 치료의 용량-반응 항종양 활성.

[0306] IMG853의 항종양 효과를 난소 암종의 확립된 피하 이종이식 모델에서 평가했다. SCID 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하로 주사되는 OV-90 난소 암종 세포 (1×10^7 세포/동물)로 접종되었다. 종양이 약 100 mm³의 크기에 도달했을 때 (종양 세포 접종 후 13일), 마우스를 무작위로 4 그룹으로 나누었다 (그룹당 6 동물). 마우스를 1.2, 2.5 또는 5.0 mg/kg의 IMG853의 단일 정맥내 주사로 치료했다. 대조군 그룹의 동물은 PBS의 단일 정맥내 주사를 투여받았다. 대조군 그룹의 동물은 동일한 계획으로 정맥내로 투여되는 PBS를 투여받았다. 종양 크기를 주당 2회 측정함으로써 종양 성장을 모니터링했다. 종양 크기를 식: 길이 x 폭 x 높이 x $\frac{1}{2}$ 을 사용하여 계산했다.

[0307] IMG853은 2.5 및 5.0 mg/kg 용량 수준에서 OV-90 종양에 대해 활성이었고 (매뉴얼 방법에 의해 3 헤테로-호모의 IHC 점수), T/C 값이 각각 36 및 18%이었다 (도 10). 2 동물은 5.0 mg/kg 그룹에서 부분 종양 퇴화를 가졌고; 치료 그룹 중의 어느 것도 다른 종양 퇴화가 나타나지 않았다. IMG853은 1.2 mg/kg 용량에서 불활성이었다 (T/C = 77%).

[0308] 실시예 6

[0309] SKOV-3 인간 난소 암종 이종이식편에서 IMG853 치료의 용량-반응 항종양 활성.

[0310] IMG853의 항종양 효과를 난소 암종의 확립된 피하 이종이식 모델에서 평가했다. SCID 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하로 주사되는 SKOV-3 난소 암종 세포 (1×10^7 세포/동물)로 접종되었다. 종양이 약 100 mm³의 크기에 도달했을 때 (종양 세포 접종 후 26일), 마우스를 무작위로 4 그룹으로 나누었다 (그룹당 6 동물). 마우스를 1.2, 2.5 또는 5.0 mg/kg의 IMG853의 단일 정맥내 주사로 치료했다. 대조군 그룹의 동물은 PBS의 단일 정맥내 주사를 투여받았다. 종양 크기를 주당 2회 측정함으로써 종양 성장을 모니터링했다. 종양 크기를 식: 길이 x 폭 x 높이 x $\frac{1}{2}$ 을 사용하여 계산했다.

[0311] IMG853은, IMG853-치료된 종양의 성장을 PBS 대조군 그룹과 비교할 때, 모든 용량에서 SKOV-3 종양에 대해 불활성이었다 (매뉴얼 방법에 의해 1-3 국소의 IHC 점수) (도 11). 데이터 분석이 수행되지 않았고, 본 연구는 이 모델에서 IMG853의 불활성에 기초하여 조기에 종료했다.

[0312] 실시예 7

[0313] KB 인간 자궁경부 선암종 이종이식편에서 IMG853 치료의 용량-반응 항종양 활성.

[0314] IMG853의 항종양 효과를 확립된 피하 이종이식 자궁경부 선암종 모델에서 평가했다. SCID 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하로 주사되는 KB 자궁경부 선암종 세포 (1×10^7 세포/동물)로 접종되었다. 종양이 약 100 mm³의 크기에 도달했을 때 (종양 세포 접종 후 7일), 마우스를 무작위로 4 그룹으로 나누었다 (그룹당 6 동물). 마우스를 1.0, 2.5 또는 5.0 mg/kg에서의 IMG853의 단일 정맥내 주사로 치료했다. 대조군 그룹의 동물은 PBS의 단일

정맥내 주사를 투여받았다. 종양 크기를 주당 2회 측정함으로써 종양 성장을 모니터링했다. 종양 크기를 식: 길이 x 폭 x 높이 x ½을 사용하여 계산했다.

[0315] IMGN853은 2.5 및 5.0 mg/kg 용량 수준 둘 모두에서 종양 성장 억제 (T/C = 0 %)의 측면에서 KB 종양에 대해 고활성이었다 (도 12). 5.0 mg/kg에서 6 마우스 중 6마리, 및 2.5 mg/kg 치료 그룹에서 6 마우스 중 5마리가 CR을 가졌고, 연구의 말기 (120일)까지 종양이 없는 상태로 남아있었다. 1.0 mg/kg 용량은 활성이었고, T/C가 37%였으나, 부분 또는 완전한 퇴화가 없었다.

[0316] 실시예 8

[0317] 포르말린 고정 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플-자동 방법에서 FOLR1의 면역조직화학 염색.

[0318] IHC 염색 검정은 시험 물품으로서 노보카스트라(Novocastra) FOLR1 항체 (Novocastra/Leica Cat # NCI-L-FR알파, 클론 BN3.2) 및 레이카 본드(Leica Bond) RX 자동 염색기를 포함하는 IVD 클래스 I 시약을 사용한다. 결합 시험 또는 대조군 물품은 일차후 시약(post primary reagent) (토끼 안티-마우스 IgG)에 이어서, 폴리머 시약 (염소 안티-토끼 폴리머) 및 3,3-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드 (DAB) 색원체를 포함하는 레이카 본드 리파인 검출 시스템(Leica Bond Refine detection system)으로 인큐베이션시켜 검출되었다. FFPE 샘플을 아래에 요약한 바와 같이 명시된 농도(들)의 일차 항체 (레이카 희석제 FOLR1을 희석시켜 제조됨)로 염색했다.

[0319] IHC 항체

시험 물품 ⁱ⁾	엽산 수용체 알파 (Novocastra/Leica Cat # NCI-L-FR 알파, Lot 159506), 쥘과, 클론 BN3.2, 액체 농축물: 75 µg/mL
대조군 물품 ⁱ⁾	IgG1 (Beckman Coulter Cat.# 6602872, Lots2S7SPS04-23 및 2S7SPS04-26) 모액 농도:1 mg/mL, 쥘과, 클론 2T8-2F5

[0320]

[0321] 레이카 본드 RX를 사용한 FFPE 검정 방법

단계 ⁱ⁾	작용	시간
베이킹	온도: 60°C	30 분
탈왁스	결합 탈왁스 용액	고정
	100% 에탄올	고정
항원 회수	ER2 결합	20 분
내인성 페록시다아제 블록	퍼옥사이드 (키트 구성요소 정제)	5 분
시험 물품	Leica 희석제 중 1.9 µg/mL 의 FOLR1	15 분
검출	초기후 시약 (키트 정제)	8 분
	폴리머 (키트 정제)	8 분
	혼합된 DAB (키트 정제)	10 분
대조염색	헤마톡실린 (키트 정제)	5 분

[0322]

[0323] 모든 염색된 샘플을 평가하고 평점했다. 대조군 샘플을 우선 시험 샘플에 이어 평가했다 (TMA로부터 전체의 섹션 및 개별적인 코어). 평가된 각 종양 조직 또는 세포 펠렛에 대해, 염색 세기 및 염색된 종양 세포의 각각의 비율에 대한 설명이 보고되었다. 막 연관된 염색을 모든 샘플에 대해 기록했다. 2회 점수를 1명의 환자로부터 평가했고, 더 높은 점수만을 분석에 포함시켰다. 점수가 단지 세포질 염색만을 나타내는 경우에, 이후 최종 점수를 제로 (0)로 보고했다. 세기 및 균일성은 하기 보여주는 표에 기재된 바와 같이 각 샘플에 대해 주어졌다. 염색 세기 및 분포 패턴을 대조 IgG 염색 (비-특이적)과 비교하여 평점했다. 세기는 0 내지 3의 척도로 평점했

고 (0 = 무염색, 1 = 약한 염색, 2 = 보통 염색 및 3 = 강한 염색) 분포를 국소 (염색된 세포 <25%), 이질 (염색된 세포 25-75%) 및 동질 (염색된 세포 >75%)로서 평점했다. 정상 조직에서는, 단지 한정된 하위구조만이 세기 및 비율을 계산할 때 평가되었다.

[0324] 세기 및 균일성 척도로 이루어진 IHC 평점 시스템

세기 (염색의 휘도)		
세기 관찰된	세기 카테고리	보고된 세기
0	음성	0
0-1	아주 약함	1
1	약함	
1-2	약함 내지 보통	2
2	보통	
2-3	보통 내지 강함	3
3	강함	
균일성 (염색된 세포-막 단독의 %)		
0		음성
초점		<25%
이질 (헤테로)		25-75%
동질 (호모)		>75%

[0325]

[0326] FFPE 종양 샘플은 종양 마이크로 어레이, 뿐만 아니라 아래에 요약한 바와 같이 7 상이한 종양으로부터의 인간 조직 블록들로부터 유래했다.

[0327] FFPE 시험 샘플: TMAs

해부 부위	판매인	카탈로그 #	코드	환자 당 코아의 수	환자의 총 #
신장	Pantomics	KIC1501	P-T-ARR-KID-122711-1	2	69
폐	Pantomics	LUC1501	P-T-ARR-LNG-122711-1	2	70
폐	Tristar	69571059/TA1249	P-T-ARR-OVA-122711-1	1	110
난소	Biochain	T8235725-5	P-T-ARR-OVA-122111-1	1	62
난소	Pantomics	OVC1501	P-T-ARR-OVA-122711-1	2	70
난소	Tristar	69571091/TA1322	P-T-ARR-OVA-010912-1	2	96
자궁 (자궁내막)	Pantomics	EMC1501	P-T-ARR-EME-122711-1	2	70
다양한	Pantomics	MTU481	P-T-ARR-122711-1	1	48

[0328]

[0329] FFPE 시험 샘플: 전체의 섹션

기관	코드	공급원	진단 (공급 서류에 대해)
난소	1	미공지	자궁내막 선암종
	2	Proteogenex	자궁내막 선암종
	3	CHTN	자궁내막, 장액 및 투명의 특징과 혼합된 선암종
	4	CHTN	선암종, 높은 등급 w/ 혼합된 유두상, 장액, 자궁내막모양 및 투명 세포면
	5	CHTN	장액 유두상 선암종
	6	Proteogenex	장액 선암종
	7	Proteogenex	장액 유두상 선암종
	8	Proteogenex	장액 유두상 선암종
	9	CHTN	장액 유두상 선암종
	10	Proteogenex	장액 유두상 선암종
폐	1	CHTN	저조하게 분화된 선암종
	2	CHTN	세기관지폐포 특징을 갖는 잘 분화된 소염 선암종
	3	CHTN	선암종, 점액 특징
	4	CHTN	선암종
	5	CHTN	선암종
	6	CHTN	선암종 (세기관지폐포) 암종
	7	CHTN	선암종
	8	CHTN	투명 세포 특징을 갖는 보통 분화된 선암종
	9	CHTN	선암종
	10	CHTN	편평상피 세포 암종

[0330]

[0331] 세포 (종양 세포 또는 전달감염된 세포)를 포르말린 고정시키고 파라핀 포매시켰다 (FFPE). 유세포측정에 의해 다양한 범위의 FOLR1 발현을 나타내는 것으로 보여지는 FFPE 세포 펠렛 샘플, 및 정상 인간 조직을 양성 및 음성 대조군을 특성화하고 특이성 분석을 위해 이 연구에 사용했다. 다양한 수준의 FOLR1 및 각각의 점수를 나타내는 세포 펠렛이 하기에 보고된다. 세포 펠렛에서 염색 점수 및 각각의 FOLR1 발현 수준 사이에 불량한 상관관계가 존재한다 (결합된 항체/세포, ABC, 고정된 유세포측정에 의해 결정됨). 예를 들면, 1-3 헤테로의 점수는 각각 40,098 및 565,481 ABC 값을 나타내는 SW620 및 IGROV-1에 대해 주어진다. 또한, 1,500,000의 ABC 값을 나타내는 HeLa 세포는 2-3 헤테로의 점수를 나타내는 반면, 830,003 ABC를 나타내는 300.19/FR1은 3 호모의 더 높은 점수를 나타내었다.

[0332] 1.9 $\mu\text{g/mL}$ 의 시험 물품 농도에서 세포 펠렛에 대한 최종 점수

세포주	#ABC 값	염색 점수
SW620	40,098	1-3 헤테로
T47D	97,576	1-2 헤테로
IGROV-1	565,481	1-3 헤테로
300.19/ FR1	830,003	3 호모
HELA	1,500,587	2-3 헤테로
KB	4,000,000	3 호모

[0333]

[0334] ^a 보고된 ABC 값은 세포 모집단에서 세포당 결합된 항체의 평균이고, 다음과 같이 결정되었다: $1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 농도의 안티-FOLR1-PE (1:1)는 유세포측정 방법 및 퀀티브라이트™ 비즈 (BD Biosciences)를 사용하여 각각의 세

포주에 대한 ABC 값을 결정하기 위해 사용되었다.

[0335] 유세포측정 히스토그램은 세포 대 세포당 결합된 안티-FOLR1의 수의 분포를 나타낸다 (FOLR1 발현 수준). 히스토그램 및 각각의 IHC 염색 결과 둘 모두는 각각의 이들 세포주가 넓은 범위의 FOLR1 발현을 갖는 이질 세포 모집단을 함유하는 것을 지시한다. 예외는 균일한 유세포측정 히스토그램 및 IHC 염색 점수 둘 모두를 보여주는 300.19/FR1 세포주이다. 이 데이터는 더 균일한 수준의 FOLR1을 각각 발현시키는 세포주들이 ABC 값 및 각각의 염색 점수 사이에 더 나은 상관관계를 제공할 수 있음을 시사한다. 상기 검정이 모든 FOLR1-양성 세포 펠렛 대조군에서 양성 염색을 실증했다더라도, 대부분의 이들 세포 펠렛으로부터 염색 점수 및 각각의 FOLR1 발현 수준 사이에 불량한 상관관계가 존재한다. 따라서, 이 그룹으로부터의 세포 펠렛은 고발현, 중발현, 및 저발현 대조군으로서 확인될 수 없었다. IHC 및 유세포측정에 의해 세포주에서 FOLR1 발현을 묘사하는 대표적인 사진 및 히스토그램을 도 13에서 보여주고 있다.

[0336] 검정 조건을 결정하기 위해, 시험 및 대조군 물품의 일련의 희석물을 적절한 수준의 민감도를 나타내는 조건을 선택하기 위해 시험했다. 실험을, FOLR1-양성 세포 펠렛을 포함하는 FFPE 샘플, 및 FOLR1 양성 및 음성 정상 조직 (부신 (피질/수질), 유방 (유관 및 소엽/결합 조직), 난관 (표면 상피/근육 벽), 신장 (세뇨관/사구체), 폐 (유형 I/II 폐포세포/폐포간 결합 조직), 췌장 (췌도/랑게르한스섬), 타액선 (관/간질), 피부 (에크린선/상피), 위 (표면 상피/점막하층)), 및 종양 조직의 전체 섹션 (10 난소 종양 샘플 및 10 폐 종양 샘플)으로 이루어진 TMA의 패널에서 수행했다. 각 샘플을 시험 물품 농도의 연속 희석물 (0.25, 0.5, 0.9, 1.9, 3.8, 및 7.5 μ g/mL) 또는 1.9 μ g/mL 또는 3.8 μ g/mL의 대조군 물품 농도로 염색했다. 각 희석물에 대한 상대 염색 세기를 각 샘플에 대해 비교하여 최적의 희석물을 식별하였다. 최적의 희석물에 대한 기준은 1) 아이소타입 대조군으로 염색된 샘플에서 배경 염색을 유발하지 않고 2) 시험 물품으로 염색된 음성 조직 대조군에서 염색을 유발하지 않고 3) 흥미로운 징후를 나타내는 시험 샘플들 (난소 종양, 자궁내막 종양, NSCLC 종양, 및 신장 종양 FFPE 조직) 사이에서 다양한 수준의 막-연관된 FOLR1 발현을 구별하는 희석물이었다. 평가된 시험 물품의 5 희석물 중에서, 1.9 μ g/mL의 농도가 레िका 본드 RX 자동 프로토콜 (베이킹 및 디왁스 프로토콜, 20분 동안 ER2를 사용한 HIER 프로토콜, 및 염색 프로토콜 IHC F- With Extra Rinses)을 사용한 염색 결과에서 최적 동적 범위를 보여주었다.

[0337] 실시예 9

[0338] 검정-자동 염색 방법의 동적 범위를 특성화하는 대조군의 확인 및 특성화

[0339] **품질 대조군:** 인간 정상 타액선, 폐 및 췌장은 염색 절차가 예상대로 수행됐음을 확인하기 위해 각 검정에 이용되는 양성 조직 대조군으로서 확인되었다. 인간 정상 식도가 음성 대조군으로서 확인되었다. 이들 대조군들은 다음으로서 특성화되었다: 동적 범위의 검정을 포괄하는 대조군을 확립하기 위해, 동적 범위의 검정을 나타내는 것으로 기대되는 몇 개의 FOLR1 양성 및 음성 정상 조직 샘플로 이루어진 조직 마이크로어레이 (TMA)를 최적화 및 검증 단계 동안 검정 입증 대조군으로서 사용했다. 이 TMA에서 확인된 구조를 갖는 4 정상 조직은 다음과 같이 적당한 검정 대조군으로서 확인되었다: 정상 인간 폐의 호흡 상피 (2 호모의 점수); 정상 인간 췌관 (3 호모 국소의 점수); 정상 인간 타액선의 사이관 (1-2 헤테로의 점수); 및 정상 인간 식도 (0의 점수). 총 4 검정 수행에 걸쳐, 이 TMA로부터 확인된 적당한 검정 대조군들은 동일한 결과를 제공했다. 이들 결과는 선택된 대조군이 일관된 결과를 제공하고 동적 범위의 검정을 포괄함을 지시한다.

[0340] 동적 범위의 검정을 포괄하는 대조군으로 확인된 정상 조직의 구조

정상 기관	하부구조	염색 점수 (대조군 물품)	염색 점수 (시험 물품)
식도	모든 구조	0 (음성)	0 (음성)
타액선	사이관	0 (음성)	1-2 헤테로
폐	호흡 상피	0 (음성)	2 호모
췌장	관	0 (음성)	3 호모 정점

[0341]

[0342] 정점 염색은 극성화된 비-균일한 막 염색으로서 정의된다

[0343] 실시예 10

[0344] 자동 염색 방법의 성능 분석.

[0345] 이 검정의 의도한 용도는 재생가능하게, 그리고 난소, 자궁내막, NSCLC, 및 신장 FFPE 종양 조직에서 막-연관된 FOLR1 발현의 다양한 수준 및 다양한 균일성을 구별하기에 적절한 민감도 (최적의 동적 범위)로 FOLR1을 특이적으로 검출하기 위한 것이다. 따라서, 특이성, 재현성, 및 민감도가 성능 기준으로 고려되었다.

[0346] 본 연구 검정의 특이성 및 민감도를 본 연구 검정과 함께 정상 조직 염색을 이전에 보고된 결과와 비교하여 평가했다. 이 연구로부터의 염색 결과를 FFPE 정상 조직을 사용한 Scorer 등 2010 (*염산 수용체 - 알파에 대한 신 규 모노클로날 항체의 완전한 면역조직화학 평가*, The Novocastria Journal of Histopathology, REAGENTS: 2010(3):8-12, 동일한 항체 클론 BN3.2를 기술함), 및 새로 냉동된 정상 조직 (이뮤노젠 리포트 IMH28-003)에 대한 IMG853 (huMov19 (M9346A) 항체)을 사용한 조직 교차 반응성 (TCR) 연구로부터의 상응하는 염색 결과와 비교했다. 각 방법으로부터의 염색 결과의 비교는 3 검정이 일반적으로 유사한 정상 조직 염색 프로파일을 보였으나, 상대 민감도가 상이했고, Scorer 검정이 가장 덜 민감하고, 본 연구 검정 (IMH28-011)이 중간 민감도를 갖고, TCR 연구 방법이 가장 민감했다. 일부 구조는 단지 2 더 민감한 방법 (연구 검정 및 TCR 검정)에서만 양성 염색을 보였다. 본 연구 검정 및 TCR 방법에서도 양성이지 않은 경우에 Scorer에 의해 사용된 가장 덜 민감한 검정에서 양성 염색의 예는 존재하지 않았다. 이들 결과는 본 연구 검정의 특이성 및 민감도가 정상 조직에서 FOLR1 발현의 평가에 적절하다는 것을 실증한다.

[0347] 본 연구 검정의 특이성 및 민감도는 추가로 난소, 자궁내막, NSCLC, 및 신장 종양 (검정의 의도된 임상 용도에 대표적인 샘플 세트)으로 이루어진 종양 TMA의 패널을 염색하고 평가함으로써 특성화되었다. 양성 염색은 종양 조직에 일관되게 국소화되었고, 간질, 혈관, 림프구를 포함하는 정상 인접한 조직 성분들 및 정상 기관 조직은 예상대로 음성 또는 양성으로 염색되었다. 난소 암종 또는 NSCLC의 각 하위유형에 대해, 상이한 판매처들로부터의 TMA들 간에 염색 점수의 분포는 유사한 점수들의 분포를 보였으며, 이는 이 방법이 다양한 고착 및 가공 조건에 민감하지 않음을 시사한다. 분포 패턴이 TMA들 간에 유사했기 때문에, 상이한 어레이로부터의 데이터를 조합하고 점수를 분류했다. 하위유형당 20 이상의 샘플을 함유하는 종양 하위유형에 대한 이들 점수들의 요약은 하기 표에 기재되어 있다. 이들 표에 요약된 바와 같이, 동적 범위의 점수가 각 종양 유형에 대해 언급되고 이 검정이 난소, 자궁내막, NSCLC, 및 신장 FFPE 종양 조직에서 막-연관된 FOLR1 발현의 다양한 수준 및 다양한 균일성을 구별하기에 적절한 민감도를 나타냄을 지시한다. 장액 난소, 자궁내막 난소, NSCLC, 자궁내막암종, 및 신장 투명 세포 암종의 대표적인 사진들이 도 14-18에 제공된다. 예를 들면, 염색 가이드 또는 진단 키트에 유용한 부가적 대표 사진들은 도 23-25에서 보여주고 있다. 이들 연구는 상기 검정이 진단 시약 또는 동반 진단 시약으로서 사용하기에 특이적이고 적절한 민감도를 가짐을 지시한다.

[0348] 난소 종양의 지배적인 하위유형에 대한 염색 점수의 요약

하위유형	샘플 수 (%)						
	총	≥3 헤테로 ^a	≥2 헤테로 ^a	≥1 헤테로 ^a	1-3 초점	임의의 양성	음성
자궁내막모양	35	15	18	20	6	26	9
	(100)	(43)	(51)	(57)	(17)	(74)	(26)
점액	29	2	4	5	0	5	24
	(100)	(7)	(14)	(17)	(0)	(17)	(83)
장액	129	44	92	92	8	100	29
	(100)	(34)	(71)	(71)	(6)	(78)	(22)

[0349]

[0350] ¹⁾ 초점 염색 패턴은 배제되었다

[0351] NSCLC 종양에 대한 염색 점수의 요약

유형	하위유형	샘플 수 (%)						
		총	≥ 3 헤테로 ⁱ⁾	≥ 2 헤테로 ^a	≥ 1 헤테로 ^a	1-3 초점	임의의 양성	음성
아테노-암종	All ^b	67	17	39	42	5	47	20
		(100)	(25)	(58)	(63)	(7)	70	30
	명시된 세기관지폐 포	7	2	5	5	0	5	2
		(100)	(29)	(71)	(71)	(0)	(71)	(29)
편평상피 세포 암종	All	74	1	4	6	6	12	62
		(100)	(1)	(5)	(8)	(8)	(16)	(84)

[0352]

[0353] ⁱ⁾ 초점 염색 패턴은 배제되었다

[0354] 모든 선암종 샘플은 명시된 세기관지폐포 암종 샘플을 제외하고 포함되었다

[0355] 자궁내막의 선암종 및 신장의 투명 세포 종양에 대한 염색 점수 요약

종양/하위유형	샘플 수(%)						
	총	≥ 3 헤테로 ^a	≥ 2 헤테로 ^a	≥ 1 헤테로 ^a	1-3 초점	임의의 양성	음성
자궁내막/아테 노-암종	58	5	23	30	10	40	18
	(100)	(9)	(40)	(52)	(17)	(69)	(31)
신장/투명 세포	34	0	9	23	6	29	5
	(100)	(0)	(26)	(68)	(18)	(85)	(15)

[0356]

[0357] 초점 염색 패턴이 배제되었다

[0358] 본 연구 검정의 정밀도는 난소, NSCLC, 또는 신장 종양의 3 FFPE 종양 조직 샘플을 사용하여 당해 검정의 인트라-런(intra-run) 및 인터-런(inter-run) 재현성을 평가함으로써 조사했고, 여기서 각 샘플은 높은, 중간 또는 낮은 점수를 나타낸다. 인트라-런 재현성에 대해, 각각 폐, 난소, 및 신장 종양의 섹션을 함유하는 9 슬라이드를 레이카 본드 RX 위에 9 랜덤 위치에 두었다. 인터-런 재현성에 대해, 동일한 샘플로부터의 섹션을 함유하는 3 슬라이드를 3일의 다른 날에 염색했다. 인트라-런 및 인터-런 재현성 실험 둘 모두로부터의 모든 슬라이드를 평가했고 각각의 샘플: 폐 종양 (높음: 3 호모), 난소 종양 (중간: 2 헤테로), 및 신장 종양 (낮음: 1-2 헤테로)에 대해 동등한 염색 결과를 보여주었다. 이 데이터는 낮은, 중간 및 높은 수준의 발현을 갖는 조직 유형에 걸쳐 재현성을 실증했다.

[0359] 실시예 11

[0360] IHC에 의한 ≥ 2 이질의 FOLR1 발현 점수는 IMGN853으로의 치료를 위한 환자 선택 기준이다.

[0361] 종양 세포주에서 FOLR1-발현의 수준을 항체-PE 콘주게이트 (FR1-24-PE) 및 퀀티브라이트 시스템을 사용하여 측정했다. 3 난소 암종 세포주 (Igrov-1, Skov-3 및 Ovar-3), 유모암종 세포주 Jeg-3 및 자궁경부 암종 세포주 KB를 본 연구에 포함시켰다. 신뢰할 수 있는 ABC 값을 얻기 위해, 항체-PE 콘주게이트와 함께 결합 실험을 포화 농도 (모든 이용가능한 결합 부위가 콘주게이트에 의해 차지되는 농도)에서 수행해야 한다. FR1-24-PE 콘주게이트에 대한 그와 같은 농도를 결정하기 위해, 본 발명자들은 다양한 FOLR1 발현을 갖는 FOLR1-양성 세포주의 패널에 대한 결합 실험을 수행했다. 세포를 얼음에서 2시간 동안 넓은 농도 범위의 FR1-24-PE 콘주게이트와 인큐베이션하고, FACS 완충액 (1% BSA를 포함하는 PBS)으로 세척하고, PBS 중의 1% 포르말데하이드로 고정시키고 FACSCalibur 유세포 분석기에서 분석했다. 1×10^{-8} M의 농도에서 콘주게이트는 모든 시험된 세포주 Igrv-1, Jeg-3, Skov-3, Ovar-3, 및 KB에 대한 세포 표면 결합 부위를 포화했다. 차후 결합 ABC-실험에서, FR1-24-PE

콘주게이트를 1×10^{-8} M의 농도로 사용했다. 각 샘플을 3회 분석했고; 몇 개의 독립적 실험을 각 세포주에 대해 수행했다. 최고 발현은 대략 $4,000,000 \pm 300,000$ 의 ABC 값을 갖는 KB 세포에서 발견되었고, 그 다음은 각각 $400,000 \pm 85,000$ 및 $150,000 \pm 75,000$ 의 ABC 값을 갖는 Igrov-1 및 Jeg-3 세포주였다. 2 세포주, Skov-3 및 Ovc3-3은 각각 $20,000 \pm 10,000$ 및 $7,000 \pm 4,000$ ABC의 낮은 FOLR1 발현을 나타냈다. ABC 값들의 유의미한 실험-대-실험 변동은 Jeg-3 세포에서 관찰되었고, 여기서 상기 ABC-값은 40,000 내지 300,000로 가변적이었다. 이 가변성은, 다른 분석된 세포주에서 얻은 ABC 값들이 훨씬 덜 가변적이었기 때문에, 검정 가변성보다는 세포주의 일부 생물학적 특성을 반영했을 것 같았다 (하기 표 참고).

세포주	ABC (평균 \pm SD, n) ⁱ⁾	실험-대-실험 변화	
		등록된 최고 ABC	등록된 최저 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
Ovc3-3	$7,000 \pm 4,000$	10,000	4,000

ⁱ⁾ SD - 표준 편차; n - 독립적 실험의 수

ABC 값을 FR1-24 PE-표지된 항체를 사용한 FACS 기반 검정 및 퀀티브라이트 시스템에 의해 측정했다. 평균 \pm 표준 편차 (SD)를 독립적 실험에 대해 계산했다.

IMGN853의 효능 및 특이성을 광범위한 FOLR1 발현을 갖는 FOLR1-양성 세포주에 대해 분석했다 (세포주의 ABC 값은 상기 제공되어 있다). 또한, FOLR1-음성 세포주 Namalwa 및 SW2를 실험에 포함시켰다. IMGN853은, 각각 0.10 ± 0.01 nM, 0.50 ± 0.07 nM 및 1.00 ± 0.05 nM의 IC₅₀ 값을 나타내는, 높은 FOLR1 발현 KB ($4,000,000 \pm 300,000$ ABC), Igrov-1 ($400,000 \pm 85,000$ ABC) 및 Jeg-3 ($150,000 \pm 75,000$ ABC)을 갖는 세포에 대해 매우 높은 세포독성이었다. 모든 3 세포주에 대한 세포-사멸 활성은, 과잉의 변형되지 않은 huMov19 (M9346A) 항체 (0.5μ M)가 콘주게이트의 효능을 전형적인 비-특이적 수준 (10 내지 20-배)으로 현저하게 감소시키기 때문에, FOLR1-의존적이었다. IMGN853은 낮은 FOLR1 발현자 Skov-3 및 Ovc3-3 세포 (각각 $20,000 \pm 10,000$ 및 $7,000 \pm 4,000$ ABC), 및 FOLR1-음성 세포 Namalwa 및 SW2 (2 nM 초과 IC₅₀ 값)에 대해 단지 미미하게 활성이었다. 이들 세포주에 대한 IMGN853의 세포독성 활성은 낮았고, huMov19 (M9346A)로의 차단이 그것에 영향을 주지 않았기 때문에 FOLR1-비의존적이었다. 도 19 및 20을 참고한다.

마우스 이중이식 종양 모델로부터 제조된 FFPE 샘플을 상기 기재된 최적화되고 검증된 검정을 사용하여 FOLR1 양성에 대해 평가했다. 대조군 물품으로 염색된 임의 이중이식 샘플의 종양 세포에서 염색은 관찰되지 않았다. 하기 세포주로부터 유래된 FFPE 마우스 이중이식 조직은 하기 염색 패턴을 보여주었다: Igrov-1, KB, 및 NCI-H2110은 수준 3 세기의 동질 염색 패턴을 보여주었고; Ishikawa 및 Ovc3 3은 수준 3 세기의 이질 염색 패턴을 보여주었고; LXFA737은 수준 2 세기의 동질 염색 패턴을 보여주었고; OV-90은 수준 2 세기의 이질 패턴을 보여주었고; SKOV3은 음성이었다. 종양 이중이식편들의 대표적인 사진들은 도 21 및 22에 제공된다.

모세포주 또는 종양 단편	질환 징후	최종 점수	염색 카테고리
IGROV-1	난소암	1-3 호모	3 호모
		1-3 호모	
		1-3 호모	
Ishikawa	자궁내막 암	2-3 헤테로	3 헤테로
		1-2 헤테로/3 초점	
		2 헤테로/3 초점	
		2 헤테로/3 초점	
KB	자궁경부암	3 호모	3 호모
		3 호모	
LXFA737	NSCLC	2 호모	2 호모
		2 호모	
NCI-H2110	NSCLC	2-3 호모	3 호모
		2 호모	
OV-90	난소암	1-2 헤테로	2 헤테로
		음성 ^a	
OVCAR3	난소암	1-3 헤테로	3 헤테로
		1-3 헤테로	
SKOV-3	난소암	음성	음성
		음성	

[0367]

[0368]

염색 역치 (≥ 2 이질)는 최소 발현 수준 (염색 세기) 및 최소 염색 분포 (종양 세포 발현 FOLR1의 백분율) 둘 모두가 필요하다. 전-임상 데이터는 난소 암종에서 이 역치에 대한 정당한 근거를 제공한다. ≥ 2 이질의 IHC 점수를 갖는 마우스 이종이식 종양 샘플은 생체내에서 IMGN 853에 대해 민감도를 나타낸다. 마우스 이종이식 난소 종양 모델로부터 제조된 FFPE 샘플을 상기 기재된 최적화되고 검증된 검정을 사용하여 FOLR1 양성에 대해 평가했다. 2 난소 암종 이종이식 모델 OVCAR-3, 및 IGROV-1은 수준 3 세기의 이질 또는 동질 염색 패턴을 보여주었다. OV-90 난소 암종 세포로부터 유래된 이종이식 모델은 수준 2 세기의 이질 염색 패턴을 보여주었고; Skov-3 난소 암종 모델은 FOLR1-음성이었다. IMGN853은 수준 3 FOLR1 세기로 2 난소 모델에서 고효능이었고, 수준 2 FOLR1 세기로 OV-90 모델에서 활성이었다. SKOV-3 모델에서는 활성이 관찰되지 않았다. 이종이식 모델을 또한 폐, 자궁내막, 및 자궁경부 종양을 포함하는 다른 질환 징후에 대해 평가했고, 활성 및 FOLR1 염색 점수 사이에 상관관계가 검출되었다라도, 부가적 샘플이 시험되어야 했다.

[0369]

IMGN853에 대한 난소 종양 이종이식 모델의 민감도 대 FOLR1 발현 수준

이종이식	생체내 활성 (5 mg/kg 의 IMGN853, 단일 용량)	세기 점수, 분포
OVCAR3	고활성	3 헤테로
IGROV-1	고활성	3 호모
OV-90	활성	2 헤테로
SKOV-3	불활성	음성

[0370]

[0371] IMGN853에 대한 다른 종양 이중이식 모델의 민감도 대 FOLR1 발현 수준

이종이식	종양의 유형	생체내 활성 (5 mg/kg 의 IMGN853, 단일 용량)	세기 점수, 분포
NCI-H2110	NSCLC	고활성	3 호모
Ishikawa	자궁내막	불활성	2 호모
KB	자궁경부	고활성	3 호모

[0372]

[0373] 본원에 언급된 모든 공보, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트, 및 승인 번호/데이터베이스 서열 (폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열 둘 모두를 포함)은 각각의 개별적인 공보, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트, 또는 승인 번호/데이터베이스 서열이 참조로 인용되는 것으로 구체적으로 그리고 별도로 지시되는 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그의 전체가 본원에 참조로 인용된다.

서열

서열번호:1 - 인간 엽산 수용체 1

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIA 사마귀 ELLNVCMAKHHKEKPGPEDKLHEQC
RPWRKNACSTNTSQAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPW
IQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKA
VGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPN
EEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

서열번호:2 - 인간 엽산 수용체 1 핵산 서열

atggtcagcggatgacaacacagctgctgctccttctagtgtgggtggctgtagtaggggaggctcagacaaggattgcatgggccaggact
gagcttctcaatgtctgcatgaacgccaagcaccacaaggaaaagccaggccccgaggacaagttgcatgagcagtgctgacctggagga
agaatgcctgctgttctaccaacaccagccaggaagcccataaggtatgttctacatatagattcaactggaaccactgtggagagatggca
cctgctgcacaacggcatttcatccaggacactgctctacagtgctcccccaactggggccctggatccagcaggtggatcagagctgg
cgcaagagcgggtactgaacgtgccccgtgcaagaggactgtgagcaatggtgggaagattgtcgacctctacacctgcaagagcaa
ctggcacaagggctggaactggacttcagggttaacaagtgccagtgaggagctgctgccaacctttccatttctacttccccacccactg
ttctgtgcaatgaaatctggactcactctacaaggtcagcaactacagccgaggagtgccgctgcatccagatgtgtgtcgaccagccca
gggcaaccccaatgaggaggtggcgagggttctatgctgcagccatgagtgaggctgggcctgggcagcctggccttctctgcttagcctgg
ccctaagctgctgtgctgctcagc

서열번호:3 - huMov19 vHC

QVQLVQSGAEVVKP 가스 VKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTF
YNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTITVTVSS

서열번호:4 - huMov19 vLCv1.00

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNL
EAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGTKLEIKR

서열번호:5 - huMov19 vLCv1.60

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNL
EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGTKLEIKR

[0374]

수탁번호

[0375]

기탁기관명 : 미국 종균 협회 (ATCC)

수탁번호 : PTA-10772

수탁일자 : 20100407

기탁기관명 : 미국 종균 협회 (ATCC)

수탁번호 : PTA-10773

수탁일자 : 20100407

기탁기관명 : 미국 종균 협회 (ATCC)

수탁번호 : PTA-10774

수탁일자 : 20100407

기탁기관명 : 미국 종균 협회 (ATCC)

수탁번호 : PTA-10775

수탁일자 : 20100407

기탁기관명 : 미국 종균 협회 (ATCC)

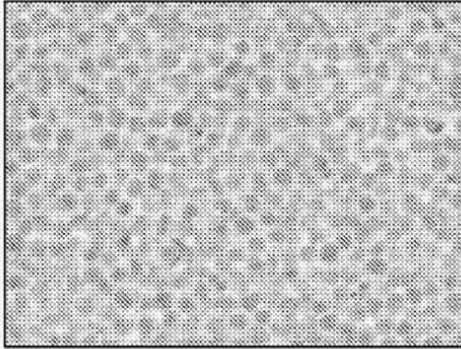
수탁번호 : PTA-10776

수탁일자 : 20100407

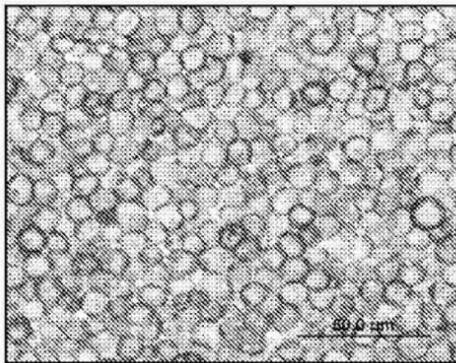
도면

도면1

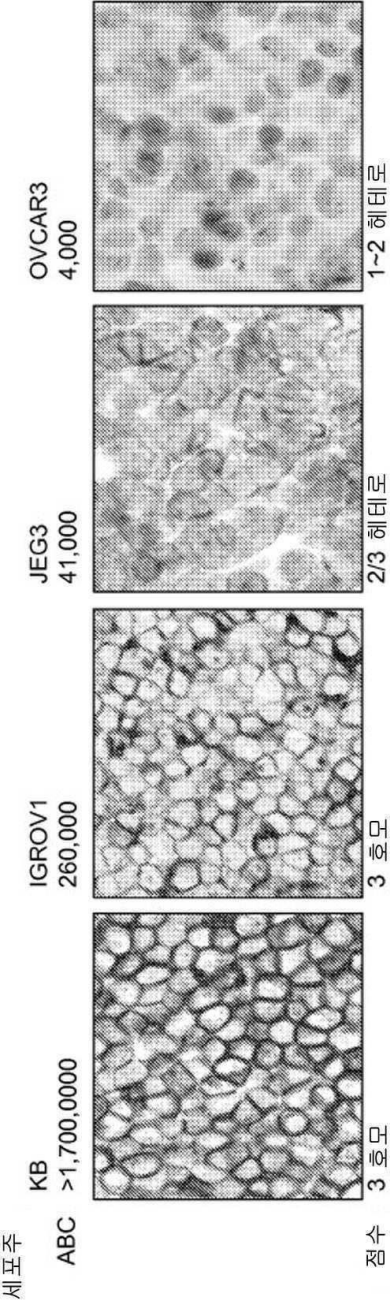
A. 300-19 세포



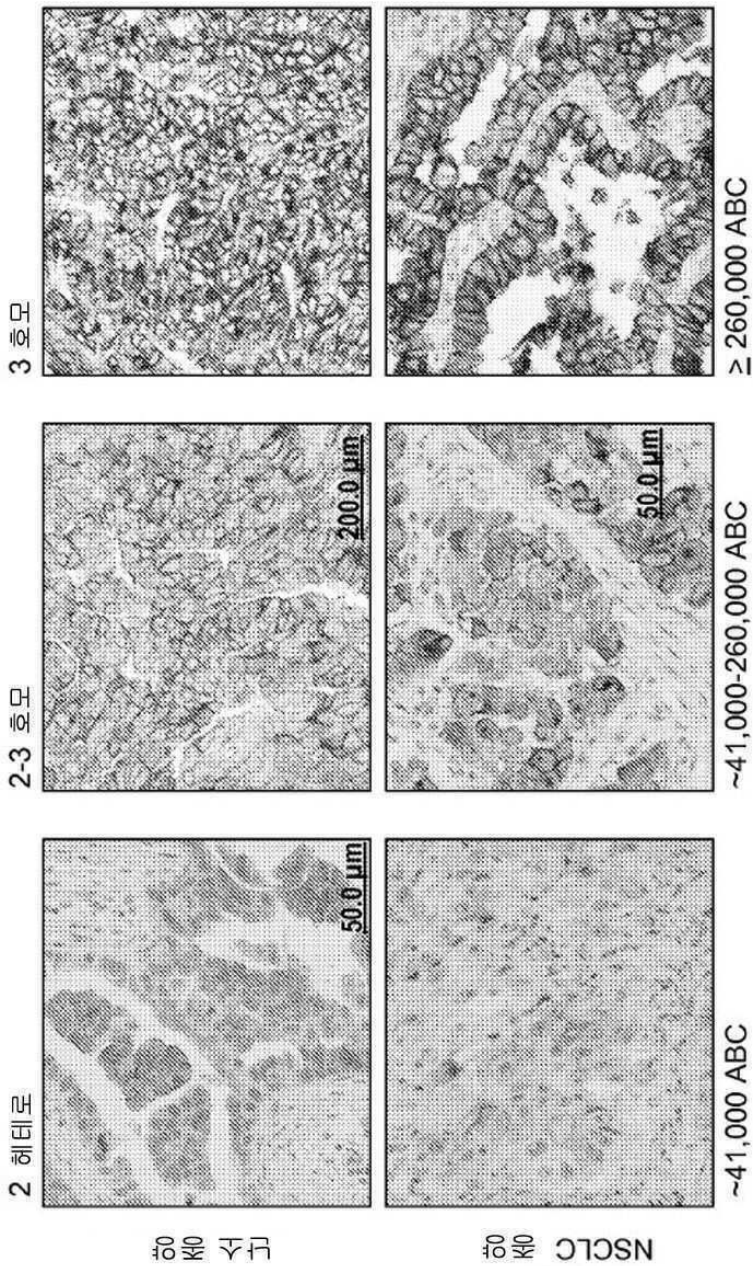
B. FOLR1으로 전달감염된 300-19 세포



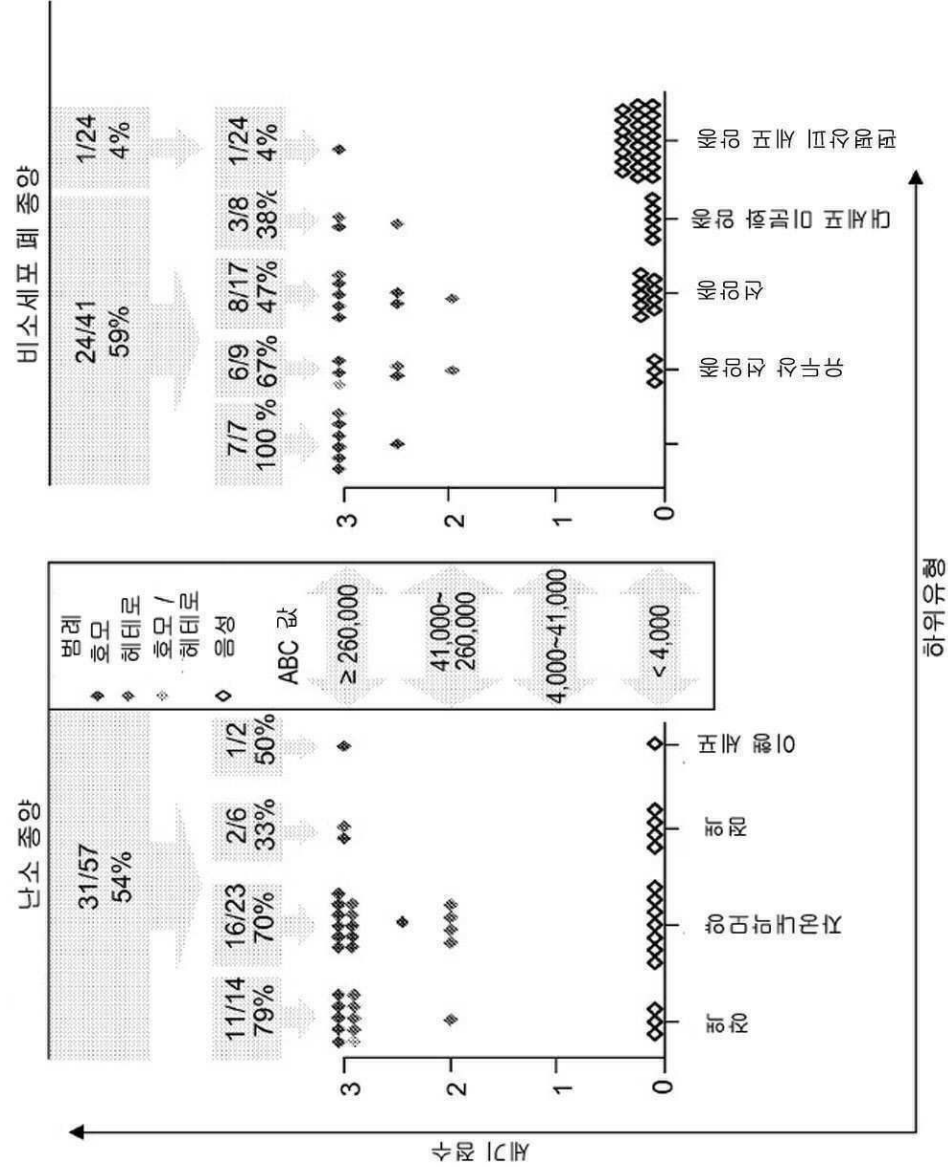
도면2



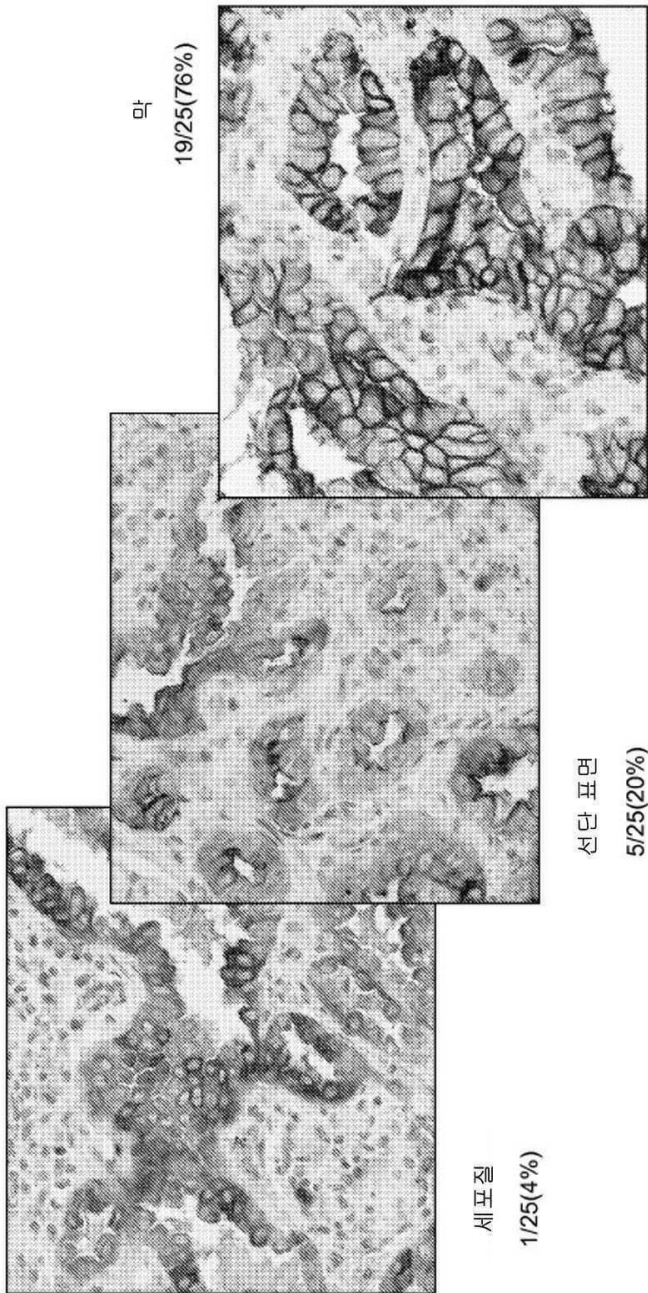
도면3



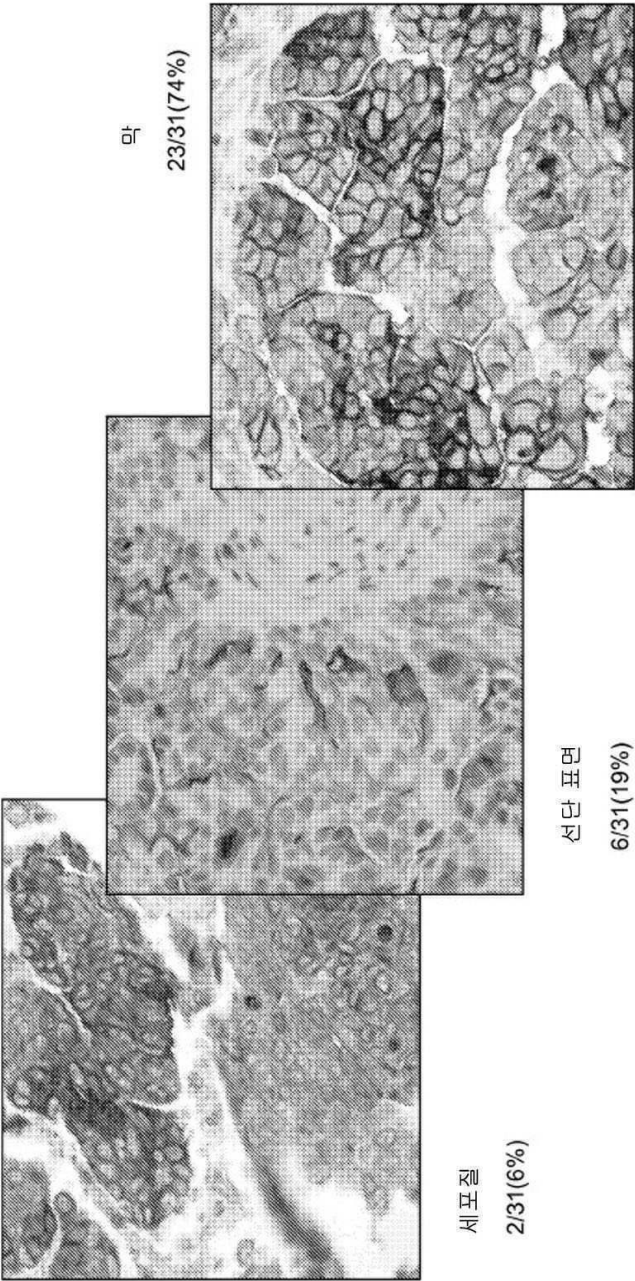
도면4



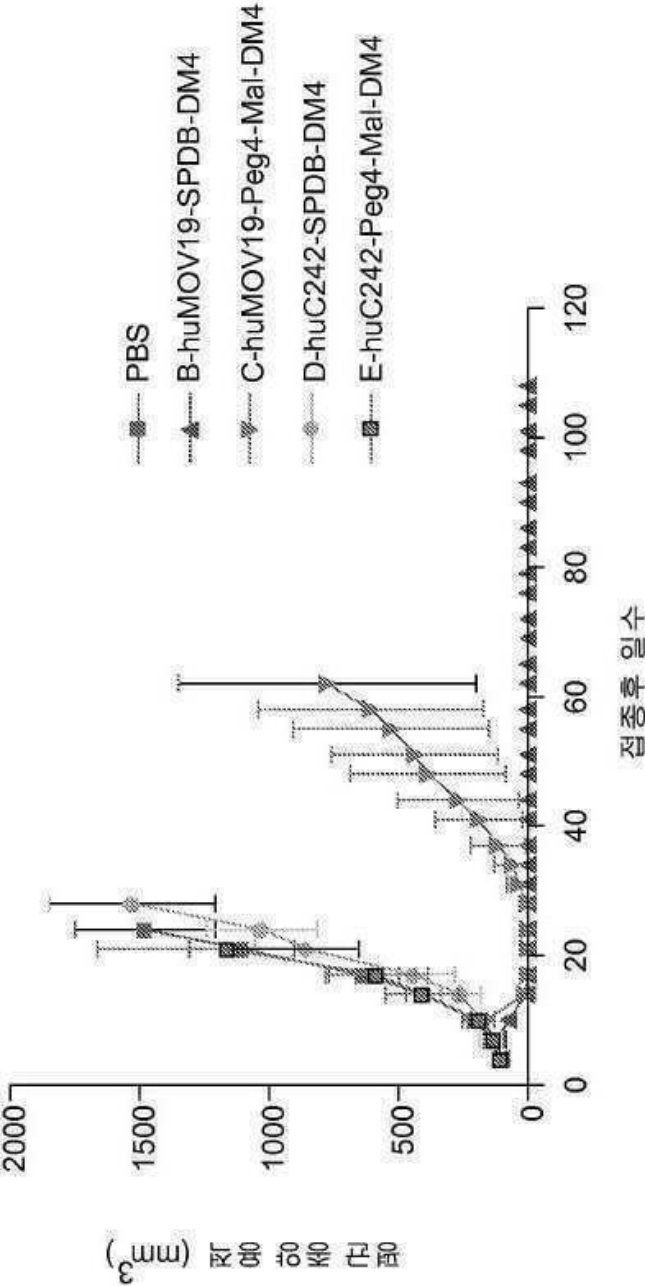
도면5



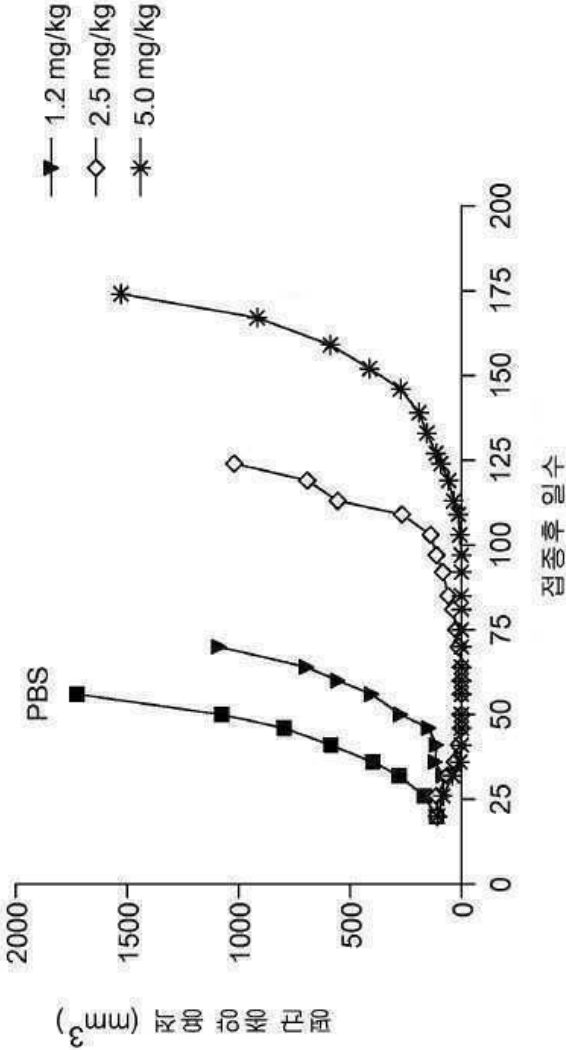
도면6



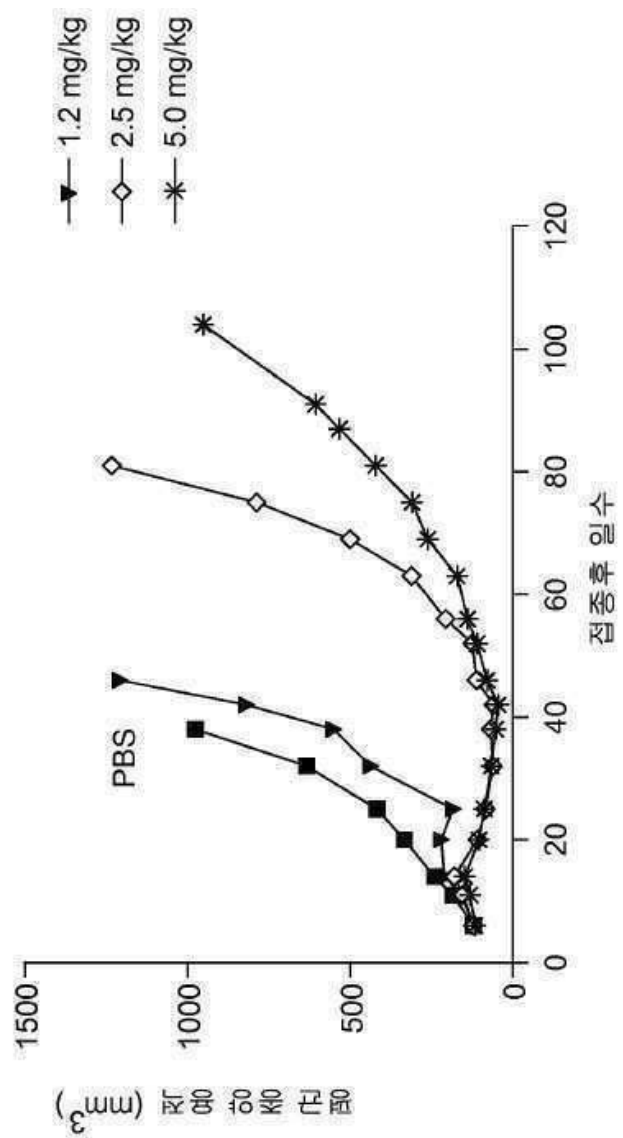
도면7



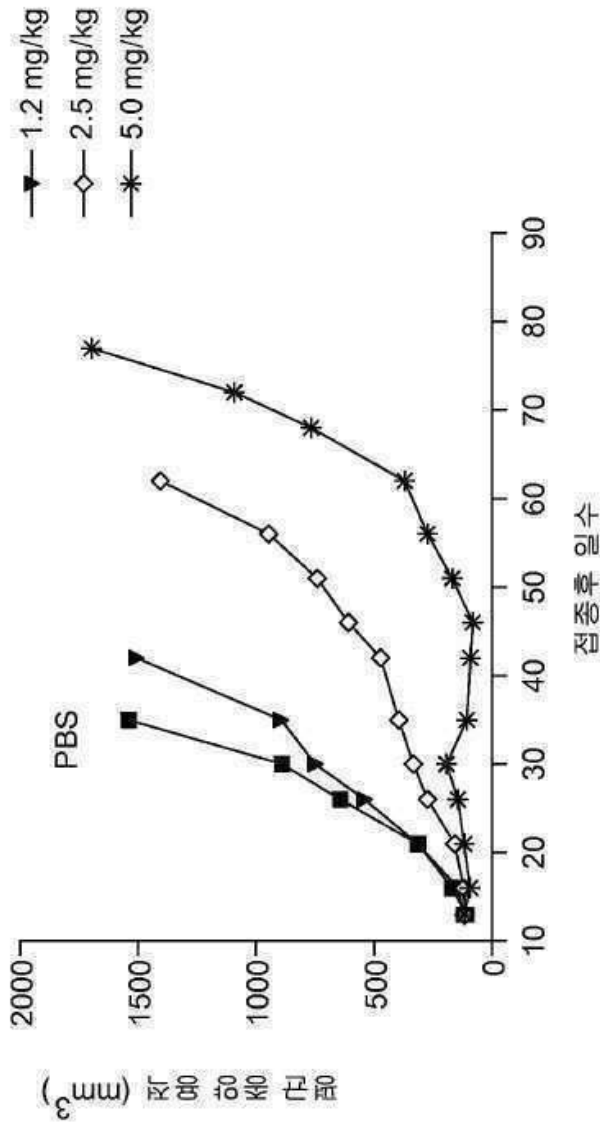
도면8



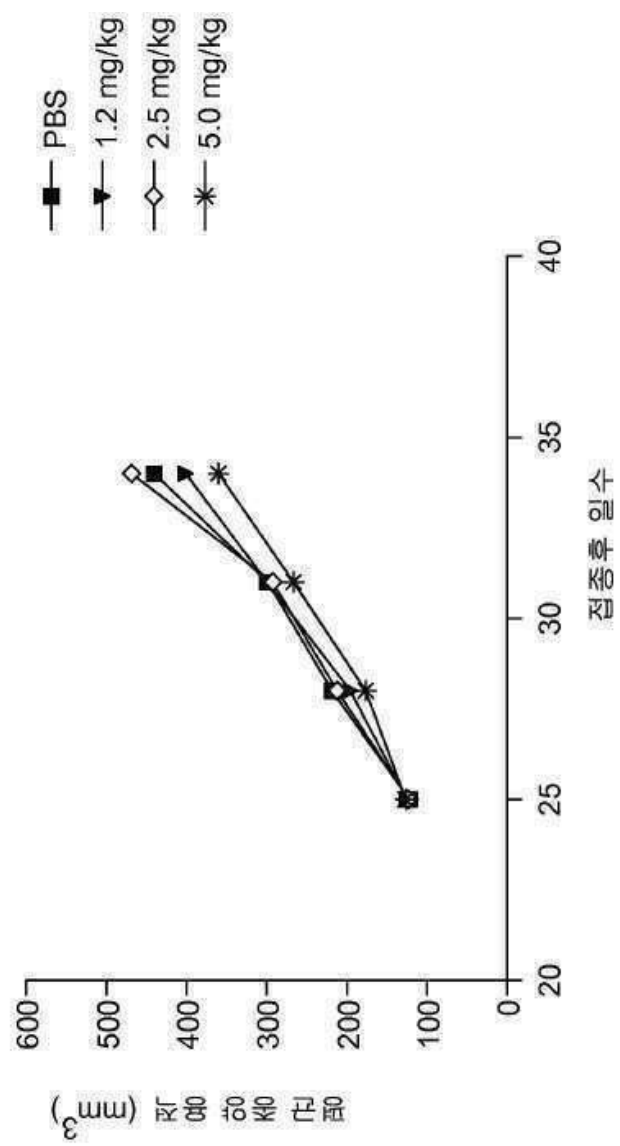
도면9



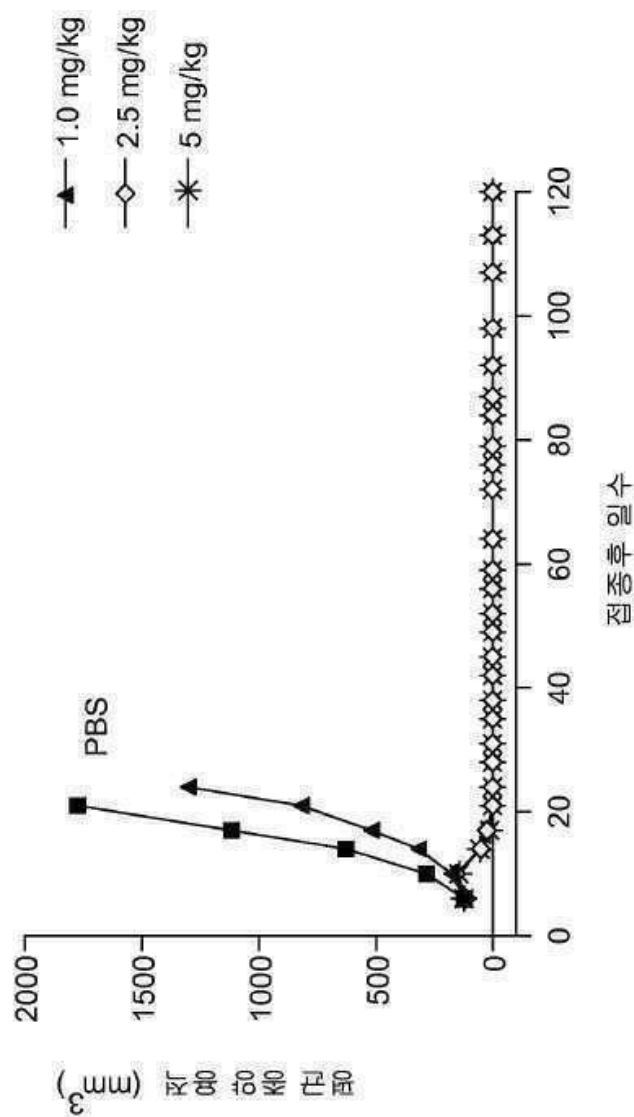
도면10



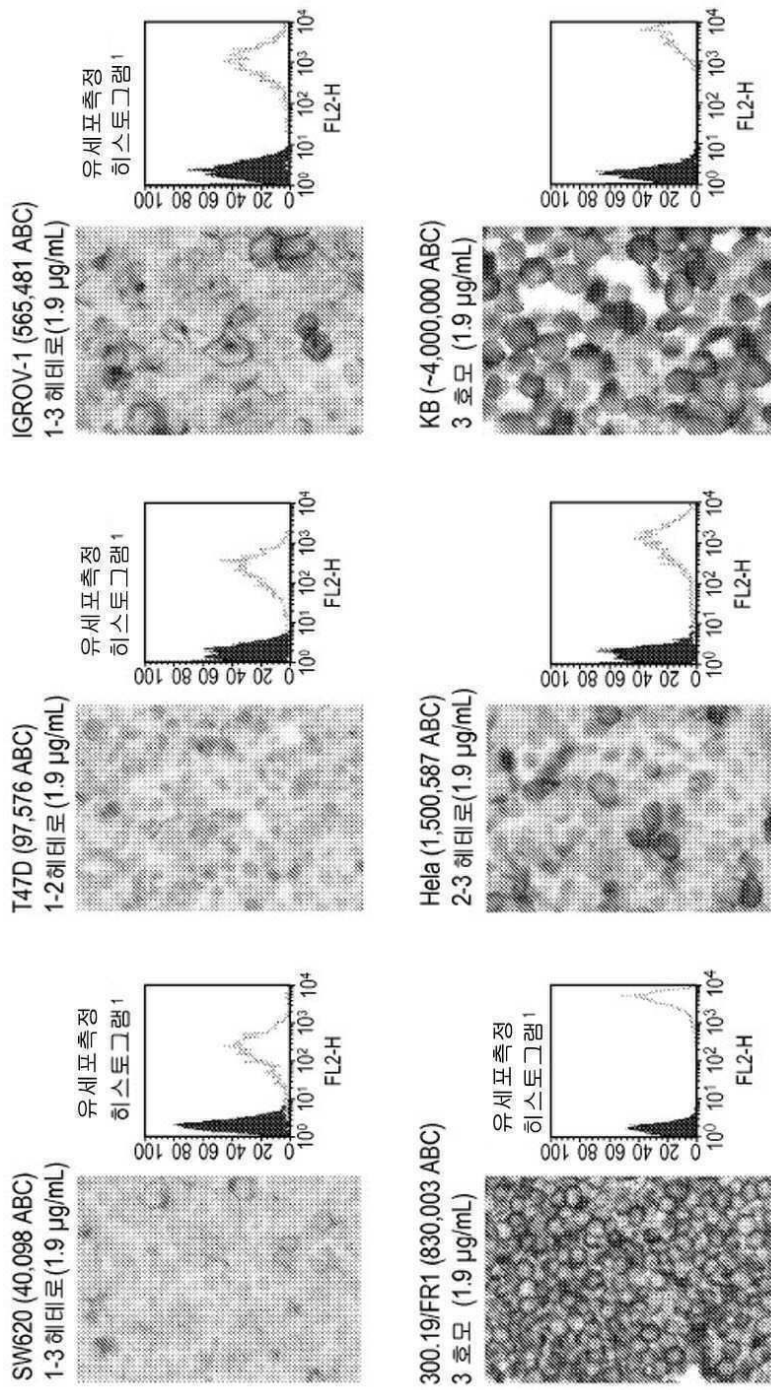
도면11



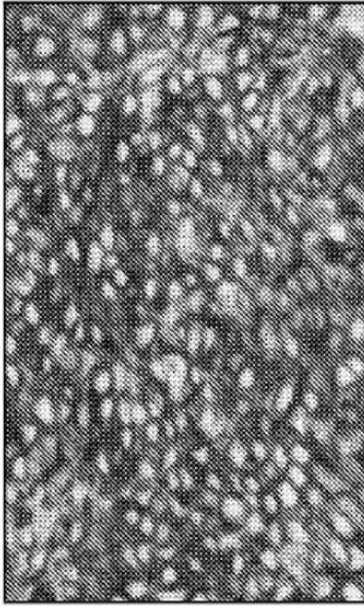
도면12



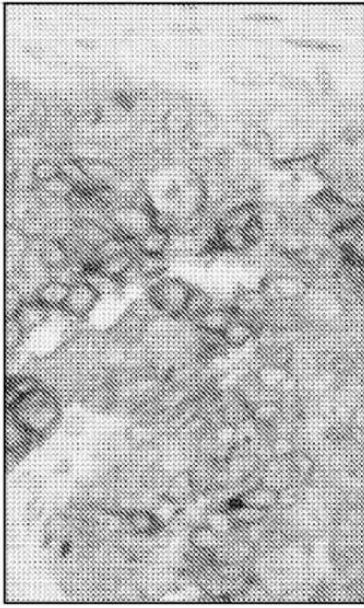
도면13



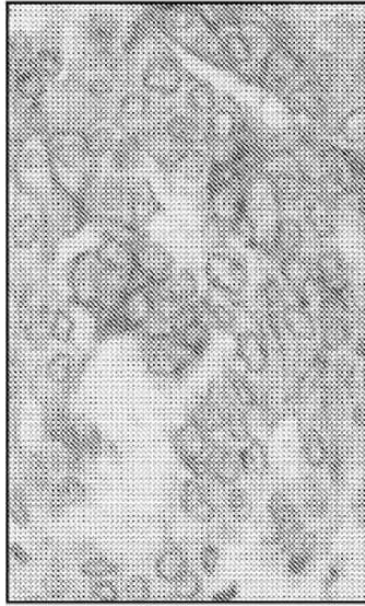
도면14



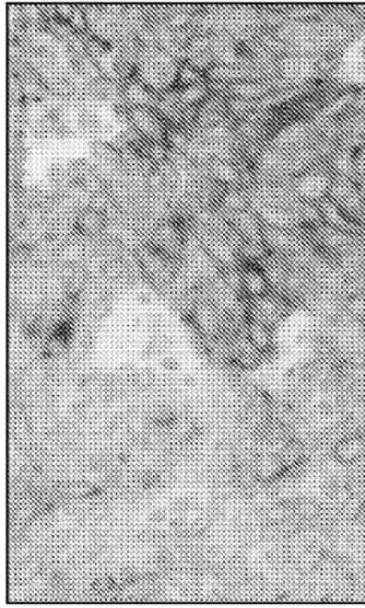
3 호모 (코아 H13, Pantomics)



2-3 호모 (코아 G03, Pantomics)

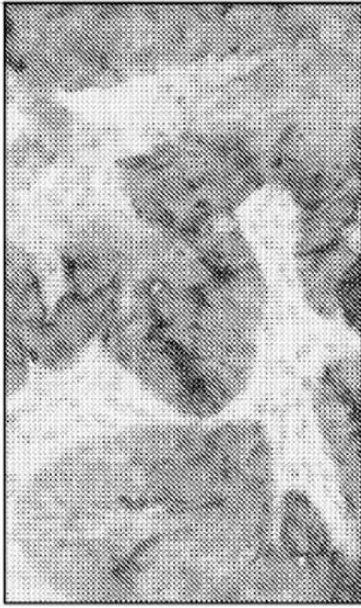


2 호모 (코아 A07, Pantomics)

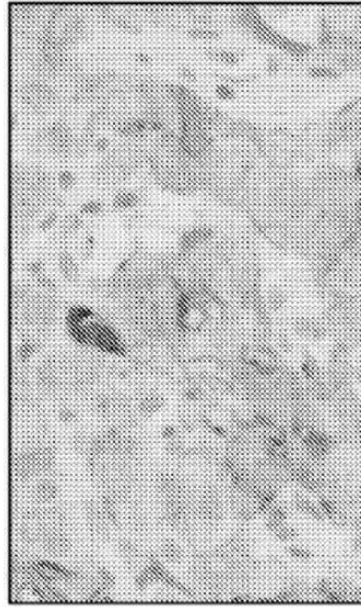


2 헤테로 (코아 D08, Pantomics)

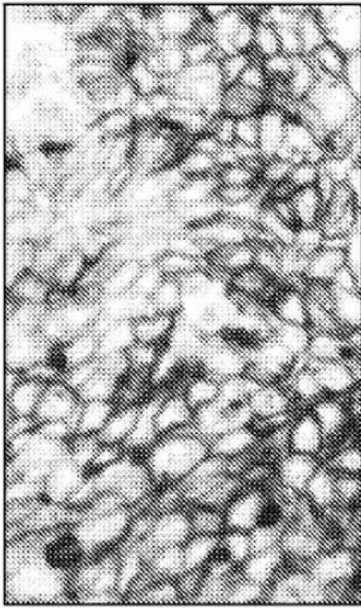
도면15



2-3 호모 (P-T-OVA-032610-1)



1-2 헤테로 (코아 G14, Pantomics)

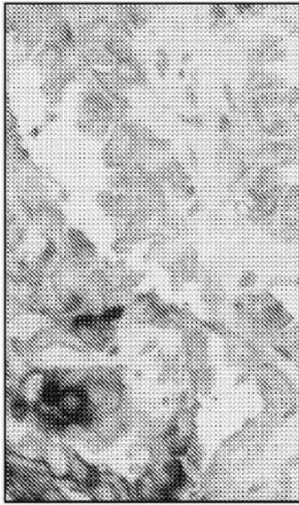


3 호모 (코아 A12, Pantomics)

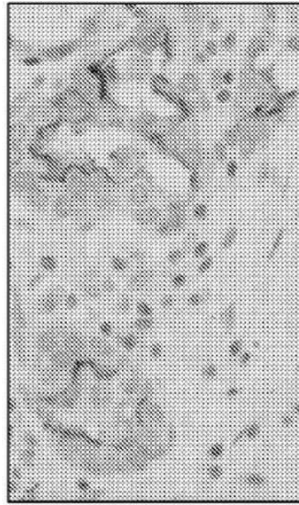


3 초점 (코아 E11, Pantomics)

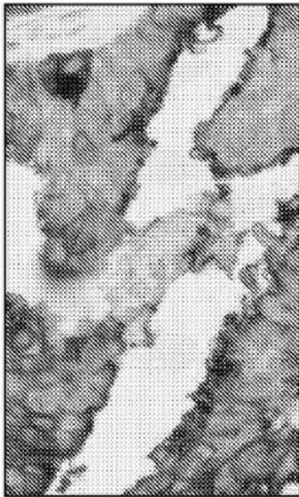
도면16



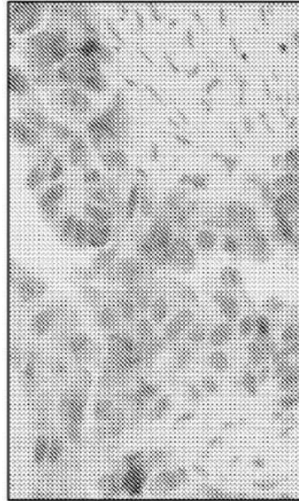
2-3 호모 (코아 J05, Pantomics)



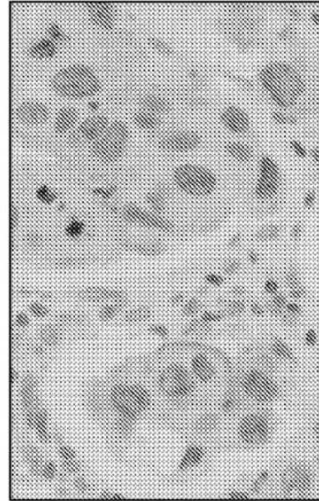
2 호모 초점 (코아 G10, Pantomics)



3 호모 (코아 F03, Pantomics)



2세포로 (코아 29, Tristar)



1-2 세포로 (코아 H15, Pantomics)

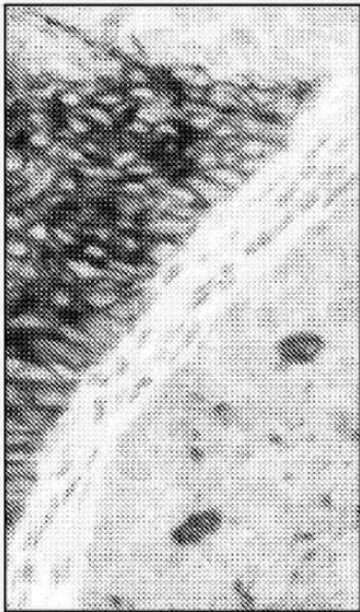
도면17



2 헤테로 (코아 G08, Pantomics)



1 헤테로 (코아 I11, Pantomics)

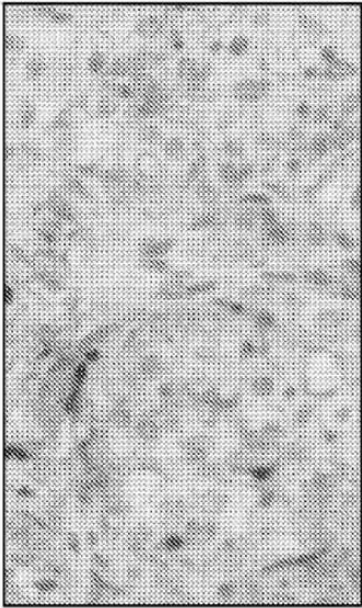


3 헤테로 (코아 I04, Pantomics)

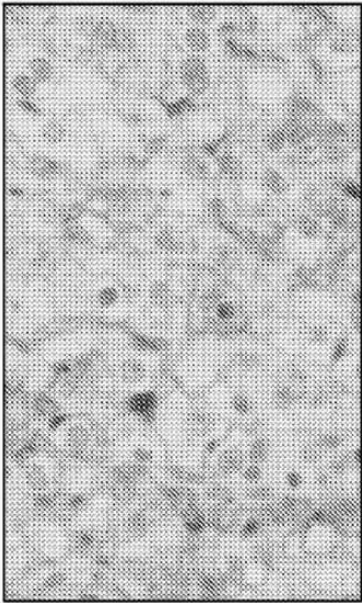


2 헤테로 (코아 G10, Pantomics)

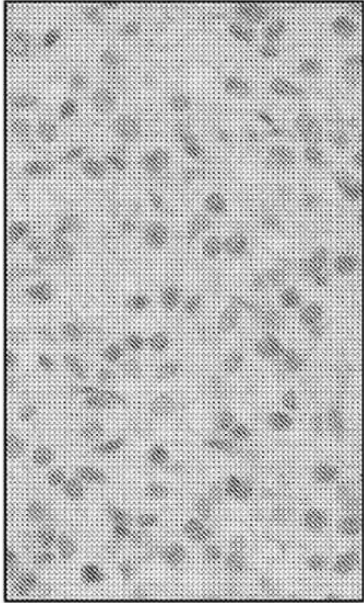
도면18



2 헤테로 (코아 G02, Pantomics)

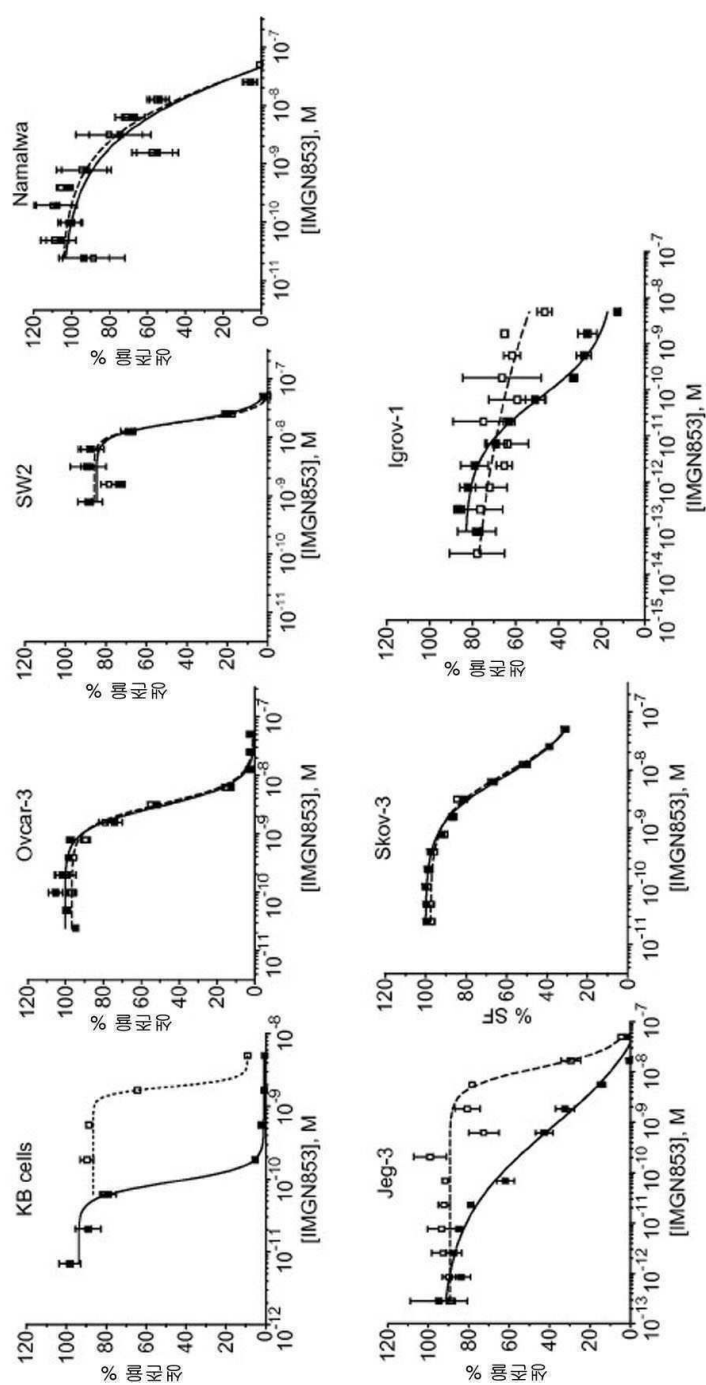


2 호모 (코아 C05, Pantomics)

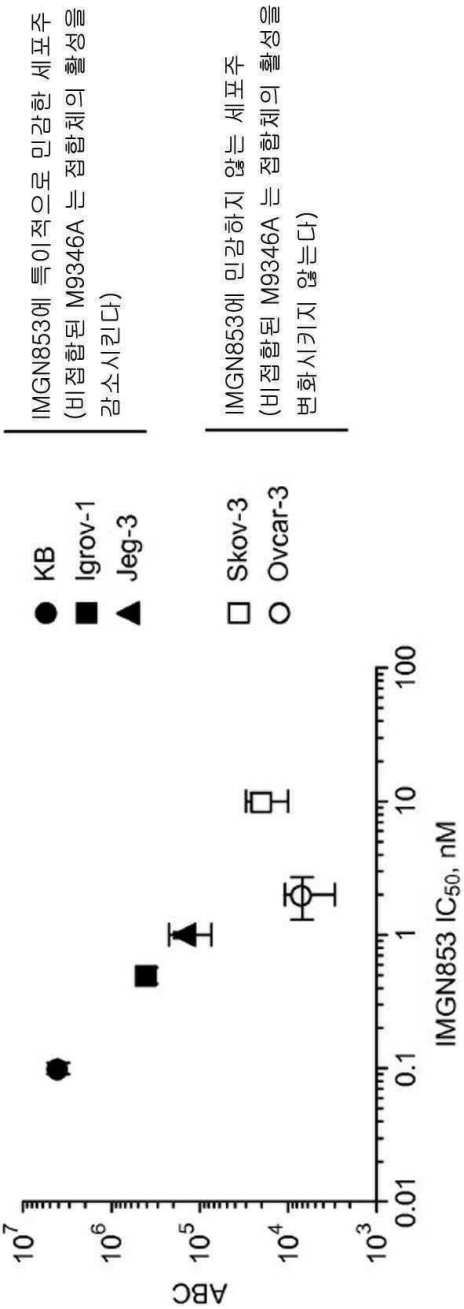


1 헤테로 (코아 E05, Pantomics)

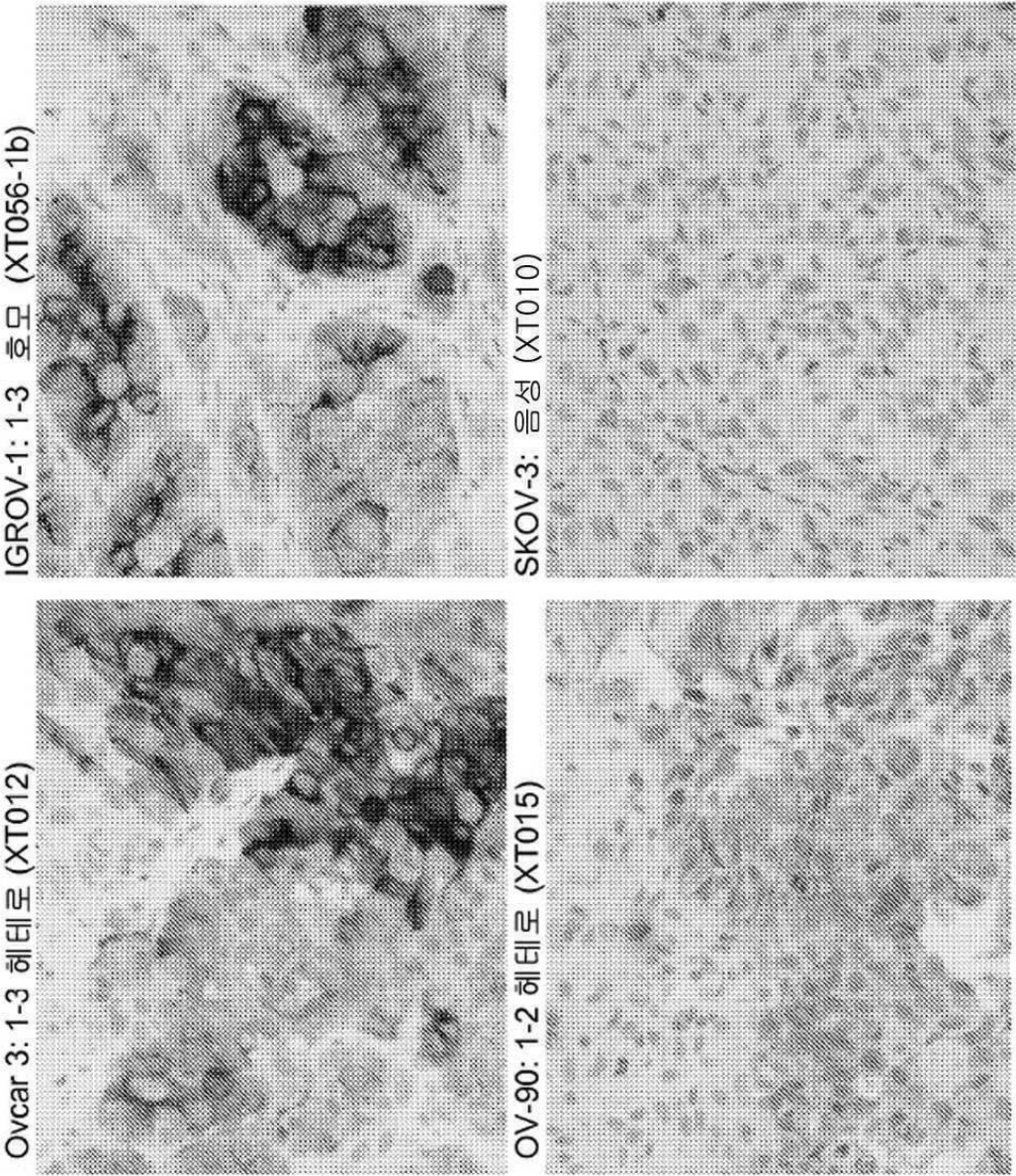
도면19



도면20



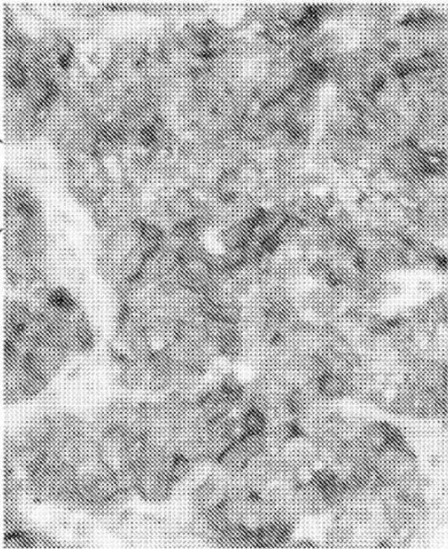
도면21



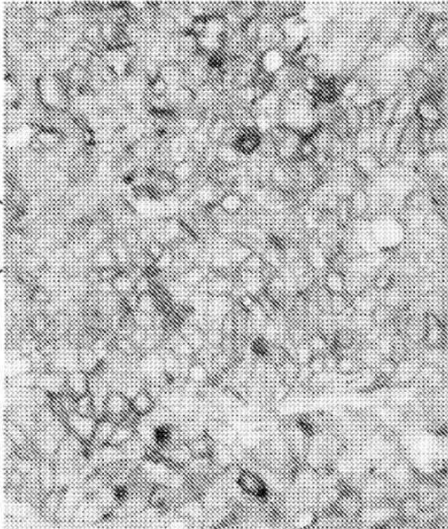
도면22

A. NSCLC

NCI-H2110: 2-3 호모 (XT097)

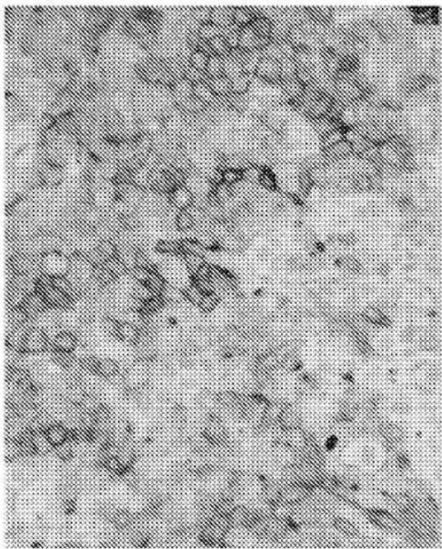


LXFA737: 2 호모 (5374)



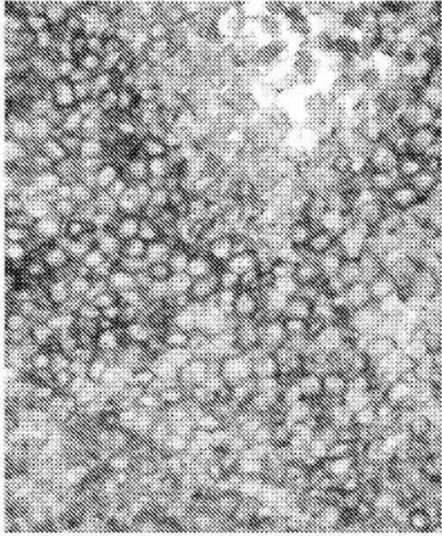
B. 자궁내막 종양

Ishikawa: 2 헤테로/3 초점 (XT054)



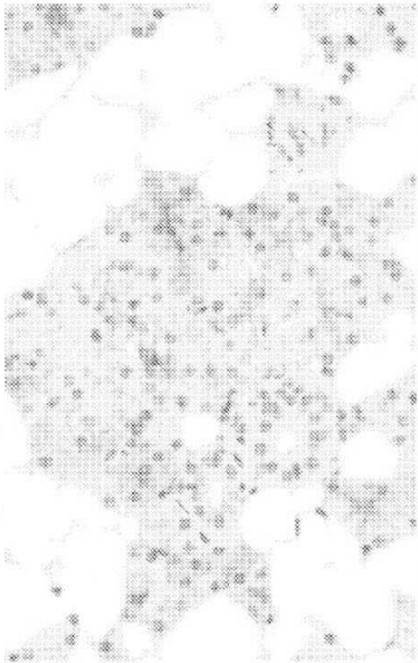
C. 자궁경부 종양

KB: 3 호모 (XT005)



도면23

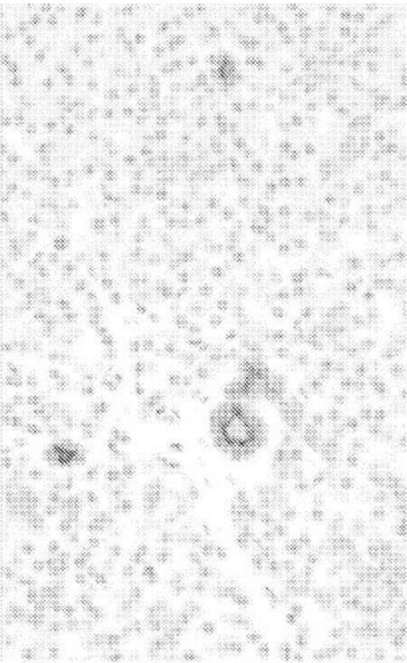
타액샘, 사이관: 1-2 헤테로



식도, 0 (음성)



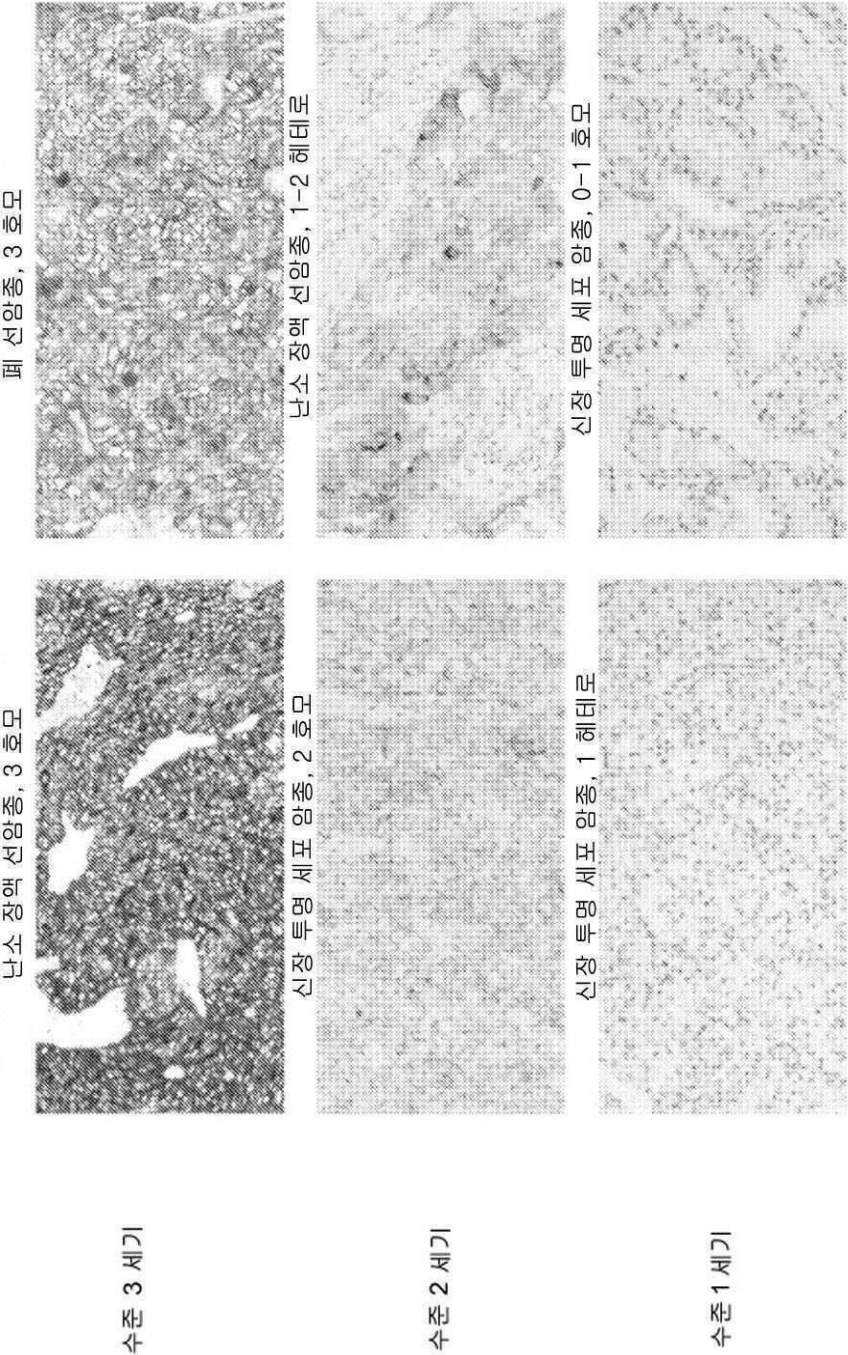
체장, 관: 3 호모



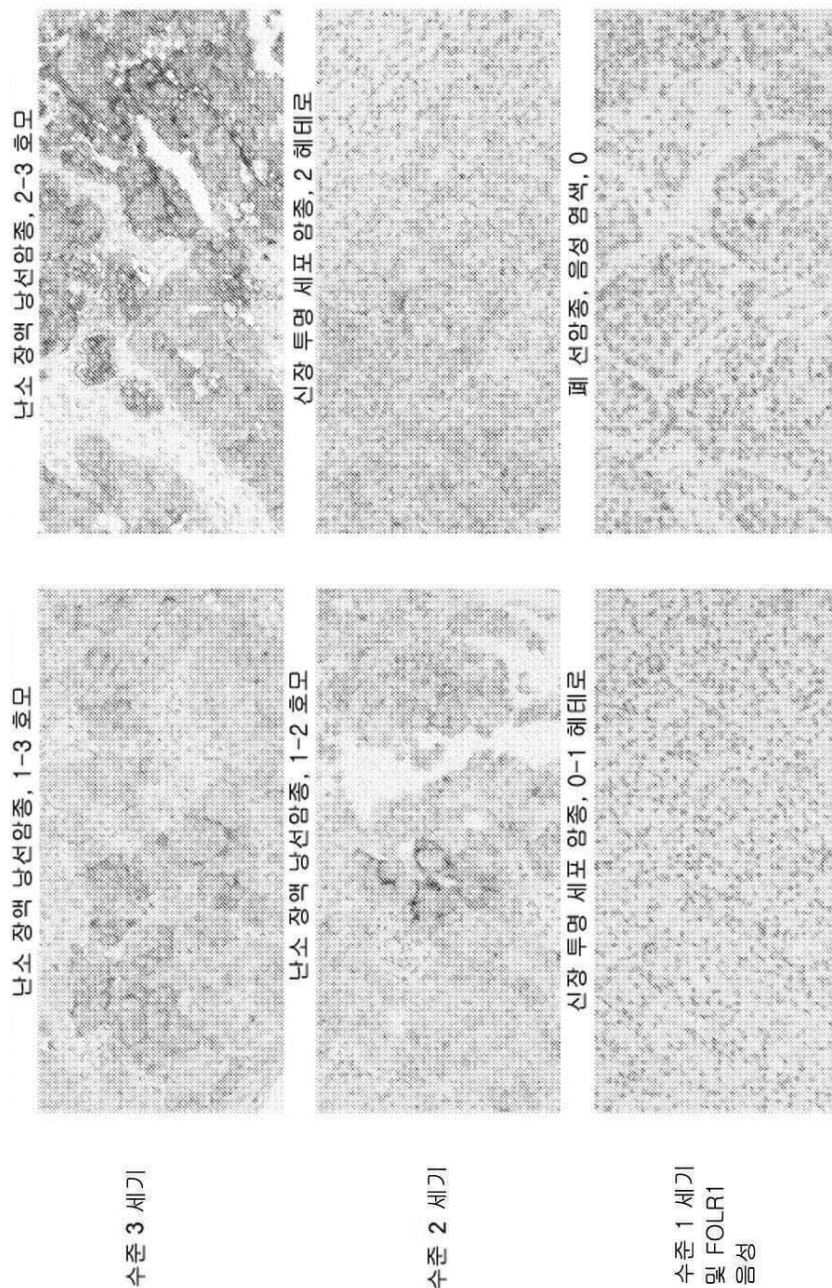
폐, 호흡 상피: 2호모



도면24



도면25



서열 목록

- <110> Immunogen, Inc.
CARRIGAN, Christina N.
WHITEMAN, Kathleen R.
PAYNE, Gillian
LADD, Sharron
- <120> METHODS FOR INCREASING EFFICACY OF FOLR1 CANCER THERAPY
- <130> 2921.015PC01
- <140> PCT/US2012/031544

<141> 2012-03-30
 <150> US 61/471,007
 <151> 2011-04-01
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

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

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

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

145 150 155 160
 Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175

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

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 225 230 235 240
 Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255
 Ser

<210> 2

<211> 771

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctcttcttag tgtgggtggc tgtagtaggg 60
 gaggctcaga caaggattgc atgggccagg actgagcttc tcaatgtctg catgaacgcc 120
 aagcaccaca aggaaaagcc agggccccgag gacaagttgc atgagcagtg tcgaccctgg 180

aggaagaatg cctgctgttc taccaacacc agccaggaag ccataagga tgtttcttac 240
 ctatatagat tcaactggaa ccaactgtga gagatggcac ctgcctgcaa acggcatttc 300
 atccaggaca cctgcctcta cgagtgtcc cccaacttgg ggccctggat ccagcaggtg 360
 gatcagagct ggcgcaaaga gcggtactg aacgtgcccc tgtgcaaaga ggactgtgag 420
 caatggtggg aagattgtcg cacctcctac acctgcaaga gcaactggca caagggttgg 480
 aactggactt cagggtttta caagtgcgca gtgggagctg cctgccaacc ttccatttc 540
 tacttccca caccactgt tctgtgcaat gaaatctgga ctactccta caaggtcagc 600

aactacagcc gagggagtgg ccgtgcac cagatgtggt tcgaccagc ccagggcaac 660
 cccaatgagg aggtggcgag gttctatgct gcagccatga gtggggctgg gcctgggca 720
 gcctggcctt tctgtcttag cctggcccta atgtgtgtgt ggctgtcag c 771

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vHC

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vLCv1.00

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

100 105 110

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vLCv1.60

<400> 5

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

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