



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107011439 B

(45) 授权公告日 2020.11.10

(21) 申请号 201611025725.1
 (22) 申请日 2012.07.13
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107011439 A
 (43) 申请公布日 2017.08.04
 (30) 优先权数据
 61/508,444 2011.07.15 US
 61/604,412 2012.02.28 US
 61/604,954 2012.02.29 US
 (62) 分案原申请数据
 201280043606.2 2012.07.13
 (83) 生物保藏信息
 ATCC PTA-11885 2011.05.19
 ATCC PTA-11884 2011.05.19
 ATCC PTA-11886 2011.05.19

ATCC PTA-11887 2011.05.19
 (73) 专利权人 卫材R&D管理有限公司
 地址 日本东京都
 (72) 发明人 丹尼尔·约翰·奥珊尼斯
 (74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
 责任公司 11219
 代理人 金海霞 杨青
 (51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 C12N 15/13 (2006.01)
 G01N 33/82 (2006.01)
 G01N 33/574 (2006.01)
 审查员 王鹏

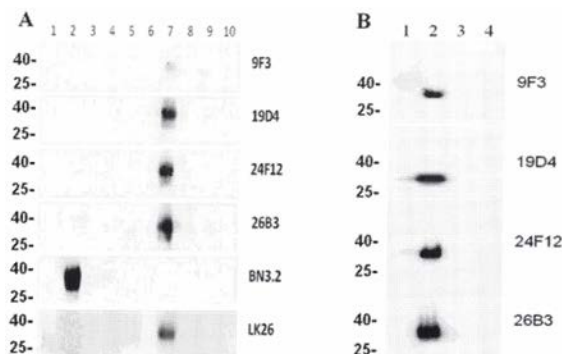
权利要求书5页 说明书61页
 序列表31页 附图20页

(54) 发明名称

抗叶酸受体 α 抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及抗叶酸受体 α 抗体及其应用。具体地,本文描述了特异性针对叶酸受体 α 的抗体及其抗原结合片段、相关的多核苷酸、表达载体和表达所述抗体的细胞。本文还提供了使用所述抗体及其抗原结合片段的方法和相关的试剂盒。本文还提供了使用所述抗体及其抗原结合片段来诊断癌症例如乳腺癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、输卵管癌、卵巢癌或肺癌的方法。所述方法包括测定源自于对象的样品中叶酸受体 α 的量,并将该水平与对照样品或参比样品中叶酸受体 α 的水平进行比较。



1. 一种特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体,其包含:

a. 由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的轻链CDR2、由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的轻链CDR3、由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的重链CDR2以及由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的重链CDR3;

b. 由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的轻链CDR2、由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的轻链CDR3、由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的重链CDR2以及由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成的重链CDR3;或者

c. 由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的轻链CDR2、由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的轻链CDR3、由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的重链CDR2以及由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链CDR3。

2. 权利要求1的分离的抗体,其中所述抗体是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

3. 权利要求1的分离的抗体,其包括由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的轻链可变区和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的重链可变区。

4. 权利要求1的分离的抗体,其包括由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成的轻链可变区和由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成的重链可变区。

5. 权利要求1的分离的抗体,其包括由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的轻链可变区和由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链可变区。

6. 一种分离的多核苷酸,其编码特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的抗体,其中:

a. 所编码的抗体的轻链CDR1由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成,所编码的抗体的轻链CDR2由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成,所编码的抗体的轻链CDR3由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成,所编码的抗体的重链CDR1由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成,所编码的抗体的重链CDR2由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成,并且所编码的抗体的重链CDR3由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成;

b. 所编码的抗体的轻链CDR1由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成,所编码的抗体的轻链CDR2由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成,所编码的抗体的轻链CDR3由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成,所编码的抗体的重链CDR1由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成,所编码的抗体的重链CDR2由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成,并且所编码的抗体的重链CDR3由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成;或者

c. 所编码的抗体的轻链CDR1由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成,所编码的抗体的轻链CDR2由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成,所编码的抗体的轻链CDR3由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成,所编码的抗体的重链CDR1由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成,所编码的抗体的重链CDR2由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成,并且所编码的抗体的重链CDR3由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成。

7. 权利要求6的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:49的核酸序列。

8. 权利要求6的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48的核酸序列。

9. 权利要求6的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:57的核酸序列。
10. 权利要求6的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56的核酸序列。
11. 权利要求6的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:41的核酸序列。
12. 权利要求6的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的核酸序列。
13. 一种载体,其包含权利要求6至12任一项的分离的多核苷酸。
14. 一种重组细胞,其包含权利要求13的载体。
15. 权利要求14的重组细胞,其中所述细胞是真核细胞、植物细胞或细菌。
16. 一种特异性针对叶酸受体 α (FR α)的分离的抗体,其由保藏在ATCC并且登记号为PTA-11884、PTA-11886或PTA-11887的细胞系产生。
17. 权利要求1或16的抗体在制备用于通过包括以下步骤的方法在生物样品中检测叶酸受体 α (FR α)或表达FR α 的癌症的试剂盒中的应用:将所述样品暴露于权利要求1或16的抗体,以及检测叶酸受体 α (FR α)。
18. 权利要求17的应用,其中所述生物样品源自于人类、啮齿动物、非人类灵长动物、兔或狗。
19. 权利要求1或16的抗体在制备用于通过包括以下步骤的方法诊断对象中表达叶酸受体 α 的癌症的试剂盒中的应用:
 - a. 将所述对象的生物样品暴露于权利要求1或16的抗体;
 - b. 对所述样品中存在的叶酸受体 α (FR α)的量进行定量;
 - c. 将所述样品中存在的叶酸受体 α (FR α)的量与已知标准进行比较;以及
 - d. 确定所述对象的叶酸受体 α (FR α)水平是否落在与癌症相关的叶酸受体 α (FR α)水平之内。
20. 权利要求19的应用,其中所述对象的腺癌细胞表达叶酸受体 α 这一发现表明,与所述腺癌细胞不表达叶酸受体 α 的情况相比,所述对象具有5年存活率提高的更高可能性。
21. 权利要求1或16的抗体在制备用于通过包括以下步骤的方法监测对象中表达叶酸受体 α 的癌症的试剂盒中的应用:
 - a. 将所述对象的生物样品暴露于权利要求1或16的抗体;
 - b. 对所述样品中存在的被所述抗体结合的叶酸受体 α (FR α)的量进行定量;
 - c. 将所述样品中存在的叶酸受体 α (FR α)的量与下面的i或ii进行比较:
 - i. 已知标准,或
 - ii. 在较早时间点从所述对象获得的生物样品;以及
 - d. 确定所述对象的叶酸受体 α (FR α)水平是否指示癌症的进展、消退或病情稳定。
22. 权利要求17的应用,其中所述生物样品源自于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞或组织。
23. 权利要求19的应用,其中所述癌症是乳腺癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、输卵管癌、或卵巢癌。
24. 权利要求23的应用,其中所述癌症是肺癌。
25. 权利要求24的应用,其中所述肺癌是腺癌。

26. 权利要求19的应用,其中所述已知标准包含:

- a. 源自于被鉴定为未患癌症的对象或具有已知浓度的叶酸受体 α 蛋白的制备物的叶酸受体 α (FR α) 水平;
- b. 源自于被鉴定为患有早期的表达叶酸受体 α 的癌症的对象的FR α 水平;
- c. 源自于被鉴定为患有中期的表达叶酸受体 α 的癌症的对象的FR α 水平;或
- d. 源自于被鉴定为患有晚期的表达叶酸受体 α 的癌症的对象的FR α 水平。

27. 权利要求26的应用,其中所述癌症是乳腺癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、输卵管癌、卵巢癌或肺癌。

28. 权利要求19至27任一项的应用,其中将所述对象的生物样品暴露于权利要求1或16的抗体的步骤还包括将所述对象的生物样品暴露于第二种抗体,其中所述第二种抗体为:

- i. 权利要求1的抗体;或
- ii. 权利要求16的抗体。

29. 权利要求28的应用,其中所述第二种抗体不同于第一种抗体。

30. 权利要求28的应用,其中将所述对象的生物样品暴露于权利要求1或权利要求16的抗体,然后暴露于:

a. 特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体,其包含由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的轻链CDR2、由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的轻链CDR3、由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的重链CDR2以及由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的重链CDR3;

b. 由保藏在ATCC并且登记号为PTA-11884的细胞系产生的特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体;

c. 特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体,其包含由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的轻链CDR2、由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的轻链CDR3、由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的重链CDR2以及由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成的重链CDR3;

d. 由保藏在ATCC并且登记号为PTA-11886的细胞系产生的特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体;

e. 特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体,其包含由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的轻链CDR2、由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的轻链CDR3、由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的重链CDR2以及由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链CDR3;

f. 由保藏在ATCC并且登记号为PTA-11887的细胞系产生的特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体;

g. 特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体,其包含由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:27的氨基酸序列组成的轻链CDR2、由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的轻链CDR3、由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成的重链CDR2以及由SEQ ID NO:32的氨基酸序列组成的重链CDR3;或者

h. 由保藏在ATCC并且登记号为PTA-11885的细胞系产生的特异性针对叶酸受体 α (FR α) 的分离的抗体。

31. 权利要求21至27任一项的应用,其中所述方法在治疗所述对象的癌症后进行。
32. 权利要求17至27任一项的应用,其中所述抗体是被标记的。
33. 权利要求32的应用,其中标记物是放射性标记物、荧光标记物、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物或酶。
34. 权利要求17至27任一项的应用,其中暴露的叶酸受体 α (FR α) 结合或未结合于细胞。
35. 权利要求17至27任一项的应用,其中使用蛋白印迹、免疫组织化学、流式细胞术、放射免疫测定法、免疫沉淀、电化学发光免疫测定法 (ECLIA) 或ELISA来检测所述样品中叶酸受体 α (FR α) 的存在。
36. 一种用于检测生物样品中叶酸受体 α (FR α) 的存在的试剂盒,所述试剂盒包含:
至少一种权利要求1或16的抗体,以及
用于在不使用时容纳所述抗体的容器,和所述抗体的使用说明书。
37. 一种用于检测生物样品中叶酸受体 α (FR α) 的存在的试剂盒,所述试剂盒包含至少一种权利要求1或16的抗体,其中包含的抗体被固定于固相支持物。
38. 一种用于检测生物样品中叶酸受体 α (FR α) 的存在的试剂盒,所述试剂盒包含至少一种权利要求1或16的抗体,其中包含的抗体被可检测地标记。
39. 权利要求19或20的应用,其中所述对象的叶酸受体 α (FR α) 水平指示所述对象所患癌症的类型。
40. 权利要求39的应用,其中所述癌症是肺腺癌或鳞状细胞肺癌。
41. 权利要求1至5或16任一项的分离的抗体,其中所述抗体被可检测地标记。
42. 权利要求41的抗体,其中可检测的标记物是放射性标记物、荧光标记物、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物或酶。
43. 权利要求42的抗体,其中所述标记物是钆、 ^{111}In -DOTA、 ^{111}In -二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶或聚组氨酸。
44. 权利要求17至27任一项的应用,其中所述抗体被固定于固相支持物。
45. 权利要求20或21的应用,其中所述方法还包括为患有表达叶酸受体 α (FR α) 的腺癌的对象预测有利结果,其中有利结果被定义为具有提高的5年存活率。
46. 权利要求22的应用,其中所述组织是手术切除的肿瘤组织或活检组织。
47. 权利要求19的应用,其中所述生物样品源自于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞或组织。
48. 权利要求47的应用,其中所述组织是手术切除的肿瘤组织或活检组织。
49. 权利要求21的应用,其中所述生物样品源自于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞或组织。
50. 权利要求49的应用,其中所述组织是手术切除的肿瘤组织或活检组织。
51. 权利要求28的应用,其中所述抗体是被标记的。
52. 权利要求51的应用,其中标记物是放射性标记物、荧光标记物、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物或酶。
53. 权利要求28的应用,其中暴露的叶酸受体 α (FR α) 结合或未结合于细胞。
54. 权利要求28的应用,其中使用蛋白印迹、免疫组织化学、流式细胞术、放射免疫测定法、免疫沉淀、电化学发光免疫测定法 (ECLIA) 或ELISA来检测所述样品中叶酸受体 α (FR α)

的存在。

55. 权利要求17、19或21的应用,其中所述生物样品源自于循环肿瘤细胞。

56. 权利要求17、19或21的应用,其中所述生物样品源自于与组织不关联的细胞。

57. 权利要求17、19或21的应用,其中所述生物样品源自于细针抽吸样品。

58. 权利要求17、19或21的应用,其中所述生物样品源自于组织学制备物。

抗叶酸受体 α 抗体及其应用

[0001] 本申请是国际申请日2012年7月13日、国际申请号PCT/US2012/046672于2014年3月7日进入中国国家阶段、申请号201280043606.2、发明名称“抗叶酸受体 α 抗体及其应用”的申请的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年7月15日提交的美国临时申请号61/508,444、2012年2月28日提交的美国临时申请号61/604,412和2012年2月29日提交的美国临时申请号61/604,954的权益,每个临时申请的全部内容通过参考并入本文。

技术领域

[0004] 本文提供的主题涉及叶酸受体 α (FR α) 特异性抗体以及生产和使用所述抗体的方法。

背景技术

[0005] 在人类中,叶酸的高亲和性受体存在4种同工型: α 、 β 、 γ 和 δ 。 α 、 β 和 δ 形式通常通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚结合于细胞膜。它们在细胞外区室和细胞内吞区室之间重复循环,并且能够将叶酸运输到细胞内。叶酸受体的可溶形式可以由蛋白酶或磷脂酶对膜锚定型叶酸受体的作用而产生。

[0006] 叶酸受体 α (也称为FR α 、FR- α 、FOLR-1或FOLR1)表达于多种上皮组织,包括脉络丛、肺、甲状腺、肾、子宫、乳腺、输卵管、附睾和唾液腺的上皮组织。Weitman,SD等,Cancer Res 52:3396-3401(1992);Weitman SD等,Cancer Res 52:6708-6711(1992)。已在多种癌症中观察到FR α 的过表达,包括肺癌(例如类癌瘤和非小细胞肺癌如腺癌)、间皮瘤、卵巢癌、肾癌、脑癌(例如间变性室管膜瘤、小脑幼年型毛细胞性星形细胞瘤和脑转移)、宫颈癌、鼻咽癌、中胚层来源的肿瘤、头颈的鳞状细胞癌、子宫内膜癌、卵巢的乳头状浆液性和子宫内膜样腺癌、卵巢的浆液性囊腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胰腺癌、骨癌(例如高等级骨肉瘤)、垂体瘤(例如垂体腺瘤)、结肠直肠癌和甲状腺髓样癌。参见例如美国专利号7,754,698;美国专利申请号2005/0232919;国际公布号W0 2009/132081;Bueno R等,J of Thoracic and Cardiovascular Surgery,121(2):225-233(2001);Elkanat H&Ratnam M.Frontiers in Bioscience,11,506-519(2006);Basal等,PLoS ONE,4(7):6292(2009);Fisher RE J Nucl Med,49:899-906(2008);Franklin,WA等,Int J Cancer,Suppl 8:89-95(1994);Hartmann LC等,Int J Cancer 121:938-942(2007);Iwakiri S等,Annals of Surgical Oncology,15(3):889-899(2008);欧洲专利公布EP 2199796;Parker N.等,Analytical Biochemistry,338:284-293(2005);Weitman,SD等,Cancer Res 52:3396-3401(1992);SabaNF等,Head Neck,31(4):475-481(2009);Yang R等,Clin Cancer Res 13:2557-2567(2007)。在某些类型的癌症(例如头颈的鳞状细胞癌)中,高水平的FR α 表达与不良预后相关,而在其他类型的癌症(例如非小细胞肺癌)中,较高水平的FR α 表达与更有利的预后相关。参见例如Iwakiri S等,Annals of Surgical Oncology,15(3):889-899;SabaNF等,

Head Neck, 31 (4) :475-481 (2009)。

[0007] 癌症的较早检测提高存活率和生命质量。为了提高早期检测和治疗的的可能性,对用于诊断表达FR α 的癌症和用于监测已有的表达FR α 的癌症的非侵入性方法,存在迫切需求。

发明内容

[0008] 本文提供了特异性结合于FR α 的抗体。本文还描述了能够编码所提供的抗体的相关多核苷酸、表达所提供的抗体的细胞以及相关的载体和可检测的抗体标记物。此外,本文描述了使用所提供的抗体的方法。例如,所提供的抗体可用于诊断癌症,监测癌症的进展、消退或病情稳定,为对象中的癌症产生预后,确定患者是否应该进行癌症治疗,或确定对象是否患有表达FR α 的癌症并因此可能适合于使用FR α 特异性抗癌疗法进行治疗。

[0009] 叶酸受体 α (FR α) 特异性抗体

[0010] 本文描述了特异性结合于FR α 的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段是鼠类IgG或其衍生物。

[0011] 在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的轻链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的轻链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的重链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的重链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的重链CDR3氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链,并且还包括具有与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。

[0012] 所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:5基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:37基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该轻链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:9基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:41基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该重链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:5基本上相同或一致的氨基酸序列,并且所述重链可变结构域包括与

SEQ ID NO:9基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中提供了能够结合FR α 的天然或非还原形式的9F3.H9.H3.H3.B5.G2 (9F3) 抗体或其抗原结合片段。

[0013] 在某些实施方式中,9F3抗体由2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (10801 University Blvd.,Manassas,Virginia 20110-2209) 并被分配有登记号PTA-11887的抗体产生细胞产生。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞产生的抗体对FR α 的结合亲和性。在某些实施方式中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链CDR和重链CDR。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。

[0014] 还公开了编码特异性结合于FR α 的天然或非还原形式的抗体或抗原结合片段的分离的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的轻链CDR1序列,例如SEQ ID NO:34。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的轻链CDR2,例如SEQ ID NO:35。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的轻链CDR3,例如SEQ ID NO:36。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:38。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的重链CDR2,例如SEQ ID NO:39。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的重链CDR3,例如SEQ ID NO:40。所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以包含具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的CDR1例如SEQ ID NO:34、与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO:35以及与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO:36的轻链。所述分离的多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:38,与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:39,以及与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:40。所述分离的多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的轻链CDR1,例如SEQ ID NO:34,由与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR2,例如SEQ ID NO:35,和由与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3,例如SEQ ID NO:36;以及与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:38,与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:39,和与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:40。也可以使用抗体样蛋白作为CDR支架,对CDR的抗原结合排列方式进行工程化改造。这样的工程化改造的抗原结合蛋白也在本公开的范围之内。

[0015] 本文描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:5基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:37的轻链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的分离的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:9基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:41的重链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的分离的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:5基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:37的轻链可变结构域区段,以及

包括与SEQ ID NO:9基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:41的重链可变结构域区段。本文提供的能够编码可变结构域区段的分离的多核苷酸可以被包含在相同或不同的载体上,以产生抗体或抗原结合片段。本文描述的多核苷酸可以编码能够结合FR α 的天然或非还原形式的9F3抗体或其抗原结合片段。

[0016] 本文描述了特异性结合于FR α 的天然或非还原形式的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段是鼠类IgG或其衍生物。尽管所述抗体或抗原结合片段可以是人类、人源化或嵌合的,但本文中示例的抗体或抗原结合片段是鼠类的。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的轻链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的轻链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的重链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的重链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的重链CDR3氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链,并且还包括具有与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。

[0017] 所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:13基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:45基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该轻链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:17基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:49基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该重链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:13基本上相同或一致的氨基酸序列,并且所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:17基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中提供了能够结合FR α 的天然或非还原形式的19D4.B7 (19D4) 抗体或其抗原结合片段。

[0018] 在某些实施方式中,19D4抗体由2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) 并被分配有登记号PTA-11884的抗体产生细胞产生。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞产生的抗体对FR α 的结合亲和性。在某些实施方式中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的

轻链CDR和重链CDR。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。

[0019] 还公开了编码特异性结合于FR α 的天然或非还原形式的抗体或抗原结合片段的分离的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的轻链CDR1序列,例如SEQ ID NO:42。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的轻链CDR2,例如SEQ ID NO:43。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的轻链CDR3,例如SEQ ID NO:44。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:46。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的重链CDR2,例如SEQ ID NO:47。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的重链CDR3,例如SEQ ID NO:48。所述多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以包含具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的CDR1例如SEQ ID NO:42、与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO:43以及与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO:44的轻链。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:46,与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:47,以及与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:48。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的轻链CDR1,例如SEQ ID NO:42,由与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR2,例如SEQ ID NO:43,和由与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3,例如SEQ ID NO:44;以及与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:46,与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:47,和与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:48。也可以使用抗体样蛋白作为CDR支架,对CDR的抗原结合排列方式进行工程化改造。这样的工程化改造的抗原结合蛋白也在本公开的范围之内。

[0020] 本文描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:13基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:45的轻链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:17基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:49的重链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:13基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:45的轻链可变结构域区段,以及包括与SEQ ID NO:17基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:49的重链可变结构域区段。本文提供的能够编码可变结构域区段的多核苷酸可以被包含在相同或不同的载体上,以产生抗体或抗原结合片段。本文描述的多核苷酸可以编码能够结合FR α 的天然或非还原形式的19D4抗体或其抗原结合片段。

[0021] 本文描述了特异性结合于FR α ,能够结合FR α 的天然或非还原形式的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段是鼠类IgG或其衍生物。尽管所述抗体或抗原结合片段可以是人类、人源化或嵌合的,但本文中示例的抗体或抗原结合

片段是鼠类的。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的轻链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的轻链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的重链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的重链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的重链CDR3氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链,并且还包含具有与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。

[0022] 所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:21基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:53基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该轻链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:25基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:57基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该重链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:21基本上相同或一致的氨基酸序列,并且所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:25基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中提供了能够结合FR α 的天然或非还原形式的24F12.B1 (24F12) 抗体或其抗原结合片段。

[0023] 在某些实施方式中,24F12抗体由2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) 并被分配有登记号PTA-11886的抗体产生细胞产生。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞产生的抗体对FR α 的结合亲和性。在某些实施方式中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链CDR和重链CDR。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。

[0024] 还公开了编码特异性结合于FR α 的抗体或抗原结合片段的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的轻链CDR1序列,例如SEQ ID NO:50。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的轻链CDR2,例如SEQ ID NO:51。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与

SEQ ID NO:20基本上相同或一致的轻链CDR3,例如SEQ ID NO:52。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:54。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的重链CDR2,例如SEQ ID NO:55。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的重链CDR3,例如SEQ ID NO:56。所述多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以包含具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的CDR1例如SEQ ID NO:50、与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO:51以及与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO:52的轻链。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:54,与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:55,以及与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:56。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的轻链CDR1,例如SEQ ID NO:50,由与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR2,例如SEQ ID NO:51,和由与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3,例如SEQ ID NO:52;以及与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:54,与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:55,和与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:56。也可以使用抗体样蛋白作为CDR支架,对CDR的抗原结合排列方式进行工程化改造。这样的工程化改造的抗原结合蛋白也在本公开的范围之内。

[0025] 本文描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:21基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:53的轻链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:25基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:57的重链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:21基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:53的轻链可变结构域区段,以及包括与SEQ ID NO:25基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:57的重链可变结构域区段。本文提供的能够编码可变结构域区段的多核苷酸可以被包含在相同或不同的载体上,以产生抗体或抗原结合片段。本文描述的多核苷酸可以编码能够结合FR α 的天然或非还原形式的24F12抗体或其抗原结合片段。

[0026] 本文描述了特异性结合于天然、非还原或化学保护形式的FR α 的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段是鼠类IgG或其衍生物。尽管所述抗体或抗原结合片段可以是人类、人源化或嵌合的,但本文中示例的抗体或抗原结合片段是鼠类的。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的轻链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的轻链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的重链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的重链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:

32基本上相同或一致的重链CDR3氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及具有与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及具有与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及具有与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链,并且还包括具有与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及具有与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。

[0027] 所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:29基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:61基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该轻链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:33基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:65基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该重链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:29基本上相同或一致的氨基酸序列,并且所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:33基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中提供了能够结合FR α 的天然、非还原或化学保护形式的26B3.F2 (26B3) 抗体或其抗原结合片段。

[0028] 在某些实施方式中,26B3抗体由2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) 并被分配有登记号PTA-11885的抗体产生细胞产生。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞产生的抗体对FR α 的结合亲和性。在某些实施方式中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链CDR和重链CDR。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。

[0029] 还公开了编码特异性结合于FR α 的天然、非还原或化学保护形式的抗体或抗原结合片段的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的轻链CDR1序列,例如SEQ ID NO:58。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的轻链CDR2,例如SEQ ID NO:59。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的轻链CDR3,例如SEQ ID NO:60。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:62。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的重链CDR2,例如SEQ ID NO:63。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的重链CDR3,例如SEQ ID NO:64。所述多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以包含具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的

CDR1例如SEQ ID NO:58、与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO:59以及与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO:60的轻链。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:62,与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:63,以及与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:64。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的轻链CDR1,例如SEQ ID NO:58,由与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR2,例如SEQ ID NO:59,和由与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3,例如SEQ ID NO:60;以及与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:62,与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:63,和与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:64。也可以使用抗体样蛋白作为CDR支架,对CDR的抗原结合排列方式进行工程化改造。这样的工程化改造的抗原结合蛋白也在本公开的范围之内。

[0030] 本文描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:29基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:61的轻链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:33基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:65的重链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:29基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:61的轻链可变结构域区段,以及包括与SEQ ID NO:33基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:65的重链可变结构域区段。本文提供的能够编码可变结构域区段的多核苷酸可以被包含在相同或不同的载体上,以产生抗体或抗原结合片段。本文描述的多核苷酸可以编码能够结合FR α 的天然、非还原或化学保护形式的2B3抗体或其抗原结合片段。

[0031] 本文提供了包含编码所述抗体和抗原结合片段的多核苷酸的载体,以及表达特异性结合于FR α 的抗体或抗原结合片段的细胞。本文还提供了能够表达所描述的载体的细胞。这些细胞可以是哺乳动物细胞(例如CHO-K1细胞)、昆虫细胞(例如Sf7细胞)、酵母细胞、植物细胞或细菌细胞(例如大肠杆菌(E.coli))。所描述的抗体也可以由杂交瘤细胞产生,如本文章中所描述的。

[0032] 用于诊断癌症的方法

[0033] 本文中提供了用于诊断对象中上皮起源的乳腺癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、输卵管癌、卵巢癌或肺癌的方法。在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的样品中存在的FR α 水平,并将观察到的FR α 水平与对照样品中的FR α 水平进行比较,来评估对象是否患有表达FR α 的癌症,其中源自于对象的样品中的FR α 水平与对照样品中的FR α 水平之间的差异是对象患有或未患表达FR α 的癌症的指示。

[0034] 在某些实施方式中,对照样品可以源自于未患表达FR α 的癌症的对象。在某些实施方式中,对照样品可以源自于患有表达FR α 的癌症的对象。在某些实施方式中,当对照样品源自于未患表达FR α 的癌症的对象时,观察到样品中存在的FR α 的量相对于对照样品中所观察到的量的增加是被评估对象患有表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,当对照样品源自于未患表达FR α 的癌症的对象时,观察到测试样品中存在的FR α 的量相对于对照样品中所观察到的量的降低或相似性是被评估对象未患表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式

中,当对照样品源自于患有表达FR α 的癌症的对象时,观察到测试样品中存在的FR α 的量相对于对照样品中所观察到的量的相似性是被评估对象患有表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,当对照样品源自于患有表达FR α 的癌症的对象时,观察到测试样品中存在的FR α 的量相对于对照样品中所观察到的量的降低是被评估对象未患表达FR α 的癌症的指示。

[0035] 在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 水平,通过将样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。类似的方法可用于确定对象是否患有与FR α 产生增加不相关的癌症。用于评估FR α 的存在的样品可以源自于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)、组织学制备物等。

[0036] 在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的样品中存在的与细胞或组织相关的FR α 水平,并将观察到的FR α 水平与对照样品中的FR α 水平进行比较,来评估对象是否患有表达FR α 的癌症,其中源自于对象的样品中的FR α 水平与对照样品中的FR α 水平之间的差异是对象患有表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 水平,通过将样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以是循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)、组织学制备物等。

[0037] 在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的样品中存在的与细胞或组织不相关的FR α 水平,并将观察到的FR α 水平与对照样品中的FR α 水平进行比较,来评估对象是否患有表达FR α 的癌症,其中源自于对象的样品中的FR α 水平与对照样品中的FR α 水平之间的差异是对象患有表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 水平,通过将样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以是尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、组织学制备物等。

[0038] 在所描述的方法的各种实施方式中,癌症可以是表达FR α 的癌症。在特定实施方式中,表达FR α 的癌症是卵巢癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是子宫内膜癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是结肠直肠癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是甲状腺癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是输卵管癌。在另一种实施方式中,表达FR α 的癌症是非小细胞肺癌例如腺癌。或者,所描述的方法可用于鉴定不表达FR α 的癌症,例如鳞状细胞癌。例如,所描述的方法可用于将表达FR α 的肺癌例如腺癌与不表达FR α 的肺癌例如鳞状细胞癌区分开。所描述的方法可用于将表达FR α 的乳腺癌例如纤维腺瘤与不表达FR α 的乳腺癌例如囊性肉瘤区分开。此外,所描述的方法可用于将表达FR α 的甲状腺癌例如乳头状癌与不表达FR α 的甲状腺癌例如髓样癌区分开。在本文描述的某些实施方式中,在对象中检测到表达FR α 的癌细胞,可用于确定对象可以用针对FR α 的治疗剂进行治疗。在某些实施方式中,针对FR α 的治疗剂可以是抗体例如Farletuzumab。

[0039] 在各种不同情况下,通过将样品与结合FR α 的抗体或其抗原结合片段相接触来测定FR α 水平。在某些实施方式中,可以将样品与一种以上类型的结合FR α 的抗体或其抗原结合片段相接触。在某些实施方式中,可以将样品与结合FR α 的第一种抗体或其抗原结合片段相接触,然后与结合FR α 的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。诸如本文中描述的抗体可用于这种情况。例如,抗体选自:

[0040] (a) 与抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种结合相同表位的抗体

或其抗原结合片段；

[0041] (b) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种或其抗原结合片段；

[0042] (c) 包含抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链CDR和轻链CDR的抗体或其抗原结合片段；

[0043] (d) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的抗体或其抗原结合片段；或

[0044] (e) 具有由保藏于ATCC并且登记号为PTA-11887、PTA-11884、PTA-11886或PTA-11885的任一种细胞系产生的抗体的氨基酸序列的抗体，或其抗原结合片段。

[0045] 在某些实施方式中，FR α 水平通过蛋白印迹分析、放射免疫测定法、免疫荧光测定法、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光 (ECL) 免疫测定法、免疫组织化学、荧光激活细胞分选 (FACS) 或ELISA测定法来测定。

[0046] 在本发明的上述情况的各种实施方式中，对照样品是健康对象中的标准化的对照FR α 水平。在其他实施方式中，对照样品可以是已知浓度的FR α 蛋白 (例如重组或纯化的FR α 蛋白样品)。在某些实施方式中，可以将观察到的受试对象的FR α 水平与在来自于已知患有表达FR α 的癌症的患者的样品中观察到的FR α 水平或已知的FR α 浓度进行比较。

[0047] 用于监测癌症的方法

[0048] 本文中提供了用于监测对象中表达FR α 的癌症的方法。可以在癌症治疗之前、癌症治疗之后或癌症治疗之前与之后两个时间使用所描述的方法。在某些实施方式中，所描述的方法包括通过测定源自于对象的测试样品中存在的FR α 水平，并将观察到的FR α 水平与在较早时间点从所述对象获得的样品中的FR α 水平进行比较，来评估表达FR α 的癌症是进展、消退还是保持稳定，其中测试样品和较早样品中的FR α 水平之间的差异提供了所述癌症是进展、消退还是保持稳定的指示。就此而言，测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有提高的FR α 水平，可以指示表达FR α 的癌症的进展。相反，测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有降低的FR α 水平，可以指示表达FR α 的癌症的消退。因此，测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有无显著差异的FR α 水平，可以指示表达FR α 的癌症的病情稳定状态。在某些实施方式中，源自于对象的样品中的FR α 水平，通过将所述样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以源自于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联的细胞 (即游离细胞)、组织 (例如手术切除的肿瘤组织、活检组织，包括细针抽吸物)、组织学制备物等。

[0049] 在某些实施方式中，所描述的方法包括通过测定源自于对象的测试样品中存在的与细胞或组织相关的FR α 水平，并将观察到的FR α 水平与在较早时间点以类似方式从对象获得的样品中的FR α 水平进行比较，来评估表达FR α 的癌症是进展、消退还是保持稳定，其中测试样品和较早样品中的FR α 水平之间的差异提供了所述癌症是进展、消退还是保持稳定的指示。就此而言，测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有提高的FR α 水平，可以指示表达FR α 的癌症的进展。相反，测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有降低的FR α 水平，可以指示表达FR α 的癌症的消退。因此，测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有无显著差异的FR α 水平，可以指示表达FR α 的癌症的病情稳定状态。在某些实施方式中，源自于对象的样品中的FR α 水平，通过将所述样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以是循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联

的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)、组织学制备物等。

[0050] 在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的测试样品中存在的与细胞或组织不相关的FR α 水平,并将观察到的FR α 水平与在较早时间点以类似方式从对象获得的样品中的FR α 水平进行比较,来评估表达FR α 的癌症是进展、消退还是保持稳定,其中测试样品和较早样品中的FR α 水平之间的差异提供了所述癌症是进展、消退还是保持稳定的指示。就此而言,测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有提高的FR α 水平,可以指示表达FR α 的癌症的进展。相反,测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有降低的FR α 水平,可以指示表达FR α 的癌症的消退。因此,测试样品相对于较早样品中所观察到的水平具有无显著差异的FR α 水平,可以指示表达FR α 的癌症的病情稳定状态。在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 水平,通过将所述样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以是尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、组织学制备物等。

[0051] 在所描述的方法的各种实施方式中,癌症可以是表达FR α 的癌症。在特定实施方式中,表达FR α 的癌症是卵巢癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是子宫内膜癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是结肠直肠癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是甲状腺癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是输卵管癌。在另一种实施方式中,表达FR α 的癌症是非小细胞肺癌例如腺癌。

[0052] 在各种不同情况下,通过将样品与结合FR α 的抗体或其抗原结合片段相接触来测定FR α 水平。在某些实施方式中,可以将样品与一种以上类型的结合FR α 的抗体或其抗原结合片段相接触。在某些实施方式中,可以将样品与结合FR α 的第一种抗体或其抗原结合片段相接触,然后与结合FR α 的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。诸如本文中描述的抗体可用于这种情况。例如,抗体选自:

[0053] (a) 与抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种结合相同表位的抗体或其抗原结合片段;

[0054] (b) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种或其抗原结合片段;

[0055] (c) 包含抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链CDR和轻链CDR的抗体或其抗原结合片段。

[0056] 在某些实施方式中,FR α 水平通过蛋白印迹分析、放射免疫测定法、免疫荧光测定法、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定法、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定法来测定。

[0057] 在详细描述和所提供的实施例和相关附图中,更详细地提供了所概述的主题的其他方面。

附图说明

[0058] 图1显示了在非还原条件下通过SDS-PAGE获得的FR α 的迁移图案。FR α 以天然(第2泳道)或还原和烷基化(第3泳道)形式进行评估。

[0059] 图2示出了包含单克隆抗体抗体9F3、24F12和26B3的表位(阴影区域)的FR α 的氨基酸残基(SEQ ID NO:1),所述表位通过氢/氘交换质谱术和对接方法来预测。

[0060] 图3示出了在SDS-PAGE凝胶上运行的来自于表达FR α 或FR同源物FR β 、FR Γ 或FR Δ 的CHO细胞的纯化重组体(A)和全细胞裂解物(B)的4种蛋白印迹。蛋白被制备在含有或不含还原剂的样品缓冲液中。图A,第1泳道,分子量标志物;第2-5泳道分别为0.5 μ g还原的FR α 、FR β 、FR Γ 和FR Δ ;第6泳道,空白;第7-10泳道分别为0.5 μ g未还原的FR α 、FR β 、FR Γ 和FR Δ 。阳性条带表示每一泳道中仅有的反应性物质,并对应于 \sim 38kDa的分子量。图B,第1泳道分子量标志物,第2泳道CHO-FR α ,第3泳道CHO-FR β ,第4泳道CHO-FR Δ 全细胞裂解物,它们被制备在不含还原剂的样品缓冲液中并在SDS-PAGE凝胶上分离。每张图用右侧标出的指定的抗FR α Ab进行探测。FR的分子量为:FR α \sim 38kDa;FR β \sim 30kDa;FR Γ \sim 28kDa;FR Δ \sim 26kDa。分别在变性和非还原或还原条件下识别FR α 的LK26和BN3.2抗体被用作阳性对照。

[0061] 图4示出了福尔马林固定、石蜡包埋的乳头状浆液性卵巢癌组织样品,其用单克隆抗体26B3探测FR α 的存在。

[0062] 图5示出了正常组织中的FR α 表达。用抗体26B3染色的正常肺(A)和肾(B)样品证实了FR α 的表达高度局限于上皮细胞,并具有主要在顶端的分布(图像被放大20x)。

[0063] 图6提供了使用抗体26B3或抗体BN3.2产生的肺腺癌的M-分值的比较的图示。

[0064] 图7示出了非小细胞肺癌的组织学亚型的FR α 染色:(A)放大20x的肺腺癌,(B)放大40x的肺腺癌,(C)放大20x的肺腺鳞癌,以及(D)放大40x的肺鳞状细胞癌。

[0065] 图8提供了用抗体26B3染色的肺腺癌的两份平行样品(核心)的M-分值的比较的图示。

[0066] 图9示出了肺腺癌和鳞状细胞癌的FR α 分布的M-分值。平均M-分值分别为19.84(\pm 18.64)和1.39(\pm 5.54)($p < 0.0001$)。

[0067] 图10示出了三种肺腺癌细针抽吸(FNA)样品(A)、(B)和(C)中的FR α 表达。用抗体26B3对来自于淋巴结FNA的细胞块材料进行染色,证实了FR α 的成功染色,其表达局限于上皮细胞并具有顶端分布。

[0068] 图11示出了通过使用抗体26B3对组织样品进行免疫组织化学分析而被认定为患有FR α 阳性和FR α 阴性的肺腺癌的对象的存活函数(死亡或检查)。

[0069] 图12示出了用抗体26B3染色的代表性组织微阵列(TMA)的放大20x或40x的图像,(A)原位导管癌,(B)-(D)侵入性导管癌。

[0070] 图13提供了由26B3染色确定的相对于乳腺癌样品的分子亚型(her-2(+))和her-2(-))的M-分值分布的图示。

[0071] 图14(A-D)以20x或40x放大倍数显示了用抗体26B3染色的来自于IV期her2阴性乳腺癌的代表性组织学样品。

[0072] 图15显示了用抗体26B3染色的通过细针抽吸获得的转移性乳腺癌样品的代表性图像。

[0073] 图16显示了卵巢浆液性癌中的FR α 表达。(A)在10x放大倍数下可以看见3+强(右视野)和2+中等膜染色(左上视野)。(B)以20x放大倍数示出了与(A)相同的区域,证实了3+强且浓密的圆周形膜染色(右视野)。2+中等膜染色(左上视野)具有与3+相比更弱、更稀的染色,并且它是圆周形或定位于腔缘。(C)显示出1+弱的膜染色局限于腔缘并需要40x放大倍数来可视化。(D)卵巢表面上皮细胞和下方的皮层基质细胞是完全阴性的(20x放大)。

[0074] 图17以40x放大倍数显示出FR α 表达局限于腔缘,正常子宫内膜具有弱的1+和中等

的2+强度(A)。在20x放大倍数下可以在非典型复杂性增生的腔缘上观察到强的(+3)膜染色(B)。

[0075] 图18显示了1级子宫内膜腺癌的腔缘上强的(+3)FR α 膜染色(A)。此外,许多肿瘤细胞具有2+或3+细胞质染色(20x放大)。在2级子宫内膜腺癌的腔缘上存在FR α 膜染色(2+和3+);细胞质染色是弱的(20x放大)(B)。在40x放大倍数下,3级子宫内膜腺癌的约50%的肿瘤细胞表现出3+强的、圆周形膜染色以及弱的细胞质染色(C)。

[0076] 图19以20x放大倍数显示了具有鳞状化生的腺癌,其中约80%的化生的鳞状细胞具有2+和3+FR α 膜染色以及1+和2+FR α 细胞质染色(A)。子宫内膜透明细胞癌的肿瘤细胞具有大的不规则的核、显著的核仁和丰富的透明细胞质。在40x放大倍数下,这些肿瘤细胞中的大多数都具有2+或3+FR α 膜染色(B)。

[0077] 图20显示了正常输卵管的纤毛和非纤毛细胞在腔缘和外侧细胞缘上具有3+FR α 膜染色(A)。细胞质染色也是明显的(20x放大)。(B)慢性输卵管炎,在基质中具有丰富的淋巴细胞和浆细胞。粘膜细胞在腔缘上保留3+FR α 染色(20x放大)。(C)2级输卵管浆液性腺癌的肿瘤细胞形成复杂的乳头状突起,并在腔缘和外侧细胞缘上显示出3+FR α 膜染色,并且细胞质染色也是明显的(20x放大)。

[0078] 图21示出了卵巢皮质浆液/输卵管囊肿。衬细胞显示出3+强的膜染色和细胞质染色(20x放大)。

具体实施方式

[0079] 下面的描述表征了特异性结合于FR α 的抗体及其抗原结合片段。本文还描述了能够编码这些抗体和抗原结合片段的相关多核苷酸、表达所述抗体和抗原结合片段的细胞以及相关的载体和可检测的抗体标记物。此外,本文描述了使用所述抗体和抗原结合片段的方法。例如,所提供的抗体和抗原结合片段可用于诊断卵巢癌、乳腺癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、输卵管癌或肺癌;监测卵巢癌、乳腺癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、输卵管癌或肺癌的进展、消退或病情稳定;确定患者是否应该进行癌症治疗,或确定对象是否患有表达FR α 的癌症并因此可能适合于使用FR α 特异性抗癌疗法进行治疗。

[0080] 定义

[0081] 在整个说明书和权利要求书中使用了与描述的各个方面相关的各种术语。除非另有指明,否则这样的术语应该被给予它们在本领域中的通常含义。其他特别定义的术语应该以与本文中提供的定义相符的方式进行解释。

[0082] 当在本说明书和权利要求书中使用时,没有具体数量的指称包括其复数形式,除非内容明确表明不是如此。因此,例如,对“细胞”的指称包括两个或更多个细胞的组合等。

[0083] 当指称可测量的值例如量、时间长度等时,本文中使用的术语“约”意味着涵盖与指定的值相比最多 $\pm 10\%$ 的变化,如果这样的变化适合于执行所公开的方法的话。除非另有指明,否则在说明书和权利要求书中使用的表示成分、性质如分子量、反应条件等的数量的所有数字应该被理解为在所有情况下均被术语“约”修饰。因此,除非指明与之相反,否则在下面的说明书和权利要求书中提到的数值参数都是近似值,其可以随着本发明试图获得的所需性质而变。至少,并且不试图限制等同原则应用于权利要求书的范围,每个数值参数至少应该根据所报告的有效数字的数目并通过使用常规的取整技术来进行解释。

[0084] 尽管说明本发明的宽范围的数值范围和参数是近似值,但在特定实例中提出的数值被尽可能精确地报告。然而,任何数值都固有地含有由它们各自的试验测量结果中存在的标准偏差必然造成的一些误差。

[0085] “分离的”是指生物组分(例如核酸、肽或蛋白质)已与天然存在所述组分的生物体中的其他生物组分、即其他染色体DNA和RNA及染色体外DNA和RNA以及蛋白质基本上分离开,与所述其他生物组分分开产生或从所述其他生物组分中纯化出来。因此,已被“分离的”核酸、肽和蛋白质包括通过标准纯化技术纯化的核酸和蛋白质。“分离的”核酸、肽和蛋白质可以是组合物的一部分并仍然是分离的,如果这样的组合物不是所述核酸、肽或蛋白质的天然环境的一部分的话。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达而制备的核酸、肽和蛋白质,以及化学合成的核酸。

[0086] “多核苷酸”被同义地称为“核酸分子”或“核酸”,是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可以是未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链DNA和双链DNA、作为单链区和双链区的混合物的DNA、单链RNA和双链RNA、和作为单链区和双链区的混合物的RNA,以及包含DNA和RNA的杂合分子,所述DNA和RNA可以是单链的或更通常为双链的或者是单链区和双链区的混合物。此外,“多核苷酸”是指包含RNA或DNA或者RNA和DNA两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰的碱基的DNA或RNA,以及出于稳定性或其他原因而具有修饰的骨架的DNA或RNA。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化碱基和不常见碱基例如次黄嘌呤核苷。可以对DNA和RNA做出各种修饰;因此,“多核苷酸”包含自然界中通常存在的多核苷酸的化学、酶或代谢修饰的形式,以及病毒和细胞特征性的DNA和RNA的化学形式。“多核苷酸”还包含相对短的核酸链,其通常被称为寡核苷酸。

[0087] “基本上相同”的含义可以随着术语所使用的上下文而不同。由于在重链和轻链以及编码它们的基因之间可能存在天然的序列变异,人们预期在本文描述的抗体或抗原结合片段的氨基酸序列或编码它们的基因内发现一定水平的变异,而对它们的独特结合性质(例如特异性和亲和性)具有很小的影响或没有影响。这样的预期部分地是由遗传密码的简并性以及不显著改变所编码的蛋白的性质的保守氨基酸序列变异的进化成功造成的。因此,在核酸序列的情形中,“基本上相同”是指两个或更多个序列之间至少65%的同一性。优选地,该术语是指两个或更多个序列之间至少70%的同一性,更优选地至少75%的同一性,更优选地至少80%的同一性,更优选地至少85%的同一性,更优选地至少90%的同一性,更优选地至少91%的同一性,更优选地至少92%的同一性,更优选地至少93%的同一性,更优选地至少94%的同一性,更优选地至少95%的同一性,更优选地至少96%的同一性,更优选地至少97%的同一性,更优选地至少98%的同一性以及更优选地至少99%或更高的同一性。这样的同一性可以使用nBLAST算法(Altschul等,(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin和Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)来确定。

[0088] 可以在蛋白质的氨基酸序列内出现而对蛋白质功能没有显著影响的变异程度远低于核酸序列的变异程度,这是因为同样的简并性原则不适用于氨基酸序列。因此,在抗体或抗原结合片段的情形中,“基本上相同”意味着抗体或抗原结合片段与所描述的抗体或抗原结合片段具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。其他实施方式包括这样的FR_α特异性抗体或抗原结合片段,即,其构架、支架、或其他非结合区与本文描述的抗体和抗原结合片段不具有显著的同一性,但是却整合有一个或多个CDR或提

供结合所需要的其他序列,所述一个或多个CDR或提供结合所需要的其他序列与本文描述的这样的序列具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性。

[0089] “载体”是复制子,例如质粒、噬菌体、粘粒或病毒,其中可以可操作地插入另一个核酸区段以便引起所述区段的复制或表达。

[0090] 当外源或异源核酸例如DNA被导入到细胞内时,所述细胞已被“转化”。转化的DNA可以被或不整合(共价连接)到细胞的基因组中。例如,在原核生物、酵母和哺乳动物细胞中,转化的DNA可以被维持在附加体元件例如质粒上。对于真核细胞来说,稳定转化的细胞或“稳定细胞”由真核细胞建立细胞系或建立由含有转化的DNA的子代细胞群体构成的克隆的能力来证实。“克隆”是通过有丝分裂从单一细胞或共同祖先产生的细胞群体。“细胞系”是能够在体外稳定生长许多代的原代细胞的克隆。在本文提供的某些实例中,通过用DNA转染细胞来转化细胞。

[0091] 术语“表达”和“产生”在本文中同义使用,并且是指基因产物的生物合成。这些术语涵盖了将基因转录成RNA。这些术语还涵盖将RNA翻译成一种或多种多肽,并且进一步涵盖所有天然存在的转录后和翻译后修饰。抗体或其抗原结合片段的表达或产生可以在细胞的细胞质内,或者进入细胞外环境例如细胞培养物的生长培养基中。

[0092] 术语“治疗”是指在减弱或改善伤口、病理学或病症方面的任何成功或成功迹象,包括任何客观或主观参数,例如症状的消除、缓解、减轻或使患者对病症更加耐受,减缓退化或衰退速率,使退化的终点虚弱度降低,改善对象的身体或心理舒适度,或延长存活长度。治疗可以通过客观或主观参数,包括身体检查、神经学检查或精神评估的结果来评估。

[0093] 除非另有指明,否则“抗体”是指免疫球蛋白的所有同种型(IgG、IgA、IgE、IgM、IgD和IgY),包括每种同种型的各种单体形式和聚合体形式。

[0094] 抗原结合片段是可以对特定抗原表现出结合亲和性的任何蛋白质结构。某些抗原结合片段由完整抗体的部分构成,所述部分保留了亲代抗体分子的抗原结合特异性。例如,抗原结合片段可以包含已知与特定抗原结合的抗体的至少一个可变区(重链可变区或轻链可变区)或一个或多个CDR。适合的抗原结合片段的实例包括但不限于微型双功能抗体(diabody)和单链分子以及Fab、F(ab')₂、Fc、Fab_c和Fv分子,单链(Sc)抗体,单独的抗体轻链,单独的抗体重链,抗体链或CDR与其他蛋白之间的嵌合融合体,蛋白支架,重链单体或二聚体,轻链单体或二聚体,由一条重链和一条轻链构成的二聚体等。所有抗体同种型都可用于产生抗原结合片段。另外,抗原结合片段可以包括非抗体蛋白质构架,其可以提供针对给定目标抗原的亲亲和性的取向成功地整合多肽区段,例如蛋白支架。可以重组产生抗原结合片段,或通过完整抗体的酶切割或化学切割来产生抗原结合片段。短语“抗体或其抗原结合片段”可用于表示给定的抗原结合片段整合有短语中指称的抗体的一个或多个氨基酸区段。

[0095] 当在抗体或抗体片段的情形中使用,“特异性结合”表示通过由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的结构域结合于目标蛋白的一个或多个表位,但是其基本上不识别并结合含有抗原性分子的混合群体的样品中的其他分子。通常,当通过表面等离子体共振测定法或细胞结合测定法测量时,抗体以低于约 1×10^{-8} M的Kd结合于相关抗原。

[0096] 术语“对象”是指人类和非人类动物,包括所有脊椎动物例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人类灵长动物、小鼠、兔、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。在所描述

的方法的许多实施方式中,对象是人类。

[0097] 当在本文中使用时,术语“叶酸受体 α ”(也被称为FR α 、FR- α 、FOLR-1或FOLR1)是指叶酸的高亲和性受体的 α 同工型。膜结合型FR α 通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚而连接于细胞表面。FR α 的可溶形式可以由蛋白酶或磷脂酶对膜锚定型叶酸受体的作用而产生。人类FR α 的氨基酸序列在本文中显示为SEQ ID NO:1。本文中使用的该术语涵盖了变体,例如天然存在的等位基因变体或含有至少一个氨基酸取代的序列。正如本领域技术人员将会认识到的,人类FR α 的细胞结合形式和非细胞结合形式可以涵盖SEQ ID NO:1的变体形式。

[0098] 当在本文中使用时,术语“样品”是指从对象分离的类似流体、细胞或组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)的集合物,以及对象内存在的流体、细胞或组织。在某些实施方式中,样品是生物流体。生物流体通常在生理温度下是液体,并且可以包括存在于对象或生物来源中、从其抽取、表达或通过其他方式从其提取的天然存在的流体。某些生物流体源自于特定组织、器官或局部区域,并且某些其他生物流体可以更加全体性地或全身性地位于对象或生物来源中。生物流体的实例包括血液,血清和浆膜液,血浆,淋巴,尿液,唾液,囊液,泪液,粪便,痰液,分泌性物质和器官的粘膜分泌物,阴道分泌物,腹水例如与非实体肿瘤相关的腹水,胸腔、心包腔、腹膜腔、腹腔和其他体腔的流体,通过支气管灌洗收集的流体,等等。

[0099] 生物流体也可以包括与对象或生物来源相接触的液体溶液,例如细胞和器官培养基、包括细胞或器官的调制培养基,灌洗液等。当在本文中使用时,术语“样品”涵盖从对象中取出的材料或对象中存在的材料。

[0100] 当在表达FR α 的癌症的进展的情形中使用,术语“进展”包括癌症从较低严重性向较高严重性状态变化。这可以包括肿瘤的数量或严重性、转移程度、癌症生长或扩散速度等的增加。例如,“卵巢癌的进展”包括这样的癌症从较低严重性向较高严重性状态进展,例如从I期向II期进展、从II期向III期进展等。

[0101] 当在表达FR α 的癌症的消退的情形中使用,术语“消退”包括癌症从较高严重性向较低严重性状态变化。这可以包括肿瘤的数量或严重性、转移程度、癌症生长或扩散速度等的降低。例如,“卵巢癌的消退”包括这样的癌症从较高严重性向较低严重性状态消退,例如从III期向II期消退、从II期向I期消退等。

[0102] 当在表达FR α 的癌症稳定的情形中使用,术语“稳定”意欲描述疾病状况在临床相关的时间段内没有或尚未发生足够显著的变化而不会被认为是进展性癌症或消退性癌症。

[0103] 本文描述的实施方式不限于特定的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,这些方法、试剂、化合物、组合物或生物系统当然可以改变。

[0104] FR α 特异性抗体和抗原结合片段

[0105] 本文描述了特异性结合FR α 的分离的单克隆抗体或抗原结合片段。抗体分子的一般结构包含包括重链和轻链的抗原结合结构域,以及发挥包括补体结合和结合抗体受体在内的多种功能的Fc结构域。

[0106] 所描述的抗体或抗原结合片段包括所有同种型IgA、IgD、IgE、IgG和IgM以及四链免疫球蛋白结构的合成多聚体。所描述的抗体或抗原结合片段还包括通常存在于母鸡或火鸡血清以及母鸡或火鸡卵黄中的IgY同种型。

[0107] 在实施例部分中公开的抗体或抗原结合片段源自于小鼠。可以通过重组手段从任何物种产生类似的抗体。例如，抗体或抗原结合片段可以是嵌合的大鼠、山羊、马、猪、牛、鸡、兔、骆驼、驴、人类等的抗体或抗原结合片段。对于施用于人类的应用来说，非人类来源的抗体或抗原结合片段可以在遗传学上或结构上改变成在施用于人类患者后具有较低抗原性。

[0108] 在某些实施方式中，抗体或抗原结合片段是嵌合的。当在本文中使用时，术语“嵌合的”是指这样的抗体或其抗原结合片段，即，其中至少一个可变结构域的至少某些部分源自于非人类哺乳动物、啮齿动物或爬行动物的抗体氨基酸序列，而所述抗体或其抗原结合片段的其余部分源自于人类。例如，嵌合抗体可以包含小鼠抗原结合结构域和人类Fc或其他这样的结构性结构域。

[0109] 在某些实施方式中，抗体是人源化抗体。人源化抗体可以是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合性子序列），其含有极少的源自于非人类免疫球蛋白的序列。对于大多数部分来说，人源化抗体是其中来自于接受者的互补决定区（CDR）的残基被具有希望的特异性、亲和性和能力的来自于非人类物种（供体抗体）例如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基替换的人类免疫球蛋白（接受者抗体）。一般来说，人源化抗体包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上所有的部分，其中所有或基本上所有CDR区对应于非人类免疫球蛋白的CDR区，并且所有或基本上所有构架区是人类免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体可以包括至少一部分的免疫球蛋白恒定区（Fc），通常为人类免疫球蛋白的恒定区。

[0110] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以以多种形式存在，但是它们包括表1中示出的一个或多个抗体可变结构域区段或CDR。表1中描述的抗体的同种型被示出在括号中，以描述每种抗体的恒定区，所述恒定区已知具有保守序列。

[0111] 表1. 所描述的抗体及其抗原结合片段的抗体区段（“Lc”表示轻链，“Hc”表示重链）。

抗体区段	SEQ ID NO.	序列
单克隆抗体 9F3（鼠类 IgG2a 恒定区）		
Lc CDR1	2	RASSTVSYSYLH
Lc CDR2	3	GTSNLAS
Lc CDR3	4	QQYSGYPLT

[0112]

抗体区段	SEQ ID NO.	序列
Lc 可变结构域区段	5	PAIMSASPGEKVTMTCRASSTVSYSYLHWYQQ KSGASPQLWIYGTSNLAGVPARFSGSGSGTSY SLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPLTFGAGTKL ELKRADAAP
Hc CDR1	6	SGYYWN
Hc CDR2	7	YIKSDGSNNYNPSLKN
Hc CDR3	8	EWKAMDY
Hc 可变结构域区段	9	ESGGLVLRPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWI RQFPGRLEWMGYIKSDGSNNYNPSLKNRISIT RDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYFCTREWKAM DYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDT
单克隆抗体 19D4 (鼠类 IgG2a 恒定区)		
Lc CDR1	10	RASESVDTYGNNFIH
Lc CDR2	11	LASNLES
Lc CDR3	12	QQNNGDPWT
Lc 可变结构域区段	13	PASLAVSLGQRATISCRASESVDTYGNNFIHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRT DFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNGDPWTFGGG TKLEIKRADAAP
Hc CDR1	14	HPYMH
Hc CDR2	15	RIDPANGNTKYDPKFQG
Hc CDR3	16	EEVADYTMDY
Hc 可变结构域区段	17	GAELVKPGASVKLSCTASGFNIKHPYMHVVK QRPDQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGGKATIT ADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCGREEVAD YTMDYWGQGTSTVTVSSAKTTAPSVYPLAPV
单克隆抗体 24F12 (鼠类 IgG1 恒定区)		
Lc CDR1	18	SASQGINNFLN
Lc CDR2	19	YTSSLHS
Lc CDR3	20	QHFSKLPWT
Lc 可变结构域	21	TSSLSASLGDRVTISCSASQGINNFLNHWYQQKP DGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL TISNLEPEDIAIYYCQHFSKLPWTFGGGKLEIK RADAAP
Hc CDR1	22	SYAMS

[0113]

[0114]

抗体区段	SEQ ID NO.	序列
Hc CDR2	23	EIGSGGSYTYYPDVTG
Hc CDR3	24	ETTAGYFDY
Hc 可变结构域	25	SGGGLVRPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVR QSPEKRLEWVAEIGSGGSYTYYPDVTGRFTIS RDNAKSTLYLEMSSLRSEDTAIYYCARETTAG YFDYWGQGTTTLTVSS
单克隆抗体 26B3 (鼠类 IgG1 恒定区)		
Lc CDR1	26	RTSENIFSYLA
Lc CDR2	27	NAKTLAE
Lc CDR3	28	QHHYAFPWT
Lc 可变结构域区段	29	PASLSASVGETVTITCRTSENIFSYLAWYQQKQ GISPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSL KINSLQPEDFGSYQCQHHYAFPWTFGGGSKLEI KRADAAP
Hc CDR1	30	GYFMN
Hc CDR2	31	RIFPYNGDTFYNQKFKG
Hc CDR3	32	GTHYFDY
Hc 可变结构域区段	33	GPELVKPGASVKISCKASDYSFTGYFMNWVMQ SHGKSLEWIGRIFPYNGDTFYNQKFKGRATLTV DKSSSTAHEMELRSLASEDSAVYFCARGTHYFD YWGQGTTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQT
单克隆抗体 9F3 (鼠类 IgG2a 恒定区)		
Lc CDR1	34	AGGGCCAGCTCAACTGTAAGTTACAGTTACT TGCAC
Lc CDR2	35	GGCACATCCAACCTGGCTTCT
Lc CDR3	36	CAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCAG

[0115]

抗体区段	SEQ ID NO.	序列
Lc 可变结构域区段	37	CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAA AGGTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAAC TGTAAGTTACAGTACTTGCCTGGTACCAG CAGAAGTCAGGTGCCTCCCCCAACTCTGGA TTTATGGCACATCCAATTGGCTTCTGGAGTC CCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA CCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAG GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGC AGTACAGTGGTTACCCACTCACGTTCCGGTGC TGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGAT GCTGCACCAAC
Hc CDR1	38	AGTGGTTATTACTGGAAC
Hc CDR2	39	TACATAAAGTCCGACGGTAGCAATAATTACA ACCCATCTCTCAAAAAT
Hc CDR3	40	GAGTGGAAAGGCTATGGACTAC
Hc 可变结构域区段	41	GAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAGACCTTCTC AGTCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGC TACTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGAAC TG GATCCGGCAGTTTCCAGGAAGCAGACTGGAA TGGATGGGCTACATAAAGTCCGACGGTAGCA ATAATTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAAT CTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAG TTTTTCTGAAGTTGAATTCTGTGACTACTGA GGACACAGCTACATATTTCTGTACAAGGGAG TGGAAGGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAA CCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAAC ACCCCATCAGTCTATCCACTGGCCCTGGGT GTGGAGATAACAAC
单克隆抗体 19D4 (鼠类 IgG2a 恒定区)		
Lc CDR1	42	AGAGCCAGTGAAAGTGTTGATACTTATGGCA ATAATTTTATACAC
Lc CDR2	43	CTTGCATCCAACCTAGAATCT
Lc CDR3	44	CAGCAAATAATGGGGATCCGTGGACG

抗体区段	SEQ ID NO.	序列
Lc 可变结构域区段	45	CCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAG GGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGT GTTGATACTTATGGCAATAATTTTATACACTG GTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAA ACTCCTCATTTATCTTGCATCCAACCTAGAAT CTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGG GTCTAGGACAGACTTCACCCTCACCATTGAT CCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATT ACTGTCAGCAAAAATAATGGGGATCCGTGGAC GTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAA CGGGCTGATGCTGCACCAA
Hc CDR1	46	CACCCCTATATGCAC
Hc CDR2	47	AGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAAT ATGACCCGAAGTTCCAGGGC
Hc CDR3	48	GAGGAGGTGGCGGACTATACTATGGACTAC
Hc 可变结构域区段	49	GGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAG TCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAAC ATTAACACCCCTATATGCACTGGGTGAAGC AGAGGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGATTGG AAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAA TATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTA TAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTA CCTACAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC ACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGAGGAGG TGGCGGACTATACTATGGACTACTGGGGTCA AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA ACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCC CTGTGTG
单克隆抗体 24F12 (鼠类 IgG1 恒定区)		
Lc CDR1	50	AGTGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTTTTTAA AC
Lc CDR2	51	TACACATCAAGTTTACTCA
Lc CDR3	52	CAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTGGACG

[0116]

[0117]

抗体区段	SEQ ID NO.	序列
Lc 可变结构域区段	53	ACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAG AGTCACCATCAGTTGCAGTGCAAGTCAGGGC ATTAACAATTTTTTAAACTGGTATCAGCAGA AACCAGATGGCACTGTTAAACTCCTGATCTA TTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCA TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ATTATTCTCTCACCATCAGCAACCTGGAACCT GAAGATATTGCCATATACTATTGTCAGCACTT TAGTAAGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGC ACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTG CACCAAC
Hc CDR1	54	AGCTATGCCATGTCT
Hc CDR2	55	GAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACT ATCCAGACACTGTGACGGGC
Hc CDR3	56	GAAACTACGGCGGGCTACTTTGACTAC
Hc 可变结构域区段	57	TCTGGGGGAGGCTTAGTGAGGCCTGGAGGGT CCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTC ACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCG CCAGTCTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTC GCAGAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCT ACTATCCAGACACTGTGACGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGACAATGCCAAGAGCACCTG TACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGG ACACGGCCATCTATTACTGTGCAAGGGAAAC TACGGCGGGCTACTTTGACTACTGGGGCCAA GGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA
单克隆抗体 26B3 (鼠类 IgG1 恒定区)		
Lc CDR1	58	CGAACAAGTGAGAATATTTTCAGTTATTTAG CA
Lc CDR2	59	AATGCAAAAACCTTAGCAGAG
Lc CDR3	60	CAACATCATTATGCTTTTCCGTGGACG

抗体区段	SEQ ID NO.	序列
Lc 可变结构域区段	61	CCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAA CTGTCAACCATCACATGTCTGAACAAGTGAGAA TATTTTCAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGA AACAGGGAATATCTCCTCAGCTCCTGGTCTA TAATGCAAAAACCTTAGCAGAGGGTGTGCCA TCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAC AGTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATC ATTATGCTTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGC TCCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTG CACCAAC
Hc CDR1	62	GGCTACTTTATGAAC
Hc CDR2	63	CGTATTTTTCCTTACAATGGTGATACTTTCTA CAACCAGAAGTTCAAGGGC
Hc CDR3	64	GGACTCATTACTTTGACTAC
Hc 可变结构域区段	65	GGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG TGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGATTACTCT TTTACTGGCTACTTTATGAACTGGGTGATGCA GAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGA CGTATTTTTCCTTACAATGGTGATACTTTCTA CAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTG ACTGTAGACAAATCCTCTAGCACAGCCCACA TGGAGCTCCGGAGCCTGGCATCTGAGGACTC TGCAGTCTATTTTTGTGCAAGAGGGACTCATT ACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT CACTGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCA TCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGC CCAAACTAA

[0118]

[0119] 本文描述了特异性结合于FR α 的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中，所述抗体或抗原结合片段是鼠类IgG或其衍生物。尽管所述抗体或抗原结合片段可以是人类、人源化或嵌合的，但本文中示例的抗体或抗原结合片段是鼠类的。在某些实施方式中，抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的轻链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中，抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的轻链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中，抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方式中，抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的重链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中，抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的重链CDR2氨基酸序列。在某些实施

方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的重链CDR3氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链,并且还包含具有与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。

[0120] 所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:5基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:37基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该轻链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:9基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:41基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该重链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:5基本上相同或一致的氨基酸序列,并且所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:9基本上相同或一致的氨基酸序列。

[0121] 在某些实施方式中,所述抗体由2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(10801 University Blvd.,Manassas,Virginia 20110-2209)并被分配有登记号PTA-11887的抗体产生细胞产生。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞产生的抗体对FR α 的结合亲和性。在某些实施方式中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链CDR和重链CDR。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。

[0122] 还公开了编码特异性结合于FR α 的抗体或抗原结合片段的分离的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的轻链CDR1序列,例如SEQ ID NO:34。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的轻链CDR2,例如SEQ ID NO:35。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的轻链CDR3,例如SEQ ID NO:36。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:38。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的重链CDR2,例如SEQ ID NO:39。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的重链CDR3,例如SEQ ID NO:40。所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以包含具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的CDR1例如SEQ ID NO:34、

与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO:35以及与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO:36的轻链。所述分离的多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:38,与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:39,以及与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:40。所述分离的多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:2基本上相同或一致的轻链CDR1,例如SEQ ID NO:34,由与SEQ ID NO:3基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR2,例如SEQ ID NO:35,和由与SEQ ID NO:4基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3,例如SEQ ID NO:36;以及与SEQ ID NO:6基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:38,与SEQ ID NO:7基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:39,和与SEQ ID NO:8基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:40。也可以使用抗体样蛋白作为CDR支架,对CDR的抗原结合排列方式进行工程化改造。这样的工程化改造的抗原结合蛋白也在本公开的范围之内。

[0123] 本文描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:5基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:37的轻链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的分离的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:9基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:41的重链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的分离的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:5基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:37的轻链可变结构域区段,以及包括与SEQ ID NO:9基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:41的重链可变结构域区段。本文提供的能够编码可变结构域区段的分离的多核苷酸可以被包含在相同或不同的载体上,以产生抗体或抗原结合片段。

[0124] 本文描述了特异性结合于FR α 的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段是鼠类IgG或其衍生物。尽管所述抗体或抗原结合片段可以是人类、人源化或嵌合的,但本文中示例的抗体或抗原结合片段是鼠类的。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的轻链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的轻链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的重链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的重链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的重链CDR3氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链,并且还包括具有与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的CDR1氨

氨基酸序列、与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。

[0125] 所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:13基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:45基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该轻链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:17基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:49基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该重链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:13基本上相同或一致的氨基酸序列,并且所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:17基本上相同或一致的氨基酸序列。

[0126] 在某些实施方式中,所述抗体由2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(10801 University Blvd.,Manassas,Virginia 20110-2209)并被分配有登记号PTA-11884的抗体产生细胞产生。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞产生的抗体对FR α 的结合亲和性。在某些实施方式中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链CDR和重链CDR。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。

[0127] 还公开了编码特异性结合于FR α 的抗体或抗原结合片段的分离的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的轻链CDR1序列,例如SEQ ID NO:42。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的轻链CDR2,例如SEQ ID NO:43。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的轻链CDR3,例如SEQ ID NO:44。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:46。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的重链CDR2,例如SEQ ID NO:47。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的重链CDR3,例如SEQ ID NO:48。所述多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以包含具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的CDR1例如SEQ ID NO:42、与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO:43以及与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO:44的轻链。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:46,与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:47,以及与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:48。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:10基本上相同或一致的轻链CDR1,例如SEQ ID NO:42,由与SEQ ID NO:11基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR2,例如SEQ ID NO:43,和由与SEQ ID NO:12基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3,例如SEQ ID NO:44;以及与SEQ ID NO:14基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:46,与SEQ ID NO:15基本上相同或一致的CDR2,例

如SEQ ID NO:47,和与SEQ ID NO:16基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:48。也可以使用抗体样蛋白作为CDR支架,对CDR的抗原结合排列方式进行工程化改造。这样的工程化改造的抗原结合蛋白也在本公开的范围之内。

[0128] 本文描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:13基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:45的轻链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:17基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:49的重链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:13基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:45的轻链可变结构域区段,以及包括与SEQ ID NO:17基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:49的重链可变结构域区段。本文提供的能够编码可变结构域区段的多核苷酸可以被包含在相同或不同的载体上,以产生抗体或抗原结合片段。

[0129] 本文描述了特异性结合于FR α 的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段是鼠类IgG或其衍生物。尽管所述抗体或抗原结合片段可以是人类、人源化或嵌合的,但本文中示例的抗体或抗原结合片段是鼠类的。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的轻链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的轻链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的重链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的重链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的重链CDR3氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链,并且还包括具有与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。

[0130] 所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:21基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:53基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该轻链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:25基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:57基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该重链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可

变结构域包括与SEQ ID NO:21基本上相同或一致的氨基酸序列,并且所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:25基本上相同或一致的氨基酸序列。

[0131] 在某些实施方式中,所述抗体由2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(10801 University Blvd.,Manassas,Virginia 20110-2209)并被分配有登记号PTA-11886的抗体产生细胞产生。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞产生的抗体对FR α 的结合亲和性。在某些实施方式中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链CDR和重链CDR。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。

[0132] 还公开了编码特异性结合于FR α 的抗体或抗原结合片段的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的轻链CDR1序列,例如SEQ ID NO:50。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的轻链CDR2,例如SEQ ID NO:51。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的轻链CDR3,例如SEQ ID NO:52。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:54。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的重链CDR2,例如SEQ ID NO:55。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的重链CDR3,例如SEQ ID NO:56。所述多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以包含具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的CDR1例如SEQ ID NO:50、与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO:51以及与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO:52的轻链。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:54,与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:55,以及与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:56。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:18基本上相同或一致的轻链CDR1,例如SEQ ID NO:50,由与SEQ ID NO:19基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR2,例如SEQ ID NO:51,和由与SEQ ID NO:20基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3,例如SEQ ID NO:52;以及与SEQ ID NO:22基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:54,与SEQ ID NO:23基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:55,和与SEQ ID NO:24基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:56。也可以使用抗体样蛋白作为CDR支架,对CDR的抗原结合排列方式进行工程化改造。这样的工程化改造的抗原结合蛋白也在本公开的范围之内。

[0133] 本文描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:21基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:53的轻链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:25基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:57的重链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:21基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:53的轻链可变结构域区段,以及包括与SEQ

ID NO:25基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:57的重链可变结构域区段。本文提供的能够编码可变结构域区段的多核苷酸可以被包含在相同或不同的载体上,以产生抗体或抗原结合片段。

[0134] 本文描述了特异性结合于FR α 的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段是鼠类IgG或其衍生物。尽管所述抗体或抗原结合片段可以是人类、人源化或嵌合的,但本文中示例的抗体或抗原结合片段是鼠类的。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的轻链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的轻链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的轻链CDR3氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的重链CDR1氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的重链CDR2氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段可以包括与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的重链CDR3氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。所述抗体或抗原结合片段可以包括具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的轻链,并且还包括具有与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的CDR3氨基酸序列的重链。

[0135] 所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:29基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:61基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该轻链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:33基本上相同或一致的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括与SEQ ID NO:65基本上相同或一致的序列的分离的多核苷酸可以编码该重链可变结构域的氨基酸序列。所描述的抗体或抗原结合片段可以包括轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:29基本上相同或一致的氨基酸序列,并且所述重链可变结构域包括与SEQ ID NO:33基本上相同或一致的氨基酸序列。

[0136] 在某些实施方式中,所述抗体由2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(10801 University Blvd.,Manassas,Virginia 20110-2209)并被分配有登记号PTA-11885的抗体产生细胞产生。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞产生的抗体对FR α 的结合亲和性。在某些实施方式中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链CDR和重链CDR。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。

[0137] 还公开了编码特异性结合于FR α 的抗体或抗原结合片段的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的轻链CDR1序列,例如SEQ ID NO:58。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的轻链CDR2,例如SEQ ID NO:59。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的轻链CDR3,例如SEQ ID NO:60。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:62。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的重链CDR2,例如SEQ ID NO:63。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的重链CDR3,例如SEQ ID NO:64。所述多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以包含具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的CDR1例如SEQ ID NO:58、与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO:59以及与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO:60的轻链。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:62,与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:63,以及与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:64。所述多核苷酸可以编码一种抗体或其抗原结合片段,其具有与SEQ ID NO:26基本上相同或一致的轻链CDR1,例如SEQ ID NO:58,由与SEQ ID NO:27基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR2,例如SEQ ID NO:59,和由与SEQ ID NO:28基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3,例如SEQ ID NO:60;以及与SEQ ID NO:30基本上相同或一致的重链CDR1,例如SEQ ID NO:62,与SEQ ID NO:31基本上相同或一致的CDR2,例如SEQ ID NO:63,和与SEQ ID NO:32基本上相同或一致的CDR3,例如SEQ ID NO:64。也可以使用抗体样蛋白作为CDR支架,对CDR的抗原结合排列方式进行工程化改造。这样的工程化改造的抗原结合蛋白也在本公开的范围之内。

[0138] 本文描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:29基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:61的轻链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:33基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:65的重链可变结构域区段。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸可以编码抗体或抗原结合片段,其具有包括与SEQ ID NO:29基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:61的轻链可变结构域区段,以及包括与SEQ ID NO:33基本上相同或一致的氨基酸序列、例如SEQ ID NO:65的重链可变结构域区段。本文提供的能够编码可变结构域区段的多核苷酸可以被包含在相同或不同的载体上,以产生抗体或抗原结合片段。

[0139] 编码工程化改造的抗原结合蛋白的多核苷酸也在本公开的范围之内。在某些实施方式中,所描述的多核苷酸(以及它们编码的肽)包括前导序列。可以使用本领域中已知的任何前导序列。前导序列可以包括但不限于限制性位点或翻译起始位点。

[0140] 本文描述的抗体或抗原结合片段包括具有单个或多个氨基酸取代、缺失或添加并保留所描述的抗体或抗原结合片段的生物性质(例如结合亲和性或免疫效应子活性)的变体。本领域技术人员可以产生具有单个或多个氨基酸取代、缺失或添加的变体。这些变体可

以包括：(a) 其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸取代的变体，(b) 其中向多肽添加或从多肽缺失一个或多个氨基酸的变体，(c) 其中一个或多个氨基酸包括取代基的变体，以及 (d) 其中多肽与另一个肽或多肽融合的变体，所述另一个肽或多肽例如为融合配偶体、蛋白质标签或其他化学部分，其可以向所述多肽提供有用的性质，例如用于抗体的表位、聚组氨酸序列、生物素部分等。本文描述的抗体或抗原结合片段可以包括其中在保守或非保守位置处，来自于一个物种的氨基酸残基被另一个物种中的相应残基取代的变体。在其他实施方式中，非保守位置处的氨基酸残基被保守或非保守残基取代。用于获得这些变体的技术，包括遗传学（抑制、缺失、突变等）、化学和酶学技术，对于本领域普通技术人员来说是已知的。

[0141] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以表现为数种抗体同种型，例如IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。抗体或其抗原结合片段的特异性主要由CDR的氨基酸序列和排列决定。因此，可以将一种同种型的CDR转移到另一种同种型而不改变抗原特异性。或者，已经建立了使杂交瘤从产生一种抗体同种型转换成产生另一种同种型（同种型转换）而不改变抗原特异性的技术。因此，这样的抗体同种型在所描述的抗体或抗原结合片段的范围之内。

[0142] 本文描述的抗体或抗原结合片段对FR α 具有结合亲和性（单位为M），其包括小于约 1×10^{-8} M的解离常数（K_D）。在一种实施方式中，抗体9F3对FR α 的亲和性为 7.15×10^{-10} M。在一种实施方式中，抗体19D4对FR α 的亲和性为 5.67×10^{-10} M。在一种实施方式中，抗体24F12对FR α 的亲和性为 1.02×10^{-10} M。在一种实施方式中，抗体26B3对FR α 的亲和性为 2.73×10^{-11} M。在一种实施方式中，抗体9F3对FR α 的亲和性为约 6.5×10^{-10} M至约 8×10^{-10} M。在一种实施方式中，抗体19D4对FR α 的亲和性为约 5×10^{-10} M至约 6.5×10^{-10} M。在一种实施方式中，抗体24F12对FR α 的亲和性为约 0.5×10^{-10} M至约 2×10^{-10} M。在一种实施方式中，抗体26B3对FR α 的亲和性为约 1×10^{-11} M至约 3.5×10^{-11} M。

[0143] 还提供了包含本文描述的多核苷酸的载体。所述载体可以是表达载体。因此，在本公开的范围内设想了含有编码目标多肽的序列的重组表达载体。表达载体可以含有一个或多个附加序列，例如但不限于调控序列（例如启动子、增强子）、选择标记和多腺苷酸化信号。用于转化广泛的各种宿主细胞的载体是公知的，并且包括但不限于质粒、噬粒、粘粒、杆状病毒、杆粒、细菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）以及其他细菌、酵母和病毒载体。

[0144] 本说明书范围内的重组表达载体包括合成的、基因组的或cDNA来源的编码至少一种重组蛋白且可以与适合的调控元件可操作连接的核酸片段。这样的调控元件可以包括转录启动子、编码适合的mRNA核糖体结合位点的序列以及控制转录和翻译的终止的序列。表达载体、特别是哺乳动物表达载体，也可以包括一个或多个非转录元件例如复制起点、与待表达的基因相连的适合的启动子和增强子、其他5'或3'侧翼非转录序列、5'或3'非翻译序列（例如必需的核糖体结合位点）、多腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点或转录终止序列。也可以整合有提供在宿主中复制的能力的复制起点。

[0145] 用于转化脊椎动物细胞的表达载体中的转录和翻译控制序列可以由病毒来源提供。示例性的载体可以如Okayama和Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983) 所述来构造。

[0146] 在某些实施方式中，将抗体或抗原结合片段的编码序列置于强有力的组成性启动子的控制之下，例如用于下列基因的启动子：次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶（HPRT），腺苷脱氨

酶,丙酮酸激酶, β -肌动蛋白,人类肌球蛋白,人类血红蛋白,人类肌肉肌氨酸等。此外,许多病毒启动子在真核细胞中组成性地发挥作用,并且适用于所描述的实施方式。这样的病毒启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子,SV40的早期和晚期启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子,马罗尼白血病病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、Epstein Barr病毒(EBV)、劳氏肉瘤病毒(RSV)和其他反转录病毒的长末端重复序列(LTR),以及单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。在一种实施方式中,将抗体或其抗原结合片段的编码序列置于诱导型启动子的控制之下,所述诱导型启动子例如为金属硫蛋白启动子、四环素诱导型启动子、多西环素诱导型启动子、含有一个或多个干扰素刺激响应性元件(ISRE)例如蛋白激酶R 2', 5'-寡腺苷酸合成酶、Mx基因、ADAR1的启动子等。

[0147] 本文描述的载体可以含有一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)。在融合载体中包含IRES序列,对于提高某些蛋白的表达可能是有益的。在某些实施方式中,载体系统包括一个或多个多腺苷酸化位点(例如SV40),其可以在任何上述核酸序列的上游或下游。载体组分可以被连续地连接,或者以为基因产物的表达提供最佳间隔的方式排列(即通过在ORF之间引入“间隔”核苷酸),或以另一种方式放置。调控元件例如IRES基序也被排列成提供用于表达的最佳间隔。

[0148] 载体可以包含选择标记,其在本领域中是公知的。选择标记包括阳性和阴性选择标记,例如抗生素抗性基因(例如新霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、四环素抗性基因、青霉素抗性基因),谷氨酰胺合成酶基因,用于更昔洛韦选择的HSV-TK、HSV-TK衍生物,或用于6-甲基嘌呤选择的细菌嘌呤核苷磷酸化酶基因(Gadi等,7 Gene Ther.1738-1743(2000))。编码选择标记或克隆位点的核酸序列可以在编码目标多肽或克隆位点的核酸序列的上游或下游。

[0149] 本文描述的载体可用于向多种细胞转化编码所描述的抗体或抗原结合片段的基因。例如,载体可用于产生生产抗体或抗原结合片段的细胞。因此,另一方面描述了用包含核酸序列的载体转化的宿主细胞,所述核酸序列编码特异性结合FR α 的抗体或其抗原结合片段,例如本文中描述并示例的抗体或抗原结合片段。

[0150] 在本领域中已知用于将外来基因导入细胞的多种技术,所述技术可以按照本文中描述和示例的各种实施方式,用于构造目的在于执行所描述的方法的重组细胞。所使用的技术应该提供异源基因序列向宿主细胞的稳定转移,使得所述异源基因序列可以被细胞后代遗传并表达,并使受体细胞必需的发育和生理功能不被破坏。可以使用的技术包括但不限于染色体转移(例如细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移)、物理方法(例如转染、原生质体融合、微注射、电穿孔、脂质体载体)、病毒载体转移(例如重组DNA病毒、重组RNA病毒)等(被描述在Cline,29 Pharmac. Ther.69-92(1985)中)。磷酸钙沉淀和聚乙二醇(PEG)诱导的细菌原生质体与哺乳动物细胞的融合,也可用于转化细胞。

[0151] 适用于表达本文描述的抗体或抗原结合片段的细胞优选地是真核细胞,更优选地是植物、啮齿动物或人类来源的细胞,例如但不限于NS0、CHO、CHOK1、perC.6、Tk-ts13、BHK、HEK293细胞、COS-7、T98G、CV-1/EBNA、L细胞、C127、3T3、HeLa、NS1、Sp2/0骨髓瘤细胞和BHK细胞系等。此外,可以使用杂交瘤细胞来实现抗体的表达。本领域中已经建立了用于产生杂交瘤的方法。

[0152] 可以对用本文描述的表达载体转化的细胞进行选择或筛选,以获得本文描述的抗

体或抗原结合片段的重组表达。将重组阳性细胞进行扩增并筛选表现出希望的表型的亚克隆,所述希望的表型例如为高水平表达、增强的生长性质或产生由于例如蛋白质修饰或翻译后修饰的改变而具有希望的生物化学特性的蛋白的能力。这些表型可能是由给定亚克隆的固有性质或突变造成的。可以通过使用化学品、UV波长的光、辐射、病毒、插入性诱变剂、DNA错配修复的抑制或这些方法的组合来实现突变。

[0153] 本文提供了通过将样品与本文描述的抗体或其抗原结合片段相接触来检测样品中的FR α 的方法。正如本文中所描述,样品可以源自于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)、组织学制备物等。在某些实施方式中,所描述的方法包括通过将样品与下面的(a)、(b)、(c)、(d)或(e)相接触来检测样品中的FR α :

[0154] (a) 与抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种结合相同表位的抗体或其抗原结合片段;

[0155] (b) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种或其抗原结合片段;

[0156] (c) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段;

[0157] (d) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的抗体或其抗原结合片段;或

[0158] (e) 具有由保藏于ATCC并且登记号为PTA-11887、PTA-11884、PTA-11886或PTA-11885的任一种细胞系产生的抗体的氨基酸序列的抗体,或其抗原结合片段。

[0159] 在某些实施方式中,可以将样品与本文描述的一种以上抗体或抗原结合片段相接触。例如,可以将样品与第一种抗体或其抗原结合片段相接触,然后与第二种抗体或其抗原结合片段相接触,其中所述第一种抗体或抗原结合片段与所述第二种抗体或抗原结合片段不是相同的抗体或抗原结合片段。在某些实施方式中,可以将所述第一种抗体或其抗原结合片段固定于表面例如多孔板、芯片或类似的基材,然后与样品相接触。在其他实施方式中,在与样品相接触之前,所述第一种抗体或其抗原结合片段可以完全不固定或连接于任何物体。

[0160] 可以使用抗体或其抗原结合片段的各种组合来检测样品中的FR α 。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体9F3的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体19D4的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体9F3的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体24F12的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体9F3的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体26B3的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗

变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体24F12的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体9F3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体26B3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体19D4的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体9F3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体19D4的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体24F12的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体19D4的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体26B3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体24F12的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体9F3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体24F12的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体19D4的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体24F12的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体26B3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体26B3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体9F3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与包含抗体26B3的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与包含抗体19D4的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的氨基酸序列(如表1中所提供)的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与由ATCC登记号PTA-11887的细胞系产生的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与由

位的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与能够与由ATCC登记号PTA-11885的细胞系产生的抗体结合相同表位的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与能够与由ATCC登记号PTA-11884的细胞系产生的抗体结合相同表位的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与能够与由ATCC登记号PTA-11886的细胞系产生的抗体结合相同表位的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与能够与由ATCC登记号PTA-11885的细胞系产生的抗体结合相同表位的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与能够与由ATCC登记号PTA-11884的细胞系产生的抗体结合相同表位的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与能够与由ATCC登记号PTA-11885的细胞系产生的抗体结合相同表位的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与能够与由ATCC登记号PTA-11887的细胞系产生的抗体结合相同表位的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与能够与由ATCC登记号PTA-11885的细胞系产生的抗体结合相同表位的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与能够与由ATCC登记号PTA-11886的细胞系产生的抗体结合相同表位的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与能够与由ATCC登记号PTA-11886的细胞系产生的抗体结合相同表位的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与能够与由ATCC登记号PTA-11884的细胞系产生的抗体结合相同表位的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与能够与由ATCC登记号PTA-11886的细胞系产生的抗体结合相同表位的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与能够与由ATCC登记号PTA-11885的细胞系产生的抗体结合相同表位的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。在一种实施方式中,可以将样品首先与能够与由ATCC登记号PTA-11886的细胞系产生的抗体结合相同表位的抗体或其抗原结合片段相接触,然后独立地与能够与由ATCC登记号PTA-11887的细胞系产生的抗体结合相同表位的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。

[0161] 所描述的抗体和抗原结合片段可以被可检测地标记。在某些实施方式中,标记的抗体和抗原结合片段可以便于通过本文描述的方法检测FR α 。对于本领域技术人员来说,许多这样的标记物是容易知道的。例如,适合的标记物包括但不应被认为仅限于放射性标记物、荧光标记物(例如DyLight® 649)、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物或酶。更具体来说,所描述的标记物包括钆、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶、聚组氨酸(HIS标签)、吖啶染料、花青染料、荧光酮染料、噁嗪染料、菲啶染料、罗丹明染料、Alexafluor®染料等。

[0162] 所描述的抗体和抗原结合片段可用于检测样品中的FR α 的各种测定法中。一些适合的测定法包括但不应被认为仅限于蛋白印迹分析、放射免疫测定法、免疫荧光测定法、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定法、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定法。

[0163] 在本文描述的某些实施方式中,在对象中检测到表达FR α 的癌细胞,可用于确定对象可以用针对FR α 的治疗剂进行治疗。在某些实施方式中,所述针对FR α 的治疗剂可以是抗体例如Farletuzumab。

[0164] 用于诊断癌症的方法

[0165] 本文中提供了用于诊断对象中上皮起源的卵巢癌、乳腺癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、输卵管癌或肺癌的方法。在如上所述的某些实施方式中,对样品例如组织学样品、细针抽吸样品、切除的肿瘤组织、循环细胞、循环肿瘤细胞等中的FR α 进行检测,提供了在获取所述样品的对象中诊断癌症的能力。在某些实施方式中,可能已经知道获取所述样品的对象患有癌症,但是对象所患癌症的类型可能尚未被诊断或者初步诊断可能不明确,因此检测从所述对象获得的样品中的FR α 可以允许或澄清癌症的诊断。

[0166] 在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的样品中存在的FR α 的量,并将观察到的FR α 量与对照样品中的FR α 量进行比较,来评估对象是否患有表达FR α 的癌症,其中源自于对象的样品中的FR α 量与对照样品中的FR α 量之间的差异是对象患有表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,通过将样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估源自于对象的样品中的FR α 量。类似的方法可用于确定对象是否患有与FR α 产生增加无关的癌症。用于评估FR α 的存在的样品可以源自于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)、组织学制备物等。在某些实施方式中,对象是人类。

[0167] 在某些实施方式中,诊断表达FR α 的癌症的方法包括:将对象的生物样品与FR α 特异性抗体或其抗原结合片段(例如源自于表1中提供的抗体和片段的那些FR α 特异性抗体或其抗原结合片段)相接触,对样品中存在的被所述抗体或其抗原结合片段结合的FR α 的量进行定量,将样品中存在的FR α 的量与已知标准进行比较,以及确定对象的FR α 水平是否落在与癌症相关的FR α 水平之内。在另外的实施方式中,在诊断方法后面可以跟随有施用或给出癌症特异性治疗的附加步骤。在某些实施方式中,所述癌症特异性治疗可以针对表达FR α 的癌症,例如Farletuzumab。

[0168] 在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的样品中存在的与细胞或组织相关的FR α 的量,并将观察到的FR α 量与对照样品中的FR α 量进行比较,来评估对象是否患有表达FR α 的癌症,其中源自于对象的样品中的FR α 量与对照样品中的FR α 量之间的差异是对象患有表达FR α 的癌症的指示。

[0169] 在某些实施方式中,对照样品可以源自于未患表达FR α 的癌症的对象。在某些实施方式中,对照样品可以源自于患有表达FR α 的癌症的对象。在某些实施方式中,当对照样品源自于未患表达FR α 的癌症的对象时,观察到样品中存在的FR α 的量相对于对照样品中所观察到的量的增加是被评估对象患有表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,当对照样品源自于未患表达FR α 的癌症的对象时,观察到测试样品中存在的FR α 的量相对于对照样品中所观察到的量的降低或相似性是被评估对象未患表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,当对照样品源自于患有表达FR α 的癌症的对象时,观察到测试样品中存在的FR α 的量相对于对照样品中所观察到的量的相似性是被评估对象患有表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,当对照样品源自于患有表达FR α 的癌症的对象时,观察到测试样品中存在的FR α 的量相对于对照样品中所观察到的量的降低是被评估对象未患表达FR α 的癌症的指示。

[0170] 在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 量,通过将样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以是循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)、组织学制备物等。

[0171] 在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的样品中存在的与细胞或组织不相关的FR α 的量,并将观察到的FR α 量与对照样品中的FR α 量进行比较,来评估对象是否患有表达FR α 的癌症,其中源自于对象的样品中的FR α 量与对照样品中的FR α 量之间的差异是对象患有表达FR α 的癌症的指示。在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 量,通过将样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以是尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、组织学制备物等。

[0172] 在所描述的方法的各种实施方式中,癌症可以是表达FR α 的癌症。在特定实施方式中,表达FR α 的癌症是卵巢癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是子宫内膜癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是结肠直肠癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是甲状腺癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是输卵管癌。在另一种实施方式中,表达FR α 的癌症是非小细胞肺癌例如腺癌。或者,所描述的方法可用于诊断不表达FR α 的癌症,例如鳞状细胞癌。

[0173] 在各种不同情况下,通过将样品与结合FR α 的抗体或其抗原结合片段相接触来测定FR α 的量。在某些实施方式中,可以将样品与一种以上类型的结合FR α 的抗体或其抗原结合片段相接触。在某些实施方式中,可以将样品与结合FR α 的第一种抗体或其抗原结合片段相接触,然后与结合FR α 的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。诸如本文中描述的抗体可用于这种情况。例如,抗体选自:

[0174] (a) 与抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种结合相同表位的抗体或其抗原结合片段;

[0175] (b) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种或其抗原结合片段;

[0176] (c) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段;

[0177] (d) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的抗体或其抗原结合片段;或

[0178] (e) 具有由保藏于ATCC并且登记号为PTA-11887、PTA-11884、PTA-11886或PTA-11885的任一种细胞系产生的抗体的氨基酸序列的抗体,或其抗原结合片段。

[0179] 如上面在描述检测方法的通述部分中详细描述, (a) - (e) 中所描述的抗体和抗原结合片段的各种组合可用于提供“第一种”和“第二种”抗体或抗原结合片段以执行所描述的诊断方法。

[0180] 在某些实施方式中,FR α 的量通过蛋白印迹分析、放射免疫测定法、免疫荧光测定法、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光 (ECL) 免疫测定法、免疫组织化学、荧光激活细胞分选 (FACS) 或ELISA测定法来测定。

[0181] 在所描述的诊断方法的各种实施方式中,使用对照样品。对照样品可以是阳性或阴性测定对照,其确保所使用的测定法正确工作;例如,这种性质的测定对照可以常用于免疫组织化学测定法。或者,对照样品可以是健康对象中FR α 的标准化的对照量。在某些实施方式中,可以将观察到的受试对象的FR α 水平与在来自于已知患有表达FR α 的癌症的对照对象的样品中观察到的FR α 水平进行比较。在某些实施方式中,对照对象的表达FR α 的癌症是卵巢癌、子宫内膜癌、结肠直肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、输卵管癌或肺癌例如腺癌。在某些实

施方式中,已知对照对象患有早期的表达FR α 的癌症,例如I期卵巢癌、子宫内膜癌、结肠直肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、输卵管癌或肺癌(例如腺癌)。在某些实施方式中,已知对照对象患有中期的表达FR α 的癌症,例如II期卵巢癌、子宫内膜癌、结肠直肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、输卵管癌或肺癌(例如腺癌)。在某些实施方式中,已知对照对象患有晚期的表达FR α 的癌症,例如III期或IV期卵巢癌、子宫内膜癌、结肠直肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、输卵管癌或肺癌(例如腺癌)。

[0182] 本文提供的诊断方法还提供了一种基础,在此基础上可以预测对象在诊断后存活5年的可能性是相对较高还是较低。在某些实施方式中,所描述的方法可用于为患有腺癌的对象预测有利结果,其中有利结果被定义为具有增加的5年存活率。如本文中提供的数据所表明的,与被确定为患有表达FR α 的I期或II期腺癌的对象相比,被确定为患有不表达FR α 的I期或II期腺癌的对象在5年内死亡的可能性高约2倍。因此,本文描述的诊断方法可以与这一知识相结合,以允许获得一种为被确定患有癌症的对象预测5年存活可能性的方法。在某些实施方式中,所述方法用于为被确定患有腺癌的对象预测5年存活可能性。

[0183] 在某些实施方式中,所描述的预后方法包括:将对象的生物样品与FR α 特异性抗体或其抗原结合片段(例如源自于表1中提供的抗体和片段的那些FR α 特异性抗体或其抗原结合片段)相接触,对样品中存在的被所述抗体或其抗原结合片段结合的FR α 的量进行定量,将样品中存在的FR α 的量与已知标准进行比较,以及确定对象的FR α 水平是否指示表达FR α 的癌症的存在,从而允许对对象在被诊断为患有癌症后存活5年的可能性进行预测。在某些实施方式中,对象已知患有或被确定为患有腺癌。在某些实施方式中,对象是人类。

[0184] 用于监测癌症的方法

[0185] 本文中提供了用于监测对象中上皮起源的癌症的方法。在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的测试样品中存在的FR α 的量,并将观察到的FR α 量与在较早时间点从所述对象获得的样品中的FR α 量进行比较,来评估表达FR α 的癌症是进展、消退还是保持稳定,其中测试样品和较早样品中的FR α 量之间的差异提供了所述癌症是进展、消退还是保持稳定的指示。就此而言,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有增加的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的进展。相反,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有降低的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的消退。因此,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有无显著差异的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的病情稳定状态。在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 量,通过将所述样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以源自于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)、组织学制备物等。在某些实施方式中,对象是人类。

[0186] 在某些实施方式中,监测表达FR α 的癌症的方法包括:将对象的生物样品与FR α 特异性抗体或其抗原结合片段(例如源自于表1中提供的抗体和片段的那些FR α 特异性抗体或其抗原结合片段)相接触,对样品中存在的被所述抗体或其抗原结合片段结合的FR α 的量进行定量,将样品中存在的FR α 的量与在较早时间点来自于同一对象的样品中确定的FR α 量进行比较,以及确定对象的FR α 水平是否随时间变化。测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有增加的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的进展。相反,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有降低的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的消退。因此,测试样品相对于较早

样品中所观察到的量具有无显著差异的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的病情稳定状态。在某些实施方式中,可以将样品的FR α 水平单独地与已知标准进行比较,或者还与在较早时间点评估的样品中所观察到的FR α 水平进行比较。在某些实施方式中,已知标准可以是已知浓度的FR α 蛋白(例如重组或纯化的FR α 蛋白样品)。在其他实施方式中,在诊断方法后面可以跟随有施用癌症特异性治疗的附加步骤。在某些实施方式中,所述癌症特异性治疗可以针对表达FR α 的癌症,例如Farletuzumab。

[0187] 在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的测试样品中存在的与细胞或组织相关的FR α 的量,并将观察到的FR α 量与在较早时间点以类似方式从对象获得的样品中的FR α 量进行比较,来评估表达FR α 的癌症是进展、消退还是保持稳定,其中测试样品和较早样品中的FR α 量之间的差异提供了所述癌症是进展、消退还是保持稳定的指示。就此而言,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有提高的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的进展。相反,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有降低的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的消退。因此,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有无显著差异的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的病情稳定状态。在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 量,通过将所述样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以是循环细胞、循环肿瘤细胞、与组织不关联的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活检组织,包括细针抽吸物)、组织学制备物等。

[0188] 在某些实施方式中,所描述的方法包括通过测定源自于对象的测试样品中存在的与细胞或组织不相关的FR α 的量,并将观察到的FR α 量与在较早时间点以类似方式从对象获得的样品中的FR α 量进行比较,来评估表达FR α 的癌症是进展、消退还是保持稳定,其中测试样品和较早样品中的FR α 量之间的差异提供了所述癌症是进展、消退还是保持稳定的指示。就此而言,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有提高的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的进展。相反,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有降低的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的消退。因此,测试样品相对于较早样品中所观察到的量具有无显著差异的FR α 量,可以指示表达FR α 的癌症的病情稳定状态。在某些实施方式中,源自于对象的样品中的FR α 量,通过将所述样品与结合FR α 的抗体例如本文中描述的抗体相接触来评估。用于评估FR α 的存在的样品可以是尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、组织学制备物等。

[0189] 在所描述的方法的各种实施方式中,癌症可以是表达FR α 的癌症。在特定实施方式中,表达FR α 的癌症是卵巢癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是子宫内膜癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是结肠直肠癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是甲状腺癌。在某些实施方式中,表达FR α 的癌症是输卵管癌。在另一种实施方式中,表达FR α 的癌症是非小细胞肺癌例如腺癌。

[0190] 在各种不同情况下,通过将样品与结合FR α 的抗体或其抗原结合片段相接触来测定FR α 的量。在某些实施方式中,可以将样品与一种以上类型的结合FR α 的抗体或其抗原结合片段相接触。在某些实施方式中,可以将样品与结合FR α 的第一种抗体或其抗原结合片段相接触,然后与结合FR α 的第二种抗体或其抗原结合片段相接触。诸如本文中描述的抗体可用于这种情况。例如,抗体可以选自:

[0191] (a) 与抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种结合相同表位的抗体或其抗原结合片段;

[0192] (b) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种或其抗原结合片段；

[0193] (c) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段；

[0194] (d) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的抗体或其抗原结合片段；或

[0195] (e) 具有由保藏于ATCC并且登记号为PTA-11887、PTA-11884、PTA-11886或PTA-11885的任一种细胞系产生的抗体的氨基酸序列的抗体，或其抗原结合片段。

[0196] 如上面在描述检测方法的通述部分中详细描述，(a) - (e) 中所描述的抗体和抗原结合片段的各种组合可用于提供“第一种”和“第二种”抗体或抗原结合片段以执行所描述的监测方法。

[0197] 在某些实施方式中，FR α 的量通过蛋白印迹分析、放射免疫测定法、免疫荧光测定法、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光 (ECL) 免疫测定法、免疫组织化学、荧光激活细胞分选 (FACS) 或ELISA测定法来测定。

[0198] 在详细描述和所提供的实施例和相关附图中，更详细地提供了所概述的主题的其他方面。

[0199] 用于检测FR α 的试剂盒

[0200] 本文提供了用于检测样品中的FR α 的试剂盒。这些试剂盒包括本文描述的一种或多种FR α 特异性抗体或其抗原结合片段，以及所述试剂盒的使用说明书。在某些实施方式中，被提供在所描述的试剂盒中的抗体或抗原结合片段可以是下列一种或多种：

[0201] (a) 与抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种结合相同表位的抗体或其抗原结合片段；

[0202] (b) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种或其抗原结合片段；

[0203] (c) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段；

[0204] (d) 包含如表1中所描述的抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3中的任一种的重链可变结构域区段和轻链可变结构域区段的抗体或其抗原结合片段；或

[0205] (e) 具有由保藏于ATCC并且登记号为PTA-11887、PTA-11884、PTA-11886或PTA-11885的任一种细胞系产生的抗体的氨基酸序列的抗体，或其抗原结合片段。

[0206] 所提供的抗体或抗原结合片段可以在溶液中，冷冻干燥，固定于基材、载体或板，或偶联于可检测的标记物。

[0207] 所描述的试剂盒还可以包含可用于执行本文描述的方法的附加组分。例如，试剂盒可以包含用于从对象获得样品的机构，对样品例如来自于患有缓慢进展的癌症的对象和/或未患癌症的对象的样品，一个或多个样品区室，和/或描述本发明方法的执行和组织特异性对照/标准品的说明性材料。

[0208] 用于测定FR α 水平的机构可以进一步包括例如缓冲剂或在用于测定FR α 水平的测定法中使用的其他试剂。说明书可以是例如用于执行测定法的印刷说明书和/或用于评估FR α 的表达水平的说明书。

[0209] 所描述的试剂盒还可以包括用于从对象分离样品的机构。这些机构可以包含可用于从对象获得流体或组织的一种或多种设备或试剂。用于从对象获得样品的机构还可以包含用于从血液样品分离血液组分例如血清的机构。优选地,试剂盒被设计成用于人类对象。

[0210] 所描述的试剂盒还可以包括能够被施加到样品以减少第一抗体或第二抗体的非特异性结合的封闭试剂。封闭试剂的实例是牛血清白蛋白(BSA),其可以在使用前用缓冲液进行稀释。其他可商购的封闭试剂例如Block Ace和ELISA Synblock (AbD serotec)、Background Punisher (BIOCARE MEDICAL) 和StartingBlock (Thermo Fisher Scientific) 是本领域中已知的。所描述的试剂盒还可以包括阴性对照第一抗体,其在基于抗体的检测测定法中不能充分结合于FR α 以产生阳性结果。此外,所描述的试剂盒可以包括能够与FR α 第一抗体例如抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12或抗体26B3结合的第二抗体。在某些实施方式中,第二抗体可以偶联于可检测的标记物例如辣根过氧化物酶(HRP)或荧光团,以允许检测结合于样品的第一抗体。所描述的试剂盒还可以包括比色测定或化学发光底物,其允许在样品上检测结合的第二抗体的存在。在某些实施方式中,比色测定或化学发光底物可以是2,2'-联氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS),3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),3,3'-二氨基联苯胺(DAB),SuperSignal (Thermo Fisher Scientific),ECL试剂(Thermo Fisher Scientific),或本领域普通技术人员已知的其他这样的试剂。

[0211] 提供下面的实施例是为了补充前面的公开内容并为本文描述的主题提供更好的理解。这些实施例不应被认为限制所描述的主题。应该理解,本文描述的实施例和实施方式仅仅是出于说明目的,并且对其进行的各种修改或改变对本领域技术人员来说是显而易见的,并应被包含在本发明的范围内并且是可以在不背离本发明的真实范围的情况下做出的。

[0212] 实施例1-重组人类FR α 的表达和纯化

[0213] 为了进行与本文描述的研究相关的实验,产生了数种表达叶酸受体 α (FR α)的细胞系统或细胞株,以产生表达FR α 的细胞基质或产生纯化的重组人类FR α 蛋白。所使用的一种表达系统是通过杆状病毒表达重组人类FR α 的Sf9昆虫细胞系。使用人类FR α 序列来制备该系统,所述人类FR α 序列含有被优化用于昆虫细胞表达的前导序列、N-端6x组氨酸(6xhis)表位标签和完整的天然GPI连接位点。然后将细胞在1L摇瓶中温育,并将Sf9昆虫细胞的对数期培养物以 <1 的感染复数(MOI)用重组杆状病毒进行感染。从30L培养物收获细胞,裂解,并用含有10mM 3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基]-1-丙磺酸(CHAPS)的1X磷酸盐缓冲液(PBS)提取2x。将NaCl浓度调整至300mM,并通过0.2 μ m膜进行过滤。将澄清的上清液通过亲和层析进行纯化,其中使用含有2M NaCl、1mM CHAPS的pH 7.4的1X PBS作为洗涤缓冲液,然后用pH 6.8的10mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、3M MgCl₂、1mM CHAPS洗脱。将峰级分针对pH 7.4的1X PBS充分透析,通过SDS-PAGE分析纯度,通过二喹啉甲酸测定法(BCA)定量,分成等分试样并储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0214] 使用含有人类免疫球蛋白 κ 前导序列和代替GPI连接位点的C-端6xhis表位标签的人类叶酸受体 α (FR α)序列,产生稳定地表达并分泌人类FR α 的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞系。在产生后,将表达FR α 的CHO细胞以25L规模在波状包中生长。为了纯化分泌的FR α 蛋白,通过深度过滤从细胞上清液清除细胞碎片,然后通过切向流过滤将上清液浓缩10倍,并渗滤到pH 8.0的50mM磷酸钠、300mM NaCl、1mM咪唑中。使用FPLC将其装载到预装填的Talon $^{\circledR}$

IMAC柱上。使用pH8.0的50mM磷酸钠、300mM NaCl、5mM咪唑洗掉未结合的材料,并使用含5mM-100mM咪唑的pH 8.0的50mM磷酸钠、300mM NaCl的线性梯度来洗脱结合的蛋白。将峰级分针对pH 7.4的1X PBS充分透析,通过SDS-PAGE分析纯度,通过BCA测定法定量,分成等分试样并储存在-80℃。

[0215] 也为人类叶酸受体 β (FR β)、人类叶酸受体 γ (FR γ)和人类叶酸受体 δ (FR δ)产生了类似的细胞系统。简单来说,使用含有人类免疫球蛋白 κ 前导序列和代替GPI连接位点的C-端6xhis表位标签的FR β 、FR γ 或FR δ 的构建物来瞬时转染1L 293F细胞培养物。按照上面对人类FR α 所描述的,对重组FR蛋白进行纯化。

[0216] 也制备了稳定地表达并分泌含有人类免疫球蛋白 κ 前导序列和代替GPI连接位点的C-端6xhis表位标签的人类间皮素序列的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞系,因为间皮素对于许多研究来说起到阴性对照的作用。将表达人类间皮素的CHO细胞以25L规模在波状包中生长。为了纯化分泌的间皮素蛋白,通过中空纤维过滤从细胞上清液清除碎片,并通过切向流过滤将澄清的上清液浓缩10倍。将上清液的NaCl浓度调整至300mM NaCl和0.5mM咪唑。使用FPLC将其装载到预装填的 **Talon®** IMAC柱上。使用pH 8.0的50mM磷酸钠、300mM NaCl、3mM咪唑洗掉未结合的材料,并使用pH 8.0的50mM磷酸钠、300mM NaCl、150mM咪唑来洗脱结合的蛋白。将峰级分针对pH 7.5的50mM磷酸钾充分透析。添加硫酸铵至终浓度为1M,然后使用含1M-0M硫酸铵的pH 7.5的50mM磷酸钾的步阶梯度,在预装填的苯基琼脂糖凝胶柱上进行最后的纯化。将峰级分针对pH 7.4的1X PBS充分透析,通过SDS-PAGE分析纯度,通过BCA测定法定量,分成等分试样并储存在-80℃。

[0217] 实施例2-产生纯化的还原和烷基化FR α

[0218] 进行尝试以产生FR α 的还原和烷基化的抗原性形式。为了还原所述蛋白,使用离心过滤器(Amicon Ultra, 3 kD MW限制)将纯化的FR α 在磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4)中浓缩至2mg/mL。使用BCA测定法(Thermo Scientific)测定蛋白质浓度。将得到的FR α 在8M尿素/PBS中1:1稀释,以产生在含有4M尿素的PBS中的终浓度为1mg/mL的FR α 。加入二硫苏糖醇溶液(500mM,在PBS中)至终浓度为10mM。将所述溶液在65℃温育1小时,并冷却至室温。

[0219] 接下来,将在磷酸盐缓冲盐水中的1M碘乙酰胺溶液加入到还原的叶酸受体溶液中至终浓度为10mM,并将反应在室温下和暗处保持30分钟。在这些条件下蛋白保持可溶。用于免疫接种的最终还原的FR α 被储存在含有4M尿素、10mM DTT和10mM碘乙酰胺的磷酸盐缓冲盐水中。

[0220] 图1示出了在非还原条件下通过SDS-PAGE分析的天然FR α 蛋白和蛋白的还原和烷基化形式的差异迁移。

[0221] 实施例3-使用FR α 产生杂交瘤

[0222] 将8周龄雌性Balb/c小鼠用带有六聚组氨酸标签的FR α 蛋白(n=5)或还原和烷基化的FR α 蛋白(n=5)进行免疫接种。在第0天施用的初始腹膜内免疫接种包含与弗氏完全佐剂(Rockland,目录号D614-0050)1:1(v:v)混合的50 μ g相应的免疫原。然后在14天后及其后每21天,通过腹膜内施用与弗氏不完全佐剂(Rockland,目录号D615-0050)1:1(v:v)混合的50 μ g免疫原对小鼠进行加强免疫。在初始免疫接种后24天和其后每21天,从免疫接种后的小鼠收集血液样品。

[0223] 通过针对FR α 的直接酶联免疫测定法(EIA)分析收集的血液样品。将板用FR α 蛋白

(100ml 1mg/mL溶液,在pH 7.2的PBS、0.02M磷酸钾、0.15M氯化钠中)包被并在4℃温育过夜,用含有0.2% **Tween®-20**的PBS (PBST;Rockland,目录号MB-075-1000)洗涤,并用3%鱼凝胶(Sigma)在室温下封闭1小时。允许各个小鼠血清样品的3倍连续稀释液在室温下结合1小时,然后将板用PBST洗涤3次,随后用HRP偶联的兔抗小鼠抗体(Rockland,目录号610-4320)以1:2500在37℃下探测30分钟。加入TMB底物(Rockland,目录号TMBE-100),并在30分钟后通过加入100mL 1M HCl终止反应,然后在450nm处读取吸光度(酶标仪“Benchmark”;Biorad)。将所有样品针对作为阴性对照的带有六聚组氨酸标签的重组间皮素(间皮素-His₆)蛋白进行反向筛选。

[0224] 从显示出最高抗原特异性滴度的小鼠收获脾脏,并通过脾细胞与Sp2/0 Ag14骨髓瘤细胞(ATTC CRL1581)的电融合(Hybrimune™ CEEF-50B型波形发生器;Cellestis,Romainville,France)来制备杂交瘤。随后,通过如上所述针对FR α 和重组间皮素-His₆的ELISA来筛选杂交瘤上清液,以选择阳性亲代融合细胞系。

[0225] 然后通过有限稀释法对所选择的被确定为产生对重组人类FR α (rhFR α)具有反应性的抗体的亲代细胞系进行亚克隆。然后重新测试由这些细胞产生的抗体的FR α 结合,并使用Clonotyping™系统(SouthernBiotech,Birmingham,AL)进行同种型分型。通过针对人类叶酸受体的三种其他同种型(FR β 、FR γ 和FR δ)的直接ELISA,对来自于这些克隆的上清液进行进一步筛选,以确定受体特异性。将板用100 μ L相应FR α 同种型的1 μ g/mL溶液在4℃下包被过夜,用含有0.2% **Tween®-20**的PBS (Rockland,目录号MB-075-1000)洗涤,并用3%鱼凝胶(Sigma)封闭。允许培养上清液的3倍连续稀释液在室温下结合1小时,然后如上所述将板洗涤,并用HRP偶联的抗小鼠抗体进行探测。产生对FR β 、FR γ 和FR δ 具有反应性的抗体的克隆不被选择用于进一步分析。

[0226] 将4个选择的杂交瘤克隆19D4.B7、26B3.F2、24F12.B1和9F3.H9.H3.H3.B5.G2于2011年5月19日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),并分别被分派有ATCC登记号PTA-11884、PTA-11885、PTA-11886和PTA-11887。

[0227] 实施例4-产生纯化的针对FR α 的单克隆抗体

[0228] 使用支原体测试试剂盒(Rockland,目录号MAB-012)对选择的细胞系进行支原体测试,然后以0.5 \times 10⁵细胞/mL接种到含有无血清培养基(Invitrogen,目录号12045-076)和5%低IgG FBS(0.1 μ g/ml)(Gibco,目录号16250-078)的1L滚瓶中。允许培养物在37℃生长14或21天,然后收获上清液并通过50kDa过滤膜(Spectrum Labs,Rancho Dominguez CA)浓缩约10倍,然后使用蛋白A层析(Rockland,目录号PA50-00-0025)进行纯化。根据抗体同种型,使用pH 3.5/4.5的0.1M柠檬酸钠来洗脱结合的抗体,并使用12-14kDa膜式管路系统(Spectrum Labs,Rancho Dominguez CA)通过透析将缓冲液针对PBS进行交换。使用0.22 μ m Express™PLUS Stericups(Millipore,Billerica MA)将纯化的抗体进行除菌过滤,并储存在4℃下用于进一步测试。

[0229] 进行了尝试以对4个所选杂交瘤克隆(9F3-H9、19D4-B7、24F12-B1和26B3-F2)的重链和轻链进行测序。首先,使用**RNAqueous®**试剂盒(Ambion),按照制造商的流程从每种杂交瘤细胞系(各自1 \times 10³至1 \times 10⁵个细胞的细胞沉淀物)分离总RNA。使用NanoDrop™8000分光光度计(Thermo Scientific)对RNA进行定量。

[0230] 然后通过多重RT-PCR对分离的RNA进行扩增,对每种杂交瘤使用 **Mastercycler®** EP梯度热循环仪 (Eppendorf) 进行三份平行试验。首先,对每种杂交瘤进行两个独立的基因特异性cDNA扩增($\leq 1\mu\text{g}$ RNA/反应),以确定在Ig重排期间所使用的Ig重链和轻链基因。每种混合物由被设计成与任何可能的鼠类Ig V基因家族(IgHv、IgKv)和Ig恒定区基因(IgHcr、IgKc)退火的独特的家族特异性引物构成。使用 **SuperScript® III** 一步RT-PCR系统,利用 **Platinum® Taq**高保真酶 (Invitrogen) 在下列条件下进行cDNA产生和扩增:55°C 30分钟和95°C 2分钟,然后进行40个循环的95°C 1分钟、55°C 1分钟、68°C 1分钟,最后进行68°C 10分钟的完成步骤。将DNA产物在2%琼脂糖凝胶上电泳。切下适合的条带,并使用 **QIAquick®** 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 按照制造商的流程进行凝胶纯化。将纯化的DNA进行测序 (GENEWIZ, Inc., South Plainfield, NJ) 以确定每种杂交瘤表达的种系基因区段。

[0231] 然后使用与上述相同的RNA源和基因特异性引物(与在多重RT-PCR混合物中使用的家族特异性引物不同),进行适合于为每种杂交瘤鉴定的特定基因的进一步的RT-PCR分析。为了便于克隆,将扩增的Ig cDNA置于In-Fusion (IF) 表达载体中,每种基因特异性引物还含有能够进行同源交换的载体相容性连接序列。所有其他试剂和热循环仪条件与用于上面描述的多重RT-PCR实验的相同。

[0232] 实施例5:结合于FR α 的抗体的表征

[0233] 通过表面等离子体共振 (SPR) 实验确定纯化的针对FR α 的单克隆抗体的结合特性。使用带有研究级CM5芯片的BIAcore T100 (GE Healthcare),按照制造商的指示在25°C下进行所有SPR实验。一开始,将小鼠抗体捕获试剂盒 (GE Healthcare) 中提供的抗小鼠IgG通过酰胺偶联固定化到CM5传感器芯片。每个结合循环,将小鼠抗FR α 单克隆抗体 (26B3、24F12、19D4或9F3) 捕获在单独的流动池上,而第四个流动池被用作参比。使用HBS-P (GE Healthcare) 作为运行缓冲液并以30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速进行结合实验。将每种单克隆抗体样品 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 注射3分钟以捕获抗体。然后将各种浓度的纯化的重组人类FR α (rh-FR α) (1nM-30nM) 注射到FR α 特异性和参比表面上3分钟,使用单循环动力学方法记录结合传感图。监测解离曲线25分钟。在结合之间,通过注射30 μL 10mM甘氨酸 (pH 1.7) 将表面再生。使用BIAcore T100评估软件 (2.0.1版) 对传感图进行处理,并拟合成1:1 Langmuir结合模型。抗体26B3、24F12、19D4和9F3的一些结合特性被提供在表2中。

[0234] 表2:FR α 特异性抗体的结合特性。

缩写的克隆名称	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Chi.Sq
26B3	5.24×10^5	1.43×10^{-5}	2.73×10^{-11}	2.48
24F12	3.93×10^5	3.99×10^{-5}	1.02×10^{-10}	1.08
19D4	4.27×10^5	2.42×10^{-4}	5.67×10^{-10}	0.656
9F3	4.34×10^5	3.10×10^{-4}	7.15×10^{-10}	1.89

[0236] 实施例6:所选的FR α 特异性抗体的表位作图

[0237] 在表位结合研究中,使用Octet QK进一步评估FR α 特异性抗体26B3、24F12和9F3。结果显示,对纯化的人类FR α 具有高亲和性的26B3和24F12彼此竞争结合于FR α 。因此,这些

抗体可能具有共同的表位或具有彼此紧密相邻的表位。结果还表明9F3抗体具有独特表位，因为它不与其他FR α 特异性抗体竞争结合于FR α 。

[0238] 使用氢/氘交换质谱术和对接方法，通过ExSARTM进行了其他表位作图研究。这些对抗体9F3、24F12和26B3的研究结果被示出在图2中。对于抗体26B3的表位来说，由于通过流式细胞术发现了26B3识别天然FR α 的能力，因此这些数据表明它在天然的膜锚定型结构中是可接近的。此外，这些数据进一步表明，MAb 26B3所识别的表位的构象限制，正如其不能检测还原的蛋白印迹上的蛋白所证实的，与FR α 蛋白中与第111位半胱氨酸形成二硫化物桥的第185位处的半胱氨酸相关。

[0239] 实施例7:FR α 的变性形式和化学保护的形式的识别

[0240] 进行实验以确定上述任何FR α 特异性抗体是否能够识别FR α 的变性形式。为了进行这些分析，将稳定表达GPI连接的人类FR α 、 β 或 δ 的CHOK1细胞在增补有完全Mini蛋白酶抑制剂混合物(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)和PMSF(100nM)的1.1% OBG缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1.1% OBG)中进行裂解，并在冰上放置15分钟。通过以13,000rpm离心15分钟以去除碎片，将裂解物预澄清。对于还原和变性的样品来说，将等量的蛋白(20 μ g)在含有 β -巯基乙醇+40mM DTT的NuPAGE[®] LDS样品缓冲液(Invitrogen)中煮沸10分钟。使用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在4-12% bis-tris凝胶(Invitrogen)上分离蛋白，并将其转移至PVDF膜。将膜在PBST+5%脱脂奶粉中在室温下封闭1h，随后将膜用PBST洗涤两次。使用特异性针对FR α 的纯化的小鼠单克隆抗体9F3、19D4、24F12或26B3(1 μ g/mL)进行免疫印迹，使用HRP偶联的山羊抗小鼠抗体进行检测，并使用SuperSignal West Pico化学发光底物(Pierce, Rockford, IL)进行可视化。使用Omega 12iC分子成像系统(Ultra-Lum, Claremont, CA)对发光进行可视化，并使用UltraQuantTM6.0软件(Ultra-Lum)进行图像分析。

[0241] 也使用纯化的叶酸受体制备物进行蛋白印迹分析。为了进行这些实验，将0.5 μ g如实施例1中所述产生的纯化的人类FR α 、 β 、 γ 或 δ 在含有或不含20mM DTT的1X SDS-PAGE上样缓冲液(Invitrogen)中温育，煮沸10min，并在4-12%梯度的SDS-PAGE凝胶上电泳。将蛋白转移到PVDF膜，并如上所述进行印迹探测。使用BenchmarkTM预染的蛋白梯带(Novex[®])来运行凝胶。使用纯化的重组FR蛋白进行的凝胶也通过银染进行可视化，以确保荷载的蛋白量相等。

[0242] 蛋白印迹分析表明，抗体19D4、9F3、24F12和26B3识别非还原的FR α ，然而对于任何这些抗体来说，没有检测到与还原和变性的样品的结合(图3(A)和(B))。

[0243] 还进行了免疫组织化学(IHC)研究以确定任何这些抗体是否能够结合于福尔马林固定的石蜡包埋的乳头状浆液性卵巢癌组织样品。对于FR α 来说，使用MACH4TM通用HRP-聚合物检测试剂盒(Biocare Medical)进行间接IHC测试。将福尔马林固定的石蜡包埋的样本在带正电荷的玻璃载片上以5微米切片，并在60 $^{\circ}$ C加热约60分钟。将载片在3个连续的二甲苯浴中脱石蜡，每个浴中3分钟，转移至3个连续的100%乙醇浴，每个浴中3分钟，然后转移至3个连续的95%乙醇浴，每个浴中3分钟，然后在去离子(DI)水中漂洗5分钟。然后将制备的样品用在DI水中稀释至1:10的Diva热诱导的表位恢复溶液(Biocare Medical)进行预处理，并放置在已经装填有500ml DI水的加压去掩蔽腔室内。将样品在所述去掩蔽腔室内温育15分钟，其中加压温育达到在16PSI下最高125 $^{\circ}$ C 30秒，然后冷却15分钟至95 $^{\circ}$ C。然后将载片在

室温下冷却15分钟。在冷却后,将载片在3个连续的Tris缓冲盐水/0.1% **Tween-20**®洗涤缓冲液(TBST)浴中洗涤,每个浴中3分钟。所有后续的缓冲液洗涤均以这种方式进行。然后将载片在过氧化物酶-1(Biocare Medical)封闭溶液中在室温下封闭5分钟,用TBST洗涤,然后在室温下施加Background Sniper(Biocare Medical)无血清通用封闭试剂10分钟。在将样品封闭后,将载片与被稀释在抗体稀释剂(Dako)中的2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 26B3抗体或通用阴性对照——小鼠即用型阴性对照抗体(Dako,用于阴性同种型组织)在室温下温育60分钟。然后将载片用TBST洗涤,并与MACH4™小鼠探测第一抗体增强剂(被提供在Biocare Medical MACH4™试剂盒中)在室温下温育15分钟。然后将载片再次用TBST洗涤,并与聚合物-HRP试剂(被提供在Biocare Medical MACH4试剂盒中)在室温下温育20分钟。在温育后,将载片用TBST洗涤,并与3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)溶液(Dako)在室温下温育5分钟。然后将载片用DI水充分漂洗3次,每次30-60秒,并用苏木精(Dako)复染2分钟,用TBST洗涤,在95%和100%乙醇的各3个连续的浴中脱水,在每个浴中30秒,并在3个连续的二甲苯浴中透明化,在每个浴中30秒。最后,在分析前将盖玻片施加到载片。

[0244] 通常认为,由于组织固定的破坏性质使得抗原不含三级结构,因此为了有效用于福尔马林固定的石蜡包埋组织的免疫组织化学,抗体必须能够识别目标抗原的线性表位。因此,在这一测定中抗体26B3能够识别FR α (图4)是令人吃惊的,因为通过蛋白印迹发现它不识别还原和变性的FR α 。此外,对正常组织观察到的使用抗体26B3的FR α 染色图案,与以前发表的使用多种其他抗体和技术的文献相一致,其中胰腺、甲状腺、肺、唾液腺、肾、垂体、宫颈和乳腺显示出各种不同程度的表达(表3)。如图5中所示,以正常肺(A)和正常肾(B)切片为例,正常组织中的染色图案高度局限于上皮细胞并且在本质上通常在顶端。

[0245] 表3. 正常人类组织中的FR α 表达

[0246]

组织类型	染色 (数量/强度)	注释
大脑	0/3	
小脑	0/3	
肾上腺	0/3	
卵巢	0/3	
胰腺	3/3; 2+	局限于导管和腺泡细胞的腔缘
甲状腺	2/5; 1+ (稀疏)	滤泡细胞中的细胞质染色
垂体	3/3; 1+	主要为细胞质
睾丸	0/3	
乳腺	3/3; 1+/2+	带有腔和膜染色的导管细胞
脾	0/3	
扁桃体	0/3	
胸腺	0/3	
骨髓	0/3	
肺	3/3; 2+	在支气管和肺泡细胞中染色
心	0/3	
食管	0/3	
胃	0/2	
小肠	0/3	

	结肠	0/3	
	肝	0/3	
	唾液腺	3/3; 3+	导管和腺泡细胞
	肾	3/3; 3+	近端小管细胞的腔染色
	前列腺	0/3	
[0247]	子宫内膜	0/3	
	宫颈	1/3; 1+	宫颈内细胞
	骨骼肌	0/3	
	皮肤	0/3	
	神经	0/3	
	间皮 (胸膜和肺)	3/3; 2+	肺泡细胞

[0248] 实施例8:FR α 的天然形式的识别

[0249] 进行流式细胞术研究以评估所选的FR α 特异性抗体结合天然蛋白的能力。对于这些研究来说,收获表达FR α 的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞,将其洗涤并重悬浮在冰冷的生长培养基(增补有10%FBS的RPMI)中。将细胞与9F3、19D4、24F12或26B3(1 μ g/mL)在冰上温育1小时,洗涤,然后与FITC偶联的第二抗体[1:100稀释](Southern Biotech,Birmingham,AL)温育。在分析之前,将细胞用7-氨基-放线菌素D(7-AAD)(BD Biosciences,Franklin Lakes,NJ)标记,以排除非存活的细胞。也对不表达FR α 的CHO细胞进行相同的实验程序,作为阴性对照。在EasyCyteTM流式细胞仪(Guava[®]Technologies,Hayward,CA)上对细胞进行分析。表4中提供的数据表明所有4种抗体都能够结合天然FR α 。

[0250] 表4:FR α 特异性抗体识别表达在细胞表面上的FR α

靶	对抗体观察到的几何平均值:			
	9F3	26B3	24F12	19D4
[0251] 仅仅细胞	2.7	2.7	2.7	2.0
CHOK1	5.9	5.7	5.9	---
[0252] FR α	759.5	853.7	777.0	1130.5
FR β	6.1	5.9	6.6	---
FR Δ	5.6	5.4	5.9	---

[0253] 实施例9:检测已知患有卵巢癌的对象的血清中的FR α

[0254] 进行电化学发光研究以确定本文描述的FR α 特异性抗体是否能够检测已知患有卵巢癌的患者血清中的FR α 。对于这些实验来说,使用MAb 26B3作为捕获MAb,并以75 μ g/mL的浓度添加到ECL板。将板进行洗涤,并向每个孔加入50 μ L样品血清并温育2小时。血清样品

从正常的健康女性(阴性对照)和卵巢癌患者获得。将样品在PBST(磷酸盐缓冲盐水,pH7.4,含有0.01% **Tween®20**)中1:4稀释。在温育后,将样品用PBST洗涤,并向每个孔加入25 μ L/孔的用Ru以约13个标记物/IgG分子的比率标记的MAb 19D4(1 μ g/mL),以检测结合的样品。在2小时温育期后,将板用PBST洗涤,并使用2X MSD缓冲液T进行读数。表5中的结果显示,可以使用单克隆抗体26B3和19D4来捕获并检测血清中的FR α 。

[0255] 表5: 相对的FR α 血清水平

类型 (n)	FRA平均值pg/mL	标准偏差
正常 (15)	223	74
卵巢癌 (15)	1815	3896

[0257] 实施例10: 检测已知患有卵巢癌的对象的血清和尿液中的FR α

[0258] 然后进行电化学发光研究以确定本文描述的FR α 特异性抗体是否能够检测已知患有卵巢癌患者的血清和尿液中的FR α 。对于这些实验来说,使用MAb 26B3作为捕获MAb,并以75 μ g/mL的浓度添加到ECL板。将板进行洗涤,并向每个孔加入50 μ L样品血清并温育2小时。匹配的血清和尿液样品从正常的健康女性(阴性对照)和卵巢癌患者获得。将样品(血清或尿液)在PBST(磷酸盐缓冲盐水,pH7.4,含有0.01% **Tween®20**)中1:4稀释。在温育后,将样品用PBST洗涤,并向每个孔加入25 μ L/孔的用Ru以约13个标记物/IgG分子的比率标记的MAb19D4(1 μ g/mL),以检测结合的样品。在2小时温育期后,将板用PBST洗涤,并使用2X MSD缓冲液T进行读数。表6中的结果显示,可以使用单克隆抗体26B3和19D4来捕获并检测血清和尿液中的FR α 。

[0259] 表6: 相对的FR α 血清水平和尿液水平

患者名称	血清FR α pg/mL	尿液FR α pg/mL
正常1	398	3080
正常2	236	11508
正常3	315	7704
正常4	320	13198
卵巢癌1	19479	368066
卵巢癌2	4144	23738
卵巢癌3	986	165826
卵巢癌4	719	414187

[0261] 实施例11: 作为免疫组织化学结果的度量的M-分值

[0262] 开发了一种用于每种样品的染色的度量(M-分值),其可以定义如下:

$$[0263] \quad M_i = \frac{\sum_{j=1}^3 w_j \cdot x_{ij}}{\sum_{j=1}^3 w_j} = \frac{\sum_{j=1}^3 w_j \cdot x_{ij}}{6}$$

[0264] 在方程中, x_{ij} 是对于患者*i*来说以强度*j*被染色的肿瘤的百分率, w_j 是强度的绝对值(范围为0至3+)。所述度量具有从零(无阳性染色)至50(100%的细胞以3+强度染色)的理论范围。因此,M-分值是捕获FR α 阳性细胞的比例和染色强度两者的FR α IHC肿瘤细胞膜染色的权重分值。在适当情况下,在多个组织微阵列(TMA)样品上对每位患者的M-分值进行平

均。如果样品没有结果,即不存在肿瘤或坏死组织,则M-分值被指派为非空确定值。

[0265] 下面示出了上述方程的实际应用:

[0266]	3+	2+	1+	0	M分值
	$x=40$	$y=30$	$z=10$		$M=(3x+2y+z)/6$
	$3 \times 40=120$	$2 \times 30=60$	$1 \times 10=10$		$(120+60+10)/6=31.67$

[0267] 在这里, x =以强度3+被染色的肿瘤%; y =以强度2+被染色的肿瘤%; z =以强度1+被染色的肿瘤%。

[0268] 在给定组织学内FR α 表达的阳性率被计算为按照阳性结果的定义($\geq 5\%$ 的全部肿瘤细胞染色)阳性染色的样品的比例。使用已建立的方法确定精确的二项式置信区间(Clopper C.J.和Pearson R.C.,Biometrika.26:404-13(1934))。此处示出了对所有人口统计学变量和M-分值的概述统计学数据。使用单因素ANOVA和用于总体I型误差的事后检验控制来确定平均值的差异。如果与检验相关的p-值小于该检验的Bonferroni调整的I型误差(I型误差最大值=0.05),则平均值的差异是统计学差异。

[0269] 实施例12:使用抗体26B3和抗体BN3.2对肺癌细胞进行比较性染色

[0270] 在文献中,对于通过IHC确定的表达FR α 的各种癌的百分率存在显著差异,这部分是由各种不同抗体的使用造成的,这些抗体大多数是不可商购的。一种可商购并已被证实可在FFPE切片上通过IHC检测FR α 的FR α 特异性Mab是抗体BN3.2(Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL)。因此,使用含有各种组织学类型的肺癌的可商购的TMA进行研究,以比较抗体BN3.2与抗体26B3用于FR α 检测的特异性和灵敏度两者。与其他组织学亚型尤其是鳞状细胞癌相比,两种抗体都对腺癌高度特异。然而,抗体26B3的灵敏度显著高于BN3.2,分别鉴定26/36(72%;M-分值平均值 \pm SD=19.84 \pm 18.64)和22/36(61%;M-分值平均值 \pm SD=11.38 \pm 14.25)的腺癌样品($p < 0.0001$)。这些数据证实,对于检测FFPE组织样品上的FR α 表达来说,抗体BN3.2的灵敏度显著低于26B3,并且如图6中所示,对于这两种抗体来说,在肺腺癌样品上观察到的M-分值的关系是非线性的。

[0271] 实施例13:检测已知患有肺腺癌的对象中的FR α

[0272] 进行实验以确定由抗体26B3检测到的FR α 阳性组织学的存在是否与肺癌的特定形式相关。如实施例7中所述,使用抗体26B3通过IHC染色来评估具有正常肺组织样本以及I期、II期、III期和IV期肺癌组织样本的两份平行样品的组织微阵列的FR α 表达。正如可以从表6中的数据看到的,相对于表现出有限的阳性染色的鳞状细胞癌,FR α 与腺癌更加相关。

[0273] 表7:癌组织样品的组织学评估

膜染色			膜阳性		总数
			阴性	阳性	
[0274] 组织学组	腺癌	计数 在组织学组中的%	11 28.9%	27 71.1%	38 100.0%
	鳞状细胞癌	计数 在组织学组中的%	28 90.3%	3 9.7%	31 100.0%
	其他癌	计数 在组织学组中的%	17 81.0%	4 19.0%	21 100.0%
	正常	计数 在组织学组中的%	2 20.0%	8 80.0%	10 100.0%
合计		计数 在组织学组中的%	58 58.0%	42 42.0%	100 100.0%

[0275] 在组织微阵列中在89份组织学样品上进行了进一步分析,其中36份(40%)为腺癌,32份(36%)为鳞状细胞癌,2份(2%)为腺鳞癌,其余19份(21%)代表各种不同组织学(表8)。对于每种组织学亚型来说,FR α 总阳性率显著变化。与鳞状细胞癌相比,显著更高比例的腺癌肿瘤是FR α 阳性的(72%比13%, $p < 0.0001$)。在4份阳性鳞状细胞癌样品中,只有1份在两个样品上显示出3+染色;1份在两个样品上具有中度(2+)染色,其他2份在单个样品上为非常弱的阳性(5-10%的肿瘤细胞处于1+)。此外,两份腺鳞癌样品还显示出FR α 阳性,其中染色局限于这些样品的腺癌部分(图7)。

[0276] 表8:在NSCLC类型#内FR α 表达的分布

变量	FR α 阴性 N (%)	FR α 阳性 N (%)	合计	P 值*
肿瘤组织学				
正常	1 (10%)	9 (90%)	10	
鳞状细胞癌	28 (87%)	4 (14%)	32	<0.0001
大细胞癌	3 (60%)	2 (40%)	5	
小细胞癌	7 (87%)	1 (13%)	8	
神经内分泌癌	4 (67%)	2 (33%)	6	
腺癌**	10 (16%)	28 (74%)	38	
[0277] 肿瘤等级				
1 级	1 (20%)	4 (80%)	5	
2 级	5 (22%)	18 (78%)	23	
3 级	4 (40%)	6 (60%)	10	0.517
肿瘤阶段				
I 期	4 (29%)	11 (71%)	15	
II 期	2 (17%)	10 (83%)	12	
III + IV 期***	4 (36)	7 (64)	11	0.563
性别				
女	3 (18%)	14 (82%)	17	
男	7 (33%)	14 (67%)	21	0.46

[0278] #US Biomax肺癌TMA(目录号BC041114;90份病例,双份核心)

[0279] *使用Fisher精确检验或卡方检验来确定P值:鳞状细胞癌相对于腺癌 $p < 0.0001$;男性相对于女性, $p = 0.46$;阶段, $p = 0.563$;等级, $p = 0.517$

[0280] **包括2例腺鳞癌病例,两者都仅在腺癌部分中为FR α 阳性

[0281] ***仅有1例IV期病例

[0282] 两份平行的腺癌组织学样品的M-分值分析显示出在抗体26B3的染色中几乎没有变差(图8),反映出抗体26B3染色的鲁棒性。此外,在腺癌组织学亚型内通过阶段和等级进行的M-分值检查表明,疾病的阶段和等级都不与由M-分值所定义的染色程度相关(数据未显示)。

[0283] 肺腺癌和鳞状细胞癌样品的FR α 染色的M-分值分布被示出在图9中。用抗体26B3染色的腺癌和鳞状细胞癌样品的M-分值的平均值(\pm SD)分别为19.84(\pm 18.64)和1.39(\pm 5.54)($p < 0.0001$)。当与所有其他肺癌组织学类型相比时,腺癌的M-分值也显著更高。此外,进行了树分析以确定癌症的组织学是腺癌的几率。M-分值 > 21.7 产生16的比值比(OR),进一步证实了FR α 主要表达在腺癌组织学中(分析未示出)。

[0284] 很少可以从被诊断患有晚期肺癌的患者得到福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)组织块,因为通常不进行外科切除。因此,进行了研究以确定细针抽吸(FNA)样本用于使用MAb 26B3的FR α IHC的适合性,因为晚期肺癌最通常通过小的活检组织或细胞学材料来诊断。对于这些研究来说,从9位通过胸部淋巴结抽吸物的细胞学评估而被诊断的晚期腺癌患者获得样品(图10),并证实了FR α 阳性率(63%)与在肺癌TMA上评估的组织学样本中所观察

到的相当。尽管只有小的样品量,但这些数据表明,细胞学样本可能是用于确定晚期腺癌患者中的FR α 表达的适合的组织来源。

[0285] 实施例14-FR α 由从已知患有非小细胞肺癌的患者的血液分离的CK+/CD45-细胞而不是CK-/CD45+细胞表达

[0286] 进行了研究以确定已知患有非小细胞肺癌的患者的循环肿瘤细胞(CTC)上FR α 的表达情况。对于这些研究来说,从15位健康供体和5位IV期肺癌患者获得血液样品,然后使用ApoCell的ApoSteamTM系统富集CTC。在富集后,将每种样品对细胞角蛋白(CK)、CD45(蛋白质酪氨酸磷酸酶受体C型)、细胞核和FR α 进行染色。使用抗体26B3作为第一抗体来进行FR α 染色,然后使用偶联于DyLight® 649的小鼠特异性第二抗体来检测所述第一抗体。如表9中所示,通过CK+/CD45-CTC而不是CK-/CD45+CTC观察到FR α 表达。

[0287] 表9-已知患有非小细胞肺癌的患者的循环肿瘤细胞的FR α 表达

[0288]

患者ID	CK-/CD45+计数	CK-/CD45+/FR α +%	FR α MFI (CK-/CD45+)
患者1	2,270	0.0	NA
患者2	24,462	0.0	NA
[0289] 患者3	26,503	0.0	NA
患者4	16,540	0.0	NA
患者5	2,652	0.0	NA

[0290]

患者ID	7.5mL血液中的 CK+/CD45-细胞计数	CK+/CD45-/FR α +%	FR α MFI (CK+/CD45-)
患者1	55	15.6	82,195
患者2	105	32.8	172,669
患者3	216	9.3	146,521
患者4	57	15.7	179,027
患者5	47	8.1	277,335

[0291] 实施例15:患有和未患表达FR α 的肺腺癌的对象5年存活性

[0292] 进行了实验以确定由抗体26B3检测到的FR α 阳性组织学的存在是否能够与5年存活性的提高或降低相关。如实施例7中所述对正常和癌化的I期或II期腺癌肺组织样本进行IHC染色,然后进行读数。记录肿瘤上染色的3+、2+、1+和0强度的百分率。有177个载片可解释为患者的两份或三份平行样品。当与可评估的临床和组织学数据组合时,鉴定到53例可评估的病例。根据与人口统计学、临床和在诊断为非小细胞肺腺癌后5年时的存活状态相关的数据进行分析。

[0293] 为了确定M-分值的最佳截止点,进行受试者工作特征(ROC)分析。在这一分析中,诊断准确性并不重要;然而,阳性试验的诊断似然比与阴性试验的诊断似然比的比率是重要的。这些比率如Pepe MS,《用于分类和预测的医学试验的统计学评估》(The statistical

evaluation of medical tests for classification and prediction), New York: Oxford University Press (2003) 中所描述的进行所定义。在10的截止点处, 比值比达到6.62的最大值。选择这一M值来确定染色载片的阳性。

[0294] 使用FR α 关联性作为预后因子, 产生Kaplan-Maier存活函数。对数秩检验表明, FR α 阳性对于非致死事件来说是有益的 (Chi-sq=7.34, df=1, p=0.007)。图11示出了通过26B3检测被视为FR α 阳性和FR α 阴性的I期和II期腺癌组的存活函数。在5年时, 危害比为2.42。这表明, 与具有FR α 阳性肿瘤的对象 (M \geq 10) 相比, 具有FR α 阴性的肿瘤的对象 (M<10) 在诊断5年内死亡的可能性高2.5倍。

[0295] 实施例16: 叶酸受体 α 的表达与乳腺癌的三阴性形式相关

[0296] 进行研究以评估乳腺癌组织样品的FR α 表达。使用如实施例7中所描述的用抗体26B3染色的组织微阵列 (TMA) 样品和按照实施例7中所述制备并用抗体26B3染色的FFPE组织学样品来进行分析。

[0297] 乳腺癌TMA (U.S. BioMAX, 目录号BR1503a; 72例病例, 双份核心) 上存在的组织学分布被示出在表10中, 所代表的大部分病例被鉴定为侵入性导管癌 (IDC)。TMA包括2份正常乳腺样品, 其是FR α 表达阳性的, 正如通过MAb 26B3确定的。正常乳腺中的染色局限于导管细胞, 具有腔和膜染色。3例纤维腺瘤病例中的2例 (67%)、0/2囊性肉瘤病例 (0%) 和1/6原位导管癌病例 (17%) 是FR α 阳性的。单个侵入性小叶癌 (ILC) 是FR α 染色阴性的。在59份IDC样品中, 18份 (31%) 是FR α 阳性的 (图12)。由于在该TMA上阳性病例的数量少, 相对于阶段或等级进行FR α 表达的有效分析是不可能的; 然而, 应该指出, 大部分样品为T1或T2。相对于ER/PR阳性肿瘤 (p=0.012) 和三阴性乳腺癌 (TNBC) (ER/PR+或Her2+相对于ER/PR/Her2-, p<0.0001), FR α 表达被显示为与ER/PR阴性肿瘤相关。

[0298] 在18例FR α 阳性IDC病例中, 仅有2例 (11%) 是Her2阳性的, 这意味着绝大多数 (89%) 为Her2阴性。这些数据表明, FR α 阳性更紧密跟随Her2阴性。此外, 在18例FR α 阳性IDC病例中, 3份是雌激素受体 (ER) 阳性的, 4份是孕酮受体 (PR) 阳性的, 但是所有ER/PR阳性/FR α 阳性病例是Her2阴性的。在FR α 阳性IDC病例中, 12/18 (67%) 是三阴性乳腺癌 (TNBC), 表明FR α 可以是预后非常不良的TNBC分子亚型的标志物和靶点。将TMA作为整体来看, 所有Her2阳性病例中仅有2/13 (15%) 也是FR α 阳性的, 而Her2阴性病例的16/46 (35%) 也是FR α 阳性的, 这支持FR α 表达与Her2表达负相关这一建议。图13中示出了该TMA的M-分值相对于分子亚型 (her-2 (+) 和her-2 (-)) 的分布图示。

[0299] 上面描述的TMA主要由早期乳腺癌构成: I期, 6/60 (10%); II期, 44/60 (73%); III期, 10/60 (17%)。因此, 为了证实并扩展在所述TMA上获得的结果, 对来自于已知具有0-100%阳性范围内的ER/PR表达的IV期 (T4) Her2阴性乳腺癌的61个FFPE组织块进行评估 (FFPE组织块从Genzyme Genetics的库存获得)。所有这些61份样品来自于转移瘤而不是原发肿瘤。该研究的结果概述在表11中。

[0300] 表10: 在组织学类型中FR α 阳性的分布——TMA数据

肿瘤组织学	FRα 阳性 N (%)	FRα 阴性 N (%)	合计	P 值*
正常	2 (100%)	0 (0%)	2	
纤维腺瘤	2 (67%)	1 (33%)	3	
囊性肉瘤	0 (0%)	2 (100%)	2	
DCIS - 原位导管癌	1 (17%)	5 (83%)	6	
ILC - 侵入性小叶癌	0 (0%)	1 (100%)	1	
IDC - 侵入性导管癌	18 (31%)	41 (69%)	59	
癌症总数:	21 (30%)	50 (70%)	71	
IDC 分子亚型分析:				
[0301] ER/PR+	4 (14%)	24 (86%)	28	0.012
ER/PR-	14 (45%)	17 (55%)	31	
Her2+	2 (15%)	11 (85%)	13	0.307
Her2-	16 (35%)	30 (65%)	46	
ER/PR/Her2-	12 (67%)	6 (33%)	18	<0.0001 (ER/PR+或 Her2+相 对于ER/PR/Her2-)
T1	3 (43%)	4 (57%)	7	
T2	10 (26%)	29 (74%)	39	
T3	5 (63%)	3 (37%)	8	
T4	0 (0%)	5 (100%)	5	
N0	18 (35%)	33 (65%)	51	0.092
N1/N2**	0 (0%)	8 (100%)	8	
[0302] 1 级	1 (14%)	6 (86%)	7	0.393
2 级	12 (36%)	21 (64%)	33	
3 级	5 (26%)	14 (74%)	19	

[0303] *使用Fisher精确检验,通过2X2列联表分析计算得到的P值。

[0304] **4/8 (50%) 的N1/N2样品为Her2+

[0305] 在22/61 (36%) 的这些患者中发现FRα表达(图14),这证实了在Her2阴性群体中,在早期阶段的疾病中确定的FRα阳性样本/肿瘤的百分率在晚期转移性疾病中得以保留(TMA阳性率=35%;IV期转移性疾病=36%)。在22位FRα阳性IV期转移患者中,仅有3位(14%)显示出对ER/PR的任何阳性,这样的阳性率趋势在低范围内(最高30%)。因此,19/22 (86%) 的FRα阳性患者是三阴性分子亚型。此外,将这些数据有利地与在早期疾病中在TMA上获得的数据进行比较,在后一种情况下所有FRα阳性患者的67%为三阴性亚型。

[0306] 表11:在转移性乳腺癌样品的分子亚型中FRα阳性的分布

肿瘤分子亚型	FR α 阳性 N (%)	FR α 阴性 N (%)	合计	P 值*
总样品:	22 (36%)	39 (64%)	61	
ER/PR+	3 (14%)	20 (86%)	23	
ER/PR/Her2-	19 (50%)	19 (50%)	38	0.0054 (ER/PR+相对于 ER/PR/Her2-)
1 级	3 (30%)	7 (70%)	10	
2 级	11 (28%)	28 (72%)	39	1.0 (1 级相对于 2 级)
3 级	8 (67%)	4 (33%)	12	0.037 (1 或 2 级相对于 3 级)

[0308] *使用Fisher精确检验,通过2X2列联表分析计算得到的P值。

[0309] 此外,从大量转移位点获得来自于IV期转移性疾病的样品,包括淋巴结、骨、皮肤和肝脏以及主要从胸膜和穿刺术获得的流体和细针抽吸(FNA)样品。这些“流体活检组织”中的数种是FR α 阳性染色的(图15),这表明所描述的IHC方法对多种样品类型的普遍适用性。

[0310] 实施例17:组织学妇科癌症样品的叶酸受体 α 表达的评估

[0311] 进行免疫组织化学研究来评估包括卵巢、子宫内膜和输卵管的妇科恶性肿瘤中的FR α 表达。使用如实施例7中所描述的用抗体26B3染色的组织微阵列(TMA)样品和按照实施例7中所述制备并用抗体26B3染色的FFPE组织学样品来进行分析。用于卵巢癌(目录号OV1921;96例病例,双份核心)、子宫内膜癌(目录号EMC1021;102例病例,单核心)和输卵管癌(目录号UTE601;30例病例,双份核心)的商品化组织微阵列从US Biomax, Inc. (Rockville, MD) 获得。

[0312] 如果膜染色阳性的肿瘤细胞的百分率在任何强度下大于或等于5%,则所述样品被认为是FR α 表达阳性的。如果妇科病理学家确定样品完全丢失或由活细胞数量不足以进行评估的坏死组织构成,则样品被排除,因此不包含在分析中。在子宫内膜样品中,6份仅含有非典型复杂性增生而没有腺癌。细胞类型和等级的组织学分类是基于WHO的乳腺和女性生殖器官分类(WHO Classification of Breast and Female Genital Organs) (Tavassoli和Devilee)。基于FIGO和TNM系统的临床阶段由TMA的制造商(US Biomax)提供。

[0313] 在给定的肿瘤类型内,FR α 表达的阳性率被计算为按照阳性结果的定义($\pm 5\%$ 肿瘤细胞膜染色)阳性染色的肿瘤的比例。使用2x2列联表和Fisher精确检验来评估不同的组例如组织学、阶段、等级组之间FR α 阳性的差异。如果与检验相关的p-值小于该检验的Bonferroni调整的I型误差(I型误差最大值=0.05),则平均值的差异是统计学差异。

[0314] 膜和细胞质的染色强度被评分为0,无染色;1+,弱;2+,中等和3+,强。还确定样品中每种强度的细胞的百分率。在4x、10x、20x和40x物镜下对组织进行分析。强膜染色(3+)能在4x下被容易地观察到,并在10x下验证。中等膜染色(2+)在10x下可见,并在20x下验证。弱染色(1+)需要20x或40x(图16)。在3+染色存在下,膜的浓密染色出现在顶端和外侧细胞缘。在切向截面中,完整的圆周形图案是明显的(图16(A)和(B))。2+膜染色与3+相比在强度上更弱并且更稀薄,通常位于顶端腔缘上,并偶尔出现在外侧细胞缘上。1+弱膜染色一般局限于腔缘。相伴的细胞质染色随着肿瘤类型而变。

[0315] 在卵巢肿瘤TMA上的94份可评估的样品中,70份(74%)是浆液类型的,10份(11%)是粘液性的,4份(4%)是子宫内膜样的,3份(3%)是透明细胞类型的,其余7份(8%)是各种罕见肿瘤。在87份卵巢癌样品中,每种细胞类型的FR α 阳性率如下:在浆液类型中为100%(70/70),在粘液类型中为80%(8/10),子宫内膜样类型为75%(3/4),透明细胞类型为67%(2/3)。浆液和粘液类型之间的差异是显著的,通过Fisher精确检验得到其p值为0.014(表12)。对于组织学等级或临床阶段来说,FR α 状态是不显著的。共存的细胞质染色在浆液类型中通常为2+或3+,在其他肿瘤类型中更弱并且更少见。

[0316] 表12:FR α 阳性相对于卵巢癌中的组织学类型、临床阶段和组织学等级的分布

肿瘤组织学*	FR α 阴性	FR α 阳性	合计	P 值**
	N (%)	N (%)		
浆液性癌	0 (0%)	70(100%)	70	0.014
粘液性癌	2 (20%)	8 (80%)	10	
子宫内膜样癌	1 (25%)	3 (75%)	4	
透明细胞癌	1 (33%)	2 (67%)	3	
合计	4 (5%)	83 (95%)	87	
II 期	4 (9%)	41 (91%)	45	0.15
III 期	0 (0%)	29(100%)	29	
IV 期	0 (0%)	13(100%)	13	
1 级	2 (15%)	11 (85%)	13	NS***
2 级	1 (3%)	31 (97%)	32	NS
3 级	1 (3%)	39 (97%)	40	NS

[0317] *1例移行细胞癌,1例鳞状细胞癌,1例胚胎性癌,2例卵黄囊瘤和2例粒层细胞肿瘤不包括在分析中

[0318] **使用Fisher精确检验或卡方检验确定的P值:浆液性癌相对于粘液性癌p=0.014

[0319] ***NS=不显著

[0320] 在子宫内膜样品中,FR α 被表达在80%(4/5)的正常(图17(A))、100%(6/6)的非典型复杂性增生(图17(B))和89%(80/90)的腺癌中,所述腺癌包括88例子宫内膜样类型和1例透明细胞类型(图18和19)。8例子宫内膜样腺癌含有鳞状化生区域。在正常子宫内膜中,膜染色是弱的且局限于顶端腔缘(图17(A))。在非典型复杂性增生和癌中,染色主要在腔处,并且在某些情况下具有在外侧细胞缘上的附加染色(图17(B))。在3+膜染色存在下,细胞质染色的强度从强(图18(A))到弱(图18(B)和(C))变化。具有1+或2+膜染色的肿瘤细胞很少表现出细胞质染色。大多数化生的鳞状细胞和透明细胞表现出中等至强的膜染色(图19(A)和(B))。

[0321] 在100%的1级、96%的2级和74%的3级肿瘤中FR α 表达阳性(1级相比于3级,p值=0.0029;2级相比于3级,p=0.034)。对于T1相比于T2/3、N0相比于N1和I期相比于II/III期来说,FR α 状态不显著。

[0323] 17份正常输卵管的核素、16份慢性输卵管炎样品和20份输卵管浆液性癌样品都是膜和细胞质染色强阳性的(图20(A)至(C))。

[0324] 实施例18:组织学结肠直肠样品的叶酸受体 α 表达的评估

[0325] 进行免疫组织化学研究以评估结肠直肠组织样品中的FR α 表达。使用从US Biomax获得的组织微阵列(TMA)样品(目录号BC051111)来进行分析。所述TMA含有从已知患有结肠直肠癌的对象获得的组织的90个两份平行样品和10个正常结肠直肠样品。如实施例7中所述将样品用抗体26B3染色。在从已知患有结肠直肠癌的对象获得的90个样品中,18个(20%)是FR α 表达阳性的,而所有正常样品都不是阳性。此外,阳性染色一般为中度到弱,并且没有观察到与疾病阶段的明显关系。

[0326] 实施例19:组织学甲状腺样品的叶酸受体 α 表达的评估

[0327] 进行免疫组织化学研究以评估甲状腺组织样品中的FR α 表达。使用从US Biomax获得的组织微阵列(TMA)样品(目录号TH802a)来进行分析。如实施例7中所述将样品用抗体26B3染色。甲状腺乳头状癌对于FR α 膜表达来说为强阳性(26/28,93%),并且可以与髓样癌区分开,在所述髓样癌中所有5个样品都是FR α 染色阴性的,这与以前的报告相一致。有趣的是,滤泡性腺瘤可以被分成大滤泡型和小滤泡型,其中分别有3/13(23%)和18/22(82%)显示出FR α 表达阳性。在该TMA上,在少量许特耳(Hurthle)细胞瘤(2/3,67%)和滤泡癌(3/7,43%)样品中也观察到一些阳性。这些结果概述在表13中。

[0328] 表13-甲状腺组织样品中FR α 的表达

[0329]

甲状腺癌组织学亚型 (N = 78)	FR α 阳性 N (%)	FR α 阴性 N (%)
乳头状癌, 28 (36%)	26 (93%)	2 (7%)
髓样癌, 5 (6%)	0 (0%)	5 (100%)
滤泡性腺瘤, 大滤泡型, 13 (17%)	3 (23%)	10 (77%)
滤泡性腺瘤, 小滤泡型, 22 (28%)	18 (82%)	4 (18%)
许特耳细胞瘤, 3 (4%)	2 (67%)	1 (33%)
滤泡癌, 7 (9%)	3 (43%)	4 (57%)

序列表

<110> 卫材 R&D 管理有限公司

<120> 抗叶酸受体 α 抗体及其应用

<130> SPI166123-01

<140>

<141>

<150> 61/604, 954

<151> 2012-02-29

<150> 61/604, 412

<151> 2012-02-28

<150> 61/508, 444

<151> 2011-07-15

<160> 66

[0001]

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<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

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 4
 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0004]

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 5
 Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Ser Thr Val Ser Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30

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

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

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

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8

Glu Trp Lys Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 9

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

[0006]

<400> 9

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

1 5 10 15

Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp

20 25 30

Ile Arg Gln Phe Pro Gly Ser Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Lys

35 40 45

Ser Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Trp Lys

85

90

95

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
 100 105 110

Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp
 115 120 125

Thr

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0007]

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 10
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Asn Phe Ile His
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 11
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12
 Gln Gln Asn Asn Gly Asp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0008] <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 13
 Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Asn Phe Ile His Trp
 20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala
 35 40 45

Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala

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

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

[0009]

<400> 14

His Pro Tyr Met His

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16
 Glu Glu Val Ala Asp Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0010] <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 17
 Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys His Pro Tyr Met His Trp Val Lys Gln
 20 25 30

Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn
 35 40 45

Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr
 50 55 60

Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 20
 Gln His Phe Ser Lys Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0012] <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 21
 Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
 20 25 30

Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His
 35 40 45

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

Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Ile Tyr Tyr

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24
 Glu Thr Thr Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 25
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0014] <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 25
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 20 25 30

Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Gly Ser Gly
 35 40 45

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

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

85

90

95

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 30

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

[0017]

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 31

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

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 32

Gly Thr His Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 33

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

[0018]

<400> 33

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys

1 5 10 15

Ala Ser Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln

20 25 30

Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Tyr Asn

35 40 45

Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr

50 55 60

Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala

65 70 75 80

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Thr His Tyr Phe

85

90

95

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 100 105 110

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
 115 120 125

<210> 34
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

[0019] <400> 34
 agggccagct caactgtaag ttacagttac ttgcac 36

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 35
 ggcacatcca acttgcttc t 21

<210> 36
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>		
<221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"		
<400> 36		
cagcagtaca gtggttacc actcagc		27
<210> 37		
<211> 323		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"		
<400> 37		
ccagcaatca tgtctgcatc tccaggggaa aaggtcacca tgacctgcag ggccagctca		60
[0020] actgtaagtt acagttactt gcaactgtac cagcagaagt caggtgcctc cccccaaactc		120
tggatttatg gcacatccaa cttggcttct ggagtcctg ctcgcttcag tggcagtggg		180
tctgggacct cttactctct cacaatcagc agtgtggagg ctgaagatgc tgccacttat		240
tactgccagc agtacagtgg ttaccactc acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg		300
aaacgggctg atgctgcacc aac		323
<210> 38		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"		
<400> 38		

	agtggttatt actggaac	18
	<210> 39	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 39	
	tacataaagt cgcagcgtag caataattac aaccatctc tcaaaaat	48
	<210> 40	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
[0021]	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 40	
	gagtgaagg ctatggacta c	21
	<210> 41	
	<211> 389	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
	<400> 41	
	gagtcaggac ctggcctcgt gagaccttct cagtctctgt ctctcacctg ctctgtcaact	60

	ggctactcca tcaccagtgg ttattactgg aactggatcc ggcagtttcc aggaagcaga	120
	ctggaatgga tgggctacat aaagtccgac ggtagcaata attacaaccc atctctcaaa	180
	aatcgaatct ccactactcg tgacacatct aagaaccagt ttttctgaa gttgaattct	240
	gtgactactg aggacacagc tacatatttc tgtacaaggg agtgggaaggc tatggactac	300
	tggggtcagg gaacctcagt caccgtctcc tcagccaaaa caacaccccc atcagtctat	360
	ccactggccc ctgggtgtgg agatacaac	389
	<210> 42	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
[0022]	<400> 42	
	agagccagtg aaagtgttga tacttatggc aataatttta tacac	45
	<210> 43	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 43	
	cttgcaccca acctagaatc t	21
	<210> 44	
	<211> 27	
	<212> DNA	

	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 44	
	cagcaaaata atgggatcc gtggacg	27
	<210> 45	
	<211> 331	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
[0023]	<400> 45	
	ccagcttctt tggctgtgc tctagggcag agggccacca tatcctgcag agccagtga	60
	agtgttgata cttatggcaa taatattata caetgggtacc agcagaaacc aggacagcca	120
	cccaaaactec tcatttatct tgcacccaac ctagaatctg gggtccctgc caggttcagt	180
	ggcagtggtg ctaggacaga cttaccctc accattgate ctgtggagge tgatgatgct	240
	gcaacctatt actgtcagca aaataatggg gatccgtgga cgttcggtgg aggcaccaag	300
	ctggagatca aacgggctga tgctgcacca a	331
	<210> 46	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	

	<400> 46 caccctata tgcaac	15
	<210> 47 <211> 51 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220> <221> source <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 47 aggattgatc ctgcgaatgg taatactaaa tatgaccga agttccaggg c	51
	<210> 48 <211> 30 <212> DNA [0024] <213> Artificial Sequence	
	<220> <221> source <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 48 gaggaggtgg cggactatac tatggactac	30
	<210> 49 <211> 380 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220> <221> source <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
	<400> 49	

	ggggcagagc ttgtgaagcc aggggcctca gtcaagttgt cctgcacagc ttctggcttc	60
	aacattaaac acccctatat gcactgggtg aagcagaggc ctgaccaggg cctggagtgg	120
	attggaagga ttgatcctgc gaatggtaat actaaatatg acccgaagtt ccagggaag	180
	gccactataa cagcagacac atcctccaac acagcctacc tacagctcag cagcctgaca	240
	tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtggt agagaggagg tggcggacta tactatggac	300
	tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagcca aaacaacagc cccatcggtc	360
	tatccactgg cccctgtgtg	380
	<210> 50	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
[0025]	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 50	
	agtgaagtc aggcattaa caatTTTTT aac	33
	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 51	
	tacacatcaa gtttacactc a	21
	<210> 52	

	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 52	
	cagcacttta gtaagcttcc gtggacg	27
	<210> 53	
	<211> 320	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
[0026]	<400> 53	
	acatcctccc tgtctgcctc tctgggagac agagtcacca tcagttgcag tgcaagtcag	60
	ggcattaaca attttttaa ctggtatcag cagaaaccag atggcactgt taaactcctg	120
	atctattaca catcaagttt acactcagga gtcccatcaa ggttcagtgg cagtgggtct	180
	gggacagatt attctctcac catcagcaac ctggaacctg aagatatgac catatactat	240
	tgtcagcact ttagtaagct tccgtggacg ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa	300
	cgggetgatg ctgcaccaac	320
	<210> 54	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	

	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 54	
	agctatgcca tgtct	15
	<210> 55	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 55	
	gaaattggta gtggtag ttacacctac tatccagaca ctgtgacggg c	51
[0027]	<210> 56	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 56	
	gaaactacgg cgggctactt tgactac	27
	<210> 57	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	

	<400> 57	
	tctgggggag gcttagtgag gcctggaggg tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga	60
	ttcactttca gtagctatgc catgtcttgg gttcgccagt ctccagagaa gaggctggag	120
	tgggtcgcag aaattggtag tgggtgtagt tacacctact atccagacac tgtgacgggc	180
	cgattcacca tctccagaga caatgccaag agcacctgt acctggaaat gagcagtctg	240
	aggtctgagg acacggccat ctattactgt gcaagggaaa ctacggcggg ctactttgac	300
	tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tctca	336
	<210> 58	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
[0028]	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 58	
	cgaacaagtg agaatatttt cagttattta gca	33
	<210> 59	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 59	
	aatgcaaaaa ccttagcaga g	21
	<210> 60	

	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
	<400> 60	
	caacatcatt atgcttttcc gtggacg	27
	<210> 61	
	<211> 320	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
[0029]	<400> 61	
	ccagcctccc tatctgcac tgtgggagaa actgtcacca tcacatgtcg aacaagtgag	60
	aatattttca gttatttagc atggtatcag cagaaacagg gaatatctcc tcagctcctg	120
	gtctataatg caaaaacctt agcagagggt gtgccatcaa ggttcagtgg cagtggatca	180
	ggcacacagt tttctctgaa gatcaacagc ctgcagcctg aagattttgg gagttattac	240
	tgtcaacatc attatgcttt tccgtggacg ttcggtggag gctccaagct ggaaatcaaa	300
	cgggetgatg ctgcaccaac	320
	<210> 62	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> source	

<400> 65	
ggacctgagc tggatgaagcc tggggcttca gtgaagatat cctgcaagc tctgattac	60
tcttttactg gctactttat gaactgggtg atgcagagcc atggaaagag ccttgagtgg	120
attggacgta ttttccctta caatggtgat actttctaca accagaagtt caagggcagg	180
gccacattga ctgtagacaa atcctctagc acagcccaca tggagctccg gagcctggca	240
tctgaggact ctgcagteta tttttgtgca agagggactc attactttga ctactggggc	300
caaggeacca ctctcactgt ctctcagcc aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg	360
gcccctggat ctgctgcca aactaa	386

[0031]

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag"

<400> 66

His His His His His His

1

5

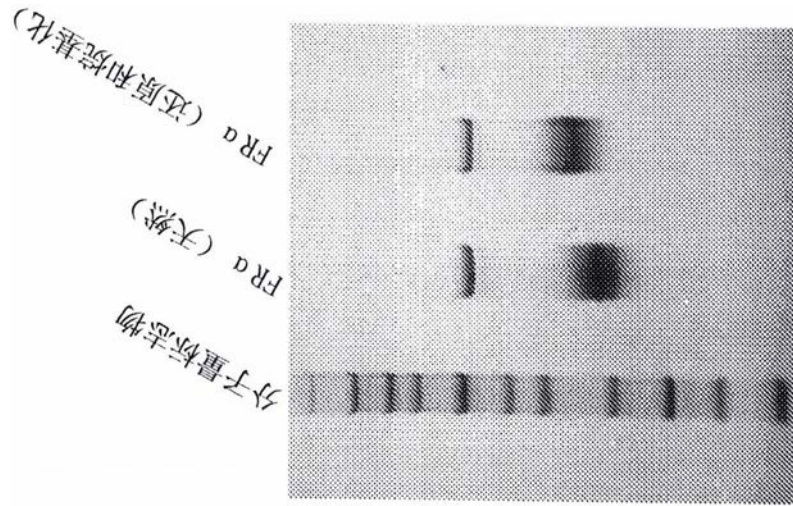


图1

```

10  20  30  40  50  60
MAQRMTTQLL LLLVWVAVVG EAQTRIAWAR TELLNVCMNA KHHKEKPGPE DKLHEQCRPW
RKNACCSINT SQAHKDVSY LYRFNWNHCG EMAPACKRHF IQDTCLYECS PNLGPWIIQQV
130  140  150  160  170  180
DQSWRKERVL NVPLCKEDCE QWVEDCRTSY TCKSNWHKGW NWTSGFNKCA VGAACQPFHF
190  200  210  220  230  240
YFPTPTVLCN EIWTHSYKVS NYSRGSGRCI QMWFDPAQGN PNEEVARFYA AAMSGAGPWA
250
AWPFLLSLAL MLLWLLS (SEQ ID NO:1)

```

图2

图示说明

- 第1-24位残基 (双下划线) =信号序列 (在rh-FR α 中不存在)
- 第41-53位残基 (阴影) =Mab 9F3 (PTA-11887) 表位
- 第68-80位和第92-105位残基 (阴影) =Mab 24F12 (PTA-11886) 表位
- 第199-209位残基 (阴影) =Mab 26B3 (PTA-11885) 表位
- 第236-257位残基 (下划线) =GPI锚序列 (在rh-FR α 中不存在)

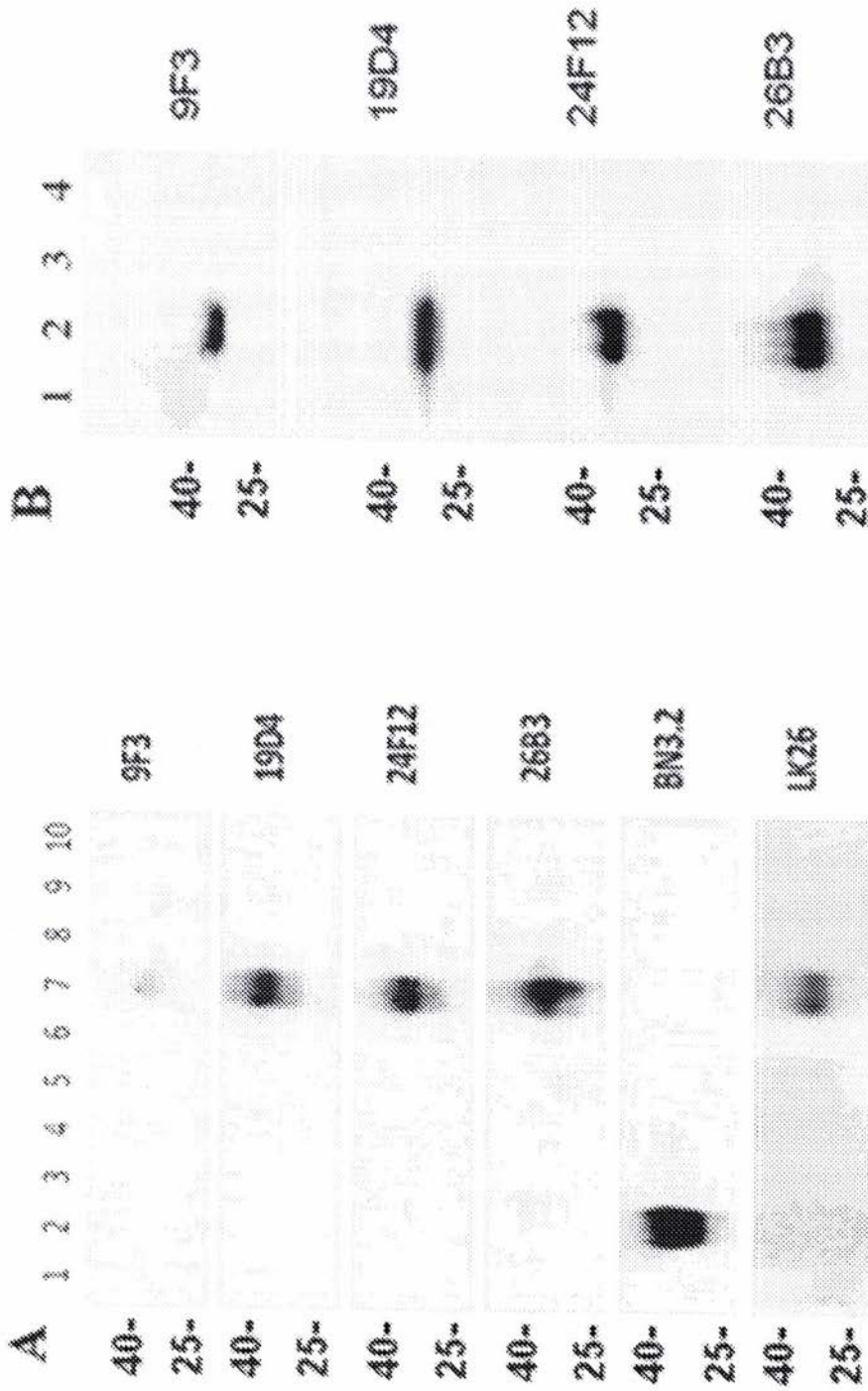


图3

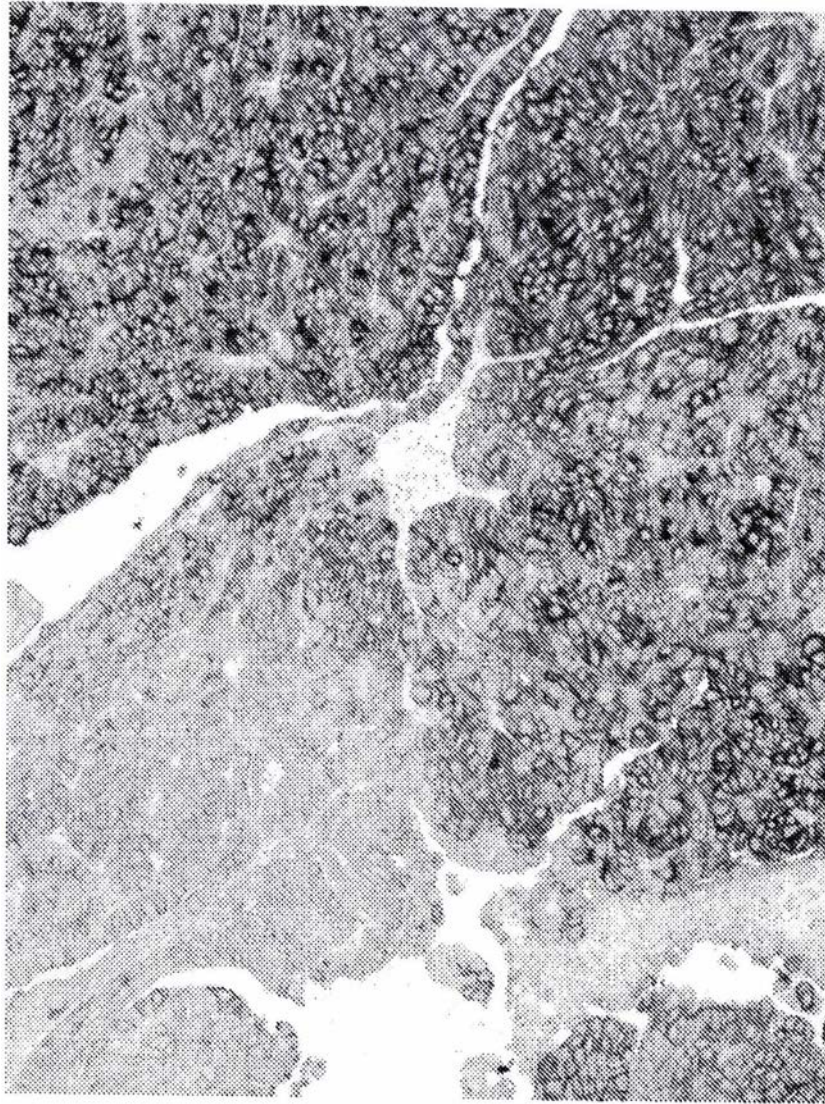


图4

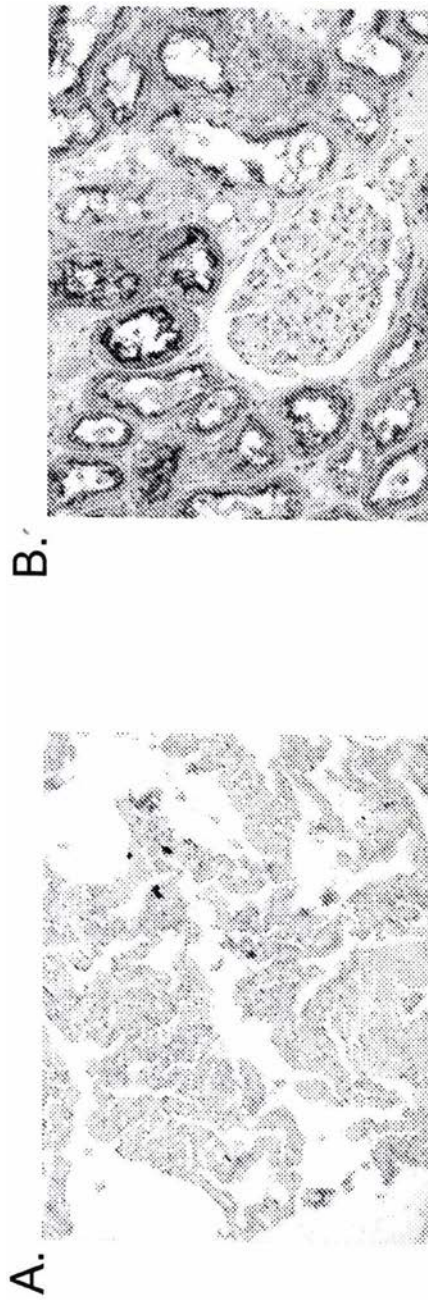


图5

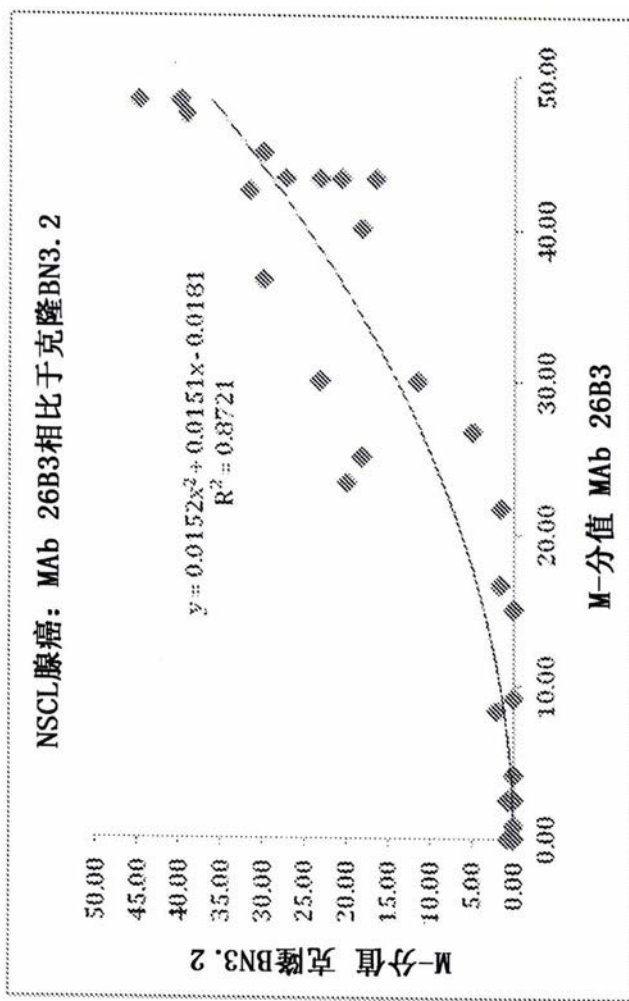


图6

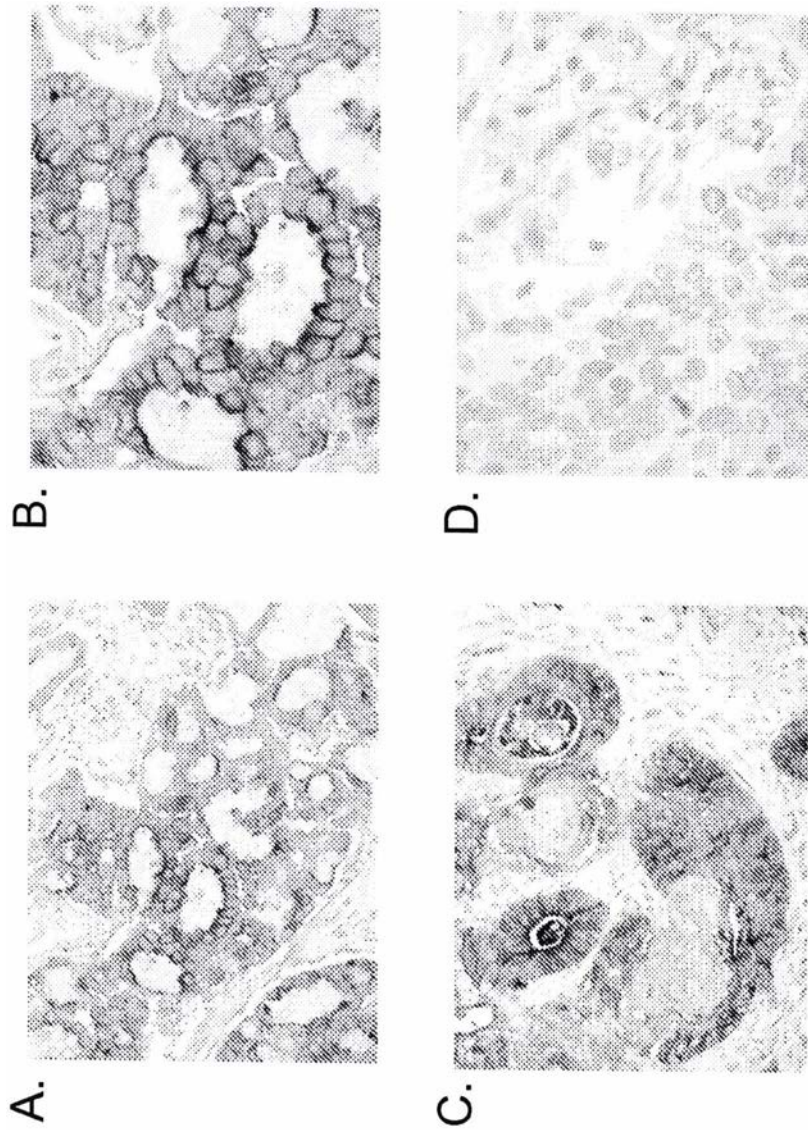


图7

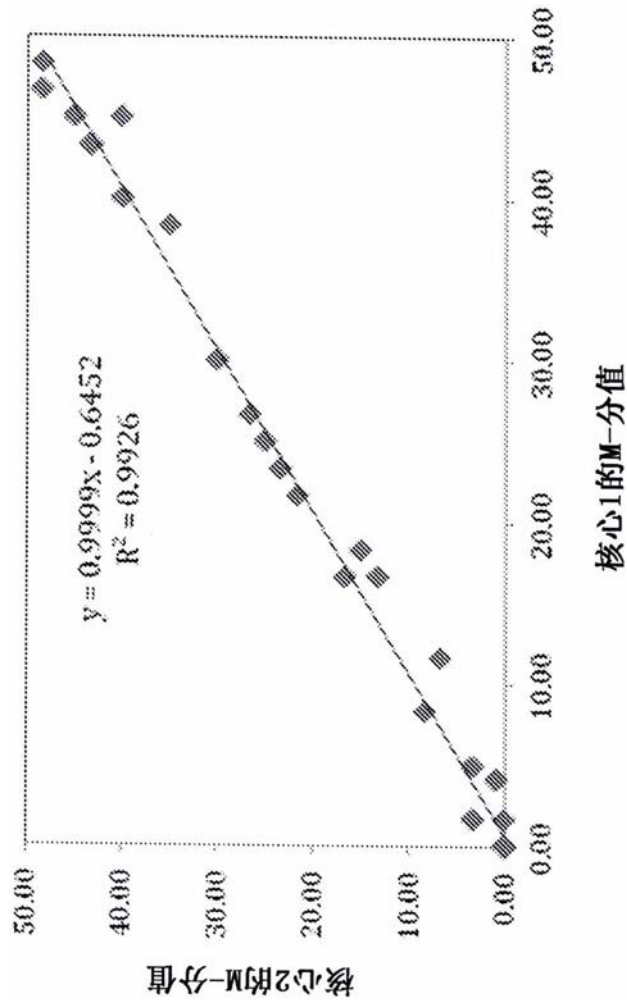


图8

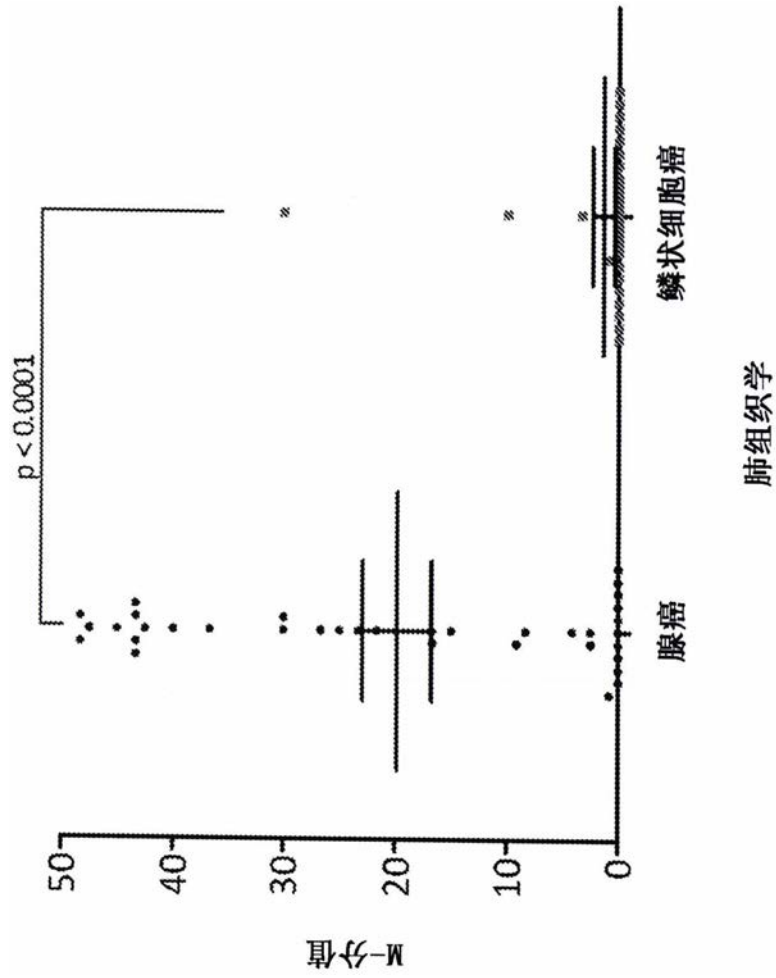


图9

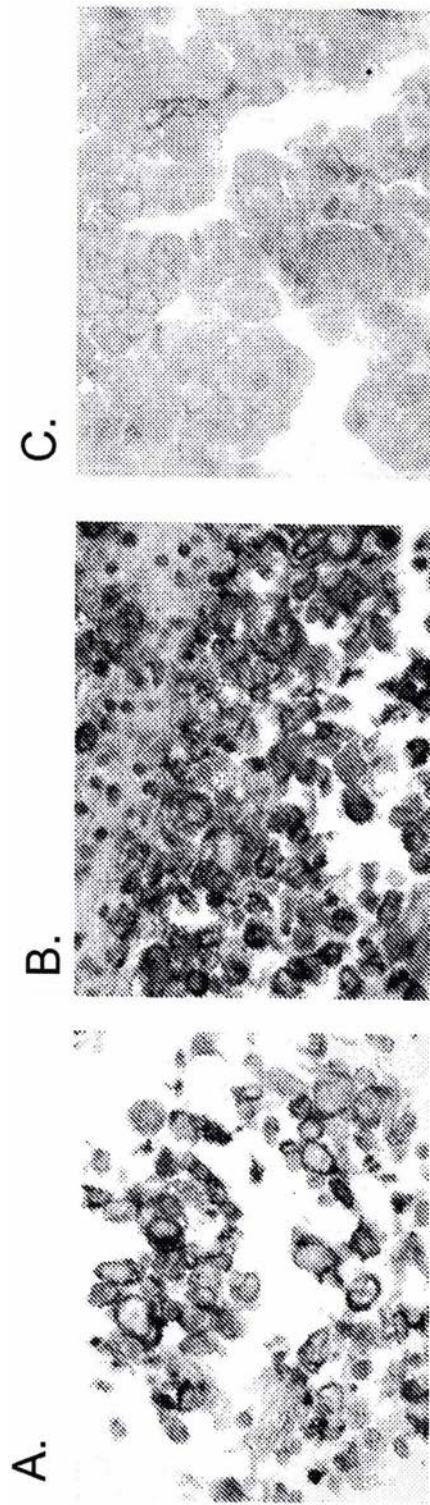


图10

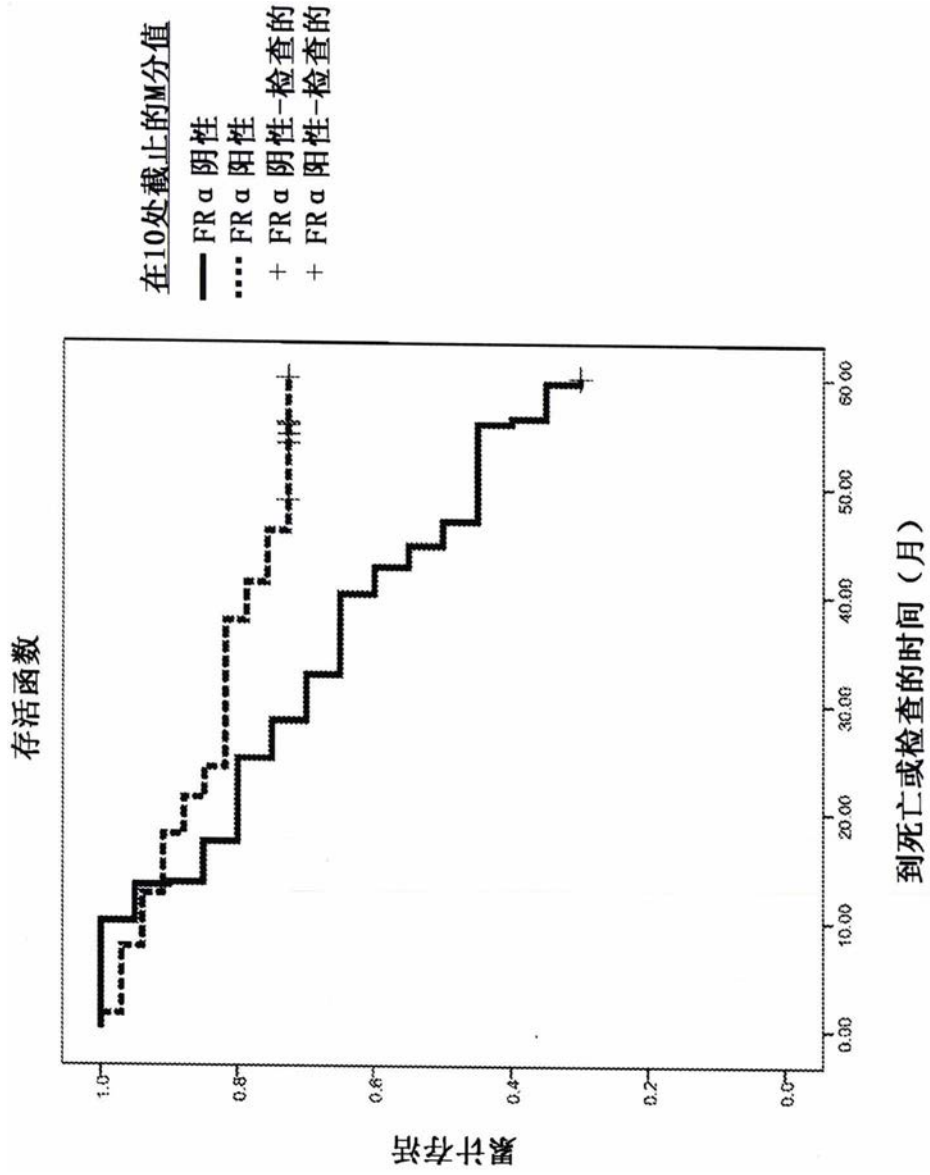


图11

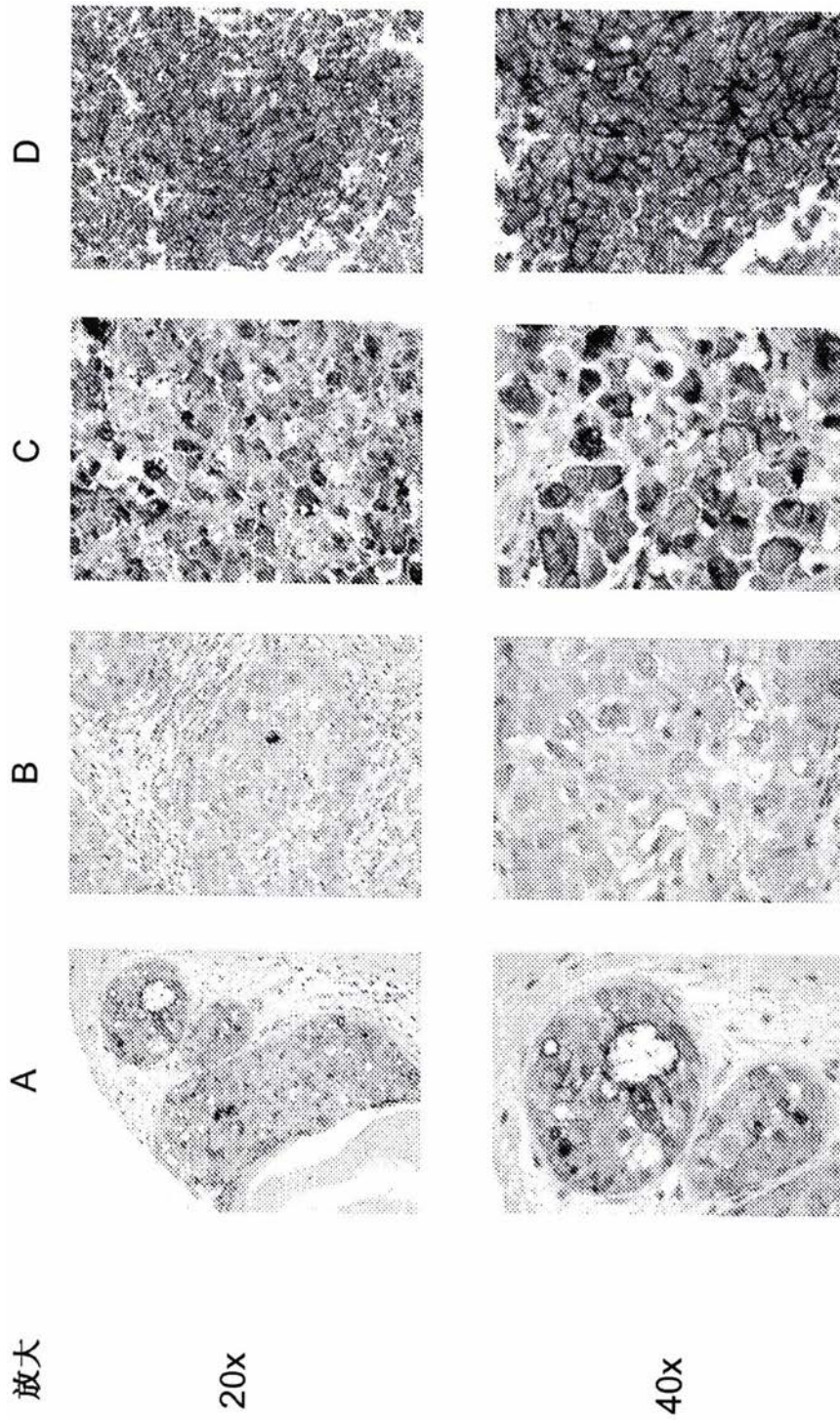


图12

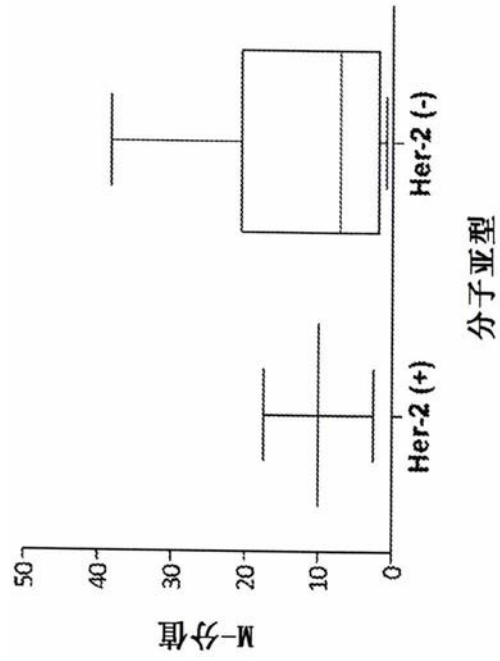


图13

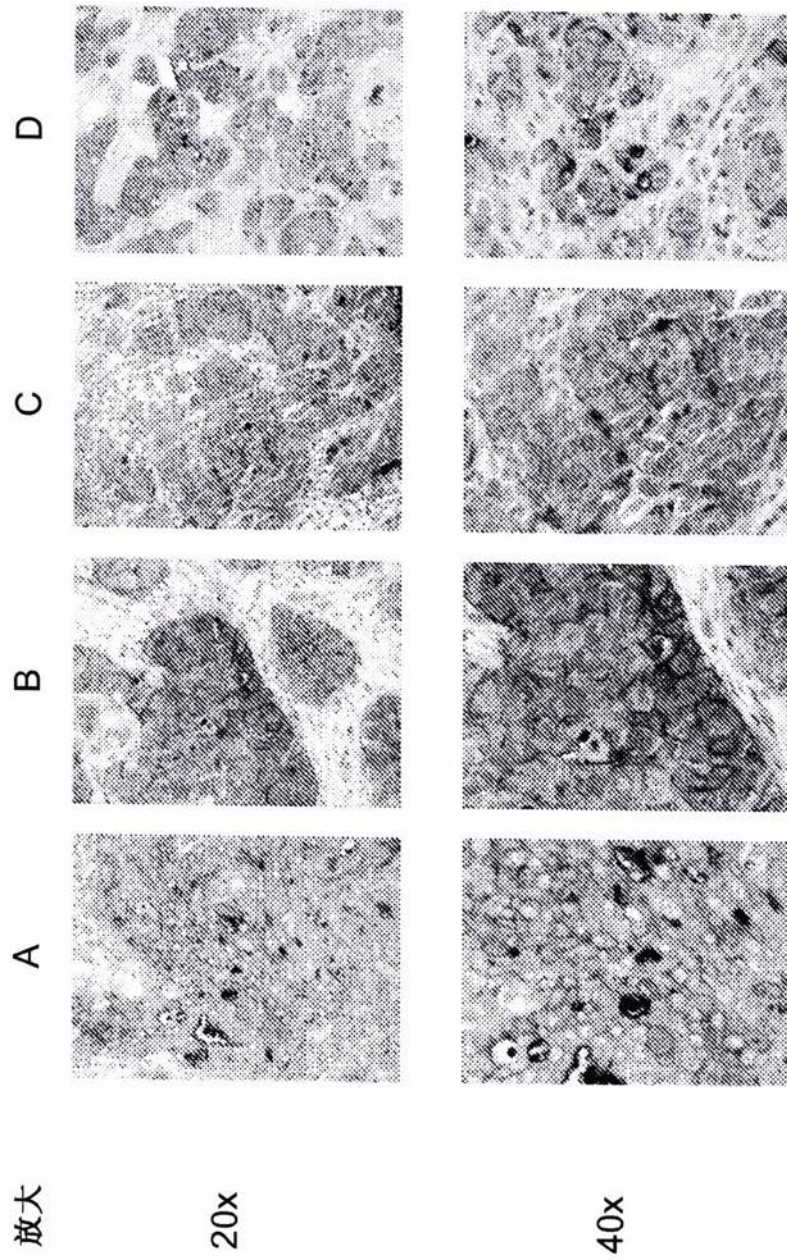


图14

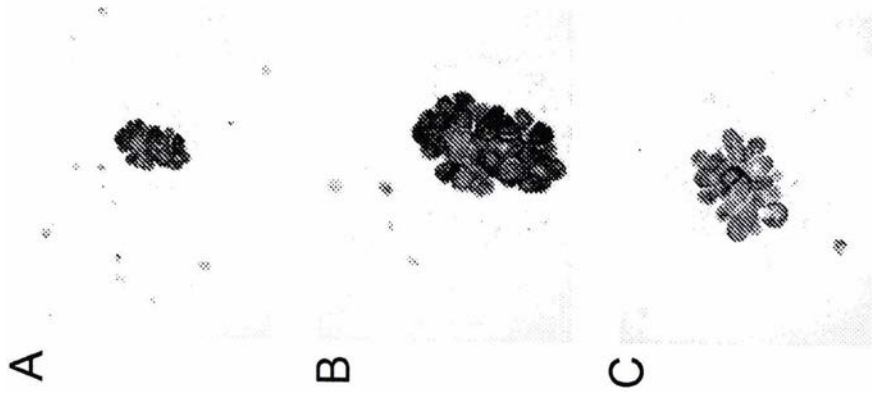


图15

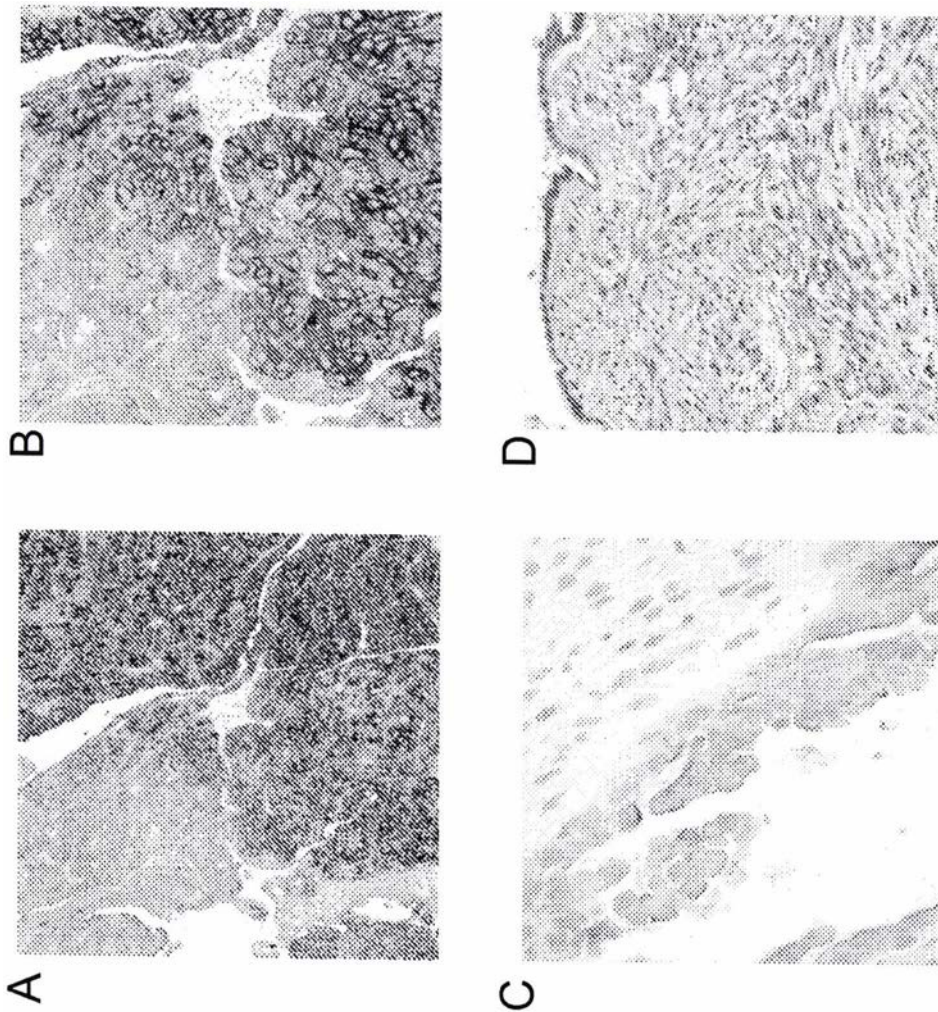


图16

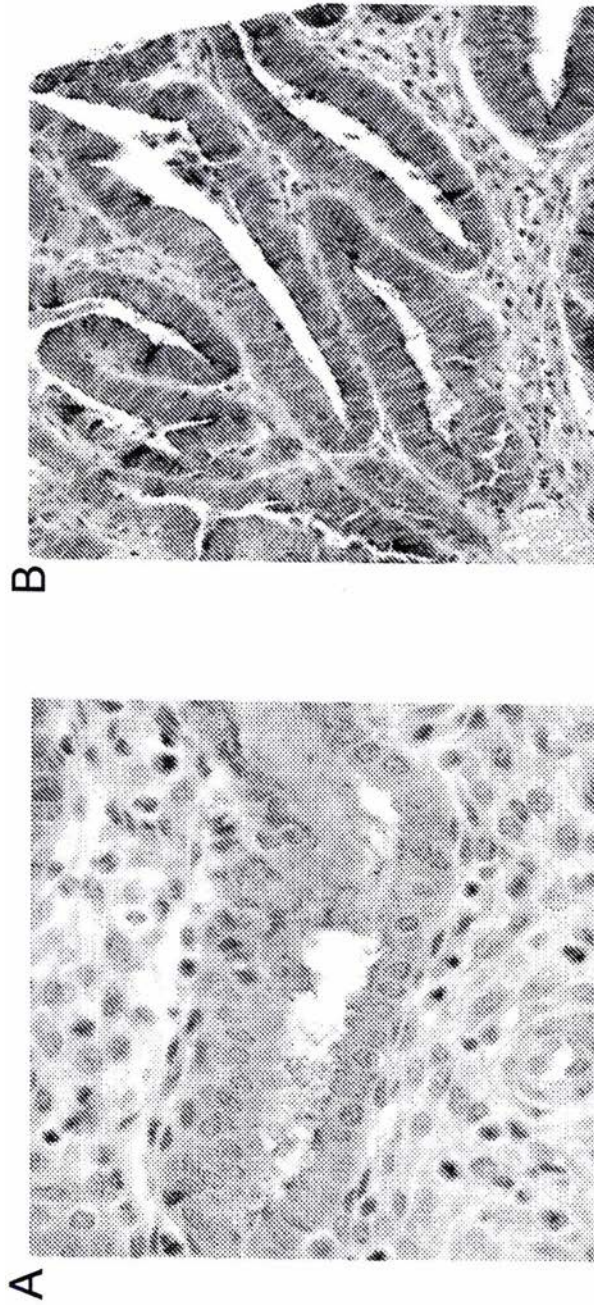


图17

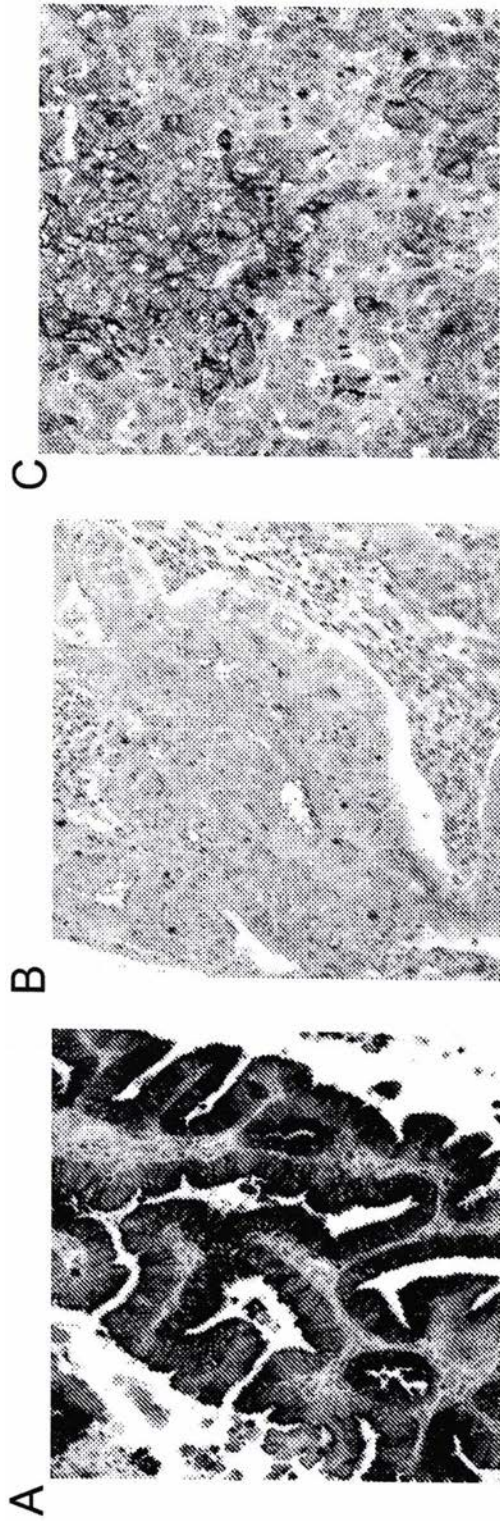


图18

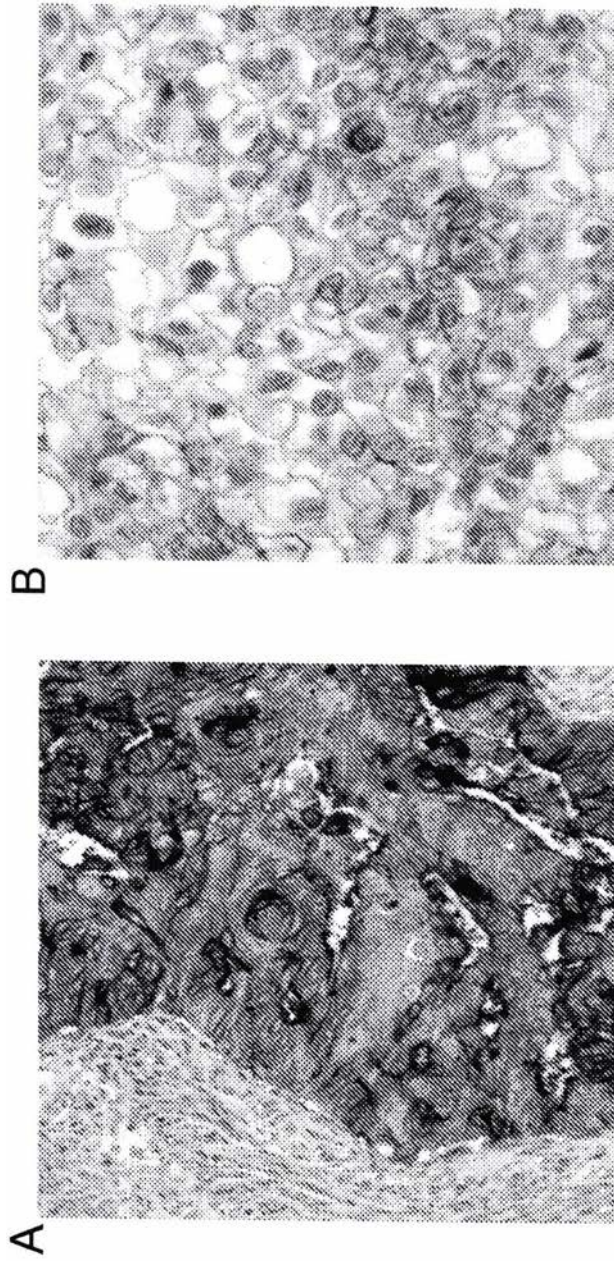


图19

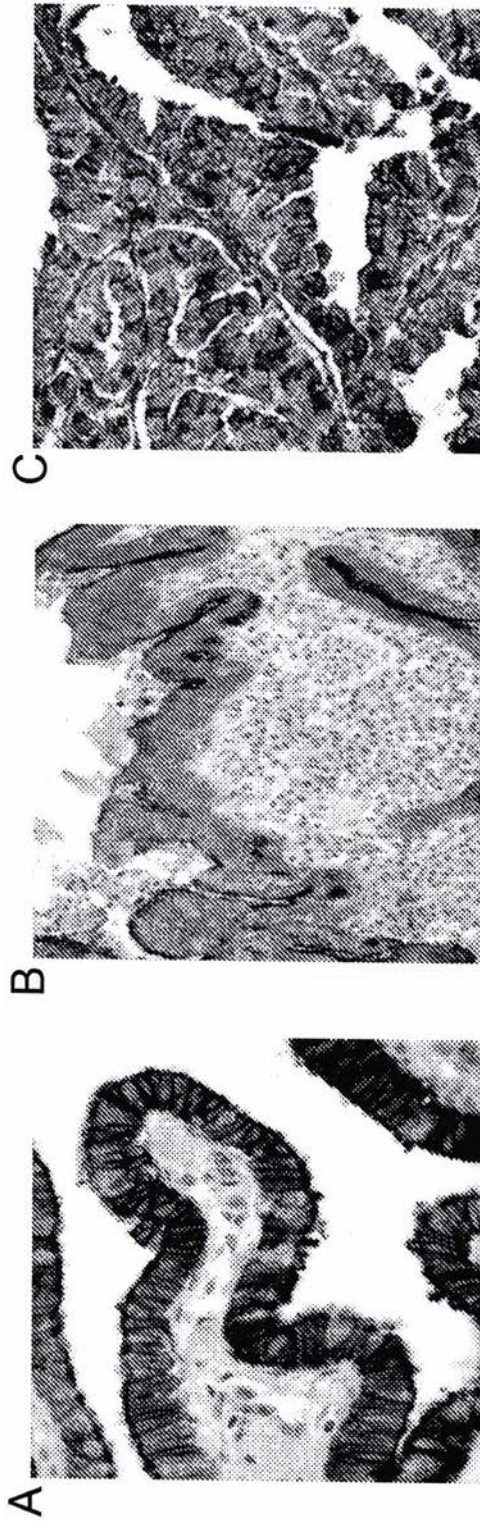


图20

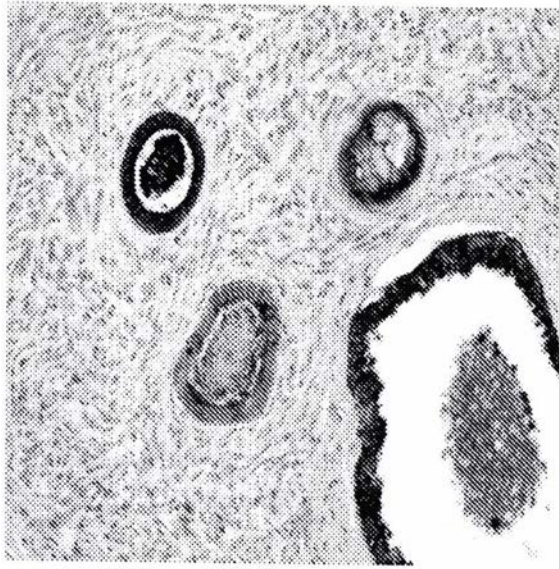


图21