



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **125636** (13) **C2**
(51) МПК (2022.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 09144	(72) Винахідник(и):	Керріган Крістіна Н. (US), Вайтмен Кетлін Р. (US), Пейн Гілліан (US), Ледд Шеррон (US)
(22) Дата подання заявки:	30.03.2012	(73) Володілець (володільці):	ІММУНОДЖЕН, ІНК., 830 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451, USA (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	12.05.2022	(74) Представник:	Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/471,007	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2010/0055034 A1, 04.03.2010; US 2009/0081710 A1, 26.03.2009; KALLI ET AL, "Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer", GYNECOLOGIC ONCOLOGY, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, (20080128), vol. 108, no. 3, doi:10.1016/J.YGYNO.2007.11.020, ISSN 0090- 8258, pages 619 - 626, XP022510423 [X] 1-3 * the whole document * * In particular: Title; Abstract; Methods section; Fig. 2. *; ALLARD ET AL, "Overexpression of folate binding protein is associated with shortened progression-free survival in uterine adenocarcinomas", GYNECOLOGIC ONCOLOGY, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, (20070927), vol. 107, no. 1, doi:10.1016/J.YGYNO.2007.05.018, ISSN 0090- 8258, pages 52 - 57, XP022274915 [X] 1-3 * the whole document * * In particular: Title; Abstract; Materials and methods section; Figs. 1 and 3. *; BUENO R ET AL, "The alpha folate receptor is highly activated in malignant pleural mesothelioma", JOURNAL OF THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURGERY, MOSBY-YEAR BOOK, INC., ST. LOUIS, MO, US, (20010201), vol. 121, no. 2, doi:10.1067/MTC.2001.111176, ISSN 0022-5223, pages 225 - 233, XP002356784 [Y] 1-3 * the whole document * * In particular: Title; Abstract; Materials and methods section. *; MARIANGELA FIGINI ET AL, "Conversion of murine antibodies to human antibodies and their optimization for ovarian cancer therapy targeted to the folate receptor", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, (20080815), vol. 58, no. 4, ISSN 1432-0851, pages 531 - 546, XP019706293 [Y] 1-3 * the whole document * * In particular: Title; Abstract; Materials and methods section. *.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	01.04.2011		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.02.2017, Бюл.№ 3		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	11.05.2022, Бюл.№ 19		
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	а201312203, 30.03.2012		

(54) СПОСОБИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РАКУ, ЯКИЙ МОЖЕ РЕАГУВАТИ НА АНТИ-FOLR1 АНТИТІЛО АБО АНТИ-FOLR1 ІМУНОКОН'ЮГАТ

(57) Реферат:

UA 125636 C2

Надаються способи ідентифікації раку, який може реагувати на анти-FOLRI антитіло або анти-FOLRI імунокон'югат, при таргетній терапії раку, направлений проти людського рецептора фолату 1. Набори включають реагенти для використання за допомогою додатково передбачених способів.

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

За даною заявкою запитується перевага відносно попередньої заявки США № 61/471 007, поданої 1 квітня 2011 яка включена в даний документ у вигляді посилання.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

5 Галузь Техніки

Галузь техніки в цілому належить до підвищення ефективності лікування раку, розвиток якого характеризується надлишковою експресією людського рецептора фолату 1 (FOLR1). Зокрема, винахід належить до способу підвищення ефективності лікування пацієнтів, схильних до розвитку в них раку або з поставленим діагнозом рак, у яких пухлинні клітини надлишково експресують FOLR1, що визначається за допомогою аналізу експресії генів за допомогою антагоніста FOLR1, наприклад, імунокон'югата FOLR1.

Рівень техніки

Рак є однією із головних причин смерті в розвинених країнах світу. Більше ніж мільйону людей ставиться діагноз рак, що є причиною 500 000 смертей на рік тільки в Сполучених Штатах Америки. Вважається, що більше ніж у 1 з 3 людей протягом життя розв'ється одна з форм раку. Існує більше 200 різних типів раку, на чотири з яких - рак молочної залози, легенів, товстої кишки й передміхурової залози - припадає більше половини всіх знову зареєстрованих випадків захворювання (Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26).

Рецептор фолієвої кислоти 1 (FOLR1), також відомий як рецептор фолієвої кислоти альфа або фолатзв'язувальний білок, являє собою N-глікозилований білок, що експресується на плазматичній клітинній мембрані. FOLR1 володіє високим ступенем спорідненості до фолієвої кислоти й дещо більш низьким - до похідних фолієвої кислоти. FOLR1 опосередковує доставку всередину клітини активної форми фолієвої кислоти, 5-метилтетрагідрофолату.

Надлишкова експресія FOLR1 спостерігається в більшості випадків раку яєчників, а також у багатьох випадках раку матки, раку ендометрію, підшлункової залози, нирок, легенів і молочної залози, у той час як експресія FOLR1 у здорових тканинах обмежується апікальною мембраною епітеліальних клітин у проксимальних ниркових каналцях, альвеолярних пневмоцитах легенів, сечовому міхурі, яєчках, хороїдному сплетінні й щитоподібній залозі (Weitman SD et al., Cancer Res 52: 3396-3401 (1992); Antony AC, Annu Rev Nutr 16: 501-521 (1996); Kalli KR, et al. Gynecol Oncol 108: 619-626 (2008)). Така модель експресії FOLR1 робить його бажаною мішенню для FOLR1-направленої антиракової терапії.

Через звичайно безсимптомний розвиток раку яєчників аж до пізньої стадії, найчастіше він пізно діагностується й має поганий прогноз при лікуванні за допомогою доступних на даний час процедур, як правило, за допомогою хіміотерапевтичних препаратів після хірургічної циторедукції (von Gruenigen V et al., Cancer 112: 2221-2227 (2008); Ayhan A et al., Am J Obstet Gynecol 196: 81 e81-86 (2007); Harry VN et al., Obstet Gynecol Surv 64: 548-560 (2009)). Таким чином, існує чітка нереалізована медична необхідність в більш ефективних терапевтичних засобах для лікування раку яєчників.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід заснований на відкритті динамічного діапазону експресії FOLR1 у пухлинній тканині й збільшення чутливості пухлини з підвищеним рівнем експресії FOLR1 до терапії анти-FOLR1 антитілами або анти-FOLR1 імунокон'югатами. Даний винахід дозволяє успішно виконувати лікування пацієнтів, які мають велику ймовірність відповіді на терапію, що складається із введення терапевтичних агентів, тобто анти-FOLR1 антитіл або анти-FOLR1 імунокон'югатів пацієнтам, у яких визначається підвищений рівень експресії FOLR1.

Даний винахід надає спосіб ідентифікації суб'єкта, схильного до позитивної реакції на таргетну антиракову терапію проти рецептора фолату 1 (FOLR1-таргетну), причому спосіб включає виявлення експресії FOLR1 у зразку тканини суб'єкта.

Даний винахід також належить до способу збільшення ефективності лікування раку, що включає введення терапевтично ефективної дози FOLR1-таргетної антиракової терапевтичної речовини суб'єкту, у зразку тканини якого була виявлена підвищена експресія FOLR1.

Даний винахід також належить до способу прогнозування ефективності лікування раку низькими дозами препарату, що включає введення терапевтично ефективної дози FOLR1-таргетної антиракової терапевтичної речовини суб'єкту, у зразку тканини якого була виявлена підвищена експресія FOLR1.

В одному варіанті втілення винаходу способи лікування направлені проти раку яєчників, недрібноклітинної аденокарциноми легенів (у тому числі бронхіолоальвеолярного раку), карциноми нирок і раку ендометрію.

В одному втіленні винаходу ступінь і рівномірність експресії FOLR1 визначається за допомогою способів імуногістохімічного (IGX) аналізу, проточної цитометрії або гібридизації

нуклеїнових кислот. В іншому варіанті рівень експресії FOLR1 визначається за допомогою імуногістохімічного аналізу. Необмежуючі приклади ІГХ включають способи ІГХ, у яких різняться різні рівні FOLR1 і калібровані ІГХ способи, як описано в даному документі. Експресія FOLR1 може бути оцінена за допомогою відповідних систем, у тому числі, але не обмежуючись ними, за допомогою способів оцінки, описаних у даному документі. Наприклад, експресія FOLR1 може бути оцінена за допомогою каліброваного ІГХ способу, який включає діапазон інтенсивності забарвлювання 0, 1, 2, 3 і 3+, де 0 означає найнижчу інтенсивність забарвлювання й 3+ - найвищу інтенсивність. Відповідно до іншого або додаткового варіанта, експресія FOLR1 може бути оцінена за допомогою каліброваного ІГХ способу, у якому досліджується однорідність забарвлювання, що коливається від фокальної (<25 % забарвлених клітин) до неоднорідної (25-75 % забарвлених клітин) і однорідної (>75 % забарвлених клітин), де фокальне забарвлювання є найменш рівномірним, а однорідне - найбільш рівномірним.

У ще одному варіанті втілення експресія FOLR1 у зразку (наприклад, зразку пухлинної тканини) вимірюється й порівнюється з одним або більше еталонними зразками й виконується специфічна оцінка відповідності ступеня й рівномірності експресії FOLR1 у зразку пухлинної тканини суб'єкта, ксенотрансплантата пухлини або клітинній лінії в порівнянні з одним або більше еталонними зразками. У різних прикладах експресія FOLR1 при однорідному забарвлюванні зразка тканини або клітинного зразка з рівнями інтенсивності забарвлювання FOLR1, що дорівнюють 1, 2, 3 або 3+, вважається збільшеною; експресія FOLR1 також вважається збільшеною за інтенсивності FOLR1 забарвлювання зразка тканини або клітинного зразка з рівнем 3 при неоднорідному або фокальному характері забарвлювання. В іншому варіанті втілення експресія FOLR1 у зразку вимірюється й порівнюється з одним або більше еталонними зразками для визначення порівнянного рівня забарвлювання. В одному варіанті втілення використовується еталонний зразок з попередньою ІГХ оцінкою й/або попередньо встановленою кількістю антигена на клітину або числом ЗАК (зв'язаних антитіл на клітину), таким чином, кількість антигена або ЗАК для зразка тканини може бути визначена шляхом порівняння.

В одному варіанті втілення експресія FOLR1 у зразку (наприклад, зразку пухлинної тканини) вимірюється й порівнюється з одним або більше контрольними зразками й виконується специфічна оцінка відповідності ступеня й рівномірності експресії FOLR1 у зразку пухлинної тканини суб'єкта, ксенотрансплантата пухлини або клітинній лінії в порівнянні з одним або більше контрольними зразками. В одному варіанті втілення експресія FOLR1 у зразку порівнюється зі зразком для негативного контролю, який демонструє відсутність або низький рівень експресії FOLR1. В іншому варіанті втілення експресія FOLR1 у зразку порівнюється зі зразком для позитивного контролю, що володіє підвищеною експресією FOLR1 (рівень 1, 2, 3 або 3+). У деяких варіантах втілення контрольні зразки включають, але не обмежуються ними, клітинні зразки Namalwa, SW2, SW620, T47D, IGROV-1, 300,19 FR1, HeLa або KB. У конкретних варіантах втілення контрольні зразки включають клітини або клітинні конгломерати із клітин, трансфікованих рецепторами фолієвої кислоти (наприклад, 300.19 FR1).

В одному варіанті втілення FOLR1-таргетною антираковою терапевтичною речовиною є FOLR1 імунокон'югат. В одному варіанті втілення імунокон'югат включає анти-FOLR1 антитіло, лінкер і цитотоксин.

В іншому варіанті втілення анти-FOLR1 антитіло являє собою huMOV19. У іншому варіанті втілення лінкер вибирають із групи, що складається з розщеплюваного лінкера, нерозщеплюваного лінкера, гідрофільного лінкера і лінкера на основі дикарбонової кислоти. В іншому варіанті втілення лінкер вибирають із групи, що включає: N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)пентаноат (SPP) або N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфопентаноат (сульфо-SPP), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)бутаноат (SPDB) або N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил) циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинімідил-4-(малеїмідометил) циклогексанкарбоксилат (сульфоБМСС), N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоат (SIAB) і N-сукцинімідил-[(N-малеїмідопропіонамід)тетраетиленглікольний] естер (NHS-PEG4-малеїмід). В іншому варіанті втілення лінкер являє собою N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB). В іншому варіанті здійснення винаходу цитотоксичний агент вибирають із групи, що складається з майтансиноїду, аналога майтансиноїду, бензодіазепіну, таксоїду, CC-1065, аналога CC-1065, дуокарміцину, аналога дуокарміцину, каліхеаміцину, доластатину, аналога доластатину, ауристатину, похідного томаїміцину й похідного лептоміцину або цих агентів у формі пролікарського засобу. В іншому варіанті втілення цитотоксичний засіб являє собою майтансиноїд. В іншому варіанті втілення цитотоксичним агентом є N(2')-деацетил-N-(2')-(3-меркапто-1-оксепрол)-майтансин або N(2')-деацетил-N2-(4-

меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин. В іншому варіанті втілення цитотоксичний агент являє собою N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин (DM4). У ще одному варіанті втілення імунокон'югат включає антитіло HUM0V19, сульфо-SPDB і DM4 (IMGN853).

Винахід також належить до набору для вимірювання рівня експресії FOLR1 у суб'єкта, куди входить реагент для виявлення FOLR1 і інструкція із застосування. В одному варіанті втілення реагент для виявлення FOLR1 включає FOLR1 зв'язувальний пептид, білок або молекулярний зонд (наприклад, нуклеїнову кислоту). В іншому варіанті втілення реагент для виявлення FOLR1 являє собою анти-FOLR1 антитіло. В іншому варіанті втілення набір додатково включає вторинне антитіло, яке зв'язується з анти-FOLR1 антитілом. В одному варіанті втілення використовуються антитіла в концентрації від 0,5 до 7,5 мкг/мл, краще від 0,9 до 3,8 +/- 0,5 мкг/мл. У різних варіантах втілення антитіла використовуються в концентраціях 1,0 +/- 0,5 мкг/мл, 1,5 +/- 0,5 мкг/мл, 1,9 +/- 0,5 мкг/мл, 2,5 +/- 0,5 мкг/мл, 3,0 +/- 0,5 мкг/мл, 3,5 +/- 0,5 мкг/мл, 3,8 +/- 0,5 мкг/мл або до 4,2 мкг/мл. В іншому варіанті втілення антитіла використовуються в концентрованому розчині з інструкціями для розведення для досягнення кінцевої концентрації від 0,9 до 3,8 +/- 0,5 мкг/мл. В іншому варіанті втілення винаходу набір додатково включає реагент для виявлення, який вибраний із групи, що складається з ферменту, флуорофора, радіоактивної мітки й люмінофора. В іншому варіанті втілення реагент для виявлення вибраний із групи, що складається з біотину, дигоксигеніну, флуоресцеїну, тритію й родаміну.

Набір також може включати інструкції для виявлення й оцінки експресії FOLR1.

Також набір може включати контрольні або еталонні зразки. Приклади контрольних або еталонних зразків, що не мають обмежувального характеру, включають зразки тканин, клітинних конгломератів або клітин. Контрольні або еталонні зразки можуть бути одержані із клітинних ліній культури тканин (нормальних або пухлинних), зразків нормальної тканини (нормальний контроль) або пухлинних тканин (позитивний контроль). Типові клітинні лінії включають SW620, T47D, IGROV-1, HELA, KB, JEG-3 і клітинні лінії, постійно або тимчасово трансфіковані вектором експресії, що експресує FOLR1 (наприклад, 300.19 FR1). Приклади тканин, які можуть бути використані як зразки нормальних тканин для способів виявлення експресії FOLR1, описані в даному документі й включають нормальні тканини легенів, слинних залоз і підшлункової залози.

Винахід також належить до способу ідентифікації раку, що складається з реєстрації відповіді на анти-FOLR1 антитіло або анти-FOLR1 імунокон'югат, яка включає: (а) контактування біологічного зразка, що включає клітини зазначеної пухлини з агентом, що зв'язує FOLR1 білок на поверхні клітини; (б) визначення зв'язування зазначеного агента, який зв'язується з FOLR1 білком на клітинній поверхні біологічного зразка, зазначеного в (а); (в) оцінку зв'язування, зазначеного на стадії (б), зазначена оцінка присвоюється на основі порівняння з одним або декількома еталонними зразками; і (г) порівняння зазначеної на стадії (в) оцінки з оцінкою зразка тканини або клітин, при якому оцінка рівня FOLR1 зазначеного раку є більше нормального або зниженого рівня експресії FOLR1 еталонного зразка, або оцінка рівня FOLR1 зазначеного раку, що дорівнює або більше ніж оцінка для високого рівня експресії FOLR1 еталонного зразка, ідентифікує зазначений рак як такий, що ймовірно реагує на анти-FOLR1 антитіло або анти-FOLR1 імунокон'югат. У деяких варіантах втілення рак являє собою рак яєчників або рак легенів.

Винахід також належить до способу ідентифікації пухлини, чутливої до терапії анти-FOLR1 антитілами або анти-FOLR1 імунокон'югатами, причому зазначений спосіб включає: (а) вимірювання рівня експресії FOLR1 у зразку пухлинної тканини, одержаної із зазначеної пухлини, де зазначене вимірювання включає використання способу виявлення, що розпізнає інтенсивність або рівномірність забарвлювання в зразку пухлинної тканини, що експресує FOLR1 у порівнянні з інтенсивністю або рівномірністю забарвлювання одного або декількох еталонних зразків; (б) визначення ступеня інтенсивності забарвлювання FOLR1 для зазначеного зразка пухлинної тканини; і (в) порівняння інтенсивності забарвлювання FOLR1, визначеної на етапі (б) з відносним значенням, яке визначається шляхом вимірювання експресії білка FOLR1, щонайменше, в одному контрольному зразку, де зазначений контрольний зразок являє собою тканину, клітини або клітинний конгломерат, який є нечутливим до терапії анти-FOLR1 антитілами або анти-FOLR1 імунокон'югатами, і в якому інтенсивність забарвлювання FOLR1 зазначеного зразка визначена на етапі (б), і є більш високою, ніж зазначене відносне значення, ідентифікує дану пухлину як чутливу до терапії анти-FOLR1 антитілами або анти-FOLR1 імунокон'югатами. У деяких варіантах втілення виявлення виконується вручну або за допомогою автоматизованої системи. В одному варіанті втілення способом виявлення є ІГХ. В

іншому варіанті втілення використовується відкалібрований спосіб ІГХ, при якому можливо розрізняти різні рівні експресії FOLR1.

Винахід також належить до способу оптимізації терапевтичної схеми з анти-FOLR1 антитілами або анти-FOLR1 імунокон'югатами для суб'єкта, що страждає на рак легенів або рак яєчників, причому зазначений спосіб включає: (а) контактування зазначеного зразка тканини зазначеного суб'єкта з антитілом, яке специфічно зв'язує FOLR1 білок на поверхні клітини; (б) вимірювання ступеня зв'язування зазначеного в (а) антитіла із зазначеним FOLR1 білком на поверхні клітини в зазначеному зразку за допомогою способу виявлення, який може розрізняти інтенсивність або рівномірність забарвлювання при експресії FOLR1 у пухлинному зразку в порівнянні з інтенсивністю або рівномірністю забарвлювання одного або декількох еталонних зразків, і призначення ступеня забарвлювання зазначеному зразку; і (в) введення високої дози анти-FOLR1 імунокон'югата, коли результат вимірювання на стадії (б) є меншим або дорівнює результату для нормальної або зниженої експресії FOLR1 еталонного зразка, або введення низьких доз анти-FOLR1 імунокон'югата при результаті вимірювання, який є більшим, ніж результат для нормальної або зниженої експресії FOLR1 еталонного зразка.

Винахід також належить до способу виявлення експресії FOLR1 на клітинній поверхні ракових клітин зразка пухлинної тканини індивідуума, де зазначений спосіб включає: (а) одержання зразка пухлинної тканини, де зразок клітин зазначеного раку зафіксований у формаліні й залитий парафіном; (б) контактування зазначеного зразка з антитілом, яке специфічно зв'язує FOLR1 білок на поверхні клітини; (в) вимірювання ступеня зв'язування зазначеного в (б) антитіла з зазначеним FOLR1 білком на поверхні клітини в зазначеному зразку пухлинної тканини за допомогою способу виявлення, який може розрізняти інтенсивність або рівномірність забарвлювання при експресії FOLR1 у пухлинному зразку в порівнянні з інтенсивністю або рівномірністю забарвлювання одного або декількох еталонних зразків; і (г) призначення рівня експресії FOLR1 зазначеному FOLR1 після порівняння рівня інтенсивності або рівномірності забарвлювання клітинної поверхні FOLR1 у зазначеному зразку пухлинної тканини з одним або більше еталонними зразками.

Винахід також належить до способу ідентифікації суб'єкта, що страждає на рак легенів або рак яєчників, здатного відповісти на режим терапії низькими дозами анти-FOLR1 антитіл або анти-FOLR1 імунокон'югата, що включає: (а) контактування біологічного зразка, що включає клітини зазначеного раку яєчників або легенів з агентом, який зв'язується з FOLR1 білком на клітинній поверхні; (б) визначення ступеня зв'язування зазначеного агента для зазначеного в (а) біологічного зразка; (в) призначення рівня зв'язування, зазначеного на стадії (б), при якому зазначений рівень надається на основі порівняння з одним або декількома еталонними зразками; і (г) порівняння зазначеного на стадії (в) рівня з рівнем еталонного зразка тканини або клітин, при якому оцінка для згаданого рівня FOLR1 при раку яєчників або легенів є більшою ніж оцінка для нормальної або зниженої рівня експресії FOLR1 еталонного зразка, або оцінка для згаданого рівня FOLR1 при раку яєчників або легенів дорівнює або є більшою за оцінку для високого рівня експресії FOLR1 еталонного зразка, що ідентифікує зазначений рак яєчників або легенів, як здатний відповісти на низькі дози анти-FOLR1 антитіл або анти-FOLR1 імунокон'югата. У деяких варіантах втілення спосіб додатково включає введення терапевтично ефективною кількості гуманізованого анти-FOLR1 антитіла або анти-FOLR1 імунокон'югата зазначеному суб'єкту.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1. Ручний спосіб забарвлювання: Виявлення експресії FOLR1 за допомогою анти-FOLR1 антитіл у трансфікованих клітинах. Клітини серії 300.19 були трансфіковані полінуклеотидом, що кодує людський FOLR1. Експресія білка FOLR1 виявлялась із застосуванням мишачого антитіла BN3.2. Smith AE et al, Hybridoma (Larchmt). 2007 Oct;26(5):281-8.

Фігура 2. Ручний спосіб забарвлювання: Використовуючи анти-FOLR1 антитіла можна виділити різні рівні експресії FOLR1. Антитіло BN3.2 використовувалося для виявлення експресії FOLR1 у різних клітинах ксенотрансплантата. Межа виявлення для антитіла BN3.2 становить приблизно 4000 антитіл, зв'язаних із клітиною (ЗАК).

Фігура 3. Ручний спосіб забарвлювання: Використовуючи анти-FOLR1 антитіла можна виділити різні рівні експресії FOLR1 у зразках тканин. Антитіло BN3.2 використовувалося для виявлення експресії FOLR1 у пухлинах яєчників (А) і пухлинах недрібноклітинного раку легенів (В).

Фігура 4. Ручний спосіб забарвлювання: Рівномірна експресія FOLR1 у пухлинах НДРЛ і раку яєчників. Експресія FOLR1 була високою в багатьох зразках карциноми яєчників, а також аденокарциноми легенів і бронхіолоальвеолярної карциноми. Більшість зразків карциноми

яєчників продемонстрували найвищі рівні інтенсивності забарвлювання серозних або ендометріюїдних клітин. При дослідженні НДРЛ найвищі значення ЗАК були виявлені в зразках бронхіолоальвеолярної карциноми й папілярної аденокарциноми.

5 Фігура 5. Ручний спосіб забарвлювання: Експресія FOLR1, як правило, обмежується мембраною клітин НДРЛ. Мікроскопічне дослідження з високим розділенням показало, що забарвлювання FOLR1 пухлини НДРЛ було обмежено переважно клітинними мембранами.

10 Фігура 6. Ручний спосіб забарвлювання: Експресія FOLR1, як правило, обмежується мембраною клітин раку яєчників. Мікроскопічне дослідження з високим розділенням показало, що забарвлювання FOLR1 пухлини раку яєчників було обмежено переважно клітинними мембранами.

15 Фігура 7. In vivo ефективність huMov19-таргетних кон'югатів в KB моделі ксенотрансплантата. FOLR1-таргетований розщеплюваний кон'югат huMov19-SPDB-DM4 (B) у порівнянні з не-FOLR1-таргетованим huC242-SPDB-DM4 (D) і нерозщеплюваним кон'югатом huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C) порівняно з нетаргетованим huC242-PEG4Mal-DM4 (E) були протестовані шляхом встановленої моделі ксенотрансплантата KB клітин, підшкірно імплантованих мишам з ТКІН (тяжкою комбінованою імунною недостатністю). Таргетування huMov19 за FOLR1 привело до значного зниження середнього об'єму пухлини.

20 Фігура 8. Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 терапії OVCAR-3 ксенотрансплантата карциноми яєчників людини. Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ.

25 Фігура 9. Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 терапії IGROV-1 ксенотрансплантата карциноми яєчників людини. Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ.

30 Фігура 10. Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 терапії OV-90 ксенотрансплантата карциноми яєчників людини. Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ.

35 Фігура 11. Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 терапії SKOV-3 ксенотрансплантата карциноми яєчників людини. Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ.

40 Фігура 12. Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 терапії KB ксенотрансплантата аденокарциноми шийки матки людини. Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,0, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ.

45 Фігура 13. Автоматизовані способи забарвлювання: типові фотографії й гістограми, що показують експресію FOLR1 у клітинних лініях, визначену за допомогою ІГХ і проточної цитометрії. Клітини ліній SW620, T47D, Igrov-1, 300.19/FR1, HeLa і KB оцінювалися за інтенсивністю й рівномірністю забарвлювання FOLR1. Ступінь і рівномірність забарвлювання клітин SW630 і IGROV-1 були оцінені, як 1-3 неоднорідна, T47D як 1-2 неоднорідна, HeLa як 2-3 неоднорідна, у той час як 300.19/FR1 і KB були оцінені, як 3 однорідна.

50 Фігура 14. Автоматизовані способи забарвлювання: типове забарвлювання FOLR1 серозного раку яєчників. Зразки показали ступінь і рівномірність забарвлювання такі, як 3 однорідна, 2-3 однорідна, 2 однорідна й 2 неоднорідна, встановлені за допомогою ІГХ на зрізах тканини серозного раку яєчників.

55 Фігура 15. Автоматизовані способи забарвлювання: типове забарвлювання FOLR1 ендометріюїдного раку яєчників. Зразки показали ступінь і рівномірність забарвлювання такі, як 3 однорідна, 2-3 однорідна, 3 фокальна й 1-2 неоднорідна, встановлені за допомогою ІГХ на зрізах тканини ендометріюїдного раку.

60 Фігура 16. Автоматизовані способи забарвлювання: типове забарвлювання FOLR1 НДРЛ підтипу аденокарциноми (за винятком бронхіолоальвеолярної карциноми). Зразки показали ступінь і рівномірність забарвлювання такі, як 3 однорідна, 2-3 однорідна, 2 неоднорідна, 2 однорідна й 1-2 неоднорідна, встановлені за допомогою ІГХ на зрізах тканини недрібноклітинного раку легенів, підтипу аденокарциноми.

Фігура 17. Автоматизовані способи забарвлювання: типове забарвлювання FOLR1 аденокарциноми ендометрію. Зразки показали ступінь і рівномірність забарвлювання такі, як 3 неоднорідна, 2 неоднорідна й 1 неоднорідна, встановлені за допомогою ІГХ на зрізах тканини аденокарциноми ендометрію.

Фігура 18. Автоматизовані способи забарвлювання: типове забарвлювання FOLR1 нирково-клітинної карциноми. Зразки показали ступінь і рівномірність забарвлювання такі, як 2 однорідна, 2 неоднорідна й 1 неоднорідна, встановлені за допомогою ІГХ на зрізах тканини нирково-клітинного раку.

Фігура 19. Цитотоксична *in vitro* активність IMGN853. П'ять FOLR1-позитивних клітинних ліній (KB, IGROV-1, JEG-3, SKOV-3 і OVCAR-3) і дві FOLR1-негативні клітинні лінії (Namalwa і SW2) аналізували на їх чутливість до цитотоксичних ефектів IMGN853. Клітини піддавали впливу IMGN853 (суцільна лінія) або IMGN853 плюс 0,5 мкМ некон'югованого huMov19 (M9346A) (пунктирна лінія) протягом 5 днів, а виживаність клітин визначали за допомогою аналізу на основі WST-8. Показані репрезентативні дані. Відсоток клітин, що вижили, наносили на графік у порівнянні з десятковим логарифмом концентрації IMGN853.

Фігура 20. Чутливість FOLR1-позитивних клітинних ліній до IMGN853 проти рівня експресії FOLR1. Ефективність і специфічність IMGN853 була проаналізована на FOLR1-позитивних клітинних лініях із широким спектром експресії FOLR1. Клітинні лінії, інкубовані з IMGN853 і KB, Igrov-1 і Jeg-3 показали специфічну чутливість до IMGN853, тоді як некон'юговані huMov19 (M9346A) показали зниження активності кон'югата. Skov-3 і Ovar-3 не були чутливі до IMGN853, і некон'юговані huMov19 (M9346A) не змінили активність кон'югата.

Фігура 21. Автоматизовані способи забарвлювання: моделі ефективності ксенотрансплантата карциноми яєчників, забарвлені для FOLR1. Зразки показали ступінь і рівномірність забарвлювання такі, як 1-3 неоднорідна (Ovar 3), 1-3 однорідна (Igrov 1), 1-2 неоднорідна (Ov 90) і негативний результат (SKOV 3), встановлені за допомогою ІГХ на зрізах тканини ксенотрансплантатів раку яєчників.

Фігура 22. Автоматизовані способи забарвлювання: мишачі моделі ксенотрансплантатів. Показані зразки забарвлювання для FOLR1 ксенотрансплантатів клітинних ліній НДРЛ (А), карциноми ендометрію (В) і карциноми шийки матки (С). Зразки НДРЛ показали ступінь і рівномірність забарвлювання такі, як 2-3 однорідна або 2 однорідна, карциноми ендометрію 2 неоднорідна/3 фокальна, раку шийки матки 3 однорідна.

Фігура 23. Посібник з автоматизованого забарвлювання контрольних зразків тканин. Забарвлені зразки, використовувані для негативного (стравохід 0) і позитивного контролю (слинна залоза 1-2 неоднорідна, легені 2 однорідна, підшлункова залоза 3 однорідна), показані підготовленими для автоматизованої ІГХ.

Фігура 24. Посібник з автоматизованого забарвлювання пухлинних тканин. Типові зразки забарвлювання рівня 3, рівня 2 і рівня 1 показані на контрольній тканині підготовленими для автоматизованої ІГХ.

Фігура 25. Посібник з автоматизованого забарвлювання пухлинних тканин. Типові зразки забарвлювання рівня 3, рівня 2 і рівня 1/ негативного показані на контрольній тканині підготовленими для автоматизованої ІГХ.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід належить до способів підвищення ефективності або ймовірності відповіді на лікування раку, що характеризується надлишковою експресією FOLR1. Даний винахід заснований на відкритті існування динамічного діапазону експресії FOLR1 у пухлинній тканині й збільшення чутливості пухлини з підвищеним рівнем експресії FOLR1 до терапії анти-FOLR1 антитілами або анти-FOLR1 імунокон'югатами. Нами також було виявлені відмінності між автоматизованими й ручними способами аналізу чутливості й виявлення динамічних діапазонів. Додатково передбачені набори, що включають один або більшу кількість реагентів, використовуваних для практичного втілення способів згідно з винаходом.

І. Визначення

Для полегшення розуміння суті даного винаходу, нижче визначається ряд термінів і виразів.

Термін "рецептор фолієвої кислоти 1 людини" або "FOLR1", використовуваний у даному документі, належить до будь-якого нативного людського FOLR1, якщо не зазначене інше. Термін "FOLR1" належить до "повнорозмірних" необроблених FOLR1, а також до будь-якої форми FOLR1, одержаної в результаті процесінгу всередині клітини. Термін також включає варіанти FOLR1, що природно зустрічаються, наприклад сплайс-варіанти, алельні варіанти й ізоформи. Поліпептиди FOLR1, описані в даному документі, можуть бути виділені з різних джерел, наприклад з людських тканин різних типів, або з іншого джерела, або одержані за допомогою рекомбінантних або синтетичних способів. Приклади послідовностей FOLR1 включають, але не обмежуються номерами NCBI P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1 і NP_057936.1 і зазначені в SEQ ID №: 1 і 2.

Термін "підвищена експресія" FOLR1 належить до зразка, що показує підвищені рівні експресії FOLR1. В одному прикладі експресія FOLR1 вимірюється за допомогою ІГХ і дається

оцінка інтенсивності забарвлювання або оцінка рівномірності забарвлювання зразка в порівнянні з контрольною групою (наприклад, відкаліброваних зразків), шляхом використання визначених значень (наприклад, тестовому зразку надається значення інтенсивності 3, якщо інтенсивність є порівнянною з рівнем 3 каліброваного зразка, або тестовому зразку надається значення інтенсивності 2, якщо інтенсивність є порівнянною з рівнем 2 каліброваного зразка). Наприклад, показник 1, 2, 3 і 3+ або вище, визначений за допомогою імуногістохімії показує підвищену експресію FOLR1. Рівномірність забарвлювання, яка може бути неоднорідною або однорідною, також свідчить про підвищену експресію FOLR1. Інтенсивність забарвлювання й оцінки однорідності забарвлювання можуть бути використані окремо або в комбінації (наприклад, 2 однорідна, 2 неоднорідна, 3 однорідна, 3 неоднорідна тощо). В іншому прикладі підвищення рівня експресії FOLR1 може бути визначене шляхом виявлення його збільшення щонайменше в 2 рази, або щонайменше в 3 рази, або щонайменше в 5 разів у порівнянні з контрольними значеннями (наприклад, рівень експресії в тканині або клітині суб'єкта без раку або суб'єкта що має рак, не викликає підвищення значень FOLR1).

Термін "еталонний зразок" може бути використаний для кореляції й порівняння результатів, одержаних від досліджуваного зразка за допомогою способів, описаних у винаході. Еталонними зразками можуть бути клітини (наприклад, клітинні лінії, конгломерати клітин) або тканини. Рівні FOLR1 в "еталонному зразку" можуть показувати абсолютні або відносні значення, знаходитися всередині діапазону значень, брати мінімальне й/або максимальне значення, середнє значення й/або медіанне значення FOLR1. Способи діагностики згідно з винаходом включають порівняння рівнів експресії FOLR1 у зразку, який тестують, з "референтними значеннями". У деяких варіантах втілення референтне значення відповідає рівню експресії FOLR1 в еталонному зразку. Референтне значення може бути заздалегідь заданим значенням, а також може бути визначене з еталонних зразків (наприклад, контрольних біологічних зразків), досліджуваних паралельно з тестовими зразками. Референтне значення може бути одним граничним значенням, наприклад медіанним або середнім, або діапазоном значень, таким, як довірчий інтервал. Референтні значення можуть бути встановлені для різних підгруп осіб, таких, як особи, схильні до раку, особи, що мають рак на ранніх або пізніх стадіях, особи чоловічої й/або жіночої статі або особи під час проходження антиракової терапії. Приклади нормальних еталонних зразків або значень, і позитивних еталонних зразків або значень, описані в даному документі.

У деяких варіантах втілення еталонний зразок являє собою зразок здорової тканини, зокрема відповідної тканини, яка не уражена раковою пухлиною. Цей тип еталонних зразків називається зразками для негативного контролю. В інших варіантах втілення еталонний зразок являє собою зразок пухлинної тканини, яка експресує FOLR1. Цей тип еталонних зразків називається зразками для позитивного контролю. Зразки для позитивного контролю також можуть бути використані як індикатор порівняння для перевірки однорідності (неоднорідна проти однорідної) й/або ступеня (1, 2, 3, 3+) інтенсивності забарвлювання, яка корелює з рівнем експресії FOLR1. Зразки для порівняльного позитивного контролю також називають каліброваними еталонними зразками, які використовуються для визначення динамічного діапазону інтенсивності або однорідності забарвлювання. Як показано в прикладах 1-9, еталонні зразки, які не експресують FOLR1, включають тканини стравоходу людини; зразки з низьким рівнем експресії FOLR1 включають тканини слинної залози (зокрема, проміжних проток) і легенів (зокрема дихального епітелію), зразки тканин з високим рівнем експресії FOLR1 включають тканини підшлункової залози (зокрема, клітини проток). Клітинні лінії з низькою експресією включають, але не обмежуються OVCAR3 і T47D, лінії з помірною експресією включають, але не обмежуються ними, SW620, IGROV-1, JEG3 і лінії з високою експресією включають, але не обмежуються ними, KB і IGROV1. Особливо бажаними зразками для позитивного контролю високої експресії FOLR1 є лінії клітин, постійно або тимчасово трансфікованих фолатним рецептором 1 (наприклад, 300.19/FR1). Відповідні позитивні й негативні контрольні рівні FOLR1 для конкретного виду раку можуть бути визначені шляхом вимірювання рівнів FOLR1 у одного або у декількох відповідних суб'єктів, і такі контрольні рівні можуть бути прив'язані до конкретних популяцій пацієнтів (наприклад, контрольний рівень може відповідати віковій групі, так що порівняння може бути виконане між рівнями FOLR1 зразків, одержаних від суб'єктів певного віку, і контрольними рівнями для конкретного типу захворювання, фенотипу або відсутності таких у певній віковій групі. Такі контрольні рівні можуть бути прив'язані до конкретних способів, використовуваних для вимірювання рівня FOLR1 у біологічних зразках (наприклад, імунологічних і ін. аналізів), рівні FOLR1 можуть відрізнятися через специфічну методику, на якій ці вимірювання базуються.

Термін "первинне антитіло" належить до антитіла, яке специфічно зв'язується з антигеном білка-мішені в зразку тканини. Первинне антитіло, як правило, є першим антитілом, використовуваним у процедурі імуногістохімічного (ІГХ) аналізу. В одному варіанті втілення первинним антитілом є єдине антитіло, використовуване в процедурі ІГХ. Термін "вторинне антитіло" належить до антитіла, яке специфічно зв'язується з первинним антитілом, утворюючи місток між первинним антитілом і наступним реагентом, якщо такі є. Первинне антитіло, як правило, є другим антитілом, використовуваним у процедурі імуногістохімічного аналізу.

"Зразок" або "біологічний зразок" згідно з даним винаходом має біологічне походження в конкретних варіантах втілення, одержаний з еукаріотичних організмів. У кращих варіантах втілення зразок являє собою зразок тканини людини, але на практиці даного винаходу також можуть бути використані зразки тканини тварини. Необмежуючі джерела зразків для використання в даному винаході включають, наприклад, щільні тканини, аспірати, одержані під час біопсії, асцитичну рідину, рідинні екстракти, кров, плазму, сироватку, спинномозкову рідину, лімфоїдну рідину, зовнішні ділянки шкіри, дихального, кишкового й сечостатевого трактів, слюзи, слину, молоко, пухлини, органи, клітинні культури й/або компоненти клітинної культури. Даний винахід є особливо ефективним для зразків ракової тканини, які звичайно включають зразки щільних тканин, або різних рідин організму, таких як асцитична рідина, де кількість доступних матеріалів є невеликою. Даний спосіб може бути використаний для вивчення аспектів експресії FOLR1 або стану зразка, у тому числі, але не обмежуючись цим, порівняння різних типів клітин або тканин, порівняння різних стадій розвитку й виявлення або визначення присутності й/або типу захворювання або аномалії.

Для цілей даного винаходу, поняття "зріз" зразка тканини належить до одиначної частини або визначеної кількості зразка тканини, наприклад, до тонкого шару тканини або клітин, вирізаних зі зразка тканини. Необхідно розуміти, що декілька зрізів тканинних зразків можуть бути одержані й піддані аналізу відповідно до даного винаходу. У деяких випадках вибрана частина або зріз тканини складається з однорідної популяції клітин. В інших випадках вибрана частина включає ділянку тканини, наприклад, як необмежуючий приклад просвіт. Вибрана частина може складатися, наприклад, з однієї клітини або з двох клітин, або може представляти багато тисяч клітин. У більшості випадків процес збору клітин є важливим, і в той час як винахід описаний для використання з метою детекції клітинних компонентів, спосіб також може бути використаний для виявлення неклітинних компонентів організму (наприклад, як необмежуючий приклад, розчинних у крові компонентів).

Під "корелюванням" або "кореляцією" мається на увазі порівняння, у будь-якому разі, продуктивності й/або результатів першого аналізу із продуктивністю й/або результатами другого аналізу. Наприклад, можна використовувати результати першого аналізу при проведенні другого аналізу й/або можна використовувати результати першого аналізу, щоб визначити, чи варто проводити другий аналіз і/або чи можна порівнювати результати першого аналізу з результатами другого аналізу. В одному варіанті втілення підвищена експресія FOLR1 корелює зі збільшенням імовірності ефективності FOLR1-таргетованої протиракової терапії.

Термін "антитіло" означає молекулу імуноглобуліну, яка розпізнає й специфічно зв'язується з мішенню, такою як білок, поліпептид, пептид, вуглевод, полінуклеотид, ліпід або комбінацією вищевказаного через, щонайменше, один сайт розпізнавання антигена усередині варіабельного регіону молекули імуноглобуліну. Використовуваний у даному документі термін "антитіло" включає інтактні поліклональні антитіла, інтактні моноклональні антитіла, фрагменти антитіл (наприклад, Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv-фрагменти), одноланцюгові Fv (ScFv) мутанти, мультиспецифічні антитіла, такі як біспецифічні антитіла, одержані з, щонайменше, двох інтактних антитіл, хімерні антитіла, гуманізовані антитіла, людські антитіла, складені білки, які включають частину антитіла, що визначає антиген і будь-які інші модифіковані молекули імуноглобуліну, що включають сайт розпізнавання антигена за умови, що антитіла володіють очікуваною біологічною активністю. Антитіло може належати до будь-якого з п'яти основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, або їх підкласів (ізотипів) (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2), що базуються на ідентичності їх важких ланцюгів константних доменів, названих альфа, дельта, епсилон, гама й му, відповідно. Різні класи імуноглобулінів володіють різними й добре відомими структурними субодиницями й тривимірними конфігураціями. Антитіла можуть бути відкритими або кон'югованими з іншими молекулами, такими як токсини, радіоізотопи тощо.

"Блокувальне" антитіло або "антитіло-антагоніст" являє собою антитіло, яке інгібує або зменшує біологічну активність антигена, з яким воно зв'язується, наприклад, FOLR1. У конкретному варіанті втілення блокувальні антитіла або антитіла-антагоністи значною мірою

або повністю інгібують біологічну активність антигена. Очікувана біологічна активність знижується на 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або навіть на 100 %.

Термін "анти-FOLR1 антитіло" або "антитіло, яке зв'язується FOLR1" належить до антитіла, яке здатне зв'язувати FOLR1 з достатньою афінністю. Дане антитіло є ефективним як діагностичний і/або терапевтичний засіб для прицільного впливу на FOLR1. Ступінь зв'язування анти-FOLR1 антитіла з неспорідненим, не FOLR1 білком становить менше, ніж приблизно 10 % від ступеня зв'язування антитіла з FOLR1, наприклад, вимірюної за допомогою радіоімунаналізу (PIA). У деяких варіантах втілення антитіло, яке зв'язується з FOLR1 має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ або $\leq 0,1$ нМ. Приклади анти-FOLR1 антитіл відомі в даній галузі й описані в патенті США № 2012/0009181, включеному в даний документ за допомогою посилання.

Термін "фрагмент антитіла" означає частину інтактного антитіла й належить до антиген визначальних варіабельних регіонів інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіла включають, але не обмежуються ними, Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv фрагменти, лінійні антитіла, однокланові антитіла й мультиспецифічні антитіла, утворені із фрагментів антитіл.

"Моноклональне антитіло" належить до однорідної популяції антитіл, що беруть участь у високоспецифічному розпізнаванні й зв'язуванні з однією антигенною детермінантою або епітопом. Цим вони відрізняються від поліклональних антитіл, які звичайно включають різні антитіла, спрямовані проти різних антигенних детермінант. Термін "моноклональне антитіло" включає інтактні й повнорозмірні моноклональні антитіла, а також фрагменти антитіл (наприклад, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), однокланові (ScFv), мутанти, складені білки, які включають частини антитіл і будь-які інші модифіковані молекули імуноглобуліну, що включають сайт розпізнавання антигена. Крім того, поняття "моноклональне антитіло" належить до антитіл, одержаних будь-якою кількістю способів, включаючи, але не обмежуючись ними, використання гібридом, селекцію фагів, рекомбінантну експресію й трансгенні тварини.

Терміни "епітоп" або "антигенна детермінанта" використовуються взаємозамінно й належать до тієї частини антигена, яка може розпізнаватися й специфічно зв'язується з конкретним антитілом. Якщо антиген являє собою поліпептид, епітопи можуть бути сформовані із суміжних і несуміжних амінокислот зіставленням при третинному складанні білка. Епітопи, що формуються із суміжних амінокислот, як правило, зберігаються під час денатурації білка, тоді як епітопи, утворені третинним складанням звичайно втрачаються під час денатурації білка. Епітоп звичайно включає щонайменше три, а частіше, щонайменше, 5 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації.

"Афінність зв'язування" звичайно належить до інтенсивності суми нековалентних взаємодій між одним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитілом) і його партнером по зв'язуванню (наприклад, антигеном). Якщо не зазначене інше, при використанні в даному документі, поняття "афінність зв'язування" належить до внутрішньої афінності зв'язування, яка відображує взаємодію 1:1 між членами пари зв'язування (наприклад, антитілом і антигеном). Афінність молекули X щодо свого партнера Y звичайно може бути представлена за допомогою константи дисоціації (K_d). Афінність може бути виміряна загальними способами, відомими в даній галузі техніки, включаючи описані в даному документі. Низькоафінні антитіла звичайно зв'язуються з антигеном повільно й, як правило, легко дисоціюють, тоді як антитіла з високою афінністю звичайно зв'язуються з антигеном швидше й, як правило, залишаються зв'язаними довше. Різні способи вимірювання афінності зв'язування добре відомі в даній галузі техніки, будь-який з них може бути використаний для цілей даного винаходу. Конкретні демонстративні варіанти втілення описані далі.

"Або краще" при використанні в даному документі належить до позначення афінності зв'язування й належить до сильного зв'язку між молекулою і її партнером по зв'язуванню. "Або краще" при використанні в даному описі належить до сильного зв'язку, представленого меншим чисельним значенням K_d . Наприклад, у випадку, коли антитіло володіє спорідненістю до антигена "0,6 нМ або краще", спорідненість антитіла до антигена дорівнює $<0,6$ нМ, тобто 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ тощо, або будь-якому значенню менше 0,6 нМ.

Фрази "по суті аналогічний" або "по суті такий самий", при використанні в даному документі, означає досить високий ступінь подібності між двома числовими значеннями (звичайно одне пов'язане з антитілом згідно з винаходом, інше пов'язане з референсним антитілом / антитілом для порівняння), так що фахівцю в даній галузі техніки необхідно враховувати різницю між двома значеннями, яка може бути малою або взагалі не нести біологічної й/або статистичної значущості у контексті вимірювання зазначених значень біологічних характеристик (наприклад, значення K_d). Різниця між двома зазначеними значеннями становить менше ніж приблизно 50 %, менше ніж приблизно 40 %, менше ніж приблизно 30 %, менше ніж приблизно 20 % або

менше ніж приблизно 10 % залежно від значення для референсного антитіла/антитіла для порівняння.

Поліпептид, антитіло, полінуклеотид, вектор, клітини або композиції, які є "виділеними", являють собою поліпептид, антитіло, полінуклеотид, вектор, клітини або композиції, що перебувають у формі, яка не зустрічається в природі. Виділені поліпептиди, антитіла, полінуклеотиди, вектори, клітини або композиції включають ті, які були очищені настільки, що далі вони існують в іншій формі порівняно з тією, у якій вони зустрічаються в природі. У деяких варіантах втілення виділені антитіло, полінуклеотид, вектор, клітини або композиції є, по суті, чистими.

Використовуваний у даному документі термін "по суті чистий" належить до матеріалу, який, щонайменше чистий на 50 % (тобто без забруднень), щонайменше чистий на 90 %, щонайменше чистий на 95 %, щонайменше чистий на 98 % або щонайменше чистий на 99 %.

Термін "імунокон'югат" або "кон'югат", використовуваний у даному документі, належить до сполуки або її похідного, які зв'язані з агентом, що зв'язується з клітиною (наприклад, анти-FOLR1 антитіла або його фрагмента) і визначається загальною формулою C-L-A, де C = цитотоксин, L = лінкер, і A = агент, що зв'язується з клітиною, або анти-FOLR1 антитіло або фрагмент антитіла. Імунокон'югати також можуть бути визначені загальною формулою у зворотному порядку: A-L-C.

"Лінкер" означає будь-яку хімічну групу, яка здатна зв'язувати сполуку, як правило, лікарський засіб, такий як майтансиноїд, з агентом, що зв'язується з клітиною, таким як анти-FOLR1 антитіло або його фрагмент, стабільним ковалентним способом. Лінкери можуть бути чутливими або бути практично стійкими до кислотно-індукованого розщеплення, розщеплення, індукованого світлом, розщеплення, індукованого пептидазою, розщеплення, індукованого естеразою й розщеплення дисульфідного зв'язку, в умовах, за яких сполука або антитіло залишається активним. Придатні лінкери добре відомі в даній галузі техніки й включають, наприклад, дисульфідні групи, тіоефірні групи, кислотно-лабільні групи, фотолабільні групи, пептидазо-лабільні групи й естеразо-лабільні групи. Лінкери також включають заряджені лінкери і їх гідрофільні форми, відомі в даній галузі техніки, як описано вище.

Терміни "рак" і "раковий" належать або описують фізіологічний стан у ссавців, у якому популяція клітин характеризується нерегульованим клітинним ростом. Приклади раку включають, але не обмежуються ними, карциному, лімфому, бластоми, саркому й лейкоз. Більш конкретні приклади таких видів раку включають плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легенів, недрібноклітинний рак легенів, аденокарциному легенів, плоскоклітинний рак легенів, рак черевної порожнини, гепатоцелюлярний рак, рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак товстої кишки, колоректальний рак, карциному ендометрію або матки, карциному слинної залози, рак нирок, рак печінки, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитоподібної залози, карциному печінки й різні типи раку голови й шиї.

Терміни "пухлина" і "новотвір" належать до будь-якої маси тканини, яка в результаті надмірного клітинного росту або проліферації може бути як доброякісною (нераковою), так і злоякісною (раковою), включаючи передракові ураження тканин.

Терміни "ракова клітина", "клітина пухлини" і їх граматичні еквіваленти належать до загальної популяції клітин, одержаних з пухлини або передракових уражень, у тому числі й неонкогенних клітин, які становлять більшу частину популяції пухлинних клітин, і онкогенних стовбурних клітин (ракових стовбурних клітин). Термін "клітина пухлини", при використанні в даному документі, буде змінений на термін "неонкогенний", коли мова йде лише про пухлинні клітини, не здатні до відновлення й диференціювання, щоб відрізнити ці пухлинні клітини від ракових стовбурних клітин.

Термін "суб'єкт" належить до будь-якої тварини (наприклад, ссавця), включаючи, але не обмежуючись ними, людей, приматів, крім людини, гризунів тощо, яка повинна одержати конкретне лікування. Як правило, термін "суб'єкт" і "пацієнт" використовуються в даному документі взаємозамінно у відношенні суб'єкта-людини.

Призначення "у комбінації з" одним або більшою кількістю додаткових терапевтичних агентів включає одночасне (спільне) і послідовне введення в будь-якому порядку.

Термін "фармацевтична композиція" належить до препарату, який знаходиться у формі, що забезпечує біологічну активність діючої речовини для забезпечення його ефективності, і яка не включає додаткових компонентів, які є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому необхідно вводити композицію. Така композиція може бути стерильною.

"Ефективна кількість" антитіла, як описано в даному документі, означає кількість, достатню для здійснення специфічно заявленого призначення. "Ефективна кількість" може бути визначена емпірично й рутинним способом щодо заявленого призначення.

Термін "терапевтично ефективна кількість" належить до кількості антитіла або іншого лікарського засобу для "лікування" захворювання або розладу в суб'єкта або ссавця. У випадку раку, терапевтично ефективна кількість лікарського засобу може зменшити число ракових клітин; зменшити розмір пухлини; інгібувати (тобто сповільнити до певної міри й, у певному варіанті втілення, зупинити) інфільтрацію ракових клітин у периферичні органи; інгібувати (тобто сповільнити до певної міри й, у певному варіанті втілення, зупинити) розвиток метастазів пухлини; інгібувати, до певної міри, ріст пухлини й/або полегшити до певної міри один або більше симптомів, пов'язаних з раком. Див. далі визначення поняття "лікування". Залежно від здатності препарату відповідним чином запобігати росту й/або знищувати існуючі ракові клітини, він може бути цитостатичним і/або цитотоксичним. У деяких варіантах втілення визначення підвищених рівнів FOLR1 дає можливість призначати знижену дозу FOLR1-таргетної терапії для досягнення такого ж терапевтичного ефекту, який був би при призначенні більш високих доз. "Кількість, ефективна для профілактики" належить до ефективної кількості, у дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного профілактичного результату. Звичайно, але не обов'язково, виходячи з того, що профілактична доза використовується до початку захворювання або на його ранній стадії, профілактично ефективна кількість буде меншою, ніж терапевтично ефективна кількість.

Термін "сприятливо реагувати" звичайно належить до викликання в суб'єкта сприятливого стану. Що стосується лікування раку, термін належить до забезпечення в суб'єкта терапевтичного ефекту. Позитивний терапевтичний ефект при лікуванні раку може бути виміряний декількома способами (див. W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1 S-10S (2009)). Для оцінки терапевтичної ефективності антиракової терапії можуть бути використані, наприклад, оцінка інгібування росту пухлини, експресії молекулярних маркерів, експресії сироваткових маркерів і молекулярні способи візуалізації. У відношенні інгібування росту пухлини, згідно зі стандартами NCI, значення співвідношення $T/C \leq 42\%$ є мінімальним рівнем протипухлинної активності. $T/C < 10\%$ вважається високим рівнем протипухлинної активності, при тому, що формула визначення T/C виглядає, як: $T/C (\%) = \text{Медіана об'єму пухлини, що піддається терапії} / \text{Медіана об'єму пухлини, використовуваної для контролю} \times 100$.

Термін "мітка", використовуваний у даному документі, належить до виявлюваної сполуки або композиції, кон'югованої з антитілом безпосередньо або опосередковано, таким чином, що утворюється "мічене" антитіло. Мітка може виявлятися сама по собі (наприклад, радіоізотопні або флуоресцентні мітки) або, у випадку ферментної мітки, вона може каталізувати хімічне змінення субстрату сполуки або композиції, яке потім може бути виявлене.

"Хіміотерапевтичний засіб" являє собою хімічну сполуку, використовувану для лікування раку, незалежно від її механізму дії. Класи хіміотерапевтичних засобів включають, але не обмежуються ними: алкілюючі агенти, антиметаболіти, рослинні алкалоїди, що блокують мітотичне веретено, цитотоксичні / протипухлинні антибіотики, інгібітори топоізомери, антитіла, фотосенсибілізатори й інгібітори кіназ. Хіміотерапевтичні засоби включають сполуки, використовувані для "таргетної терапії" і традиційної хіміотерапії.

Такі терміни, як "терапія" або "лікування" або "лікувати" або "полегшення стану" або "полегшити стан" належать до 1) терапевтичних заходів, що дозволяютьвилікувати, сповільнити розвиток, зменшити симптоми й/або зупинити прогресування діагностованого патологічного стану або розладу й 2) профілактичних або превентивних заходів, які запобігають і/або сповільнюють розвиток можливого патологічного стану або розладу. Таким чином, ті, хто потребує лікування, включають тих, хто вже має розлад; тих, хто схильні до розладу й тих, у кого необхідно запобігти розладам. У деяких варіантах втілення суб'єкт вважається успішно "вилікуваним" від раку у відповідності зі способами згідно з даним винаходом, якщо він демонструє одне або більш із наступного: зменшення кахексії, збільшення тривалості життя, подовження часу до прогресування пухлини, зниження пухлинної маси, зниження пухлинної маси й/або продовження відрізка часу до виникнення метастазів пухлини й часу до виникнення рецидиву пухлини, відповідь пухлини на лікування, повну відповідь, часткову відповідь, стабілізацію захворювання, усунення прогресування захворювання, виживаність без прогресування захворювання (ВБП), загальну виживаність (ЗВ); кожний з параметрів оцінений згідно зі стандартами, встановленими Національним інститутом раку й Адміністрацією США по харчових продуктах і лікарських речовинах для затвердження нових лікарських засобів. Див. Johnson et al., (2003) J. Clin. Oncol. 21 (7):1404-1411.

"Виживаність без прогресування" (ВБП), також називана "часом до прогресування пухлини" (ЧДП) указує тривалість часу протягом лікування й після нього, поки пухлина не росте. Виживаність без прогресування захворювання включає відрізок часу, за який пацієнти зазнавали повну або часткову відповідь на лікування, а також відрізок часу, за який пацієнти

зазнавали стабілізацію захворювання.

"Період ремісії" (ПР) належить до відрізка часу протягом лікування й після нього, протягом якого пацієнт не зазнає ознак захворювання.

"Загальна виживаність" (ЗВ) належить до продовження очікуваної тривалості життя в порівнянні з особами або пацієнтами, яких не піддавали будь-якому впливу або лікуванню.

При використанні в даному описі винаходу й формулі винаходу, форми однини включають форми множини, якщо з контексту явно не випливає інше.

Необхідно розуміти, що описаний у даному варіанті втілення термін "такий, що включає", в аналогічних варіантах втілення описується в термінах "такий, що складається з" і/або « такий, що по суті складається з".

Термін "і/або", при використанні у фразі, такий як "А і/або Б" у даному описі, включає "А і Б", "А або Б", "А" і "Б". Аналогічно, термін "і/або", використовуваний у фразі типу "А, Б і/або В" призначений для охоплення кожного з наступних варіантів: А, Б і В; А, Б або В; А або В; А або Б; Б або В; А і В; А і Б, Б і В; А (окремо), Б (окремо) і В (окремо).

II. Біологічні зразки

Біологічні зразки часто фіксують за допомогою фіксатора. Для цієї мети звичайно використовуються альдегідні фіксатори, такі як формалін (формальдегід) і глутаральдегід. Зразки тканин фіксуються за допомогою інших способів фіксації, таких як занурення в спирт (Battifora і Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095). Використовувані зразки також можуть бути залиті парафіном. В одному варіанті втілення зразки тканини фіксуються у формаліні й заливаються парафіном (ФФЗП). В іншому варіанті втілення блок ФФЗП забарвлюється гематоксиліном і еозином до вибору однієї або більше його частин для проведення аналізу з метою вибору конкретної зони (зон) зразка ФФЗП. Способи підготовки блоків тканин із цих частин зразків використовувалися в попередніх ІГХ дослідженнях різних факторів прогнозу й/або добре відомі фахівцям у даній галузі техніки (див., наприклад, Abbondanzo et al., Am J Clin Pathol. 1990 May; 93 (5):698-702; Allred et al., Arch Surg. 1990 Jan.;125 (1):107-13).

Коротко, всі інтактні органи або тканини можуть бути розрізані на досить дрібні зразки й витримані в різних фіксаторах (наприклад, формалін, спирт тощо) протягом різних періодів часу, поки тканина не "зафіксується". Можуть бути одержані зразки практично будь-якої інтактної тканини, хірургічно видаленої з організму. Зразки можна розрізати на відносно невеликі фрагменти, які розміщують в обладнанні, що звичайно використовується в гістопатологічних лабораторіях. Розмір фрагментів зразка звичайно становить від декількох міліметрів до декількох сантиметрів.

III. Кон'югати детекторних антитіл

Даний винахід також належить до антитіл проти FOLR1, звичайно моноклонального типу, які зв'язані з, щонайменше, одним агентом з утворенням кон'югата детекторного антитіла. З метою підвищення ефективності використання молекул антитіл як діагностичних, їх зв'язують звичайним або ковалентним зв'язком або утворюють комплекс, щонайменше, із однією цільовою молекулою або фрагментом. Така молекула або фрагмент може бути, не обмежуючись цим, щонайменше, однією репортерною групою. Репортерна група визначається як будь-який фрагмент, який може бути виявлений за допомогою аналізу. Необмежуючі приклади репортерних груп, кон'югованих з антитілами включають ферменти, радіоактивні мітки, гаптени, флуоресцентні мітки, фосфоресцюючі молекули, хемілюмінесцентні молекули, хромофори, люмінесцентні молекули, молекули, що проявляють фотоафінність, забарвлені частки й/або ліганди, такі як біотин.

Будь-який клітинно-зв'язувальний агент (наприклад, антитіло або поліпептид) з достатньою селективністю, специфічністю або афінністю може бути використаний як основа для виявлення FOLR1 поліпептиду. Такі властивості агента можуть бути оцінені за допомогою загальноприйнятих імунологічних скринінгових способів, відомих фахівцям у даній галузі техніки. Сайти для зв'язування з біологічно активними молекулами в молекулі антитіла, на додаток до канонічних антигензв'язуючих сайтів, включають сайти, які можуть зв'язуватися з антигеном, що знаходяться в регіоні варіабельного домену. Крім того, варіабельний домен залучений у процес самозв'язування антитіла (Kang et al., 1988) і включає епітопи (ідіотопи), розпізнавані антиантитілами (Kohler et al., 1989).

Деякі приклади кон'югатів, одержаних при зв'язуванні з білками (наприклад, антитіла), включають кон'югати, в яких агент, що зв'язує білок (наприклад, антитіло) зв'язаний з виявлюваною міткою. "Виявлювані мітки" є сполуками й/або елементами, які можуть бути виявлені завдяки їх особливим функціональним властивостям і/або хімічним характеристикам, використання яких дозволяє антитілу, до якого вони приєднані, бути виявленим і/або, за необхідності, кількісно оціненим.

У даній галузі техніки відома велика кількість відповідних візуалізуючих агентів, як відомі й способи їх кріплення до антитіл (див., наприклад, патенти США №№ 5021236; 4938948 і 4472509, кожний з яких включений у даний опис у вигляді посилання). Наприклад, у якості візуалізуючих фрагментів, можуть бути використані парамагнітні іони; радіоактивні ізотопи; флуорохромні; речовини, що виявляються за допомогою ЯМР і/або речовини для візуалізації за допомогою рентгенівського випромінювання.

Приклади флуоресцентних міток, що припускаються для використання їх як кон'югатів для зв'язування з білками (наприклад, антитілами), включають Aieha 350, Aieha 430, Aieha 488, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Dylight 488, флуоресцеїнізотіоціанат, зелений флуоресцентний білок (GFP), HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, фікоеритрин, REG, родамін зелений, родамін червоний, тетраметилродамін (TMR), Renographin, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамін, Texas Red і похідні цих міток (наприклад, галогеновані аналоги, модифіковані ізотіоціанатом або іншим кон'югуючим лінкером тощо). Прикладом радіоактивної мітки є тритій.

Виявлювані кон'югати, що зв'язуються з білками (наприклад, антитіла), розглянуті в даному винаході, включають призначені для використання *in vitro*, де антитіло зв'язане із удруге зв'язаним лігандом і/або ферментом (ферментна мітка), які будуть забарвлювати продукт при контакті із хромогенним субстратом. Приклади придатних ферментів включають уреазу, лужну фосфатазу, пероксидазу (хрону) і/або оксидазу глюкози. Кращими лігандами вторинного зв'язування є сполуки біотину й/або авідину й стрептавідину. Використання таких міток добре відомо фахівцям у даній галузі техніки й описане, наприклад, у патентах США №№ 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 і 4366241, кожний з яких включений у даний документ у вигляді посилання.

Молекули, що включають азидогрупи, також можуть бути використані з утворенням ковалентних зв'язків з білками через реактивні нітренові інтермедіати, які генеруються ультрафіолетовим світлом низької інтенсивності (Potter & Haley, 1983). Зокрема, 2- і 8-азидові аналоги пуринових нуклеотидів були використані як сайт-орієнтовані фотозонди для ідентифікації нуклеотидних зв'язувальних білків у сирих клітинних екстрактах (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- і 8-азидонуклеотиди також використовувалися для відображення нуклеотидних зв'язувальних доменів очищених білків (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989 і Dholakia et al., 1989) і можуть бути використані як агенти зв'язування антитіл.

У даній галузі техніки відомі декілька способів приєднання або кон'югації антитіла до його кон'югованого фрагмента. Деякі зі способів приєднання включають використання комплексів хелатів металів за допомогою, наприклад, органічного хелатуючого агента, такого як ангідрид діетилентриамінпентаоцтової кислоти (DTP A); етилентриамінтетраоцтова кислота, N-хлор-р-толуолсульфонамід і/або тетрахлор-3 α -6 α -дифенілгліколурил-3, прикріпленого до антитіла (патент США №№ 4472509 і 4938948, кожний з яких включений у даний опис у вигляді посилання). Моноклональні антитіла також можуть бути піддані взаємодії з ферментом за присутності зв'язувального агента, такого як глутаральдегід або періодат. Білокзв'язувальні кон'югати (наприклад такі, що зв'язують білок з антитілом) з маркерами флуоресцеїну готують за присутності цих зшиваючих агентів або шляхом взаємодії з ізоціанатом. У патенті США № 4938948, візуалізація пухлин молочної залози, наприклад, досягається шляхом використання моноклональних антитіл, коли виявлювані візуалізаційні фрагменти зв'язані з антитілом за допомогою лінкерів, таких як метил-р-гідроксибензимідат або N-сукцинімідил-3-(4-гідроксифеніл)-пропіонат.

В інших варіантах втілення розглядається дериватизація імуноглобулінів шляхом виборчого введення сульфгідрильних груп в Fc регіон імуноглобуліну за допомогою умов реакції, що не змінюють сайт антитіла. Кон'югати антитіл, одержані за описаною методикою, демонструють покращену довговічність, специфічність і чутливість (патент США № 5196066, включений у даний документ у вигляді посилання). Сайт-специфічне кріплення ефекторної або репортерної молекули, при якому репортерна або ефекторна молекула кон'югована з вуглеводним залишком в Fc регіоні, також описане в літературі (O'Shannessy et al., 1987).

В інших варіантах втілення винаходу імуноглобуліни позначені радіоактивними мітками за допомогою нуклідів, таких як тритій. У додаткових варіантах втілення використовуються наночастки золота (наприклад, розміром від приблизно 0,5 нм до 40 нм) і/або квантові точки (Hayward, Calif.).

5 IV. Ферменти й субстрати (Хромагени)

Для виявлення FOLR1 передбачається використання субстратів і індикаторів, таких як використовувані як приклад у варіантах втілення, що наводяться нижче.

Пероксидаза хрому (HRP) є ферментом, який спочатку утворює комплекс із перекисом водню, а потім приводить до його розкладання, у результаті чого виділяється вода й атомарний кисень. Як і з багатьма іншими ферментами, HRP і HRP-подібна активності можуть бути інгібовані надлишком субстрату. Комплекс, утворений між HRP і надлишковою кількістю перекису водню є каталітично неактивним і за відсутності донора електронів (наприклад хромогенної речовини) інгібує оборотним способом. Це означає, що надлишок перекису водню й відсутність донора електронів приводить до гасіння ендогенної активності HRP.

В аналітичних системах HRP також може бути використана для перетворення певного субстрату на його активований хромоген, що приводить до зміни кольору. Фермент HRP може бути кон'югований з антитілом, білком, пептидом, полімером або іншою молекулою за допомогою ряду способів. Такі способи відомі фахівцям у даній галузі техніки. Додавання глутаральдегіду в розчин, що включає суміш HRP і антитіл приведе до того, що молекули антитіла будуть більше кон'юговані одна з одною, ніж з ферментом. У двоетапній процедурі HRP у першу чергу реагує з біфункціональними реагентами. На другому етапі з антитілом змішують тільки активовану HRP, що приводить до набагато більш ефективного мічення без полімеризації. HRP також кон'югує зі (стрепт)авідином шляхом двоетапної глутаральдегідної процедури. Ця форма використовується в процедурах, де субстратом, є, наприклад, LAB і LSAB. Кон'югація з біотином також складається із двох етапів, тому що біотин спочатку необхідно одержати у вигляді його похідних - біотиніл-N-гідроксисукцинімідового естеру або біотингідрозиду, перш ніж його можна буде піддавати взаємодії з епсилонаминовими групами ферменту HRP.

3,3'-діамінобензидин (DAB) є субстратом для ферментів, таких як HRP, які виробляють кінцевий продукт коричневого кольору, практично нерозчинний в етанолі й інших органічних розчинниках. Окиснення DAB також приводить до полімеризації, що приводить до здатності його реагування з тетраоксидом осмію й, таким чином, до збільшення інтенсивності забарвлювання й електронної щільності. З декількох металів і способів, використовуваних для підвищення оптичної щільності полімеризованого DAB, найбільш ефективним, очевидно, є використання хлориду золота в комбінації із сульфідом срібла.

3-аміно-9-етилкарбазол (АЕС) є субстратом для ферментів, таких як HRP. Під час окиснення він утворює кінцевий продукт рожево-червоного кольору, розчинний в етанолі. Таким чином, зразки, оброблені АЕС не слід занурювати в спирт або спиртові розчини (наприклад, гематоксилін Харриса). Замість цього необхідно використовувати водні контрастуючі й заливальні середовища. АЕС, на жаль, схильний до подальшого окиснення, і під впливом яскравого світла його інтенсивність буде зменшуватися. Тому його рекомендується зберігати в темному місці.

4-хлор-1-нафтол (CN) є субстратом для ферментів, таких як HRP і випадає в осад у вигляді кінцевого продукту синього кольору. Оскільки CN розчинний в етанолі й інших органічних розчинниках, зразок не повинен дегідратуватися, піддаватися контрастуючому забарвлюванню за допомогою етанолу або заклеюванню покривними стеклами в заливальних середовищах, що включають органічні розчинники. На відміну від DAB, CN має тенденцію дифундувати від місця осадження.

p-фенілендіаміну дигідрохлорид/пірокатехін (реагент Ханкера-Яте) є субстратом донора електронів для ферментів, таких як HRP і дає продукт реакції синьо-чорного кольору, нерозчинний у спирті й інших органічних розчинниках. Як і полімеризований DAB, даний продукт реакції може бути зафіксований у розчині осмієвої кислоти. Різні результати були досягнуті при використанні реактиву Ханкера-Яте в імунопероксидазних способах.

Лужна фосфатаза кишечника теляти (AP) (молекулярна маса 100 кДа) являє собою фермент, який видаляє (шляхом гідролізу) і переносить фосфатні групи органічних складних ефірів шляхом розриву зв'язку P-O; при цьому короткочасно формується проміжний зв'язок фермент-субстрат. Основними металічними активуючими добавками для AP є Mg^{++} , Mn^{++} і Ca^{++} .

AP ніколи широко не використовувалася в імуногістохімії до публікації процедури за допомогою неміченої лужної фосфатази-антилужної фосфатази (АРААР). Розчинні імунні

комплекси, використовувані в цій процедурі, мають молекулярну масу приблизно 560 кДа. Основною перевагою АРААР процедури в порівнянні з РАР способом є відсутність завад, пов'язаних з активністю ендогенної пероксидази. Через можливе відволікання ендогенної активності пероксидази на РАР забарвлювання, техніка АРААР рекомендується для використання на мазках крові й кісткового мозку. Ендогенна активність лужної фосфатази, одержаної із тканин костей, нирок, печінки й деяких лейкоцитів може бути подавлена додаванням 1 мМ левамізолу в розчин субстрату, хоча було встановлено, що більш ефективним є додавання 5 мМ. Кишкова лужна фосфатаза належним чином не пригнічується левамізолом.

В імуногістохімічному способі забарвлювання за допомогою лужної фосфатази, фермент гідролізує нафтолові фосфатні ефіри (субстрат) до фенольних сполук і фосфатів. Феноли контактують із безбарвними солями діазонію (хромоген) з одержанням нерозчинних кольорових азобарвників. Були успішно використані декілька різних комбінацій субстратів і хромогенів.

Нафтол AS-MX-фосфат може бути використаний у його кислотній формі або у вигляді натрієвої солі. Хромогени Fast Red TR і Fast Blue BB виробляють яскраво-червоний або синій кінцевий продукт, відповідно. Обидва розчинні в спиртових і інших органічних розчинниках, так що для їхнього заливання необхідно використовувати середовища на водній основі. Для забарвлювання клітин мазків кращим є Fast Red TR.

Додаткові приклади субстратів включають нафтол AS-BI фосфат, нафтол AS-TR фосфат і 5-бром-4-хлор-3-індоксил фосфат (BCIP). Інші можливі хромогени включають Fast Red LB, Fast Garnet GBC, Nitro Blue тетразол (NBT) йодонітротетразол Violet (INT) і похідні структури.

V. Імунологічні способи

В інших варіантах втілення даний винахід належить до імунологічних способів зв'язування, очищення, кількісного видалення й/або іншого виявлення біологічних компонентів, таких як ліганди, розглянутих у даному винаході. Антитіла, одержані відповідно до даного винаходу можуть бути використані для виявлення лігандів дикого типу й/або мутантів білків, поліпептидів й/або пептидів. Як описано в даний публікації, передбачається використання лігандів дикого типу й/або мутантів специфічних антитіл. Деякі способи імунодетекції включають проточну цитометрію, імуноферментний аналіз (ІФА), радіоімуноаналіз (RIA), імунорадіометричний аналіз, флуороімуноаналіз, хемілюмінесцентний аналіз, біолюмінесцентний аналіз і вестерн-блот, тут згадані деякі з них. Етапи різних корисних імунологічних способів були описані в науковій літературі, такий як, наприклад, роботи Doolittle M H and Ben-Zeev O, *Methods Mol Biol.* 1999; 109:215-37; Gulbis B і Galand P, *Hum Pathol.* 1993 Dec.;24 (12):1271-85; і De Jager R et al., *Semin Nucl Med.* 1993 Apr.;23 (2): 165-79, кожна з яких включений у даний документ у вигляді посилання.

Загалом, способи імунного зв'язування включають одержання зразка, який імовірно включає ліганд білка, поліпептиду й/або пептиду й контактування зразка з першим лігандзв'язувальним пептидом (наприклад, анти-лігандним антитілом), відповідно до даного винаходу, залежно від обставин, за умов, що сприяють формуванню імунних комплексів.

З погляду виявлення антигена, аналізованим біологічним зразком може бути будь-який зразок, який може включати ліганд дикого типу або мутантний ліганд білково-специфічного антигена, наприклад, зріз тканини або зразка, гомогенізований екстракт тканини, аспірат біопсії, клітину, виділену й/або очищену форму будь-якої з вищевказаних композицій дикого типу або мутантів, що включають FOLR1, або навіть будь-яку біологічну рідину, яка стикається з тканиною, у тому числі крові й/або сироватку, хоча кращими є зразки або екстракти тканин.

Контактування вибраного біологічного зразка з антитілом за відповідних умов і протягом періоду часу, достатнього для утворення імунних комплексів (первинних імунних комплексів), як правило, полягає в простому додаванні композиції антитіл до зразка й витримувannya суміші протягом досить довгого періоду часу для того, щоб антитіла сформували з ними імунні комплекси, тобто зв'язалися з будь-якими лігандами білка, що включають антигени. Після закінчення цього періоду часу, композиції зразок-антитіло, такі як зріз тканини, ІФА планшет, обладнання для дот-блота або вестерн-блота, як правило, промивають, щоб видалити будь-які види неспецифічно зв'язаних антитіл, залишаючи для виявлення тільки антитіла, специфічно зв'язані з первинними імунними комплексами.

У цілому, способи виявлення утворених імунокомплексів добре відомі в даній галузі техніки й можуть виконуватися із застосуванням численних підходів. Ці способи звичайно засновані на виявленні маркера або мітки, такої як будь-яка з радіоактивних, флуоресцентних, біологічних і ферментативних міток. Використання таких міток описане, наприклад, у патентах США №№ 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 і 4366241, кожен з яких включений у даний документ у вигляді посилання. Звичайно, як відомо в даній галузі техніки, можна знайти

додаткові переваги за рахунок використання вторинного зв'язування ліганду, такі як організація зв'язування лігандів із вторинними антитілами й/або біотином/авідином.

Антитіла до антиліганду, використовувані для виявлення, самі можуть бути зв'язані з виявлюваною міткою, яку потім можна було б просто виявити, у такий спосіб дозволяючи визначити кількість первинних імунних комплексів у композиції. В альтернативному варіанті перше антитіло, яке зв'язується з первинним імунним комплексом може бути виявлене за допомогою другого зв'язувального агента, який володіє зв'язувальною здатністю до антитіла. У цих випадках другий зв'язувальний агент може бути зв'язаний з виявлюваною міткою. Другий зв'язувальний агент сам часто є антитілом, яке, таким чином, може називатися "вторинним" антитілом або полімерною системою виявлення. Первинні імунні комплекси контактують із міченим вторинним зв'язувальним агентом або системою виявлення антитіло/полімер за відповідних умов і протягом періоду часу, достатнього для утворення вторинних імунних комплексів. Потім вторинні імунні комплекси звичайно піддають промиванню для видалення неспецифічно зв'язаних мічених вторинних антитіл або лігандів, а потім проводять детекцію міток, які залишилися на вторинних імунних комплексах.

Інші способи включають виявлення первинних імунних комплексів у два етапи. Другий зв'язувальний агент, такий як антитіло, що володіє зв'язувальною здатністю до антитіл, як описано вище, використовується для утворення вторинних імунних комплексів. Після промивання, вторинні імунні комплекси контактують із третім зв'язувальним агентом або антитілом, що володіє зв'язувальною здатністю із другим антитілом, за таких самих відповідних умов і протягом періоду часу, достатнього для утворення імунних комплексів (третинних імунних комплексів). Третій ліганд або антитіло зв'язане з виявлюваною міткою, що дозволяє виконувати виявлення третинних імунних комплексів у такий же спосіб. За необхідності дана система може забезпечити ампліфікацію сигналу.

В іншому варіанті втілення для виявлення цільового антигена(ів) використовуються біотинільовані моноклональні або поліклональні антитіла, а потім антитіло на другому етапі використовується для виявлення біотину, прикріпленого до біотинових комплексів. При використанні даного способу досліджуваний зразок спочатку інкубують у розчині, що включає антитіла для першого етапу. Якщо є присутнім антиген-мішень, деякі з антитіл зв'язуються з ним, щоб сформувати біотинільований комплекс антитіло/антиген. Потім комплекс антитіло/антиген ампліфікують шляхом інкубації в послідовних розчинах стрептавідину (або авідину), біотинільованих ДНК і/або комплементарних біотинільованих ДНК, з додаванням на кожному етапі додаткових біотинових сайтів до комплексу антитіло/антиген. Етапи ампліфікації повторюються, поки не буде досягнутий відповідний рівень ампліфікації, після чого зразок інкубують у розчині, що включає антитіла проти біотину для другого етапу. Це антитіло другого етапу мічене, наприклад, ферментом, який може бути використаний для виявлення присутності комплексу антитіло/антиген шляхом гістоензимології за допомогою хромогенного субстрату. При відповідній ампліфікації кон'югат зв'язування білків (наприклад, з антитілами) може проводитися до макроскопічної видимості.

Інший відомий спосіб імунодетекції використовує переваги методології імуно-ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції). Спосіб ПЛР використовує комплекс ДНК/біотин/стрептавідин/антитіло, що промивається буфером з низьким рН або з високим вмістом солі, що приводить до вивільнення антитіл. Потім результируючий промивний розчин використовують для проведення ПЛР-реакції з придатними праймерами під відповідним контролем. У конкретних варіантах втілення величезні можливості ампліфікації й специфічності ПЛР можуть бути використані для виявлення однієї молекули антигена. Таке виявлення може відбуватися в режимі реального часу. Наприклад, розглядається використання кількісної ПЛР реального часу.

Під час клінічної діагностики й/або моніторингу хворих з різними формами захворювання, виявлення FOLR1 мутанта й/або змінювання рівнів FOLR1 у порівнянні з рівнями у відповідній біологічній пробі нормального суб'єкта вказує на пацієнта із захворюванням. Однак, як відомо фахівцям у даній галузі техніки, клінічний діагноз не обов'язково може бути поставлений на основі тільки даного способу. Фахівцям у даній галузі техніки добре знайомі істотні відмінності в типах і/або кількості біомаркерів, які використовуються для позитивної ідентифікації й/або низького рівня і/або зміни фонового рівня біомаркерів. Дійсно, фонові рівні експресії часто використовуються, щоб сформувати рівень "відсікання", перевищення якого вважається як значуще й/або позитивне значення.

В одному варіанті втілення виявлення за допомогою імунологічних способів (імуногістохімії) FOLR1 оцінюється за інтенсивністю й рівномірністю (відсоток забарвлених клітин - тільки мембрани). Порівняльна шкала інтенсивності експресії FOLR1 встановлюється, як 0 - негативна

інтенсивність, 0-1 - дуже слабка, 1 - слабка, 1-2 - від слабкої до помірної, 2 - помірна, 2-3 - від помірної до сильної, 3 - сильна. Кількісно, оцінка 0 указує на те, що забарвлювання мембран пухлинних клітин не спостерігається. Оцінка 1 указує на слабе / ледь помітне забарвлювання мембран пухлинних клітин. Для оцінки 2 у пухлинних клітинах спостерігається помірне забарвлювання мембран. Нарешті, оцінка 3 або 3+ указує на ступінь забарвлювання мембран пухлинних клітин від помірної до сильної. Зразки з оцінкою експресії FOLR1 0 або 1 можуть бути охарактеризовані, як зразки без гіперекспресії FOLR1, тоді як зразки з 2 або 3 балами можуть бути охарактеризовані, як зразки з гіперекспресією FOLR1. Зразки з гіперекспресією FOLR1 також можуть бути класифіковані за допомогою імуногістохімічної оцінки, відповідної до числа копій молекули FOLR1, експресованих клітиною й визначених біохімічно: 0=0-10000 копій/клітину, 1 = щонайменше, близько 200000 копій/клітину, 2 = щонайменше, близько 500 000 копій/клітину й 3 = щонайменше, близько 2000000 копій/клітину. Порівняльні шкали для FOLR1 відсотків однорідності забарвлювання мембрани клітини корелює в такий спосіб: 0 - негативна, фокальна (осередкова) - <25 %, неоднорідна (гетеро) - 25-75 %, однорідна (гомо) - >75 %.

VI. Гібридизація нуклеїнових кислот

In situ гібридизацію звичайно проводять на клітинах або зрізах тканини, закріплених на стеклах. In situ гібридизація може бути виконана згідно з декількома стандартними методикам (див., наприклад, Leitch et al. In situ Hybridization: a practical guide, Oxford BIOS Scientific Publishers, Microscopy handbooks v. 27 (1994)). В одній in situ процедурі флуоресцентні барвники (такі як флуоресцеїну ізотіоціанат (FITC), який флуоресцює зеленим світінням при збудженні аргонним іонним лазером) використовуються для позначення зонда у вигляді послідовності нуклеїнової кислоти, комплементарної нуклеотидної послідовності-мішені в клітині. Кожна клітина, що включає нуклеотидну послідовність-мішень зв'язується міченим зондом, що виробляє флуоресцентний сигнал при дії на клітини джерела світла з довжиною хвилі, що підходить для порушення специфічних флуорохромів, використовуваних у зонді.

Можуть бути використані різні ступені гібридизації. З підвищенням точності умов гібридизації підвищується необхідний ступінь комплементарності між зондом і мішенню для формування й підтримки стабільного дуплексного зв'язку. Точність умов збільшується при підвищенні температури, зниженні концентрації солі або збільшенні концентрації формаміду. Додавання сульфату декстрану або підвищення його концентрації також може збільшити ефективну концентрацію міченого зонда, що збільшить швидкість гібридизації й інтенсивність кінцевого сигналу. Після гібридизації стекла промивають у розчині, що звичайно включає реагенти, подібні із застосовуваними в розчині для гібридизації, з часом промивання від декількох хвилин до декількох годин, залежно від необхідної точності. Більш тривалі або більш точні промивання звичайно знижують неспецифічні фонові впливи, але при цьому існує ризик зниження загальної чутливості.

Зонди, використовувані в аналізі гібридизації нуклеїнових кислот можуть бути РНК або ДНК олігонуклеотидами або полінуклеотидами й можуть включати не тільки природні нуклеотиди, але і їх аналоги, такі як, наприклад, дигоксигенін дЦТФ, біотин дЦТФ 7-азагуанозин, азидотимідин, інозин або уридин. Інші придатні зонди включають, наприклад, пептидні зонди і їх аналоги, розгалужені ДНК-зонди, пептидометики, пептидні нуклеїнові кислоти (ПНК) і/або антитіла.

Необхідно, щоб зонди володіли достатньою комплементарністю із цільовою послідовністю нуклеїнових кислот, що являє інтерес, щоб забезпечити стабільне й специфічне зв'язування між цільовою послідовністю нуклеїнових кислот і зондом. Ступінь гомології, необхідна для стабільної гібридизації, залежить від точності середовища гібридизації й/або промивного середовища. У даному винаході кращим є використання повністю гомологічних зондів, але фахівцям у даній галузі техніки буде зрозуміло, що зонди, які демонструють меншу, але достатню гомологію також можуть бути використані в даному винаході (див., наприклад, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)).

Зонди також можуть бути утворені й вибрані декількома способами, включаючи, але не обмежуючись цим, відображення за допомогою гібридизації in situ, панелі гібридних соматичних клітин або спот-блота відсортованих хромосом; аналіз хромосомальних зв'язків; або клонування й виділення з відсортованих хромосомних бібліотек клітинних ліній людини або гібридів соматичних клітин з людськими хромосомами, радіаційних гібридів соматичних клітин, мікродисекцією хромосомних регіонів або штучних хромосом дріжджів (YACs), виявлюваних за допомогою ПЛР із праймерами, специфічними до унікальних локусів хромосом або іншого придатного засобу, такого як сусідні YAC-клони. Зонди можуть являти собою геномну ДНК, кДНК або РНК, клоновану в плазміді, фаги, косміди, YAC, бактеріальні штучні хромосоми

(BAC), вірусні або будь-які інші придатні вектори. Зонди можуть бути клоновані або синтезовані хімічним шляхом звичайними способами. У випадку клонування, виділені як зонд фрагменти нуклеїнової кислоти звичайно вбудовуються у вектор, такий як лямбда фаг, pBR322, M13, або вектори, що включають SP6 або T7 промотор і клоновані у вигляді бібліотеки в бактерії-хазяїні. [Див., наприклад, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)].

Зонди краще помітити, наприклад, за допомогою флуорофорів. Приклади флуорофорів, включають, але не обмежуються ними, хелати рідкісноземельних металів (хелати європію), Texas Red, родамін, флуоресцеїн, дансил, лісамін, умбеліферон, фікоеритрин, фікоціанін або комерційно доступні флуорофори, такі, як SPECTRUM ORANGE™ і SPECTRUM GREEN™ і/або похідні будь-якого одного або більше з перерахованих вище. Декілька зондів, використовуваних для аналізу, можуть бути помічені більше, ніж одним розпізнаваним флуоресцентним або пігментним кольором. Ці відмінності кольору забезпечують засоби для ідентифікації позицій гібридизації специфічних зондів. Крім того, зонди, які не розділені просторово, можна ідентифікувати за різними кольорами світіння або пігментами у результаті змішування двох інших кольорів (наприклад, ясно-червоний + зелений = жовтий) пігмент (наприклад, синій + жовтий = зелений) або за допомогою набору фільтрів, які пропускають світло тільки одного кольорного відтінку.

Зонди можна мітити прямо або непрямо за допомогою флуорофору шляхом звичайної методології, відомої фахівцям у даній галузі техніки.

VII. Набори й композиції для виявлення

Крім того, у винаході передбачені набори для використання в практиці даного винаходу, як описано в даному документі. Такі набори можуть включати контейнери, кожний з яких включає один або більше різних реагентів (звичайно в концентрованій формі), використовуваних у способах, у тому числі, наприклад, один або декілька зв'язувальних агентів (антитіла), які вже прикріплені до маркера або, необов'язково, реагенти для з'єднання зв'язувального агента з антитілом або молекулою нуклеїнової кислоти (також, як і сам маркер); буферні розчини відповідних нуклеотидних трифосфатів (наприклад, дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ, дУТФ, АТФ, СТР, ГТР і УТР), зворотну транскриптазу, ДНК-полімераза, РНК-полімераза, один або більше специфічний до послідовностей або вироджений праймер, використовуваний для детекції молекул нуклеїнових кислот шляхом ампліфікації; і/або реагенти й обладнання для виділення (необов'язково шляхом мікродиссекції) для підтримки практичного здійснення винаходу. Також до набору звичайно включають опис мітки або індикатора, набір інструкцій для використання компонентів набору в способі виявлення ліганд згідно з даним винаходом, де інструкції можуть бути розміщені на вкладиші й/або в упакуванні набору або його компонентів.

В інших варіантах втілення даний винахід належить до наборів для імунодетекції для використання з імунологічними способами, описаними вище. Як антитіла для виявлення білків дикого типу й/або мутантних білків, поліпептидів і/або пептидів, як правило, використовуються антитіла, краще включені в комплект. Імунологічні набори, таким чином, містять у відповідних контейнерах перше антитіло, яке зв'язується з білком дикого типу й/або мутантним білком, поліпептидом і/або пептидом і/або, необов'язково, імунологічний реагент, і/або крім того, необов'язково, білок дикого типу й/або мутантний білок, поліпептид і/або пептид.

Реагенти, що входять до складу імунологічного набору можуть приймати будь-яку форму, у тому числі виявлюваних міток, які об'єднані й/або зв'язані з даним антитілом. Розглядаються також виявлювані мітки, які об'єднані й/або приєднані до вторинного зв'язаного ліганду. Прикладами вторинних лігандів є вторинні антитіла або полімери, що мають спорідненість до першого антитіла.

Інші придатні імунологічні реагенти для використання в даному наборі включають двокомпонентні реагенти, які включають вторинне антитіло, що володіє зв'язувальною здатністю до першого антитіла, разом із третім антитілом або полімером, що володіє зв'язувальною здатністю до другого антитіла. Третє антитіло зв'язане з виявлюваною міткою. Як відзначалося вище, у даній галузі техніки відомий ряд типових міток і/або всі вони можуть бути відповідним чином використані в даному винаході.

Набори можуть також містити відповідні аліквотовані композиції білків дикого типу й/або мутантних білків, поліпептиди й/або мічені й/або немічені поліпептиди, які можуть бути використані для одержання стандартної кривої для аналізу виявлення. Набори можуть містити кон'югати з антитіло- або полімерними мітками, або в повністю кон'югованій формі, у вигляді проміжних сполук і/або у вигляді окремих фрагментів для кон'югування користувачем набору. Компоненти наборів можуть бути поміщені у водне середовище й/або знаходитись у ліофілізованій формі.

Контейнер, що містить комплект, звичайно включає, щонайменше, один флакон, пробірку, колбу, посудину, шприц й/або інші ємності, у які можуть бути поміщені антитіла, і/або краще, відповідним чином розділені на аліквоти. Набори згідно з даним винаходом також звичайно включають ємність, що містить антитіла, антигени й/або будь-які інші контейнери з реагентами в щільно закритому упакуванні для комерційного продажу. Такі контейнери можуть включати пристрої для ін'єкцій і/або пластикові контейнери видувного формування, у яких зберігаються необхідні флакони.

Набори можуть також включати один або більше терапевтичних агентів для лікування раку, таких як FOLR1 імунокон'югат і/або хіміотерапевтичний засіб.

Набір може додатково включати реагент для виявлення FOLR1, використовуваний для вимірювання рівня експресії FOLR1 у суб'єкта, куди входить реагент для виявлення FOLR1 і інструкція із застосування. В одному варіанті втілення реагент для виявлення FOLR1 включає FOLR1 зв'язувальний пептид, білок або молекулярний зонд (наприклад, нуклеїнову кислоту). В іншому варіанті втілення реагент для виявлення FOLR1 являє собою анти-FOLR1 антитіло. В іншому варіанті втілення набір додатково включає вторинне антитіло, яке зв'язується з анти-FOLR1 антитілом. В одному варіанті втілення використовуються специфічні антитіла FOLR1 в концентрації від 0,5 до 7,5 мкг/мл, краще від 0,9 до 3,8 +/- 0,5 мкг/мл. В іншому варіанті втілення використовуються антитіла в концентрації 1,0 +/- 0,5 мкг/мл, 1,5 +/- 0,5 мкг/мл, 1,9 +/- 0,5 мкг/мл, 2,5 +/- 0,5 мкг/мл, 3,0 +/- 0,5 мкг/мл, 3,5 +/- 0,5 мкг/мл, 3,8 +/- 0,5 мкг/мл або до 4,2 мкг/мл. В іншому варіанті втілення антитіло використовується в концентрованому розчині з інструкціями для розведення для досягнення кінцевої концентрації від 0,9 до 3,8 +/- 0,5 мкг/мл. В іншому варіанті втілення винаходу набір додатково включає реагент для виявлення, вибраний із групи, що складається з ферменту, флуорофора, радіоактивної мітки й люмінофора. В іншому варіанті втілення реагент для виявлення вибраний із групи, що складається з біотину, дигоксигеніну, флуоресцеїну, тритію й родаміну.

Набір також може включати інструкції для виявлення й оцінки експресії FOLR1. Набір також може включати контрольні або еталонні зразки. Необмежуючі приклади контрольних або еталонних зразків включають конгломерати клітин або клітинних ліній тканинної культури, одержані зі зразків нормальної тканини (нормальний контроль) або тканини пухлини (позитивний контроль). Приклади клітинних ліній включають KB, NCI-H2110, Igrov-1, Ishikawa, Jeg-3, Skov-3, Hela, T47D, Caco2, SW620, OAW28, HCC827, Ovcар-8 і Ovcар-3, Ov-90, інші лінії пухлинних клітин з відомою експресією FOLR1, і клітинні лінії, які постійно або тимчасово трансфіковані вектором експресії, що експресує FOLR1. Додаткові приклади тканин для позитивного контролю наведені в прикладах 9-11. Набір може також містити посібник з забарвлювання, де візуально зображені позитивні й нормальні еталонні зразки інтенсивності й однорідності забарвлювання. Такі посібники з забарвлювання можуть містити еталонні зразки нормальної легені, підшлункової залози й/або слинної залози й забарвлені пухлинні тканини з уніфікованими оцінками (наприклад, тканини пухлини яєчників, легенів, нирок і ендометрію, як описано в прикладах і продемонстровано на Фіг. 23-25)

VIII. FOLR1 зв'язувальні агенти

Будь-які антитіла, що зв'язують FOLR1 можуть бути використані для способів виявлення в даному винаході. Приклади терапевтично ефективних анти-FOLR1 антитіл можна знайти в заявці на патент США № 2012/0009181, включеній в даний документ за допомогою посилання. Повнорозмірна амінокислотна (aa) і нуклеотидна (nt) послідовності для FOLR1 відомі в цій галузі техніки й представлені в даному документі у вигляді SEQ ID №№ 1 і 2 відповідно. Особливо ефективним антитілом для виявлення FOLR1 є мишаче моноклональне антитіло анти-huFOLR1, клон BN3.2 (Leica # NCL-L-FRalpha). Прикладом терапевтично ефективного анти-FOLR1 антитіла є huMov19 (M9346A). Поліпептидні послідовності SEQ ID №№: 3-5 включають варіабельний домен важкого ланцюга huMov19 (M9346A), варіабельний домен легкого ланцюга версії 1.00 і варіабельний домен легкого ланцюга, версія 1.60 для huMov19 відповідно. У деяких варіантах втілення huMov19 (M9346A) антитіла, які кодуються плазмідами, депоновані в Американській колекції типових культур (ATCC), розташованій за адресою: 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 від 7 квітня 2010 р. відповідно до умов Будапештського договору, і мають ATCC депозитні номери PTA-10772 і PTA-10773 або 10774. Приклади FOLR1 імунокон'югатів, використовуваних у терапевтичних способах згідно з винаходом наведені нижче.

IX. FOLR1 імунокон'югати

Даний винахід також належить до способів підвищення ефективності кон'югатів (які також згадуються в даному документі як імунокон'югати), що включають анти-FOLR1 антитіла, фрагменти антитіл, функціональні еквіваленти, покращені антитіла і їх аспекти, як описано в

даному документі, зв'язані або кон'юговані з цитотоксином (лікарським засобом) або пролікарським засобом. Приклади імунокон'югатів FOLR1 можна знайти в заявці на патент США № 2012/0009181, включеній в даний документ за допомогою посилання. Зокрема, ефективні терапевтичні імунокон'югати, згідно з винаходом, включають антитіло huMov19, описане вище.

Придатні лікарські засоби або пролікарські засоби добре відомі фахівцям у даній галузі техніки. У деяких варіантах втілення ліки або пролікарські засоби є цитотоксичними агентами. Цитотоксичний агент, використовуваний у складі цитотоксичного кон'югата згідно з даним винаходом може бути будь-якою сполукою, яка призводить до загибелі клітини, або індукує загибель клітин, або в будь-який спосіб зменшує життєздатність клітин і включає, наприклад, майтансиноїди і їх аналоги, бензодіазепіни, таксоїди, CC-1065 і аналоги CC-1065, дуокарміцини і їх аналоги, енедійни, наприклад каліхеаміцини, доластатин і його аналоги, включаючи ауристатини, похідні томайміцину, похідні лептоміцину, метотрексат, цисплатин, карбоплатин, даунорубіцин, доксорубіцин, вінкрисдин, вінбластин, мельфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил і морфолінодоксорубіцин. У деяких варіантах втілення цитостатичні агенти являють собою майтансиноїди й аналоги майтансиноїдів.

Лікарський засіб або пролікарський засіб може бути зв'язаний, наприклад, з анти-FOLR1 антитілом, таким як huMov19 або його фрагментом за допомогою дисульфідного зв'язку. Лінкерна молекула або зшиваючий агент включає реакційноздатну групу хімічних речовин, які можуть реагувати з анти-FOLR1 антитілом або його фрагментом. У деяких варіантах втілення реакційноздатними групами хімічних речовин, здатними реагувати із клітинно-зв'язувальним агентом є N-сукцинімідиллові естери й N-сульфосукцинімідиллові естери. Крім того, лінкерна молекула включає реакційноздатну групу хімічних речовин, у деяких варіантах втілення дитіопіридилъну групу, яка може реагувати з лікарським засобом з утворенням дисульфідного зв'язку. У конкретних варіантах втілення лінкерні молекули включають, наприклад, N-сукцинімідил 3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP) (див., наприклад, Carlsson et al., Biochem. J., 173: 723-737 (1978)), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)бутаноат (SPDB) (див., наприклад, патент США № 4563304), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо) 2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB) (див. публікацію США № 20090274713), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо) пентаноат (SPP) (див., наприклад, реєстраційний номер CAS 341498-08-6), 2-імінотіолан або ангідрид ацетилбурштинової кислоти.

Також можуть бути одержані кон'югати антитіло-майтансиноїд з нерозщеплюваними зв'язками. Такі зшиваючі агенти описані в даній галузі техніки (див. Thermoscientific Pierce Crosslinking Technical Handbook і заявку на патент США № 2005/0169933), і включають, але не обмежуються ними, N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил) циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроат), який є "довголанцюговим" аналогом SMCC (LC-SMCC), к-малеїмідоундеканової кислоти N-сукцинімідилловий естер (KMUA), β-малеїмідопропіонової кислоти N-сукцинімідилловий естер (BMPS), γ-малеїмідомасляної кислоти N-сукцинімідилловий естер (GMBS), ε-малеїмідокпронової кислоти N-гідроксисукцинімідовий естер (EMCS), m-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідовий естер (MBS), N-(α-малеїмідоацетокси)-сукцинімідовий естер (AMAS), сукцинімідил-6-β-малеїмідопропіонамідо)гексаноат (SMPH), N-сукцинімідил-4-(p-малеїмідофеніл)-бутират (SMPB) і N-(p-малеїмідофеніл)ізоціанат (PMPI), N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоат (SIAB), N-сукцинімідилйодацетат (SIA), N-сукцинімідилбромацетат (SBA) і N-сукцинімідил 3-(бромацетамідо)пропіонат (SBAP). У деяких варіантах втілення антитіло модифікують за допомогою зшиваючих реагентів, таких як сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сульфо-SMCC, малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімід (MBS), сульфо-MBS або сукцинімідилйодацетат, як описано в літературі, внесенням від 1 до 10 реакційноздатних груп (Yoshitake et al., Eur. J. Biochem., 101:395-399 (1979); Hashida et al., J. Applied Biochem., 56-63 (1984); and Liu et al., Biochem., 18:690-697 (1979)).

Даний винахід включає аспекти, у яких від приблизно 2 до приблизно 8 молекул лікарського засобу ("лікарське навантаження"), наприклад, мایتансиноїду, зв'язані з анти-FOLR1 антитілом або його фрагментом. Протипухлинний ефект такого кон'югата є набагато більш ефективним у порівнянні з лікарським навантаженням більшим або меншим числом препаратів, зв'язаних з тим самим клітинно-зв'язувальним агентом. Поняття "лікарське навантаження", при використанні в даному документі, належить до кількості молекул лікарського засобу (наприклад, мایتансиноїду), які можуть бути прикріплені до клітинно-зв'язувального агента (наприклад, до анти-FOLR1 антитіла або його фрагмента). В одному аспекті кількість молекул лікарського засобу, які можуть бути прикріплені до клітинно-зв'язувального агента може становити в середньому від приблизно 2 до приблизно 8 (наприклад, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0,

5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1). У деяких варіантах втілення лікарським засобом є N²-деацетил-N²-(3-меркапто-1-оксипропіл)-майтансин (DM1) або N²-деацетил-N²-(4-меркапто-4-метил-1-оксипентил) мایتансин (DM4). Таким чином, у конкретному варіанті втілення антитіло huMov19 кон'юговано з DM1 або DM4. В іншому варіанті втілення антитіло FR-1-21 кон'юговано з DM1 або DM4. В іншому варіанті втілення антитіло FR-1-48 кон'юговано з DM1 або DM4. В іншому варіанті втілення антитіло FR-1-49 кон'юговано з DM1 або DM4. В іншому варіанті втілення антитіло FR-1-57 кон'юговано з DM1 або DM4. В іншому варіанті втілення антитіло FR-1-65 кон'юговано з DM1 або DM4.

Х. Кореляція між експресією FOLR1 і терапевтичною ефективністю

У деяких варіантах втілення винахід належить до способу ідентифікації суб'єктів з підвищеною ймовірністю відповіді на FOLR1-таргетну протиракову терапію. Даний винахід частково заснований на відкритті, що полягає в тому, що підвищені рівні експресії FOLR1 корелюють з ефективністю FOLR1-таргетної протиракової терапії.

Оцінка зразків тканин, одержаних від пацієнтів і кореляція ефективності при використанні in vivo моделей ксенотрансплантатів демонструє ефективність аналізу експресії для вибору суб'єктів з підвищеною ймовірністю відповіді на лікування. ІГХ забезпечує оцінку експресії FOLR1 на пухлинних клітинах: від 0 (експресія відсутня) до 3+ (дуже високі рівні експресії). Дані досліджень in vivo за допомогою моделей ксенотрансплантатів демонструють, що зразки тканин з оцінкою 1, 2, 3 або 3+ для експресії FOLR1, краще з оцінкою 2, 3 або 3+, мають підвищену ймовірність реакції на FOLR1-таргетну протиракову терапію клінічно значущими дозами FOLR1 імункон'югатів (наприклад, доза імункон'югата FOLR1 5 мг/кг для ксенотрансплантата буде дорівнювати приблизно 185 мг/м² для пацієнтів). Таким чином, виявлення осіб з підвищеною оцінкою FOLR1 допоможе визначити пацієнтів, що можуть реагувати на клінічно значущі дози. Як описано більш докладно нижче, сприйнятливість FOLR1 терапії корелює з оцінкою FOLR1, що дорівнює 2 або вище, особливо з оцінкою 3. Крім того, більш рівномірні рівні експресії FOLR1 забезпечують кращу кореляцію з терапевтичним ефектом. Таким чином, гомогенність (однорідність) забарвлювання є кращою, але комбінації підвищеної інтенсивності з неоднорідністю забарвлювання також свідчать про підвищену експресію FOLR1. Наприклад, оцінка більше 2 з неоднорідним забарвлюванням є критерієм відбору пацієнта для лікування за допомогою FOLR1 терапевтичного агента.

Аналіз експресії FOLR1 також ідентифікує пацієнтів, у яких знижені дози FOLR1-таргетної протиракової терапії ("терапія низькою дозою") можуть бути ефективними для одержання протипухлинної відповіді. Як було оцінено на практиці, сполуки звичайно вводять у найменшій дозі, яка достатня для досягнення бажаного терапевтичного ефекту. Це особливо важливо для терапії, що викликає клінічні й часто небажані побічні ефекти. Здатність розпізнавати пацієнтів з підвищеним рівнем експресії FOLR1 дозволяє мінімізувати дози FOLR1-таргетної терапії, у такий спосіб зменшуючи можливі побічні ефекти при збереженні терапевтичної ефективності.

Як показано в даному документі, оцінка експресії FOLR1 2 або більше з неоднорідним забарвлюванням, корелює з підвищеною чутливістю до анти-FOLR1 імункон'югатів. У деяких варіантах втілення спостерігається збільшення реактивності кахексії, збільшення тривалості життя, подовження часу до прогресування, зменшення маси пухлини, зниження пухлинної маси й/або продовження часу до метастазування пухлини, часу до виникнення рецидиву пухлини, відповідь пухлини на лікування, повна відповідь, часткова відповідь, стабілізація захворювання, прогресування захворювання, збільшення виживаності без прогресування (ВБП) або загальної виживаності (ЗВ). У деяких варіантах втілення експресія FOLR1 2 або більше із неоднорідним забарвлюванням, корелює зі збільшенням ВБП, ВПЗ або ЗВ.

Набори для використання в способах виявлення й кореляції з еталонними/контрольними зразками можуть включати контрольні (для позитивного й/або негативного контролю) або еталонні зразки. Зразки для позитивного контролю або позитивні еталонні зразки можуть бути одержані із клітинних ліній культури тканин, зразків нормальних тканин або пухлинних тканин. Позитивні й негативні еталонні зразки можуть бути одержані із клітинних ліній, включаючи SW620, T47D, IGROV-1, HeLa, KB, JEG-3, інших пухлинних клітинних ліній і клітинних ліній постійно або тимчасово трансфікованих вектором експресії, що кодує FOLR1. Зразки нормальної або пухлинної тканини й клітинні лінії культури тканин також можуть бути використані як еталонні зразки для негативного контролю. Для інформації про додаткові зразки, див. приклади 9-11 і Фігури 23-25.

ХІ. Фармацевтичні композиції й терапевтичні способи

FOLR1-зв'язувальні агенти (включаючи антитіла, імункон'югати й поліпептиди) придатні для використання в різних галузях застосування, включаючи, але не обмежуючись цим,

терапевтичні способи лікування, наприклад, при лікуванні раку. У деяких варіантах втілення агенти використовуються для інгібування росту пухлини, індукування диференціації, зменшення об'єму пухлини й/або зниження онкогенності пухлини. Способи застосування можуть бути *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*. У деяких варіантах втілення FOLR1-зв'язувальний агент, або антитіло, або імунокон'югат або поліпептид являє собою антагоніст людського FOLR1, з яким він зв'язується.

У деяких варіантах втілення захворювання, лікування якого виконується за допомогою FOLR1-зв'язувального агента або антагоніста (наприклад, huMov19 антитіла або імунокон'югата) являє собою рак. У деяких варіантах втілення рак характеризується пухлиною, що експресує рецептор фолату 1, з яким зв'язується FOLR1-зв'язувальний агент (наприклад, антитіло).

Даний винахід належить до способів лікування раку, які включають введення терапевтично ефективної кількості FOLR1-зв'язувального агента суб'єкту (наприклад, пацієнту, що потребує лікування). У деяких варіантах втілення рак являє собою рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак легенів, рак яєчників, рак печінки, рак молочної залози, рак мозку, рак нирок, рак передміхурової залози, рак шлунково-кишкового тракту, меланому, рак шийки матки, рак сечового міхура, гліобластому й рак голови й шиї. У деяких варіантах втілення рак являє собою рак яєчників. У деяких варіантах втілення рак являє собою рак легенів. У деяких варіантах втілення суб'єктом є людина.

Даний винахід також належить до способів інгібування росту пухлини за допомогою антитіл або інших агентів, описаних у даному документі. У деяких варіантах втілення спосіб інгібування росту пухлини включає контактування клітини з FOLR1-зв'язувальним агентом (наприклад, антитілом) *in vitro*. Наприклад, іморталізовану лінію клітин або лінію клітин раку, що експресують FOLR1 культивують у середовищі, в яке додані антитіла або інші агенти для інгібування росту пухлини. У деяких варіантах втілення пухлинні клітини виділяють зі зразка тканини пацієнта, такого як, наприклад, біоптат тканини, плевральний випіт або проба крові й культивують у середовищі, в яке доданий FOLR1-зв'язувальний агент для інгібування росту пухлини.

У деяких варіантах втілення спосіб інгібування росту пухлини включає контактування пухлини або пухлинних клітин з FOLR1-зв'язувальним агентом (наприклад, антитілом) *in vivo*. У деяких варіантах втілення контактування пухлини або пухлинних клітин з FOLR1-зв'язувальним агентом здійснюється на тваринній моделі. Наприклад, FOLR1-зв'язувальні агенти можуть бути введені ксенотрансплантатам, що експресують один або більше FOLR1, які були вирощені в організмах імунологічно скомпрометованих мишей (наприклад NOD/SCID мишей) для інгібування росту пухлини. У деяких варіантах втілення FOLR1-зв'язувальний агент вводять одночасно або невдовзі після введення онкогенних клітин в організм тварини, щоб запобігти росту пухлини. У деяких варіантах втілення FOLR1-зв'язувальний агент вводять як терапевтичний після росту онкогенних клітин до заданого розміру.

У деяких варіантах втілення спосіб інгібування росту пухлини включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості FOLR1-зв'язувального агента. У деяких варіантах втілення суб'єктом є людина. У деяких варіантах втілення суб'єкт має пухлину або пухлина була видалена.

У деяких варіантах втілення пухлина являє собою пухлину мозку, пухлину товстої кишки, пухлину підшлункової залози, пухлину легенів, пухлину яєчників, пухлину печінки, пухлину молочної залози, пухлину нирок, пухлину передміхурової залози, пухлину шлунково-кишкового тракту, меланому, пухлину шийки матки, пухлину сечового міхура, гліобластому, пухлину голови й шиї. У деяких варіантах втілення пухлина являє собою пухлину яєчників.

У деяких варіантах втілення винахід належить до способів інгібування росту пухлини за допомогою низьких доз FOLR1-зв'язувального агента. Термін "низька доза", використовуваний у даному документі, належить до терапевтично ефективної дози FOLR1-зв'язувального агента, яка є меншою, ніж звичайна або стандартна доза, необхідна для одержання терапевтичного ефекту.

Таким чином, у деяких варіантах втілення винахід належить до способів лікування раку за допомогою huMov19 антитіл і імунокон'югатів. У деяких варіантах втілення імунокон'югатами huMov19 є huMov19-SPDB-DM4; huMov19-sulfo-SPP-DM1; huMov19-SPP-DM1, або huMov19-PEG4-Ma1-DM4. У конкретному варіанті втілення імунокон'югатом huMov19 є huMov19-SPDB-DM4, який також називають IMG853.

У деяких варіантах втілення композиції створюються для зберігання й використання шляхом об'єднання очищеного антитіла або агента згідно з даним винаходом з фармацевтично прийнятним носієм (наприклад, носієм, наповнювачем) (Remington, The Science and Practice of

Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). Придатні фармацевтично прийнятні носії включають, але не обмежуються ними, нетоксичні буфери, такі як фосфатний, цитратний і інші органічні кислоти; солі, такі як хлорид натрію, антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту й метіонін; консерванти (наприклад октадецилдиметилбензиламонію хлорид; гексаметонію хлорид; бензалконію хлорид; бензетонію хлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин, циклогексанол, 3-пентанол і м-крезол); низькомолекулярні поліпептиди (наприклад такі, що містять менше ніж приблизно 10 амінокислотних залишків), білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон, амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; вуглеводи, такі як моносахариди, дисахариди, глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, Zn-протеїнові комплекси) і неіонні поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN або поліетиленгліколь (ПЕГ).

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можуть бути введені будь-якою кількістю способів для місцевої або системної терапії. Способи введення можуть бути місцевими (наприклад, на слизові оболонки, включаючи вагінальне й ректальне введення), використовуючи трансдермальні пластири, мазі, лосьйони, креми, гелі, краплі, супозиторії, спреї, рідини й порошки, легеневи (наприклад, шляхом інгаляції або інсуфляції порошоків або аерозолів, у тому числі за допомогою небулайзера; інтратрахеальним, інтраназальним, трансдермальним і епідермальним способом), пероральними або парентеральними, включаючи внутрішньовенні, внутрішньоартеріальні, підшкірні, внутрішньоочеревинні або внутрішньом'язові ін'єкції або інфузії, або внутрішньочерепними (наприклад, інтратекальне або внутрішньошлуночкове введення).

Антитіло або імунокон'югат згідно з винаходом можуть бути об'єднані в комбіновану фармацевтичну композицію або в режимі дозування як комбінована терапія, із другою сполукою, що володіє протираковими властивостями. Друга сполука комбінованої фармацевтичної композиції або режиму дозування краще має додатковий вплив на навантажене лікарським засобом антитіло (ADC) комбінації так, що вони не виявляють негативного впливу один на одного. Також використовуються фармацевтичні композиції, що включають FOLR1-зв'язувальний агент і другий протираковий засіб.

Для лікування захворювання придатна доза антитіла або агента згідно з даним винаходом залежить від типу захворювання, що підлягає лікуванню, тяжкості й перебігу захворювання, чутливості захворювання до лікування, терапевтичних або профілактичних цілей введення антитіла або агента, попередньої терапії, анамнезу пацієнта тощо на розсуд лікаря. Антитіло або агент можна вводити однократно або в серії процедур тривалістю від декількох днів до декількох місяців, або поки не проявиться терапевтичний ефект або зменшиться хворобливий стан (наприклад, зменшиться розмір пухлини). Оптимальна схема введення може бути розрахована, виходячи з вимірювання накопичення лікарського засобу в організмі пацієнта й буде залежати від відносної ефективності антитіла або агента. Лікар може легко визначити оптимальні дози, методологію дозування й частоту введення. У деяких варіантах втілення доза становить від 0,01 мкг до 100 мг на кг маси тіла, і може вводитися один або декілька разів щодня, щотижня, щомісяця або щорічно. У деяких варіантах втілення антитіло або інший FOLR1-зв'язувальний агент вводиться один раз кожні два тижні або один раз кожні три тижні. У деяких варіантах втілення дозування антитіла або іншого FOLR1-зв'язувального агента становить від приблизно 0,1 мг до приблизно 20 мг на кг маси тіла. Лікар може оцінити частоту введення для дози на основі вимірюного часу утримування й концентрації препарату в рідинах або тканинах тіла.

Комбінована терапія може забезпечити "синергізм" і показати "синергетичний ефект", тобто ефект, що полягає в тому, що використання разом активних інгредієнтів дає ефект більший, ніж сума ефектів при використанні сполук окремо. Синергетичний ефект можна досягти тоді, коли активні інгредієнти є: (1) спільно складеними й введенними одночасно в комбінованій лікарській формі однією дозою, (2) введенними по черзі або одночасно у вигляді окремих композицій, або (3) в іншому режимі. При почерговому введенні в почерговій терапії, синергетичний ефект може бути досягнутий при послідовному введенні сполук, наприклад, шляхом ін'єкцій у окремих шприцах. Загалом, при почерговій терапії ефективну дозу кожного активного інгредієнта вводять по черзі, тобто послідовно, тоді як при комбінованій терапії ефективні дози двох або більшої кількості активних інгредієнтів вводять разом.

Варіанти втілення даного винаходу можуть бути додатково визначені за допомогою посилання на наступні не обмежуючі приклади, які докладно описують одержання деяких антитіл згідно з даним винаходом й способи використання антитіл згідно з даним винаходом.

Фахівцям у даній галузі техніки буде очевидним те, що багато модифікацій як матеріалів, так і способів можуть бути здійснені без відхилення від галузі застосування даного винаходу.

ПРИКЛАДИ

Необхідно пам'ятати, що приклади й варіанти втілення описані в даному документі тільки в демонстративних цілях і що різні модифікації або зміни з їх урахуванням будуть запропоновані фахівцям у даній галузі техніки й повинні бути включені в сутність і об'єм даного додатка.

Високі рівні експресії рецептора фолату 1 (FOLR1) спостерігаються в пухлинах яєчників, рівні експресії від високих до помірних - у пухлинах мозку, молочної залози, сечового міхура, ендометрія, легенів, підшлункової залози й карциноми нирок. З іншого боку, у нормальних тканинах, до яких належать тканини нирок, легенів, хороїдного сплетіння, підшлункової залози, молочної залози, щитоподібної залози, яєчників, передміхурової залози й легенів, експресія FOLR1 обмежена.

У способах кількісної оцінки FOLR1 використовуються гомогенати свіжозамороженої тканини. У гомогенатах повного об'єму тканини неможливо відрізнити цитоплазматичну експресію від мембран-асоційованої експресії, тому свіжозаморожені зразки не піддаються дослідженню в клінічних умовах. Проте, зразки, фіксовані у формаліні й залиті парафіном (ФФЗП) за бажанням пацієнта можуть бути збережені в клініці для подальших досліджень.

Приклад 1

Імуногістохімічне забарвлювання FOLR1 клітинних зразків - ручні способи забарвлювання. Фіксовані формаліном і залиті парафіном конгломерати клітин і тканин використовувалися як зразки з наступними забарвлюючими реагентами й за наступних умов.

ІГХ Антитіла	Умови аналізу ФФЗП	
Досліджувані препарат:	Етапи	Умови
■ моноклональні мишачі антитіла	Пошуки антигена	Borg (Biocare)
huFOLR1 клон BN3.2		pH 9,0
(Leica # NCL-L-FRalpha)	Етапи блокування	Авідин/Біотин;
		пероксид
	Тестовий або	2,0 мкг/мл
Immunogen: Прокаріотичний	контрольний	
рекомбінантний білок відповідає 189	препарат	
амінокислотам зовнішнього домену	Розчинник	ФСБ, що містить 2 %
альфа-молекули рецептора фолату.		сироватки коня
Контрольний препарат:		
■ mulgG1 (Coulter) клон, Cat# 6602872	Вторинне антитіло	10 мкг/мл
Вторинне антитіло	Система	Комплекс авідин-біотин-
■ Біотинільоване кінське антимишаче	виявлення*	пероксидаза; ABC (Vector
(Vector, Cat#PK-6100)		Labs)
	Хромаген	ДАБ (Dako)
	Час прояву ДАБ	≥5 хв.

Зафіксовані у формаліні й залиті парафіном (ФФЗП) біоптати пухлини яєчників пацієнта й ксенотрансплантатну пухлину яєчників забарвлювали мишачими анти-FOLR1 антитілами клону BN3.2, (Leica, Cat # NCL-L-FRalpha), як контроль використовували mulgG1 вир-ва Coulter. Після демаскування антигена буфером із рівнем pH 9,5, стекла блокували 2 % кінською сироваткою в комбінації з авідином. Стекла промивали ФСБ і інкубували за кімнатної температури протягом 60 хвилин з анти-FOLR1 або контрольним mulgG1 антитілом, а потім 30 хвилин з біотинільованим анти-мишачим IgG і 40 хвилин з комплексом авідин-біотин-пероксидаза для виявлення зв'язаного вторинного антитіла. Інкубація протягом 5 хвилин з ДАБ (3,3-діамінобензидин тетрагідроклоридом) привела до появи колірного сигналу. Стекла піддавали контрастному забарвлюванню гематоксиліном.

Інтенсивність і картина розподілення забарвлювання FOLR1 були оцінені в порівнянні з контрольним забарвлюванням IgG (неспецифічним). Інтенсивність оцінювали за шкалою від 0 до 3 (0 = немає забарвлювання, 1 = слабе, 2 = помірне й 3 = сильне), а розподілення оцінювали як фокальне (<25 % забарвлених клітин), неоднорідне (25-75 % забарвлених клітин) і однорідне (> 75 % забарвлених клітин).

ФФЗП зразки були одержані з мікромасивів пухлини, а блоки людських тканин - із сімох різних пухлин, як описано нижче.

ФФЗП тестові зразки

Мікромасиви пухлини людини (ТМА)	Опис	Комерційне джерело
■ Змішана пухлина	96 зразків 33 типів раку	Biomax Cat # MC961
■ Пухлина яєчників	64 зразки	Biochain Cat # T8235725
■ НДРЛ	80 зразків	Biomax Cat # LC806
■ Колоректальний рак	85 дублікатів зразків	Biomax Cat # BC000110
Блоки людських тканин	Кількість	Комерційне джерело
■ Пухлина молочної залози	4	CHTN
■ Колоректальної рак	4	
■ Пухлина яєчників	4	
■ НДРЛ	8	
■ Пухлина підшлункової залози	1	
■ Пухлина нирки	8	
■ ПРГШ	14	

FOLR1 досліджуваний препарат і мишачий анти-FOLR1 клон BN3.2 були досліджені для визначення специфічності зв'язування з антигеном huFOLR1. Використовуючи описані способи ІГХ забарвлювання, ФФЗП зрізи 300-19 і 300-19 трансфіковані huFOLR1 (300-10/FOLR1) і конгломерати клітин забарвлювали й оцінювали на FOLR1. Для визначення FOLR1 клітини досліджуваного препарату спеціально забарвлювалися 300.19/FOLR1+ і не продемонстрували забарвлювання в клітинах 300-19 (3 - однорідне й негативне забарвлювання, відповідно). Ці результати демонструють, що клон BN3.2 орієнтований винятково на huFOLR1 антиген. (Фігура 1).

BN3.2 антитіла також використовували для виявлення експресії FOLR1 у зразках тканин. Імунореактивність кожного тестового й контрольного зразка тканин і клітинних конгломератів визначав патологоанатом-консультант, д-р David Dorfman. Спочатку були оцінені клітинні конгломерати для контролю, потім оцінювалися зразки тканин. Для кожної тканини повідомлялися оцінка й опис інтенсивності й однорідності забарвлювання. Оцінка інтенсивності забарвлювання й величина однорідності описані нижче. Кінцевий бал для кожного зразка тканини обчислювався, як оцінка тестового зразка мінус оцінка відповідного контрольного зразка. Рівень ЗАК для кожного зразка оцінювали шляхом порівняння оцінки забарвлювання з каліброваним зразком конгломерату клітин.

Інтенсивність (кількість забарвлюючого засобу)		Однорідність (кількість клітин) забарвлених	
0	Негативна		
1	Слабка	0	Негативна
2	Помірна	Фокальна	<25 %
3	Сильна	Неоднорідна (гетерогенна)	25-75 %
3 +	Дуже сильна	Однорідна (гомогенна)	>75 %

Значення показника зв'язаних антитіл на клітину (ЗАК) були визначені для FOLR1-позитивних пухлинних клітинних ліній (KB, IGROV1, JEG3 і OVCAR3) за допомогою aNTH-FOLR1-фікоеритрину, BD Quantibrite Beads і проточної цитометрії й показали різні значення ЗАК (Фігура 2). Умови забарвлювання були оптимізовані для FOLR1 так, щоб конгломерати клітин, одержані з FOLR1-позитивних пухлинних клітинних ліній показали різні рівні інтенсивності ІГХ забарвлювання. Конгломерат клітин KB показав дуже високий ступінь однорідності забарвлювання з високою інтенсивністю (3+), конгломерат клітин IGROV1 показав високий ступінь забарвлювання (3), конгломерат клітин JEG3 показав помірний ступінь (2-3) неоднорідного забарвлювання, а конгломерат клітин OVCAR3 показав низький ступінь інтенсивності (1-2) неоднорідного забарвлювання. Тенденції інтенсивності забарвлювання FOLR1, спостережувані на конгломератах клітин відповідають наведеним значенням ЗАК, де KB клітини показали високе значення ЗАК 1700000, IGROV-1 клітини показали наступне за величиною значення ЗАК 260000, JEG-3 мали більш низьке значення ЗАК 41000, а OVCAR3 клітини показали найнижче значення ЗАК 4000. Результати забарвлювання й відповідні значення ЗАК перераховані в таблиці нижче.

Значення ЗАК і відповідні результати забарвлювання
huFOLR1 клітинних ліній і відповідних клітинних конгломератів

Клітинна лінія	FOLR1	
	ЗАК	Оцінка
KB	1700000	3+ однорідна
IGROV1	260000	3 однорідна
JEG3	41000	2-3 неоднорідна
OVCAR3	4000	1-2 неоднорідна

Додаткові клітинні лінії, у тому числі Capan-1, Jar, Hec-1-A, Hec-1-B, Ishikawa, NCI H292, BT474EEI, PA-1, OV-90, CaOv-4, CaOv-3, A2780, Ovcар-5, Ovcар-4, HCT-15, 786-O, NCI H838, NCI H 522, NCI H2110, NCI H1734, NCI H228 і FU.OV-3 були досліджені й визнані FOLR1 позитивними, але їх рівні експресії FOLR1 і чутливості до анти-FOLR1 імунокон'югата сильно відрізняються. Для довідкових цілей кращими є клітинні лінії, що володіють стабільною експресією FOLR1 і чутливістю до анти-FOLR1 імунокон'югатів.

Особливо важливим є те, що способом ІГХ удалося виявити стабільну експресію FOLR1 зразків тканини раку яєчників і недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ). Як показано на Фігурі 3, експресія FOLR1 може бути вірогідно виявлена в зразках карциноми яєчників і НДРЛ із оцінкою від 2 неоднорідної до 3 однорідної. Значення ЗАК для цих зразків знаходяться у діапазоні від приблизно 41000 для зразків з оцінкою 2 неоднорідною, до більш ніж 260000 для зразків з оцінкою 3 однорідною. Як показано на Фігурі 4, висока інтенсивність і однорідність забарвлювання спостерігалася також для раку яєчників, аденокарциноми легенів і бронхіолоальвеолярної карциноми. Крім того, було додатково встановлено, що експресія FOLR1 у зразках тканин НДРЛ (Фігура 5) і раку яєчників (Фігура 6) переважно локалізована на мембранах. Експресія була виявлена на декількох зразках однієї пухлини, а також на зразках різних пухлини. Цікаво, що жоден зі зразків пухлини товстої кишки, молочної залози або дрібноклітинного раку легенів не показав оцінки вище 2 неоднорідної.

Приклад 2

In vivo ефективність huMov19-PEG4Ma1-DM4 і huMov19-SPDB-DM4 кон'югатів у порівнянні з аналогічними нетаргетними кон'югатами в моделі ксенотрансплантата KB

FOLR1-таргетний розщеплюваний кон'югат huMov19-SPDB-DM4 у порівнянні з нетаргетним huC242-SPDB-DM4, нерозщеплюваний кон'югат huMov19-PEG4-Ma1-DM4 у порівнянні з нетаргетним huC242-PEG4Ma1-DM4 були протестовані за допомогою встановленої моделі ксенотрансплантата KB клітин (дуже висока експресія FOLR1, 3+ однорідна при ІГХ із ручним забарвлюванням), імплантованого підшкірно ТКІН-мишам. Миші були випадковим способом розподілені за масою тіла в групи терапії й піддавались дії або один раз (SPDB кон'югатами) на 3 день після інокуляції клітин, або тричі на тиждень у дні 3, 10 і 17 після інокуляції клітин 5 і 10 мг кон'югата/кг маси тіла, відповідно. Середній об'єм пухлини в різних групах терапії наведений на Фігурі 7. Терапія за допомогою huMov19-SPDB-DM4 або huMov19-PEG4Ma1-DM4 привела до зниження середнього об'єму пухлини в порівнянні з контрольною групою, у якій використовувався ФСБ, у той час як лікування за допомогою будь-якого з відповідних не таргетних кон'югатів не продемонструвало помітного ефекту.

Приклад 3

Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 при дії на OVCAR-3 ксенотрансплантат карциноми яєчників людини.

Протипухлинний ефект IMGN853 оцінювали на стандартній моделі підшкірного ксенотрансплантата карциноми яєчника. ТКІН-мишам інокулювали клітини карциноми яєчника OVCAR-3 (1×10^7 клітин/тварину), які вводили підшкірно в правий бік тварини. Коли об'єм пухлин досягав приблизно 100 мм³ (21 день після інокуляції пухлинних клітин), мишей випадковим способом ділили на чотири групи (по 6 тварин у групі). Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ. Ріст пухлини контролювали шляхом вимірювання її розміру двічі на тиждень. Розмір пухлини розраховували за формулою: довжина × ширина × висота × $\frac{1}{2}$.

Препарат IMGN853 продемонстрував високу активність у відношенні OVCAR-3 пухлин (ІГХ оцінка 3, однорідна, при використанні ручних ІГХ способів) з погляду інгібування росту пухлини (Т/С = 0 %), при рівнях дози 2,5 і 5,0 мг/кг (Фігура 8). У 6/6 мишей, що одержували IMGN853 в дозі 5,0 мг/кг була досягнута повна регресія (ПР) пухлини. У мишей, що одержували IMGN853 у

дозі 2,5 мг/кг була досягнута часткова регресія (ЧР) пухлини у 6/6, і ПР - у 4/6. Препарат IMGN853 показав активність у дозі 1,2 мг/кг, з Т/С, що дорівнює 18 % при ЧР 2/6 і ПР 1/6. У відповідності зі стандартами Національного інституту раку (NCI) значення Т/С у діапазоні від 10 до 42 % вважається активним, значення Т/С менше 10 % вважається надзвичайно активним.

5 Приклад 4

Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 при дії на IGROV-1 ксенотрансплантат карциноми яєчників людини.

Протипухлинний ефект IMGN853 оцінювали на стандартній моделі підшкірного ксенотрансплантата карциноми яєчника. ТКІН-мишам інокулювали клітини карциноми яєчника IGROV-1 (1×10^7 клітин/тварину), які вводили підшкірно в правий бік тварини. Коли об'єм пухлин досягав приблизно 100 мм³ (7 день після інокуляції пухлинних клітин), мишей випадковим способом ділили на чотири групи (по 6 тварин у групі). Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ. Ріст пухлини контролювали шляхом вимірювання її розміру двічі на тиждень. Розмір пухлини розраховували за формулою: довжина × ширина × висота × $1/2$.

Препарат IMGN853 продемонстрував високу активність у відношенні IGROV-1 пухлин (ІГХ оцінка 3, однорідна, при використанні ручних ІГХ способів) в дозах 2,5 і 5,0 мг/кг результуюче співвідношення Т/С дорівнює 5 % для обох доз (Фігура 9). У 5/6 і 6/6 мишей спостерігалася часткова регресія пухлини в дозах 2,5 і 5,0 мг/кг, відповідно. У дозі 1,2 мг/кг (Т/С = 47 %) препарат IMGN853 активності не продемонстрував.

20 Приклад 5

Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 при дії на OV-90 ксенотрансплантат карциноми яєчників людини.

Протипухлинний ефект IMGN853 оцінювали на стандартній моделі підшкірного ксенотрансплантата карциноми яєчника. ТКІН-мишам інокулювали ОУ-90 клітини карциноми яєчника IGROV-1 (1×10^7 клітин/тварину), які вводили підшкірно в правий бік тварини. Коли об'єм пухлин досягав приблизно 100 мм³ (13 день після інокуляції пухлинних клітин), мишей випадковим способом ділили на чотири групи (по 6 тварин у групі). Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ. У контрольній групі, що одержувала ФСБ, внутрішньовенні ін'єкції проводили за таким самим графіком. Ріст пухлини контролювали шляхом вимірювання її розміру двічі на тиждень. Розмір пухлини розраховували за формулою: довжина × ширина × висота × $1/2$.

Препарат IMGN853 продемонстрував активність у відношенні OV-90 пухлин (ІГХ оцінка 3, однорідна-неоднорідна при використанні ручних ІГХ способів) в дозах 2,5 і 5,0 мг/кг, результуюче співвідношення Т/С дорівнює 36 і 18 %, відповідно (Фігура 10). У двох тварин спостерігався частковий регрес пухлини в групі 5,0 мг/кг, ніякого іншого регресу пухлини в будь-якій із груп не спостерігалось. У дозі 1,2 мг/кг (Т/С = 77 %) препарат IMGN853 активності не продемонстрував.

40 Приклад 6

Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 при дії на SKOV-3 ксенотрансплантат карциноми яєчників людини.

Протипухлинний ефект IMGN853 оцінювали на стандартній моделі підшкірного ксенотрансплантата карциноми яєчника. ТКІН-мишам інокулювали клітини карциноми яєчника SKOV-3 (1×10^7 клітин/тварину), які вводили підшкірно в правий бік тварини. Коли об'єм пухлин досягав приблизно 100 мм³ (26 день після інокуляції пухлинних клітин), мишей випадковим способом ділили на чотири групи (по 6 тварин у групі). Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ. Ріст пухлини контролювали шляхом вимірювання її розміру двічі на тиждень. Розмір пухлини розраховували за формулою: довжина × ширина × висота × $1/2$.

Препарат IMGN853 не продемонстрував активність у відношенні SKOV-3 пухлини (ІГХ оцінка 1-3, фокальна при використанні ручних ІГХ способів) у всіх дозах, з ростом пролікованих IMGN853 пухлин паралельно контрольній групі, пролікованій ФСБ (Фігура 11). Аналіз даних не проводився, а саме дослідження було достроково припинене у зв'язку з відсутністю активності IMGN853 у цій моделі.

55 Приклад 7

Залежна від дози протипухлинна активність IMGN853 при дії на KB ксенотрансплантат людської аденокарциноми шийки матки.

Протипухлинний ефект IMGN853 оцінювали на стандартній моделі підшкірного ксенотрансплантата аденокарциноми шийки матки. ТКІН-мишам інокулювали клітини аденокарциноми шийки матки KB (1×10^7 клітин/тварину), які вводили підшкірно в правий бік тварини. Коли об'єм пухлин досягав приблизно 100 мм^3 (7 день після інокуляції пухлинних клітин), мишей випадковим способом ділили на чотири групи (по 6 тварин у групі). Мишей лікували за допомогою однократної внутрішньовенної ін'єкції IMGN853 в дозі 1,2, 2,5 або 5,0 мг/кг. Тварини контрольної групи одержували однократну внутрішньовенну ін'єкцію ФСБ. Ріст пухлини контролювали шляхом вимірювання її розміру двічі на тиждень. Розмір пухлини розраховували за формулою: довжина $\times$ ширина $\times$ висота $\times \frac{1}{2}$.

Препарат IMGN853 продемонстрував високу активність у відношенні пухлини KB із погляду гальмування росту пухлини (Т/С = 0 %) у дозах 2,5 і 5,0 мг/кг (Фігура 12). У шести із шести мишей у групі 5,0 мг/кг і у п'яти із шести мишей у групі 2,5 мг/кг спостерігалася ПР із повним зникненням пухлини до кінця дослідження (день 120). Доза 1,0 мг/кг продемонструвала активність, результуюче співвідношення Т/С дорівнювало 37 %, однак ні часткової, ні повної регресії в цій дозі не спостерігалось.

Приклад 8

Імуногістохімічне забарвлювання FOLR1 клітинних зразків, фіксованих у формаліні й залитих парафіном (ФФЗП) - автоматизовані способи забарвлювання.

При аналізі ІГХ забарвлювання використовуються IVD реагенти класу I, у тому числі антитіла Novocastra FOLR1 (Novocastra/Leica Cat # NCI-L-FRalpha, клон BN3.2) як досліджуваний препарат і автоматизоване обладнання для забарвлювання Leica Bond RX. Зв'язаний досліджуваний або контрольний зразок виявлявся шляхом інкубації із системою виявлення Leica Bond Refine, яка включає використання первинного реагенту (кролячий антимішачий IgG), а потім реагенту полімеру (козячий антикролячий полімер) і 3,3-діамінобензидин тетрагідрохлориду (ДАБ) хромогену. ФФЗП зразки забарвлювали із зазначеною концентрацією первинного антитіла (одержаний розведенням в Leica розріджувачі FOLR1), як показано нижче.

Антитіла для ІГХ

Досліджуваний препарат ¹⁾	Альфа-рецептори фолієвої кислоти (Novocastra/Leica Cat # NCI-L-FRalpha, Lot 159506), мишачі, клон BN3.2, рідкий концентрат: 75 мкг/мл
Контрольний препарат ¹⁾	IgG1 (Beckman Coulter Cat # 6602872, Lots2S7SPS04-23 і 2S7SPS04-26.) концентрація початкового розчину: 1 мг/мл, мишачі, клон 2T8-2F5

Спосіб аналізу ФФЗП за допомогою Leica Bond RX

Етап ¹⁾	Дія	Час
Термічна обробка	Температура: 60 °C	30 хвилин
Депарафінізовані	За допомогою розчину Bond Dewax	Зафіксований
	100 % етанол	Зафіксований
Демаскування антигена	Bond ER2	20 хвилин
Блок ендогенної пероксидази	Пероксид (компонент набору для очищення)	5 хвилин
Досліджуваний препарат:	FOLR1 при 1,9 мкг/мл у розріджувачі Leica	15 хвилин
Виявлення	Пост-первинний реагент (набір для очищення)	8 хвилин
	Полімер (набір для очищення)	8 хвилин
	Суміш ДАБ (набір для очищення)	10 хвилин
Контрастуюче забарвлювання	Гематоксилін (набір для очищення)	5 хвилин

Усі забарвлені зразки досліджувались і оцінювались. Спочатку досліджували контрольні зразки, потім тестові зразки (зрізи цілком і окремі центральні фрагменти тканинних блоків). Для кожної досліджуваної пухлинної тканини або конгломерату клітин проводили опис інтенсивності забарвлювання й відповідних пропорцій забарвлених клітин пухлини. Забарвлювання, асоційоване з мембранами, реєстрували для кожного зразка. У випадку, якщо від одного пацієнта були одержані дублюючі оцінки, в аналіз був включений тільки найвищий бал. Якщо

- 5 при оцінюванні реєстрували забарвлювання тільки цитоплазми, остаточно оцінка дорівнювала нулю (0). Інтенсивність і однорідність кожного зразка подавалися, як описано в таблиці нижче. Інтенсивність і картина розподілення забарвлювання були оцінені в порівнянні з контрольним забарвлюванням IgG (неспецифічним). Інтенсивність оцінювали за шкалою від 0 до 3 (0 = немає забарвлювання, 1 = слабе, 2 = помірне й 3 = сильне) а розподілення оцінювали як фокальне (<25 % забарвлених клітин), неоднорідне (25-75 % забарвлених клітин) і однорідне (>75 % забарвлених клітин). У нормальній тканині при розрахунках інтенсивності й пропорції розглядалися тільки певні підструктури.

ІГХ система оцінки, що складається зі шкали інтенсивності й рівномірності

Інтенсивність (кількість забарвлюючого засобу)		
Спостережувана інтенсивність	Категорія інтенсивності	Оцінка інтенсивності
0	Негативна	0
0-1	Дуже слабка	1
1	Слабка	2
1-2	Слабка до помірної	
2	Помірна	
2-3	Помірна до сильної	3
3	Сильна	
Однорідність (відсоток тільки забарвлених мембран клітин)		
0	Негативна	
Фокальна	<25 %	
Неоднорідна (гетерогенна)	25-75 %	
Однорідна (гомогенна)	>75 %	

10 ФФЗП зразки були одержані з мікромасивів пухлини, а також блоки людських тканин із сімох різних пухлин, як описано нижче.

ФФЗП тестові зразки: фрагменти тканинних блоків

Анатомічна зона	Постачальник	№ за каталогом	Код	Кількість зразків на одного пацієнта	Загальна кількість пацієнтів
Нирки	Pantomics	KIC1501	PT-ARR-KID-122711-1	2	69
Легені	Pantomics	LUC1501	PT-ARR-LNG-122711-1	2	70
Легені	Tristar	69571059/TA1249	PT-ARR-OVA-122711-1	1	110
Яєчники	Biochain	T8235725-5	PT-ARR-OVA-122111-1	1	62
Яєчники	Pantomics	OVC1501	PT-ARR-OVA-122711-1	2	70
Яєчники	Tristar	69571091/TA1322	PT-ARR-OVA-010912-1	2	96
Матка (ендометрій)	Pantomics	EMC1501	PT-ARR-EME-122711-1	2	70
Різнi органи	Pantomics	MTU481	PT-ARR-122711-1	1	48

ФФЗП тестові зразки: зрізи цілком

Орган	Код	Джерело	Діагноз (з документації джерела)
Яєчники	1	Невідоме	аденокарцинома ендометрію
	2	Proteogenex	аденокарцинома ендометрію
	3	CHTN	аденокарцинома змішаного типу із властивостями аденокарциноми ендометрію, серозної й світлоклітинної
	4	CHTN	аденокарцинома високого ступеня диференціювання змішаного типу з зонами папілярних, серозних, ендометріюїдних і світлих клітин
	5	CHTN	серозна аденокарцинома папілярного типу
	6	Proteogenex	серозна аденокарцинома
	7	Proteogenex	серозна аденокарцинома папілярного типу
	8	Proteogenex	серозна аденокарцинома папілярного типу
	9	CHTN	серозна аденокарцинома папілярного типу
	10	Proteogenex	серозна аденокарцинома папілярного типу
Легені	1	CHTN	слабко диференційована аденокарцинома
	2	CHTN	ацинарна аденокарцинома, добре диференційована, із властивостями бронхіолоальвеолярної
	3	CHTN	аденокарцинома з муцинозними властивостями
	4	CHTN	аденокарцинома
	5	CHTN	аденокарцинома
	6	CHTN	аденокарциноми (бронхіолоальвеолярна) карцинома
	7	CHTN	аденокарцинома
	8	CHTN	аденокарцинома, помірно диференційована, із властивостями світлоклітинної
	9	CHTN	аденокарцинома
	10	CHTN	плоскоклітинний рак

Клітини (пухлинні клітини або трансфіковані клітини) були зафіксовані формаліном і залиті парафіном (ФФЗП). При визначенні за допомогою проточної цитометрії, ФФЗП клітинні конгломерати зразків показали різні діапазони експресії FOLR1. У цьому дослідженні також були використані нормальні людські тканини для позитивного й негативного контролю й для аналізу специфічності. Конгломерати клітин показали різні рівні FOLR1, відповідні оцінки наведені нижче. У конгломератах клітин спостерігалася слабка кореляція між оцінками забарвлювання й відповідними рівнями експресії FOLR1 (зв'язаних антитіл на клітину, ЗАК, визначається за допомогою каліброваної проточної цитометрії). Наприклад оцінка 1-3 неоднорідна була дана для SW620 і IGROV-1, що показали значення ЗАК 40098 і 565481, відповідно. Крім того, клітини HeLa показали значення ЗАК 1,5 млн. при оцінці 2-3 неоднорідна, у той час як 300.19/FR1 показали значення ЗАК 830003 при високій оцінці - 3 однорідна.

Остаточні оцінки для клітинних конгломератів
при концентрації досліджуваного препарату 1,9 мкг/мл

Клітинна лінія	^a Значення ЗАК	Оцінка забарвлювання
SW620	40098	1-3 неоднорідна
T47D	97576	1-2 неоднорідна
IGROV-1	565481	1-3 неоднорідна
300,19/FR1	830003	3 однорідна
HELA	1500587	2-3 неоднорідна
KB	4000000	3 однорідна

^aОдержане значення ЗАК являє собою середнє значення зв'язаних антитіл на клітину в популяції клітин і визначається в такий спосіб: використовується концентрація $1,0 \times 10^{-8}$ М анти-FOLR1-PE (1:1) для визначення значень ЗАК відповідної лінії клітин за допомогою способів проточної цитометрії й Quantibrite™ Beads (BD Biosciences).

Гістограми проточної цитометрії показують розподілення клітин у порівнянні із числом анти-FOLR1 зв'язків на клітину (рівень експресії FOLR1). І гістограми, і відповідні результати ІГХ забарвлювання показують, що кожна із цих клітинних ліній включає гетерогенну популяцію клітин, що володіють широким діапазоном експресії FOLR1. Виключенням є клітинна лінія 300.19/FR1, що продемонструвала й рівномірну гістограму проточної цитометрії, і оцінки ІГХ забарвлювання. Ці дані свідчать про те, що клітинні лінії, що експресують FOLR1 більш рівномірно, показують більш точну кореляцію між значеннями ЗАК і відповідними оцінками забарвлювання. Хоча аналіз показав позитивне забарвлювання всіх FOLR1-позитивних контрольних конгломератів клітин, існує лише слабка кореляція між оцінкою забарвлювання й відповідними рівнями експресії FOLR1 більшості цих конгломератів клітин. Таким чином, клітинні конгломерати цієї групи не можуть бути ідентифіковані як контрольні зразки з високою, середньою й низькою експресією. Типові фотозображення й гістограми, що показують експресію FOLR1 у клітинних лініях, визначену за допомогою ІГХ і проточної цитометрії наведені на Фігурі 13.

Для визначення умов аналізу був досліджений діапазон розведень досліджуваного й контрольного препарату для того, щоб вибрати розведення, відповідні до необхідного рівня чутливості. Експерименти проводили на панелі ФФЗП зразків, включаючи FOLR1-позитивні конгломерати клітин і фрагменти тканинних блоків, та ТМА, що складаються з FOLR1 позитивних і негативних нормальних тканин (надниркової залози (кори/мозкової речовини), молочної залози (проток і долей/сполучної тканини), фаллопієвих труб (поверхневого епітелію/м'язової стінки), нирок (каналців/клубочків), легенів (пневмоцитів I/II типу/міжальвеолярної сполучної тканини), підшлункової залози (каналів/острівців Лангерганса), слинних залоз (каналів/строми), шкіри (потових залоз/епідермісу), шлунка (поверхневого епітелію/підслизової основи)), і цілих зрізів пухлинних тканин (10 зразків пухлин яєчників і 10 зразків пухлин легенів). Кожний зразок забарвлювали за допомогою серійних розведень концентрації досліджуваного препарату (0,25, 0,5, 0,9, 1,9, 3,8 і 7,5 мкг/мл) або концентрації контрольного препарату 1,9 мкг/мл і 3,8 мкг/мл. Відносні інтенсивності забарвлювання для кожного розведення порівнювали для кожного зразка для визначення оптимального ступеня розведення. Критерієм для оптимального ступеня розведення було розведення, яке 1) не викликало забарвлювання фону в забарвлених зразках з ізотипічним контролем 2) не викликало забарвлювання тканини зразка для негативного контролю, забарвленого тестовим препаратом і 3) демонструвало відмінність між різними рівнями асоційованої з мембранами експресії FOLR1 серед зразків, що являють інтерес (ФЗП тканини пухлини яєчників, пухлини ендометрію, НДРЛ і пухлини нирки). З п'яти розведень досліджуваного препарату концентрація 1,9 мкг/мл показала кращий динамічний діапазон результатів забарвлювання за допомогою автоматизованих протоколів Leica Bond RX (Протоколи термічної обробки й депарафінізування, протокол HIER за допомогою ER2 протягом 20 хвилин і протокол ІГХ забарвлювання F з додатковим промиванням).

Приклад 9

Ідентифікація й характеристика контрольних зразків, що характеризують динамічний діапазон аналізу автоматизованих способів забарвлювання

Контроль якості: нормальні людські тканини слинної залози, легенів і підшлункової залози були визначені, як тканини для позитивного контролю, використовувані в кожному аналізі, щоб

переконатися, що процедура забарвлювання виконується, як очікувалося. Нормальні тканини стравоходу людини були ідентифіковані як негативний контроль. Ці контрольні зразки були охарактеризовані в такий спосіб: для того, щоб забезпечити контроль, який охоплює динамічний діапазон аналізу, матричний мультитканинний блок (ММБ), що складається з декількох FOLR1 позитивних і негативних зразків нормальної тканини, повинен мати динамічний діапазон аналізу, використаного як аналізу перевірки контролю під час фаз оптимізації й валідації. Чотири типи нормальних тканин з визначеними структурами в цьому ММБ були визначені як відповідні види контролю для аналізу в такий спосіб: дихальний епітелій нормальної людської легені (оцінка 2, однорідна); протоки нормальної підшлункової залози людини (оцінка 3, однорідна, апікальне забарвлювання); проміжні протоки нормальної людської слинної залози (оцінка 1-2 неоднорідна) і нормальна тканина людського стравоходу (оцінка 0). Усього було проведено більше 4 аналізів, відповідні контрольні аналізи цього ММБ дали ідентичні результати. Ці результати показують, що вибраний контрольний зразок дає стійкі результати й охоплює динамічний діапазон аналізу.

Структури в нормальних тканинах, визначені як контроль,
що охоплює динамічний діапазон аналізу

Нормальний орган	Суб-структура	Оцінка забарвлювання (контрольний препарат)	Оцінка забарвлювання (досліджуваний препарат)
Стравохід	Всі структури	0 (негативна)	0 (негативна)
Слинна залоза	Проміжні протоки	0 (негативна)	1-2 неоднорідна
Легені	Дихальний епітелій	0 (негативна)	2 однорідна
Підшлункова залоза	Протоки	0 (негативна)	3 однорідна, апікальне забарвл.

Апікальне забарвлювання визначається як поляризоване неоднорідне забарвлювання мембрани

Приклад 10

Аналіз ефективності автоматизованого способу забарвлювання.

Використання даного аналізу дозволяє специфічно виявити відтворюваність FOLR1 і з відповідною чутливістю диференціювати різні рівні й одноманітність асоційованої з мембранами експресії FOLR1 (оптимальний динамічний діапазон) ФФЗП тканин пухлини яєчників, ендометрію, НДРЛ і нирок. Таким чином, критеріями ефективності вважаються специфічність, відтворюваність і чутливість.

Специфічність і чутливість аналізу оцінювали шляхом порівняння забарвлювання нормальних тканин з вивченням результатів аналізу, що повідомлялися раніше. Результати забарвлювання в цьому дослідженні були зіставлені з відповідними результатами забарвлювання в роботі Scorer et al. 2010 (A Full Immunohistochemical Evaluation of a Novel Monoclonal Antibody to Folate Receptor-alpha. The Novocastra Journal of Histopathology, REAGENTS: 2010 (3):8-12, що описує один і той самий клон антитіла BN3.2) із ФФЗП нормальної тканини й з дослідження крос-реактивності тканин (KPT) за допомогою IMG853 (huMov19 (M9346A) антитіл) на свіжозаморожених нормальній тканині (Immunogen Report IMH28-003). Порівняння результатів забарвлювання для кожного способу свідчить, що три аналізи показали в цілому аналогічні нормальні профілі забарвлювання тканин з різною відносною чутливістю. Аналіз Scorer виявився найменш чутливим, аналіз із дослідження (IMH28-011) володів проміжною чутливістю, спосіб дослідження KPT був найбільш чутливим. Деякі структури показали позитивне забарвлювання тільки при використанні двох більш чутливих способів (аналізу з дослідження й KPT аналізу). Не було жодного прикладу позитивного забарвлювання в найменш чутливому аналізі Scorer, який також не був позитивним в аналізі з дослідження й при використанні способу KPT. Дані результати показують, що специфічність і чутливість аналізу з дослідження є придатною для оцінки FOLR1 експресії в нормальних тканинах.

Специфічність і чутливість аналізу з дослідження додатково характеризується забарвлюванням і оцінкою панелі пухлинних ММБ, що складається із клітин раку яєчників, ендометрію, НДРЛ і раку нирок (набір зразків призначений для клінічного використання аналізу). Позитивне забарвлювання послідовно локалізувалось в пухлинній тканині із прилягаючими компонентами нормальної тканини, включаючи строму, судини, лімфоцити й нормальні тканини органа. Забарвлювання було негативним або позитивним, як і очікувалось. Для кожного підтипу карциноми яєчника або НДРЛ розподілення оцінок забарвлювання між ММБ різних виробників

продемонструвало аналогічне розподілення оцінок, що наводить на думку, що даний спосіб є нечутливим до різних умов фіксації й обробки. Оскільки моделі розподілення серед ММБ були подібні, дані з різних блоків були об'єднані й оцінки були класифіковані. Підсумкові оцінки для підтипів пухлини, що включають 20 або більше зразків на підтип перераховані в наступних таблицях. Як показано в цих таблицях, динамічний діапазон оцінок відзначається для кожного типу пухлини й указує, що цей аналіз демонструє відповідну чутливість до розпізнавання різних рівнів і різних видів однорідності забарвлювання експресії FOLR1, асоційованої з мембранами в тканинах пухлини яєчників, ендометрію, НДРЛ і нирок. Типові фотозображення серозної карциноми яєчників, ендометріюїдної карциноми яєчників, НДРЛ, раку ендометрію й нирковоклітинної карциноми показані на Фігурах 14-18. Додаткові фотографії, придатні, наприклад, для посібника з забарвлювання або діагностичного набору, показані на Фігурах 23-25. Дані дослідження показують, що аналіз є специфічним і володіє відповідною чутливістю для використання як діагностичного реагенту або його доповнення.

Підсумкові оцінки забарвлювання переважних підтипів пухлин яєчників

Підтип	Номер зразка (%)						
	Всього	≥3 неодн. ¹⁾	≥2 неодн. ¹⁾	≥1 неодн. ¹⁾	1-3 фокальн.	Будь-який позитивн.	Негативн.
Ендометріюїдний	35	15	18	20	6	26	9
	(100)	(43)	(51)	(57)	(17)	(74)	(26)
Муцинозний	29	2	4	5	0	5	24
	(100)	(7)	(14)	(17)	(0)	(17)	(83)
Серозний	129	44	92	92	8	100	29
	(100)	(34)	(71)	(71)	(6)	(78)	(22)

¹⁾ Фокальний характер забарвлювання був виключений

Підсумкові оцінки забарвлювання пухлини НДРЛ

Тип	Підтип	Номер зразка (%)						
		Усього	≥3 неодн. ¹⁾	≥2 неодн. ¹⁾	≥1 неодн. ¹⁾	1-3 фокальн.	Будь-який позитивн.	Нега- тивн.
Аденокарци- нома	Всі ^в	67	17	39	42	5	47	20
		(100)	(25)	(58)	(63)	(7)	70	30
	Бронхіоло- альвеоляр- на	7	2	5	5	0	5	2
		(100)	(29)	(71)	(71)	(0)	(71)	(29)
Плоскоклітин- ний рак	Всі	74	1	4	6	6	12	62
		(100)	(1)	(5)	(8)	(8)	(16)	(84)

¹⁾ Фокальний характер забарвлювання був виключений

Включені всі зразки аденокарциноми, за винятком зазначеного типу зразків бронхіолоальвеолярної карциноми

Підсумкові оцінки забарвлювання для аденокарциноми ендометрію й світлоклітинного раку нирок

Тип/підтип пухлини	Кількість зразків (%)						
	Усього	≥3 неодн. ¹⁾	≥2 неодн. ¹⁾	≥1 неодн. ¹⁾	1-3 фокальн.	Будь-який позитивн.	Негативн.
Ендометрій/аденока- рцинома	58	5	23	30	10	40	18
	(100)	(9)	(40)	(52)	(17)	(69)	(31)
Нирки/Світлоклітин- ний рак	34	0	9	23	6	29	5
	(100)	(0)	(26)	(68)	(18)	(85)	(15)

¹⁾ Фокальний характер забарвлювання був виключений

Точність аналізу дослідження вивчали шляхом виконання тесту внутрішньої й зовнішньої відтворюваності аналізу за допомогою трьох ФФЗП зразків пухлини тканини яєчників, НДРЛ або раку нирок, де кожний зразок демонстрував високу, середню або низьку оцінки. Для оцінки внутрішньої відтворюваності дев'ять стекел, кожне з яких містило зріз пухлини легені, яєчника й нирки були поміщені в дев'ять випадкових місць на Leica Bond RX. Для оцінки зовнішньої відтворюваності три стекла, що містять зрізи того самого зразка забарвлювали в три різні дні. Всі стекла після проведення експериментів внутрішньої й зовнішньої відтворюваності були оцінені й продемонстрували еквівалентні оцінки забарвлювання для кожного відповідного зразка: пухлина легенів (висока: 3 однорідна), пухлина яєчників (середня: 2 неоднорідна) і пухлина нирок (низька: 1-2 неоднорідна). Одержані дані демонструють відтворюваність для різних типів тканин з низьким, середнім і високим рівнем експресії.

Приклад 11

Експресія FOLR1 з ІГХ оцінкою ≥ 2 гетерогенна є критерієм відбору пацієнтів для лікування із застосуванням IMGN853.

Рівні експресії FOLR1 пухлинних клітинних ліній були визначені за допомогою кон'югата антитіло-PE (FR1-24-PE) і системи QuantiBRITE. Три клітинні лінії карциноми яєчників (IGROV-1, Skov-3 і Ovar-3), лінія клітин хоріокарциноми Jeg-3 і клітинна лінія карциноми шийки матки KB були включені в дослідження. Для того щоб одержати значення ЗАК, що заслуговують довіри, експерименти по зв'язуванню з кон'югатом антитіло-PE необхідно проводити при насичуючій концентрації (концентрації, за якої всі доступні сайти зв'язування зайняті кон'югатом). Для визначення такої концентрації для кон'югатів FR1-24-PE ми провели експерименти по зв'язуванню на панелі FOLR1-позитивних клітинних ліній з різними рівнями експресії FOLR1. Клітини інкубували з FR1-24-PE кон'югатом у широкому діапазоні концентрацій протягом двох годин на льоду, промивали ФАС-буфером (ФСБ із 1 % БСА), фіксували 1 % формальдегідом у ФСБ і аналізували на проточному цитометрі FACSCalibur. При концентрації 1×10^{-8} М кон'югат насичує сайти зв'язування на клітинній поверхні всіх протестованих ліній клітин Igrov-1, Jeg-3, Skov-3, Ovar-3 і KB. У наступних експериментах зв'язування FR1-24-PE і визначення ЗАК, кон'югати використовувалися в концентрації 1×10^{-8} М. Кожний зразок піддавали трикратному аналізу, на кожній клітинній лінії виконували декілька незалежних експериментів. Найвищі значення експресії були виявлені на клітинах KB зі значенням ЗАК приблизно 4000000 ± 3000000 , слідом ішли клітинні лінії IGROV-1 і Jeg-3 зі значеннями ЗАК 4000000 ± 850000 і 150000 ± 75000 , відповідно. Дві клітинні лінії, Skov-3 і Ovar-3 показали низький рівень експресії FOLR1, 20000 ± 10000 і 7000 ± 4000 ЗАК відповідно. Значні зміни значень ЗАК від експерименту до експерименту спостерігали для клітинної лінії Jeg-3, де значення ЗАК варіювали від 40000 до 300000. Ця варіабельність швидше за все відображає деякі біологічні властивості клітинної лінії, а не варіабельність аналізу, тому що значення ЗАК, одержані для інших проаналізованих клітинних ліній були набагато менш варіабельні (див. таблицю нижче).

Клітинна лінія	ЗАК (Середнє $\pm$ СВ, n) ¹⁾	Зміни від експерименту до експерименту	
		Найвищий зареєстрований рівень ЗАК	Найнижчий зареєстрований рівень ЗАК
KB	4000000 ± 3000000 , 4	4500000	3800000
IGROV-1	400000 ± 85000 , 5	480000	280000
Jeg-3	150000 ± 75000 , 14	260000	40000
Skov-3	20000 ± 10000	28000	10000
Ovar-3	7000 ± 4000	10000	4000

¹⁾ СВ - стандартне відхилення, n - кількість незалежних експериментів

Значення ЗАК були визначені за допомогою аналізу на основі ФАС із FR1-24 PE-міченими антитілами й системи Quantibrite. Середнє значення $\pm$ стандартне відхилення (СВ) було розраховано для незалежних експериментів.

Активність і специфічність IMGN853 були проаналізовані з FOLR1-позитивними клітинними лініями із широким спектром експресії FOLR1 (значення ЗАК клітинних ліній зазначені вище). Крім того, в експерименти були включені FOLR1-негативні клітинні лінії Namalwa і SW2. IMGN853 показав високу цитотоксичність проти клітин KB із підвищеною експресією FOLR1 (4000000 ± 3000000 ЗАК), Igrov-1 (400000 ± 85000 ЗАК) і Jeg-3 (150000 ± 75000 ЗАК), при цьому значення IC_{50} дорівнювали $0,10 \pm 0,01$ нМ, $0,50 \pm 0,07$ нМ і $1,00 \pm 0,05$ нМ, відповідно. Активність лізису клітин у відношенні всіх трьох клітинних ліній залежала від FOLR1, тому що надлишок

немодифікованого huMov19 (M9346A) антитіла (0,5 мкМ) помітно зменшував активність кон'югата для типових неспецифічних рівнів (від 10 до 20 разів). IMG853 показав тільки незначну активність у відношенні слабкоекспресуючих FOLR1 клітин Skov-3 і Ovar-3 (20000±10000 і 7000±4000 ЗАК відповідно), а також проти FOLR1-негативних клітин Namalwa і SW2, при значеннях IC_{50} , що перевищують 2 нМ. Цитотоксична активність IMG853 проти цих клітинних ліній була низькою й FOLR1-незалежною, блокування huMov19 (M9346A) її не торкалося. Див. Фігури 19 і 20.

ФФЗП зразки, одержані з мишачих моделей ксенотрансплантата пухлини оцінювалися на FOLR1 позитивність, використовуючи оптимізовані й затверджені способи аналізу, описаного вище. Забарвлювання не було помічене в пухлинних клітинах будь-якого зразка ксенотрансплантата, що забарвлюється контрольним препаратом. ФФЗП тканини ксенотрансплантата миші, одержані з наступних клітинних ліній показали такі моделі забарвлювання: Igrov-1, KB і NCI-H2110 показали однорідну модель забарвлювання 3-го рівня інтенсивності; Ishikawa і Ovar 3 показали неоднорідну модель забарвлювання 3-го рівня інтенсивності; LXFA737 показав однорідну модель забарвлювання з рівнем інтенсивності 2; OV-90 показав неоднорідну модель із рівнем інтенсивності 2, SKOV3 показав негативне значення. Типові фотозображення ксенотрансплантатів пухлини наведені на Фігурах 21 і 22.

Батьківська клітинна лінія або фрагмент пухлини	Тип захворювання	Остаточна оцінка	Категорія забарвлювання
IGROV-1	Рак яєчників	1-3 однорідна	3 однорідна
		1-3 однорідна	
		1-3 однорідна	
Ishikawa	Рак ендометрію	2-3 неоднорідна	3 неоднорідна
		1-2 неоднорідна/3 фокальна	
		2 неоднорідна/3 фокальна	
KB	Рак шийки матки	2 неоднорідна/3 фокальна	3 неоднорідна
		2 неоднорідна/3 фокальна	
LXFA737	НДРЛ	3 однорідна	3 однорідна
		3 однорідна	
NCI-H2110	НДРЛ	2 однорідна	2 однорідна
		2 однорідна	
OV-90	Рак яєчників	2-3 однорідна	3 однорідна
		2 однорідна	
OVCAR3	Рак яєчників	1-2 неоднорідна	2 неоднорідна
		Негативна ¹	
SKOV-3	Рак яєчників	1-3 неоднорідна	3 неоднорідна
		1-3 неоднорідна	
SKOV-3	Рак яєчників	негативна	негативна
		негативна	

Поріг забарвлювання (≥ 2 неоднорідна) вимагає мінімального рівня експресії (інтенсивність забарвлювання) і мінімального розподілення забарвлювання (відсоток пухлинних клітин, що експресують FOLR1). Доклінічні дані надають обґрунтування для цього порога у карциноми яєчників. Зразки пухлини мишачого ксенотрансплантата з балами $IGX \geq 2$ неоднорідна показали чутливість до IMG853 в умовах *in vivo*. ФФЗП зразки, одержані з мишачих моделей ксенотрансплантата пухлини оцінювалися на FOLR1 позитивність, використовуючи оптимізовані й затверджені способи аналізу, описаного вище. Дві моделі ксенотрансплантата карциноми яєчників OVCAR-3 і IGROV-1 показали неоднорідне або однорідне забарвлювання 3-го рівня інтенсивності. Модель ксенотрансплантата, одержана із клітин карциноми яєчників OV-90 показала неоднорідне забарвлювання з оцінкою рівня інтенсивності 2; модель карциноми яєчників Skov-3 виявилася FOLR1-негативною. Висока активність IMG853 була виявлена на двох моделях яєчників з рівнем 3 FOLR1 інтенсивності, активність OV-90 моделі дорівнювала 2 рівню FOLR1 інтенсивності. SKOV-3 модель не показувала ніякої активності. Моделі ксенотрансплантата оцінювали також для інших захворювань, включаючи легені, ендометрій й

пухлини шийки матки, і, хоча була виявлена кореляція між активністю й FOLR1 оцінкою забарвлювання, необхідно перевірити додаткові зразки.

Чутливість моделі ксенотрансплантата пухлин яєчників до IMGN853 проти рівня експресії FOLR1.

Ксенотрансплантат	Активність in vivo (5 мг/кг IMGN853, разова доза)	Оцінка інтенсивності, тип розподілення
OVCAR3	Висока активність	3 неоднорідна
IGROV-1	Висока активність	3 однорідна
OV-90	Активність	2 неоднорідна
SKOV-3	Неактивний	Негативний результат

Чутливість моделі ксенотрансплантата пухлин до IMGN853 проти рівня експресії FOLR1

Ксенотрансплантат	Тип пухлини	Активність in vivo (5 мг/кг IMGN853, разова доза)	Оцінка інтенсивності, тип розподілення
NCI-H2110	НДРЛ	Висока активність	3 однорідна
Ishikawa	Ендометрія	Препарат неактивний	2 однорідна
KB	Шийки матки	Висока активність	3 однорідна

5

Всі публікації, патенти, патентні заявки, інтернет-сайти й інвентарні номери/бази даних послідовностей (включаючи полінуклеотидні й поліпептидні послідовності), наведені в даному документі, включені шляхом посилання у всій їх повноті для всіх цілей і в такому ж ступені, як
якби про кожну окрему публікацію, патент, патентну заявку, інтернет-сайт або інвентарний
номер/послідовності бази даних було спеціальне й окремо зазначене, що вони застосовуються
як посилання.

10

ПОСЛІДОВНОСТІ

15

SEQ ID NO: 1 - людський рецептор фолієвої кислоти 1

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHEKEKPGPEDKLHEQ
CRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNL
GPWIOQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNWNTSGFNK
CAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHTSYKVSNNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVA
RFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

SEQ ID NO: 2 - людський рецептор фолієвої кислоти 1, послідовність нуклеїнової кислоти

atggctcagcggatgacaacacagctgctgctcctctagtggtggctgtagtagggaggctcagacaaggattgcatggccagg
actgagctctcaatgtctgcatgaacgcaagcaccacaaggaaaagccaggcccccaggacaagtgcatgagcagtgctgacctgg
aggaagaatgctgctgtcttaeaaacaaccagcaggaagccataaggatgttctacctatatagattcaactggaaaccactgtggaga
gatggcacctgctgcaaacgggcatttcacaggaacactgctctacgagtgctcccccaactggggccctggatccagcaggtggat
cagagctggcgcaagagcgggactgaacgtgcccctgtgcaagaggactgtgagcaatgggggaagattgfcgaacctctacac
ctgcaagagcaactggcacaaggcctggaactggactcagggttaacaagtgcgcagtgaggagctgctgccaacctttcatttctact
tcccacaccccactgttctgtgcaatgaaatctggaactcactctacaaggtcagcaactacagccaggaggagtgccgctgcatcagat
gtggttcgacccagccaggggcaaccccattgaggaggtggcagaggttctatgctgcagccatgagtgaggctggccctgggcagcct
ggccttctctgcttagcctggccctaatgctgctgtggctgcicagc

SEQ ID NO: 3-huMov19 vHC

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGGT
 FYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDAVYYCTRYDQSRAMDYWGQGTTVT
 VSS

SEQ ID NO: 4-huMov19 vLCv1.00

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQOPRLLIYRASNLEA
 GVPDRFSGSGSKTDFTLNISFVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKEIKR

SEQ ID NO: 5-huMov19 vLCv1.60

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQOPRLLIYRASNLEA
 GVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKEIKR

5

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ИММУНОДЖЕН, ІНК.

10

КЕРРИГАН, Крістіна Н.

БАЙТМЕН, Кетлін Р.

ПЕЙН, Гілліан ЛЕДД, Шеррон

<120> СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ FOLR1 ТЕРАПІЇ РАКУ

<130> 2921.015PC01

15

<140> PCT/US2012/031544

<141> 2012-03-30

<150> US 61/471,007

<151> 2011-04-01

<160> 5

20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
 1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
 20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
 35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
 50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
 65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
 85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 2

<211> 771

5 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggctcagc	ggaatgacaac	acagctgctg	ciccttctag	tgtgggtggc	tgtagtaggg	60
gaggctcaga	caaggattgc	atggggcagg	actgagcttc	tcaatgtctg	catgaacgcc	120
aagcaccaca	aggaaaagcc	aggcccccag	gacaagttgc	atgagcagtg	tcgaccctgg	180
aggaagaatg	cctgctgttc	taccaacacc	agccaggaag	cccataagga	tgtttcctac	240
ctatatagat	tcaactggaa	ccactgtgga	gagaaggcac	ctgcctgcaa	acggcatttc	300
atccaggaca	cctgcctcta	cgagtgtccc	cccaacttgg	ggccctggat	ccagcaggtg	360
gatcagagct	ggcgcaaaaga	gcgggtactg	aacgtgcccc	tgtgcaaaga	ggactgtgag	420
caatgggtggg	aagattgtcg	cacctcttac	acctgcgaaga	gcaactggca	caagggctgg	480
aactggactt	caggggtttaa	caagtgcgca	gtggggagctg	cctgccaaacc	tttccatttc	540
tacttcccca	cacccaactgt	tctgtgcaat	gaaatctgga	cicactccta	caaggtcagc	600
aactacagcc	gagggagtg	ccgctgcate	cagatgtggt	tcgaccagc	ccagggcaac	660
cccaatgagg	aggtggcgag	gttctatgct	gcagccatga	gtggggctgg	gccctgggca	720
gectggcctt	tcctgcttag	cctggcccta	atgctgctgt	ggctgctcag	c	771

10 <210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

15 <223> huMov19 vHC

<400> 3

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

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vLCv1.00

<400> 4

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

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> huMov19 vLCv1.60

<400> 5

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

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

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб ідентифікації раку, який може реагувати на анти-FOLR1 антитіло або анти-FOLR1 імункон'югат, причому зазначений спосіб включає:
 - (а) приведення в контакт зразка раку з антитілом для виявлення або його антигензв'язувальним фрагментом, що специфічно зв'язується з FOLR1;
 - (б) визначення зв'язування зазначеного антитіла для виявлення або його антигензв'язувального фрагмента зі зразком раку на стадії (а), за допомогою способу виявлення, що розрізняє інтенсивність та однорідність забарвлення при експресії FOLR1 у зразку раку;
 - (в) призначення ступеня для зв'язування на стадії (б), причому ступінь призначається на основі порівняння з одним або кількома еталонними зразками; та
 - (г) порівняння ступеня, призначеного на стадії (в), зі ступенем еталонного зразка тканини або клітини, причому ступінь для рівня FOLR1 при раку, який є більшим за ступінь для зниженого рівня експресії FOLR1 еталонного зразка, або ступінь для рівня FOLR1 при раку, який дорівнює або є більшим, ніж ступінь для високого рівня експресії FOLR1 еталонного зразка, ідентифікує зазначений рак як здатний реагувати на анти-FOLR1 антитіло або анти-FOLR1 імункон'югат, де зазначене анти-FOLR1 антитіло включає: (а) CDR1 важкого ланцюга (ВЛ), яка включає амінокислотну послідовність GYFMN (SEQ ID NO:6); CDR2 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO:7); та CDR3 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність YDGSRAMDY (SEQ ID NO:8); і (б) CDR1 легкого ланцюга (ЛЛ), яка включає амінокислотну послідовність KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:9); CDR2 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність RASNLEA (SEQ ID NO:10); та CDR3 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність QQSREYPYT (SEQ ID NO:11),
- де зазначений анти-FOLR1 імункон'югат має формулу (А) - (Л) - (С), причому:
 - (А) включає антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, який специфічно зв'язується з FOLR1 і включає: (а) CDR1 важкого ланцюга (ВЛ), яка включає амінокислотну послідовність GYFMN (SEQ ID NO:6); CDR2 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO:7); та CDR3 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність YDGSRAMDY (SEQ ID NO:8); і (б) CDR1 легкого ланцюга (ЛЛ), яка включає амінокислотну послідовність KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:9); CDR2 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність RASNLEA (SEQ ID NO:10); та CDR3 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність QQSREYPYT (SEQ ID NO:11),
 - (Л) включає лінкер, та
 - (С) включає цитотоксичний агент, і

де лінкер (L) зв'язує (A) з (C).

2. Спосіб ідентифікації пухлини як чутливої до терапії анти-FOLR1 антитілом або анти-FOLR1 імунокон'югатом, причому зазначений спосіб включає:

(а) вимірювання рівня експресії FOLR1 у зразку пухлини, одержаному із зазначеної пухлини, за допомогою способу виявлення, який може виявляти експресію FOLR1 за допомогою антитіла для виявлення або його антигензв'язувального фрагмента, що специфічно зв'язується з FOLR1, причому спосіб виявлення розрізняє інтенсивність та однорідність забарвлення при експресії FOLR1 у зразку пухлини порівняно з інтенсивністю та однорідністю забарвлення в одному або кількох еталонних зразках;

(б) визначення ступеня інтенсивності забарвлення FOLR1 для зразка пухлини; та

(в) порівняння ступеня інтенсивності забарвлення FOLR1, визначеного на стадії (б), з еталонним значенням, причому ступінь інтенсивності забарвлення FOLR1 для зазначеного зразка пухлини, визначений на стадії (б), який дорівнює або є більшим за еталонне значення, ідентифікує дану пухлину як чутливу до терапії анти-FOLR1 антитілом або анти-FOLR1 імунокон'югатом,

де зазначене анти-FOLR1 антитіло включає: (а) CDR1 важкого ланцюга (ВЛ), яка включає амінокислотну послідовність GYFMN (SEQ ID NO:6); CDR2 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO:7); та CDR3 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність YDGSRAMDY (SEQ ID NO:8); і (б) CDR1 легкого ланцюга (ЛЛ), яка включає амінокислотну послідовність KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:9); CDR2 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність RASNLEA (SEQ ID NO:10); та CDR3 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність QQSREYPYT (SEQ ID NO:11),

де зазначений анти-FOLR1 імунокон'югат має формулу (A) - (L) - (C), причому:

(A) включає антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, який специфічно зв'язується з FOLR1 і включає: (а) CDR1 важкого ланцюга (ВЛ), яка включає амінокислотну послідовність GYFMN (SEQ ID NO:6); CDR2 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO:7); та CDR3 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність YDGSRAMDY (SEQ ID NO:8); і (б) CDR1 легкого ланцюга (ЛЛ), яка включає амінокислотну послідовність KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:9); CDR2 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність RASNLEA (SEQ ID NO:10); та CDR3 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність QQSREYPYT (SEQ ID NO:11),

(L) включає лінкер, та

(C) включає цитотоксичний агент; і

де лінкер (L) зв'язує (A) з (C).

3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що еталонне значення визначають шляхом вимірювання експресії білка FOLR1 у принаймні одному еталонному зразку, де принаймні один еталонний зразок являє собою тканину, клітину або клітинний конгломерат, не чутливі до терапії анти-FOLR1 антитілом або анти-FOLR1 імунокон'югатом.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що зазначене антитіло для виявлення або його антигензв'язувальний фрагмент включає: (а) CDR1 важкого ланцюга (ВЛ), яка включає амінокислотну послідовність GYFMN (SEQ ID NO:6); CDR2 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO:7); та CDR3 ВЛ, яка включає амінокислотну послідовність YDGSRAMDY (SEQ ID NO:8); і (б) CDR1 легкого ланцюга (ЛЛ), яка включає амінокислотну послідовність KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:9); CDR2 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність RASNLEA (SEQ ID NO:10); та CDR3 ЛЛ, яка включає амінокислотну послідовність QQSREYPYT (SEQ ID NO:11).

5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що антитіло для виявлення або його антигензв'язувальний фрагмент включає варіабельний домен ВЛ, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, та варіабельний домен ЛЛ, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4 або 5.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що антитілом для виявлення або його антигензв'язувальним фрагментом є BN3.2.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що антитіло для виявлення або його антигензв'язувальний фрагмент додатково включає реагент для виявлення, вибраний з групи, до якої належать: фермент, флуорофор, радіоактивна мітка, люмінофор, біотин, дигоксигенін, флуоресцеїн, тритій та родамін.

8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що зазначений спосіб виявлення надає діапазон інтенсивності забарвлення для зразків з низьким рівнем експресії FOLR1, проміжним рівнем експресії FOLR1 або високим рівнем експресії FOLR1.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що спосіб виявлення являє собою імуногістохімічний (ІГХ) спосіб.
10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що зазначений ІГХ спосіб виконують вручну.
11. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що зазначений ІГХ спосіб виконують за допомогою автоматизованої системи.
12. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини має ступінь інтенсивності забарвлення 1 або більше для експресії FOLR1 згідно з оцінкою за допомогою ІГХ.
13. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини має ступінь інтенсивності забарвлення 2 або більше для експресії FOLR1 згідно з оцінкою за допомогою ІГХ.
14. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини має ступінь інтенсивності забарвлення 3 для експресії FOLR1 згідно з оцінкою за допомогою ІГХ.
15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини має неоднорідну рівномірність забарвлення для експресії FOLR1.
16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що зазначений зразок раку або пухлини має однорідну рівномірність забарвлення для експресії FOLR1.
17. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який **відрізняється** тим, що 25-75 % клітин зразка раку або пухлини мають ступінь інтенсивності забарвлення 2 або більше для експресії FOLR1 згідно з оцінкою за допомогою ІГХ.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який **відрізняється** тим, що більше ніж 75 % клітин зразка раку або пухлини мають ступінь інтенсивності забарвлення 1 або більше.
19. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який **відрізняється** тим, що 25-75 % клітин зразка раку або пухлини мають ступінь інтенсивності забарвлення 2 або більше.
20. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який **відрізняється** тим, що більше ніж 75 % клітин зразка раку або пухлини мають ступінь інтенсивності забарвлення 2 або більше.
21. Спосіб за будь-яким з пп. 1 та 3-20, який **відрізняється** тим, що еталонний зразок є позитивним еталонним зразком.
22. Спосіб за будь-яким з пп. 1 та 3-20, який **відрізняється** тим, що еталонний зразок є негативним еталонним зразком.
23. Спосіб за п. 21 або п. 22, який **відрізняється** тим, що еталонний зразок включає клітини, клітинні конгломерати або тканини.
24. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини являє собою зразок раку або пухлини ендометрія.
25. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини являє собою зразок раку або пухлини яєчника.
26. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини являє собою зразок раку або пухлини очеревини.
27. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини являє собою зразок раку або пухлини матки.
28. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що зразок раку або пухлини являє собою зразок раку або пухлини легені.
29. Спосіб за будь-яким з пп. 1-28, який **відрізняється** тим, що анти-FOLRI антитіло або анти-FOLRI імунокон'югат включає варіабельний домен ВЛ, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, та варіабельний домен ЛЛ, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4 або 5.
30. Спосіб за п. 29, який **відрізняється** тим, що анти-FOLRI антитіло або анти-FOLRI імунокон'югат включає ВЛ, який містить амінокислотну послідовність, задовану ВЛ-кодуючою послідовністю плазмідної ДНК, депонованої у АТСС 7 квітня 2010 року під номером РТА-10772, і ЛЛ, який містить амінокислотну послідовність, задовану ЛЛ-кодуючою послідовністю плазмідної ДНК, депонованої у АТСС 7 квітня 2010 року під номером РТА-10773 або РТА-10774.
31. Спосіб за будь-яким з пп. 1-30, який **відрізняється** тим, що лінкер (L) є розщеплюваним лінкером.
32. Спосіб за п. 31, який **відрізняється** тим, що лінкер (L) є вибраним з групи, до якої належать: N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)пентаноат (SPP); N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфопентаноат (сульфо-SPP); N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)бутаноат (SPDB); N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB).
33. Спосіб за п. 32, який **відрізняється** тим, що лінкер (L) являє собою N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB).

34. Спосіб за будь-яким з пп. 1-33, який **відрізняється** тим, що лінкер (L) є вибраним з групи, до якої належать: нерозщеплюваний лінкер, гідрофільний лінкер та лінкер на основі дикарбонових кислот.

5 35. Спосіб за п. 34, який **відрізняється** тим, що лінкер (L) є вибраним з групи, до якої належать: N-сукцинімідил-4-(малеїдометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC); N-сульфосукцинімідил-4-(малеїдометил)циклогексанкарбоксилат (сульфо-SMCC); N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоат (SIAB); та N-сукцинімідил-[(N-малеїдопропіонамідо)-тетраетиленгліколь]естер (NHS-PEC4-малеїмід).

10 36. Спосіб за будь-яким з пп. 1-35, який **відрізняється** тим, що цитотоксичний агент (C) є вибраним з групи, до якої належать: майтансиноїд, аналог майтансиноїду, бензодіазепін, таксоїд, CC-1065, аналог CC-1065, дуокарміцин, аналог дуокарміцину, каліхеаміцин, доластатин, аналог доластатину, ауристатин, похідна томайміцину й похідна лептоміцину, або агент у вигляді проліків.

15 37. Спосіб за п. 36, який **відрізняється** тим, що цитотоксичним агентом є майтансиноїд або аналог майтансиноїду.

38. Спосіб за п. 37, який **відрізняється** тим, що цитотоксичним агентом є N(2')-деацетил-N(2')-(3-меркапто-1-оксопропіл)-майтансин (DM1) або N(2')-деацетил-N(2')-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин (DM4).

20 39. Спосіб за будь-яким з пп. 1-38, який **відрізняється** тим, що (A) являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає варіабельний домен ВЛ, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, та варіабельний домен ЛЛ, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4 або 5.

25 40. Спосіб за п. 39, який **відрізняється** тим, що (A) являє собою антитіло, що включає ВЛ, який містить амінокислотну послідовність, задовану ВЛ-кодуючою послідовністю плазмідної ДНК, депонованої у ATCC 7 квітня 2010 року під номером РТА-10772 і ЛЛ, який містить амінокислотну послідовність, задовану ЛЛ-кодуючою послідовністю плазмідної ДНК, депонованої у ATCC 7 квітня 2010 року під номером РТА-10773 або РТА-10774.

41. Спосіб за будь-яким з пп. 1-38, який **відрізняється** тим, що:

30 (A) включає антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає варіабельний домен ВЛ, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, та варіабельний домен ЛЛ, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4 або 5,

(L) включає лінкер N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), і

(C) включає цитотоксичний агент N(2')-деацетил-N(2')-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин (DM4).

35 42. Спосіб за будь-яким з пп. 1-38, який **відрізняється** тим, що:

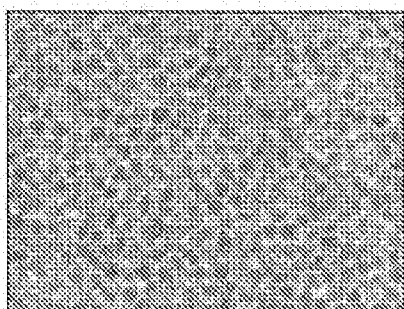
(A) включає антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає ВЛ, який містить амінокислотну послідовність, задовану ВЛ-кодуючою послідовністю плазмідної ДНК, депонованої у ATCC 7 квітня 2010 року під номером РТА-10772, і ЛЛ, який містить амінокислотну послідовність, задовану ЛЛ-кодуючою послідовністю плазмідної ДНК, депонованої у ATCC 7 квітня 2010 року під номером РТА-10774,

40 (L) включає лінкер N-сукцинімідил 4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), і

(C) включає цитотоксичний агент N(2')-деацетил-N(2')-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин (DM4).

45

A. 300-19 клітини



B. 300-19 клітини, трансфіковані FOLR1

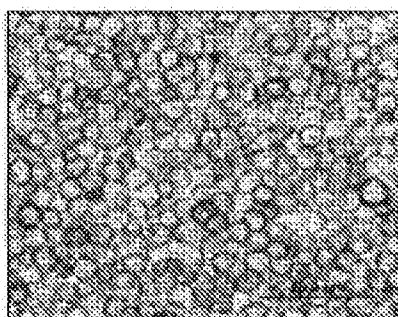


Fig. 1

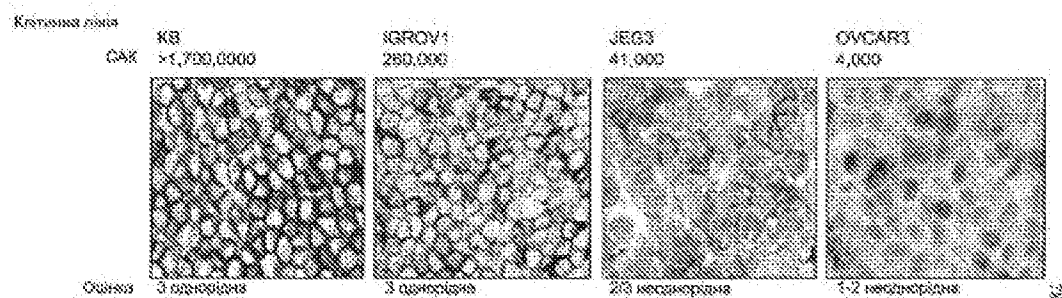


Fig. 2

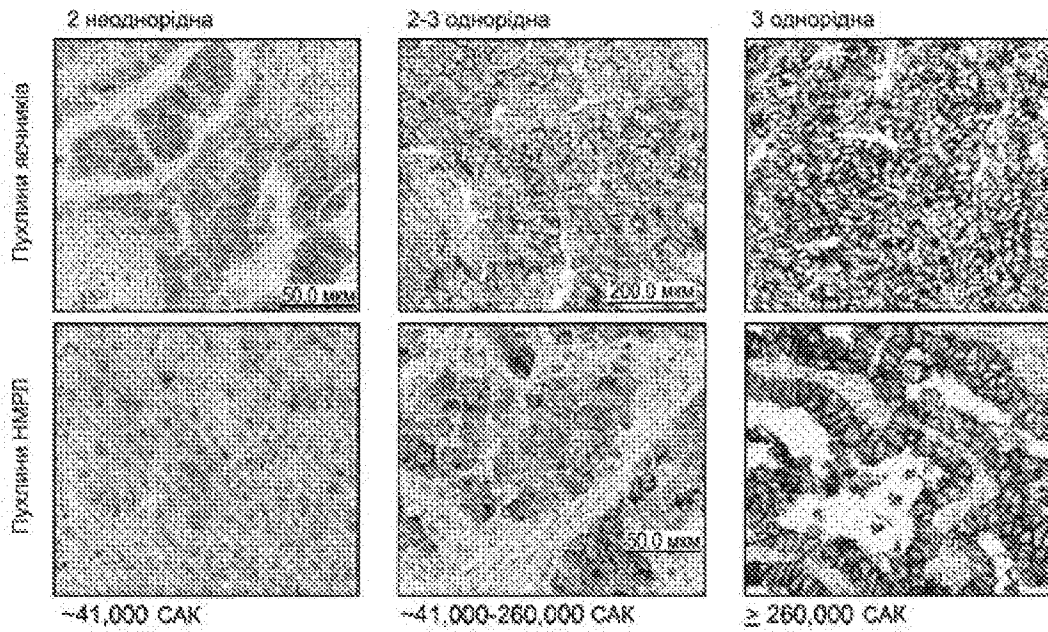


Fig. 3

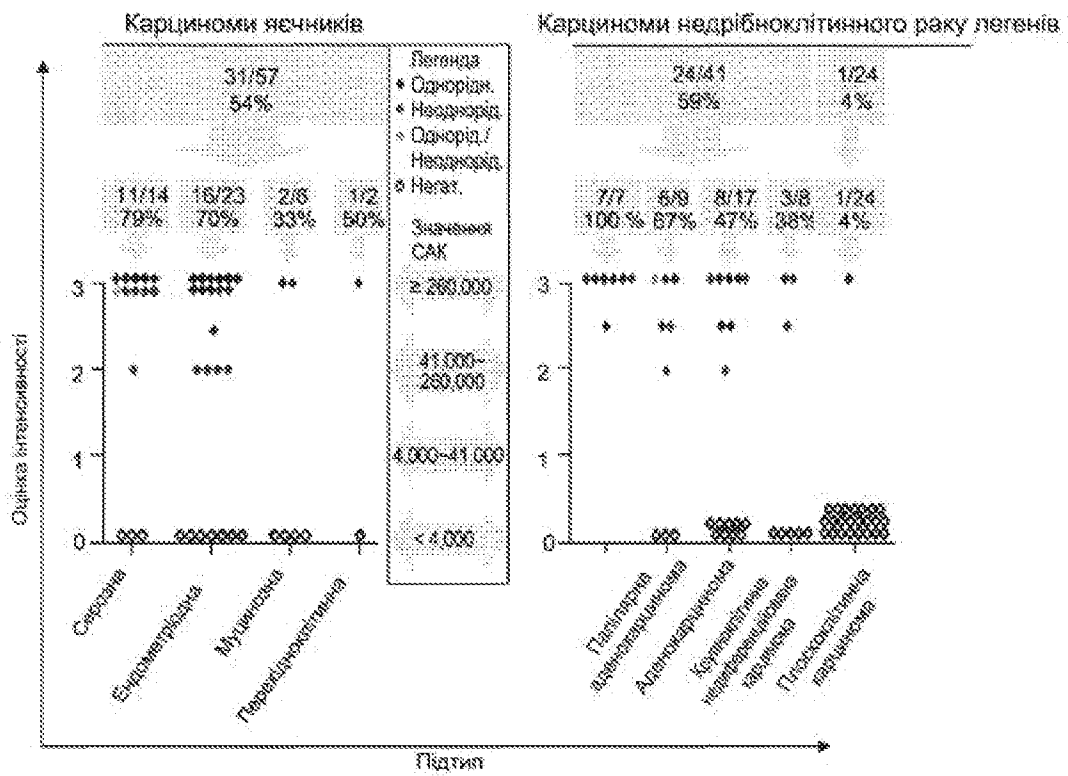


Fig. 4

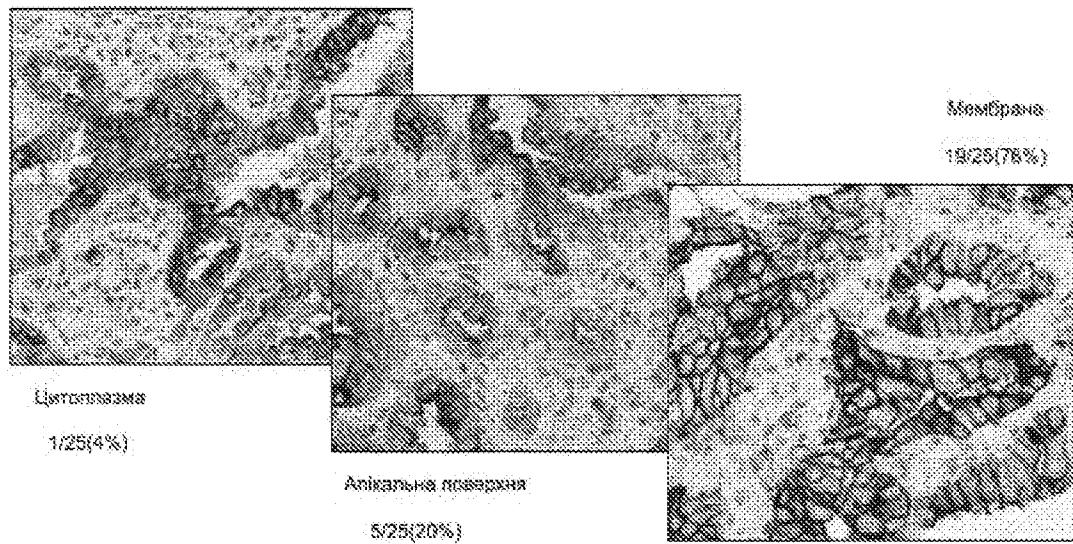


Fig. 5

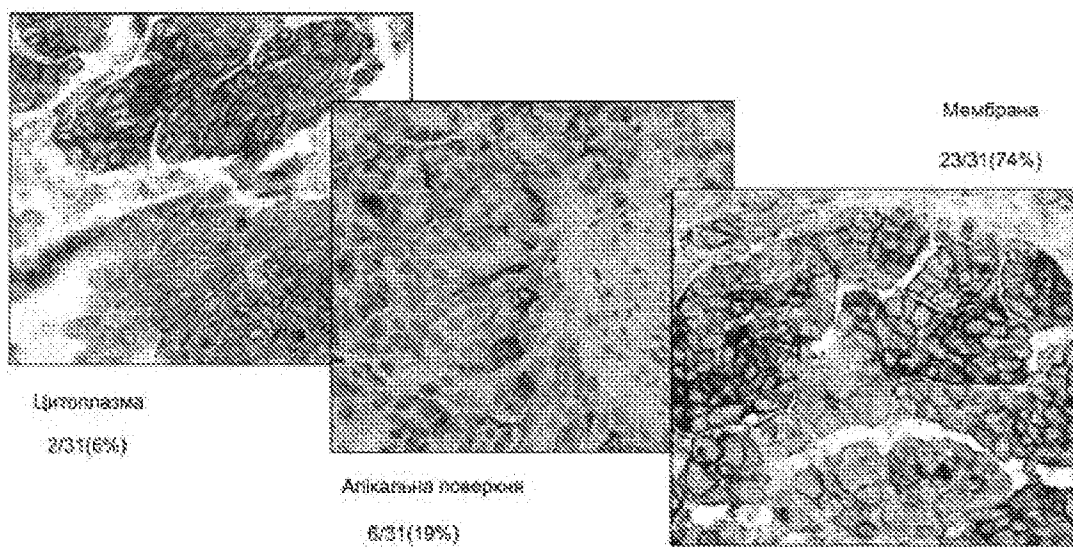


Fig. 6

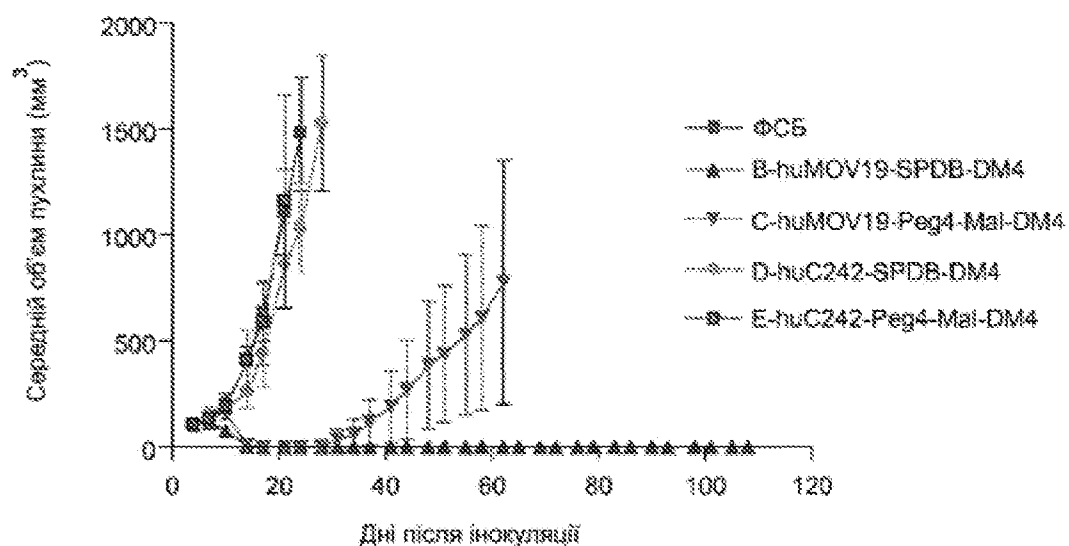


Fig. 7

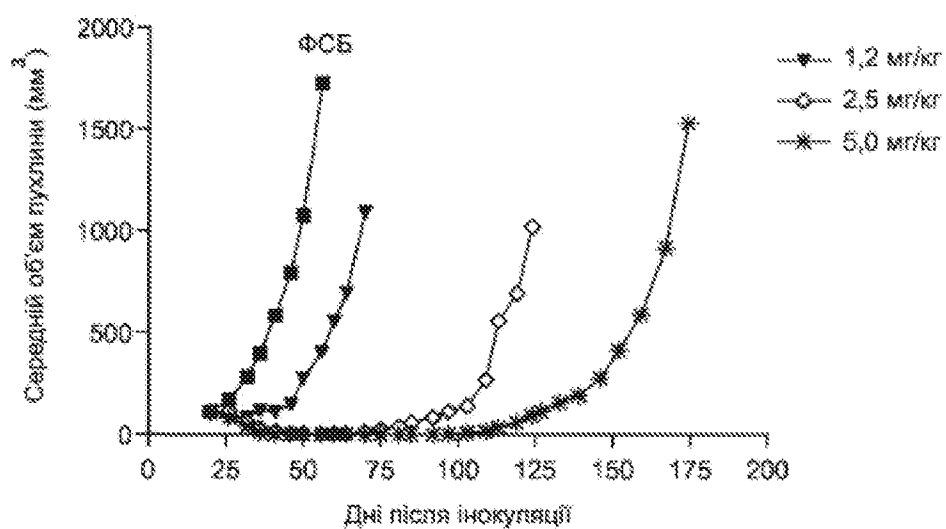
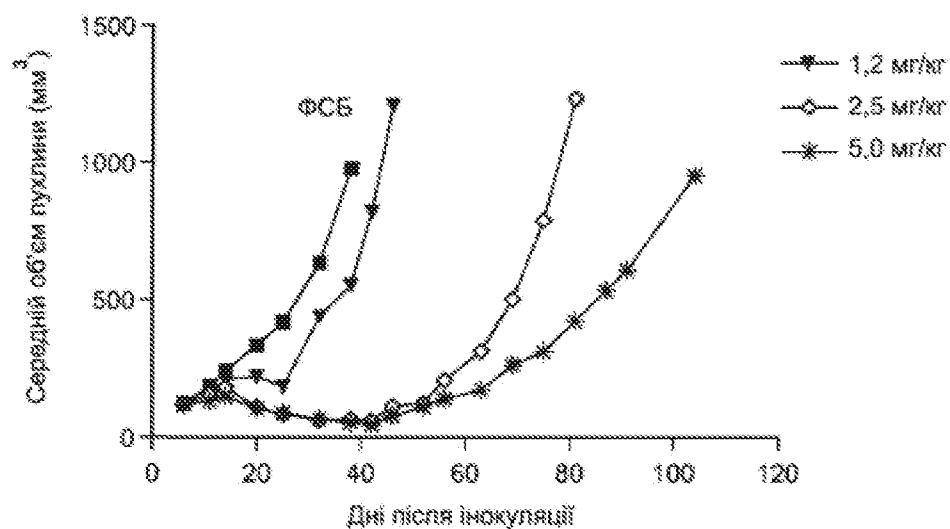
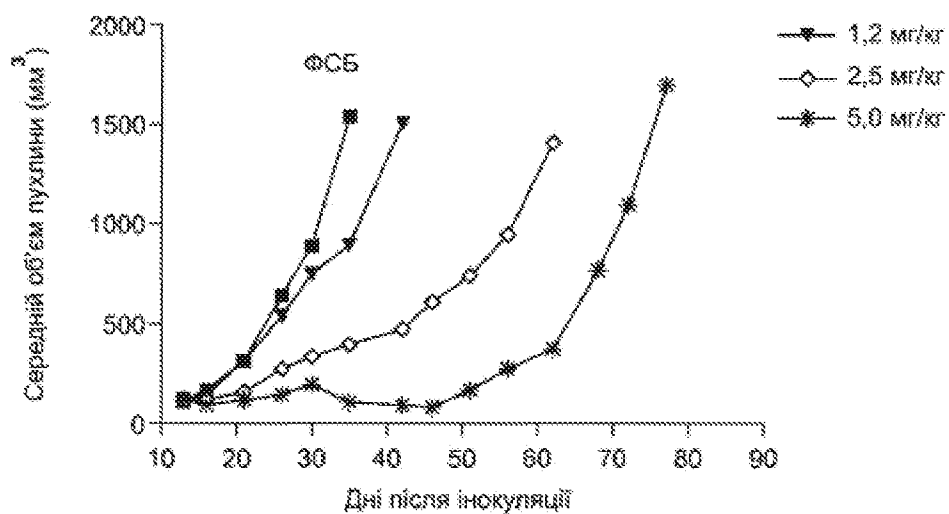


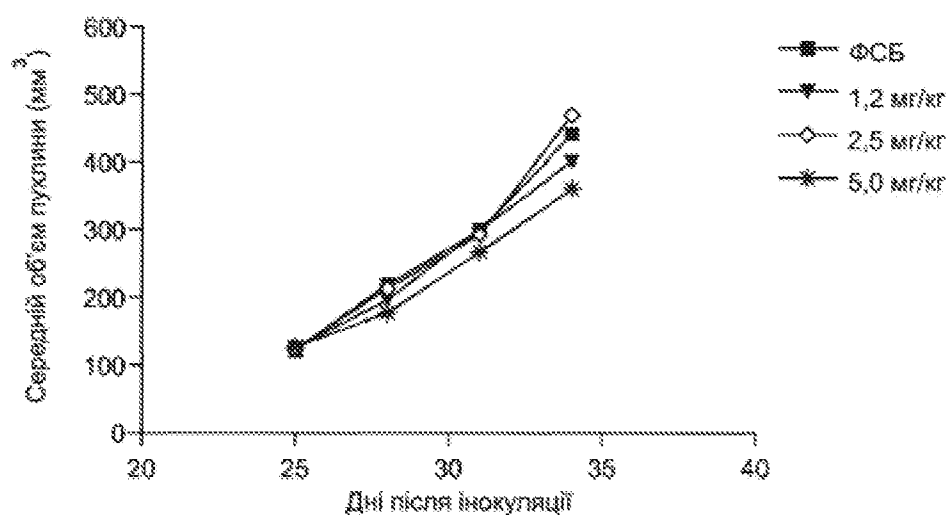
Fig. 8



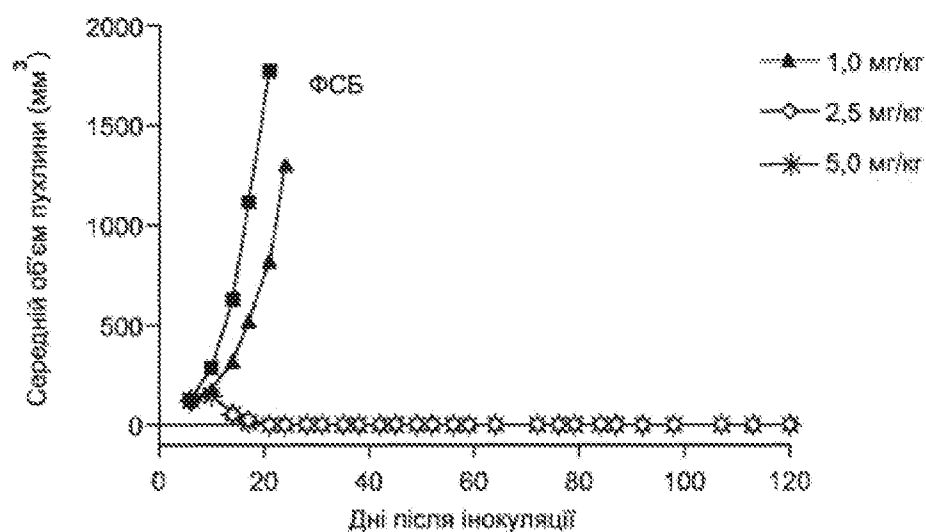
Фіг. 9



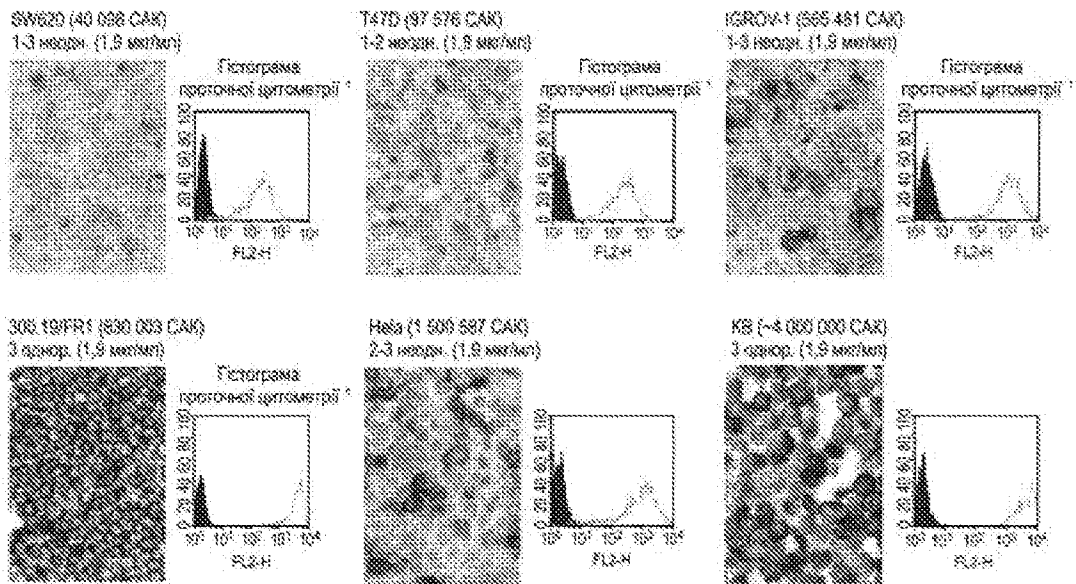
Фіг. 10



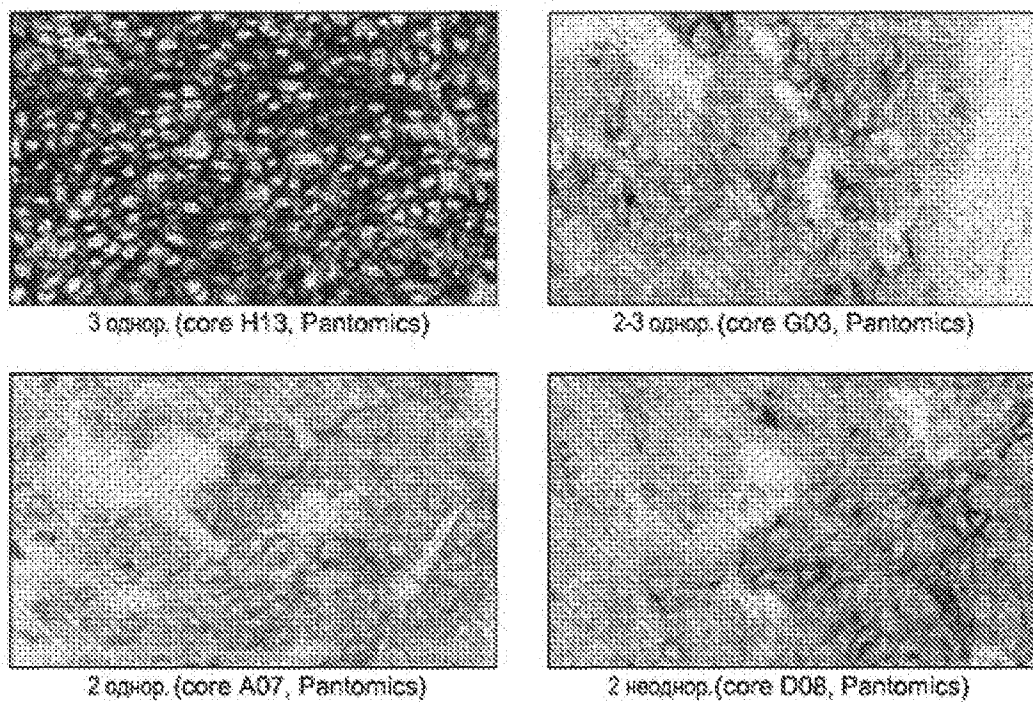
Фіг. 11



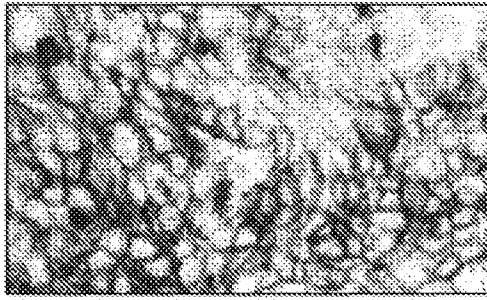
Фіг. 12



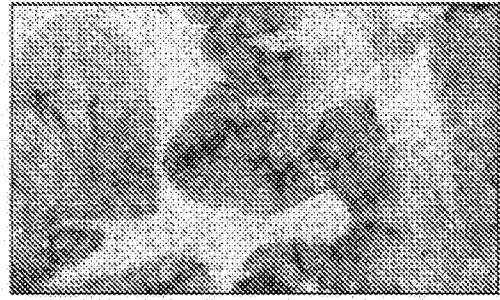
Фиг. 13



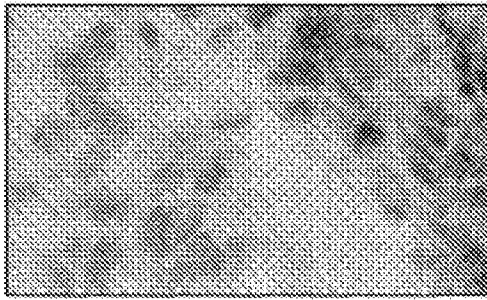
Фиг. 14



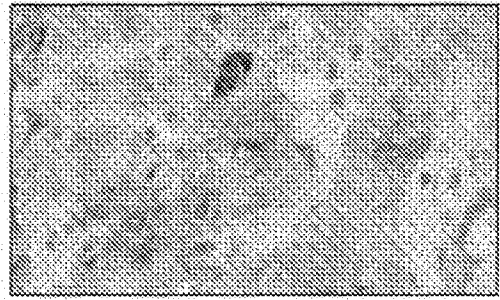
3 однор. (core A12, Pantomics)



2-3 однор. (P-T-OVA-032610-1)

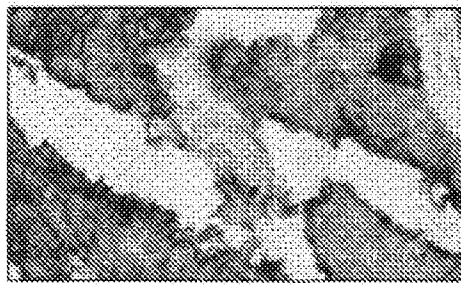


3 фохальн. (core E11, Pantomics)

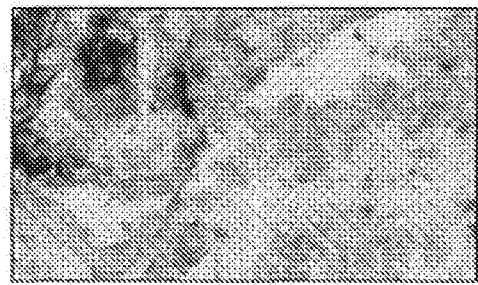


1-2 неоднор. (core G14, Pantomics)

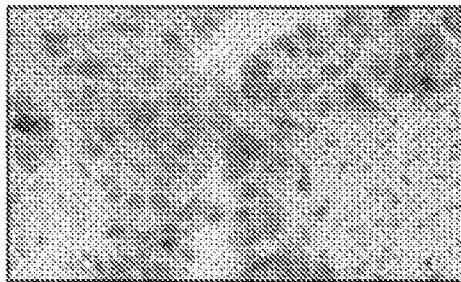
Fig. 15



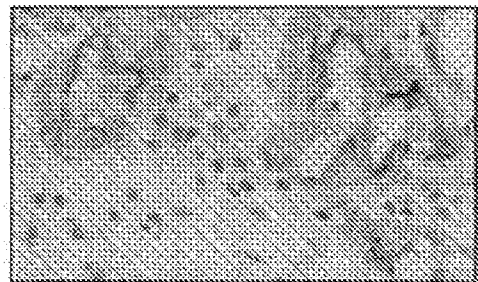
3 однор. (core F03, Pantomics)



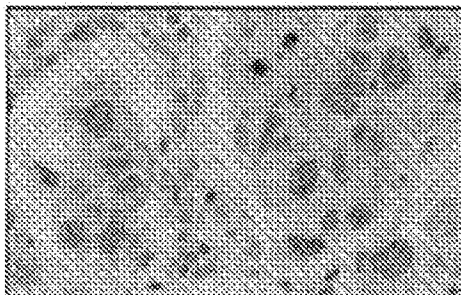
2-3 однор. (core J05, Pantomics)



2 неодн. (core 29, Tristar)

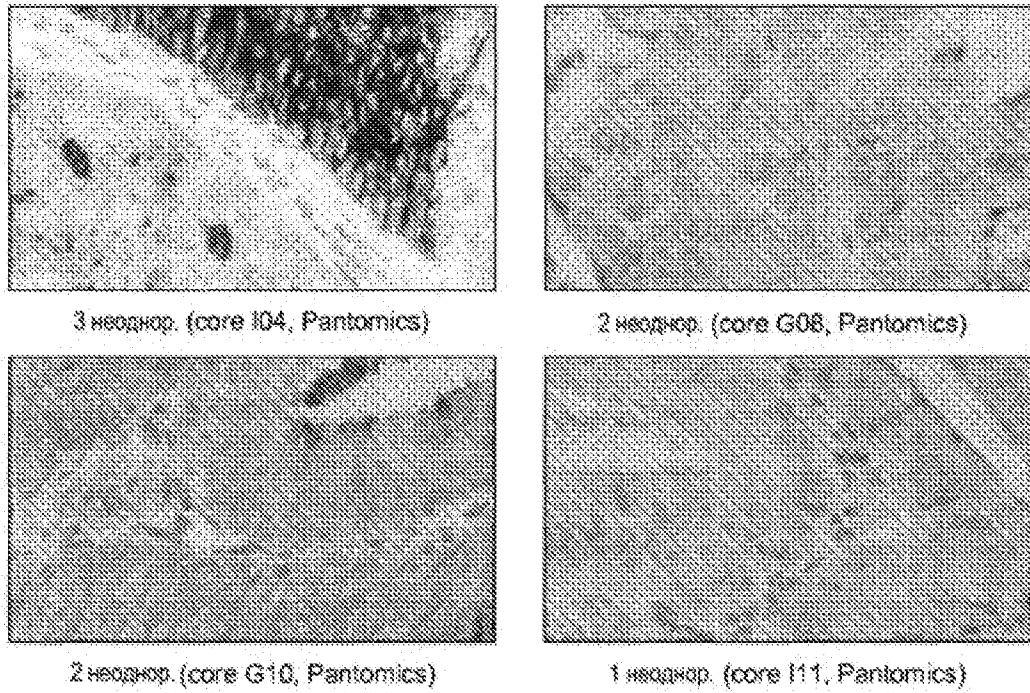


2 однор. апикалн. (core G10, Pantomics)

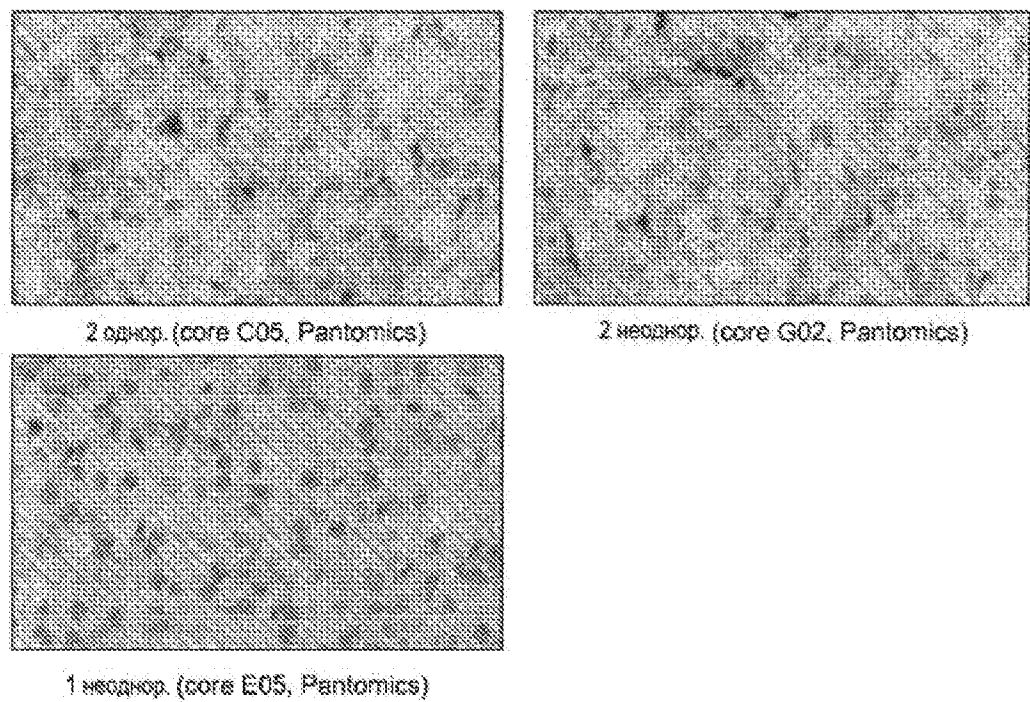


1-2 неодн. (core H15, Pantomics)

Fig. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

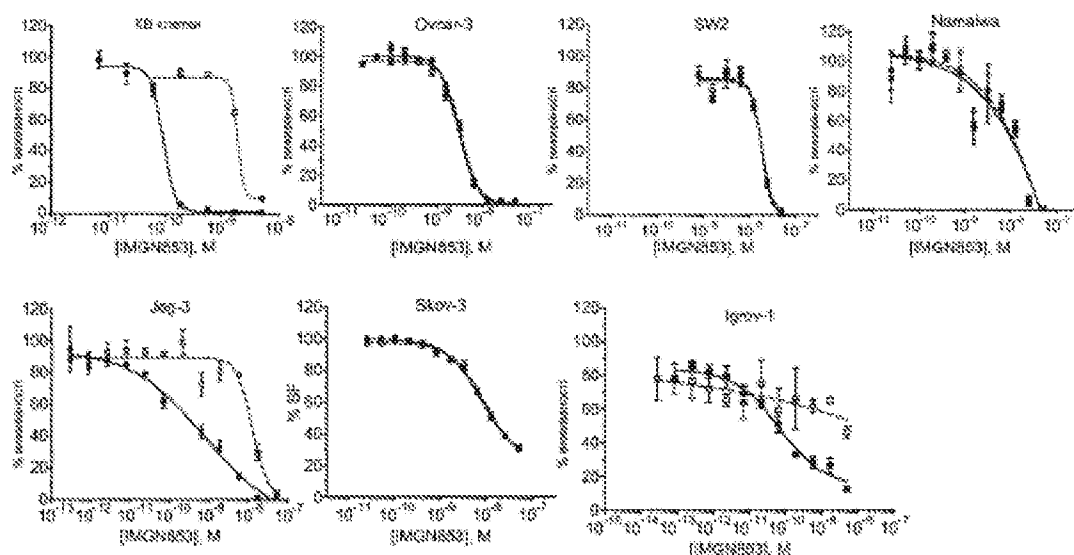


Fig. 19

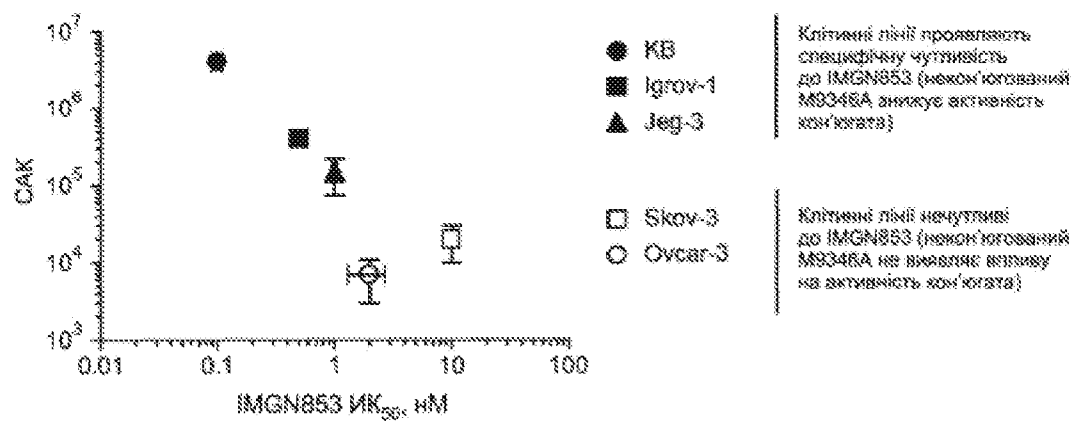
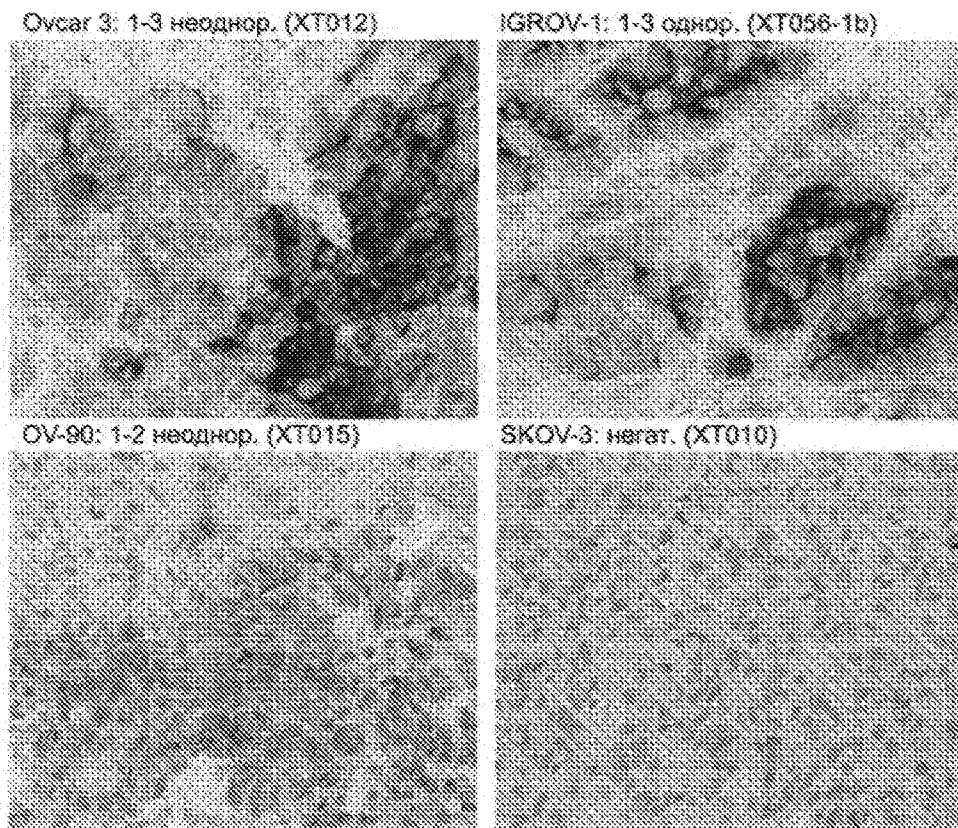


Fig. 20



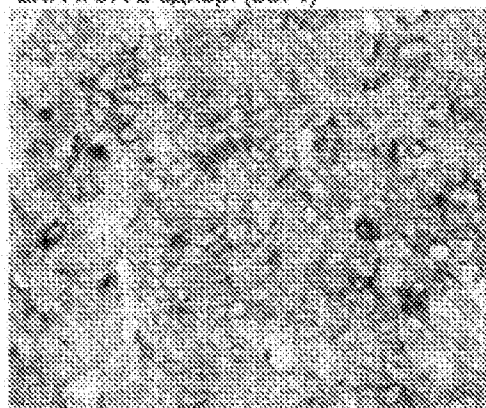
Фиг. 21

A. HMPD

NCI-H2110: 2-3 однор. (XT097)

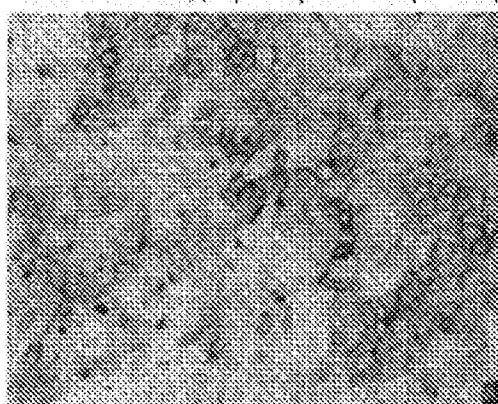


LXFA737: 2 однор. (5374)



B. Карцинома ендометрія

Ishikawa: 2 неоднор./ 3 фокальн. (XT054)



C. Карцинома шийки матки

KB: 3 однор. (XT005)

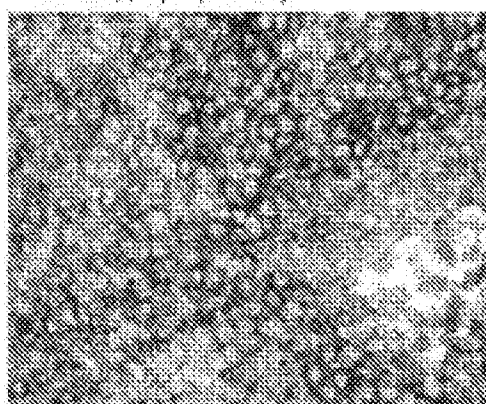
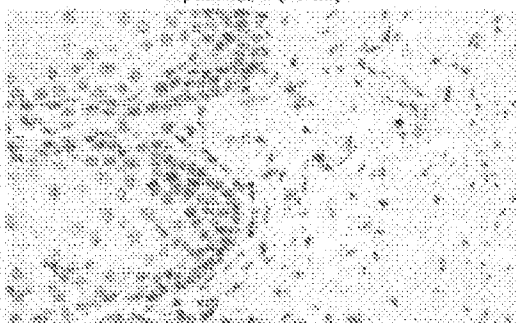


Fig. 22

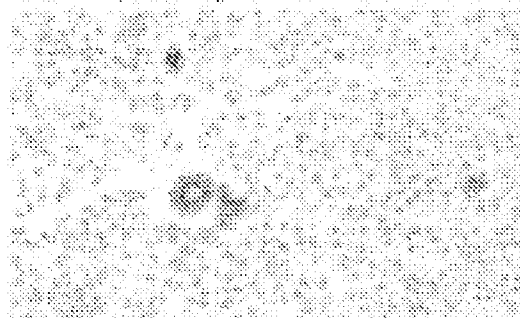
Стравохід, 0 (негат.)



Слина залоза, проміжні протоки: 1-2 неоднор.



Легеня, дихальний епітелій: 2 однор.



Підшлункова залоза, протоки: 3 однор.

Fig. 23

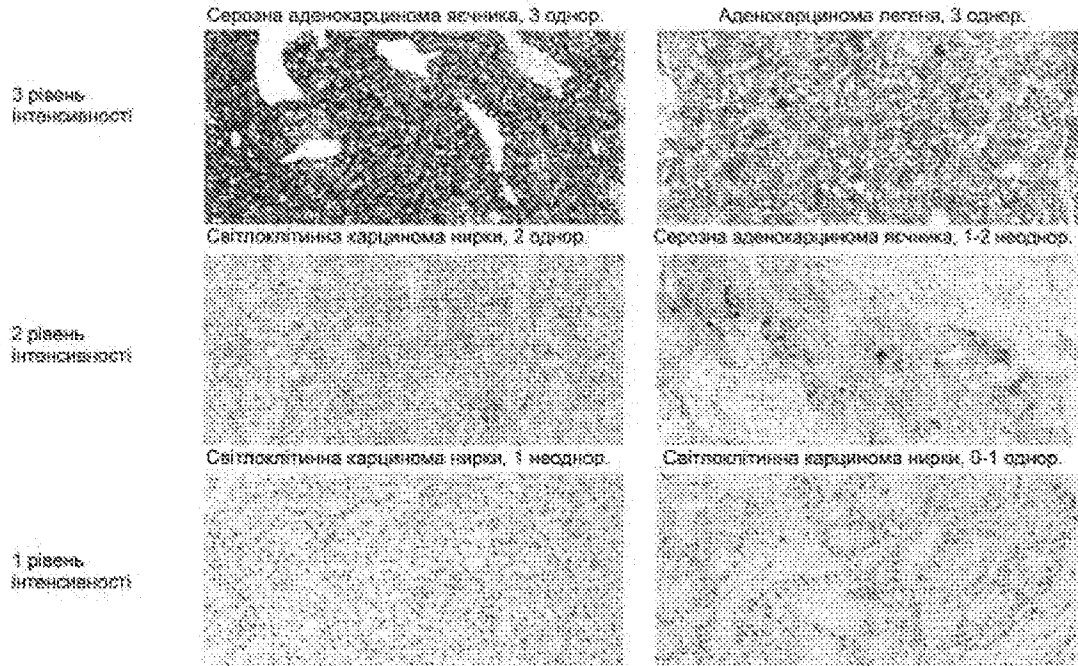


Fig. 24

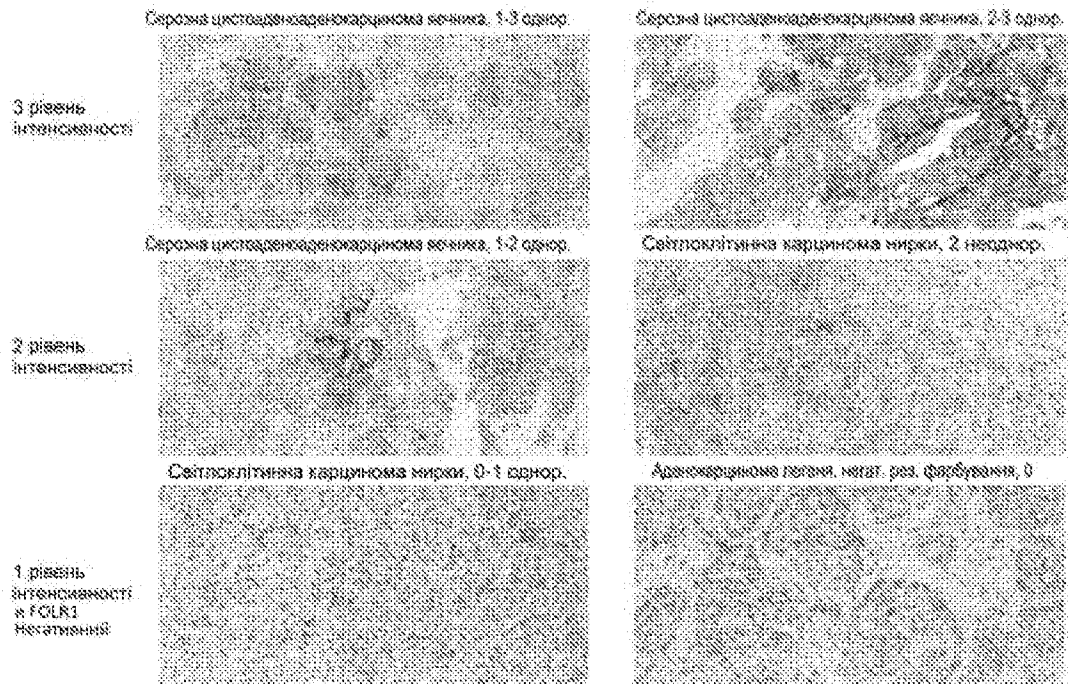


Fig. 25

