



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108743965 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201810367278.0

(22)申请日 2012.03.30

(30)优先权数据

61/471,007 2011.04.01 US

(62)分案原申请数据

201280015187.1 2012.03.30

(83)生物保藏信息

PTA-10772 2010.04.07

PTA-10773 2010.04.07

PTA-10774 2010.04.07

(71)申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 克里斯蒂娜·N·卡里根

凯瑟琳·R·怀特曼

吉利恩·佩恩 沙龙·拉德

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 樊英如 邱晓敏

(51)Int.Cl.

A61K 47/68(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书39页 附图25页

(54)发明名称

用于增加FOLR1癌症治疗的功效的方法

(57)摘要

本文提供了提高靶向人叶酸受体1的癌症治疗的成功率的方法。还提供了包括适用于所述方法的试剂的试剂盒。

1. 一种用于增加使用抗叶酸受体1 (FOLR1) 抗体或抗FOLR1免疫缀合物进行癌症治疗的功效的方法,所述方法包括对患有癌症的受试者施用抗FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物,其中已经使用检测方法检测了在来自所述受试者的癌症样本中增加的FOLR1基因或蛋白质表达,所述检测方法相对于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达FOLR1的癌症样本中的染色强度或染色均匀度。

用于增加FOLR1癌症治疗的功效的方法

[0001] 本申请是申请日为2012年3月30日、中国专利申请号为 201280015187.1 (国际申请号为PCT/US2012/031544)、发明名称为“用于增加FOLR1癌症治疗的功效的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年4月1日提交的美国临时申请号61/471,007 的权益,所述专利申请以引用方式并入本文。

[0004] 发明背景

发明领域

[0005] 本发明领域总体上涉及增加治疗其特征在于人叶酸受体 1 (FOLR1) 过度表达的癌症的功效。更确切地说,本发明涉及对容易患有或者诊断患有癌症的患者的更有效治疗,其中如通过用FOLR1 拮抗剂(例如FOLR1免疫缀合物)进行基因表达测定所确定的,肿瘤细胞过度表达FOLR1。

背景技术

[0006] 癌症是发达国家中死亡的主导原因之一,仅在美国每年就有超过一百万人诊断患有癌症并且有500,000例死亡。总的来说,估计超过三分之一的人会在他们的一生中出现某种形式的癌症。癌症有200多种不同类型,其中四种——乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌和前列腺癌——占有所有新发病例的一半以上(Jemal等,2003,Cancer J.Clin.53:5-26)。

[0007] 叶酸受体1 (FOLR1) 也被称为叶酸受体- α 或叶酸结合蛋白,是在细胞质膜上表达的N-糖基化蛋白。FOLR1具有对叶酸和若干还原的叶酸衍生物的高亲和力。FOLR1介导了生理叶酸即5-甲基四氢叶酸向细胞内部的递送。

[0008] FOLR1在绝大多数的卵巢癌以及在很多子宫癌、子宫内膜癌、胰腺癌、肾癌、肺癌和乳腺癌中过度表达,而在正常组织上的FOLR1 表达仅限于肾近端小管、肺的肺泡肺细胞、膀胱、睾丸、脉络丛以及甲状腺中的上皮细胞顶端膜上(Weitman SD等,Cancer Res 52:3396-3401(1992);Antony AC,Annu Rev Nutr 16:501-521(1996);Kalli KR等,Gynecol Oncol 108:619-626(2008))。FOLR1的这种表达模式使其成为FOLR1引导的癌症治疗的理想靶标。

[0009] 因为卵巢癌在晚期之前通常是无症状的,所以它经常是在晚期被诊断出来,并且用目前可用的程序(通常是手术减积之后的化学治疗药物)治疗时具有不良预后(von Gruenigen V等,Cancer 112: 2221-2227(2008);Ayhan A等,Am J Obstet Gynecol 196: 81 e81-86 (2007);Harry VN等,Obstet Gynecol Surv 64:548-560(2009))。因此,对用于卵巢癌的更有效治疗剂存在明显的尚未满足的医疗需求。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明基于在肿瘤组织中的FOLR1表达的动态范围的发现以及以下发现:具有增加的FOLR1表达水平的肿瘤对用抗FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物进行的治疗更具反应

性。本发明有利地允许治疗对以下治疗具有更大的反应可能性的患者：所述治疗通过对发现具有增加的FOLR1表达水平的患者施用治疗剂即抗FOLR1抗体或抗 FOLR1免疫缀合物来进行。

[0012] 本发明提供一种用于确认倾向于对叶酸受体1 (FOLR1) 靶向性抗癌治疗剂有良好反应的受试者的方法,所述方法包括检测来自所述受试者的组织样本中的FOLR1表达。

[0013] 本发明还提供一种用于增加癌症治疗效力的可能性的方法,所述方法包括对受试者施用治疗有效剂量的FOLR1靶向性抗癌治疗剂,其中已经发现来自所述受试者的组织样本中的FOLR1表达有所增加。

[0014] 本发明还提供一种用于预测低剂量癌症治疗的效力的方法,所述方法包括对受试者施用治疗有效剂量的FOLR1靶向性抗癌治疗剂,其中已发现所述受试者在样本中具有增加的FOLR1表达。

[0015] 在一个实施方案中,所述方法是针对卵巢癌、非小细胞肺腺癌(包括细支气管肺泡癌)、肾癌和子宫内膜癌。

[0016] 在一个实施方案中,FOLR1表达的程度和均匀度通过免疫组织化学法(IHC)、流式细胞术或核酸杂交来检测。在另一个实施方案中,FOLR1表达的水平通过免疫组织化学法来检测。IHC的非限制性实例包括区分不同水平的FOLR1的IHC方法和校准的IHC方法,如本文所述的那些。FOLR1表达可以使用适当的评分系统来评分,所述评分系统包括但不限于本文所述的评分方法。例如,FOLR1表达可以使用包括染色强度为0、1、2、3和3+范围的校准的IHC方法来评分,其中0是最低水平的染色强度并且3+是最高水平的染色强度。或者或此外,FOLR1表达可以使用包括染色均匀度的校准的IHC方法来评分,所述染色均匀度的范围为从局部(<25%的细胞被染色)、至异质(25-75%的细胞被染色)、至均质(>75%的细胞被染色),其中局部染色是最不均匀的染色并且均质是最均匀的染色。

[0017] 在另一个实施方案中,测量在样本(例如,肿瘤组织样本)中的 FOLR1表达并将其与一种或多种参考样本进行比较,并且来自受试者肿瘤、异种移植肿瘤或细胞系的组织样本中的FOLR1表达相对于所述一种或多种参考样本具有与表达程度和均匀度相关的FOLR1特异分数。在不同实例中,具有1、2、3或3+水平的FOLR1染色强度和均质染色模式的组织样本或细胞被认为具有增加的FOLR1表达;具有3水平的FOLR1染色强度和异质或局部染色模式的组织样本或细胞被认为具有增加的FOLR1表达。在另一个实施方案中,测量样本中的FOLR1表达并将其与一种或多种参考样本进行比较以确认可比的染色水平。在一个实施方案中,参考样本具有预先分配的IHC 分数和/或预先确定的每个细胞的抗原(或ABC)数目,并且样本组织的抗原或ABC数目可以基于所述比较来测定。

[0018] 在一个实施方案中,测量样本(例如,肿瘤组织样本)中的FOLR1 表达并将其与一种或多种对照样本进行比较,并且来自受试者肿瘤、异种移植肿瘤或细胞系的组织样本中的FOLR1表达相对于所述一种或多种对照样本具有与表达程度和均匀度相关的FOLR1特异分数。在一个实施方案中,将样本中的FOLR1表达与未展现或展现较低可检测的FOLR1表达的阴性对照样本进行比较。在另一个实施方案中,将样本中的FOLR1表达与具有增加的FOLR1表达(水平1、2、3或 3+)的阳性对照样本进行比较。在一些实施方案中,所述对照样本包括但不限于Namalwa、SW2、SW620、T47D、IGROV-1、300.19FR1、HeLa、或KB细胞。在具体实施方案中,所述对照样本包括来自叶酸受体转染的细胞的细胞或细胞团块(例如,

300.19FR1)。

[0019] 在一个实施方案中,FOLR1靶向性抗癌治疗剂是FOLR1免疫缀合物。在一个实施方案中,所述免疫缀合物包含抗FOLR1抗体、接头以及细胞毒素。

[0020] 在另一个实施方案中,所述抗FOLR1抗体是huMOV19。在另一个实施方案中,所述接头选自由以下组成的组:可裂解的接头、不可裂解的接头、亲水性接头和基于二羧酸的接头。在另一个实施方案中,所述接头选自由以下组成的组:4-(2-吡啶基二硫代)戊酸N-琥珀酰亚胺酯(SPP)或4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基戊酸N-琥珀酰亚胺酯(磺基-SPP);4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDB)或4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(磺基-SPDB);4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷羧酸N-琥珀酰亚胺酯(SMCC);4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷羧酸N-磺基琥珀酰亚胺酯(磺基SMCC);4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸N-琥珀酰亚胺酯(SIAB);以及N-琥珀酰亚胺基-[N-马来酰亚胺基丙酰胺基]-四乙二醇酯(NHS-PEG4-马来酰亚胺)。在另一个实施方案中,所述接头是4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(磺基-SPDB)。在另一个实施方案中,所述细胞毒性剂选自由以下组成的组:美登木素(maytansinoid)、美登木素类似物、苯二氮䓬类、紫杉烷类(taxoid)、CC-1065、CC-1065类似物、倍癌霉素(duocarmycin)、倍癌霉素类似物、卡奇霉素(calicheamicin)、多拉司他汀(dolastatin)、多拉司他汀类似物、奥里斯他汀(auristatin)、托马霉素(tomaymycin)衍生物以及来普霉素衍生物(leptomycin)或所述药剂的前药。在另一个实施方案中,所述细胞毒性剂是美登木素。在另一个实施方案中,所述细胞毒性剂是N(2')-脱乙酰基-N(2')-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(maytansine)或N(2')-脱乙酰基-N2-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素。在另一个实施方案中,所述细胞毒性剂是N(2')-脱乙酰基-N2-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。在又一个实施方案中,所述免疫缀合物包含抗体HUMOV19、磺基-SPDB和DM4(IMGN853)。

[0021] 本发明还针对一种用于测量受试者中的FOLR1表达的试剂盒,其包括FOLR1检测试剂和使用说明书。在一个实施方案中,所述FOLR1检测试剂包含FOLR1结合肽、蛋白质或分子探针(即核酸)。在另一个实施方案中,所述FOLR1检测试剂是抗FOLR1抗体。在另一个实施方案中,所述试剂盒进一步包括结合抗FOLR1抗体的二抗。在一个实施方案中,所述抗体以0.5至7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度、理想地0.9至3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度包括在内。在不同实施方案中,所述抗体包括以1.0 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.5 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.9 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.5 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.0 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.5 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或高达4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度包括在内。在另一个实施方案中,所述抗体以浓溶液包括在内,具有稀释说明以实现0.9至3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的最终浓度。在另一个实施方案中,所述试剂盒进一步包括选自由以下组成的组的检测试剂:酶、荧光团、放射性标记以及发光团。在另一个实施方案中,所述检测试剂选自由以下组成的组:生物素、地高辛(digoxigenin)、荧光素、氘以及罗丹明(rhodamine)。

[0022] 所述试剂盒还包括用于FOLR1表达的检测和评分的说明书。试剂盒还可以包括对照或参考样本。对照或参考样本的非限制性实例包括组织样本、细胞团块或细胞。对照或参考样本可以来源于组织培养细胞系(正常的或肿瘤的)、正常组织(正常对照)或肿瘤组织(阳性对照)样本。示例性细胞系包括SW620、T47D、IGROV-1、HELA、KB、JEG-3以及用表达FOLR1的表达载体稳定或瞬时地转染的细胞系(例如,300.19FR1)。本文描述了可在FOLR1表达的检测方法中用作正常的参考组织的示例性组织并且所述示例性组织包括正常的肺、唾

液腺和胰腺。

[0023] 本发明还针对一种用于确认癌症可能对抗FOLR1抗体或抗 FOLR1免疫缀合物有反应的方法,其包括:(a)使包含来自所述癌症的细胞的生物样本与结合细胞表面上FOLR1蛋白的药剂接触;(b)检测结合在(a)的所述生物样本的细胞表面上的FOLR1蛋白的所述药剂的结合;(c)将分数分配给步骤(b)的所述结合,其中所述分数基于与一种或多种参考样本的比较来分配;以及(d)将步骤(c)中的所述分数与参考组织或细胞的分数进行比较,其中所述癌症FOLR1水平的分数大于正常或低FOLR1表达的参考样本的分数、或者所述癌症FOLR1水平的分数等于或大于高FOLR1表达的参考样本的分数,则确认所述癌症可能对抗FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物有反应。在某些实施方案中,所述癌症是卵巢癌或肺癌。

[0024] 本发明还针对一种确认肿瘤对用抗FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物进行的治疗敏感的方法,所述方法包括:(a)测量从所述肿瘤获得的肿瘤组织样本中FOLR1表达的水平,其中所述测量包括使用相对于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达 FOLR1的癌症样本中的染色强度或染色均匀度的检测方法;(b)确定所述肿瘤组织样本的FOLR1染色强度的分数;以及(c)将在步骤(b)中确定的FOLR1染色强度分数与通过测量至少一种参考样本中 FOLR1蛋白表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用抗FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物进行的治疗不敏感的组织、细胞、或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述样本的FOLR1染色强度分数高于所述相对值,则确认所述肿瘤对用抗 FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物进行的治疗敏感。在某些实施方案中,所述检测方法手动执行或使用自动化系统来执行。在一个实施方案中,所述检测方法是IHC。在另一个实施方案中,所述IHC是可以区分不同水平的FOLR1表达的校准的IHC。

[0025] 本发明还针对一种用抗FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物来为患有肺癌或卵巢癌的受试者优化治疗方案的方法,所述方法包括:(a)使来自所述受试者的所述样本与特异性地结合细胞表面FOLR1的抗体接触;(b)使用检测方法来测量(a)中的所述抗体对所述样本中的所述细胞表面FOLR1的结合并且将染色分数分配给所述样本,所述检测方法可以相对于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达FOLR1的癌症样本中的染色强度或染色均匀度;以及(c)当步骤(b)中的分数小于或等于正常或低FOLR1表达的参考样本的分数时施用高剂量的抗FOLR1免疫缀合物、或者当所述分数大于正常或低FOLR1表达的参考样本的分数时施用低剂量的抗FOLR1免疫缀合物。

[0026] 本发明还针对一种检测来自受试者的肿瘤组织样本中癌细胞上的细胞表面FOLR1表达的方法,所述方法包括:(a)获得肿瘤组织样本,其中所述癌症样本是福尔马林固定石蜡包埋的;(b)使所述样本与特异性地结合细胞表面FOLR1的抗体接触;(c)使用检测方法测量(b)中的所述抗体对所述肿瘤组织样本中的所述细胞表面FOLR1的结合,所述检测方法可以相对于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达FOLR1的癌症样本中的染色强度或染色均匀度;以及(d)在将所述肿瘤组织样本中的细胞表面FOLR1染色强度或染色均匀度的水平与一种或多种参考样本进行比较之后,将FOLR1 表达分数分配给所述FOLR1。

[0027] 本发明还针对一种确认患有肺癌或卵巢癌的受试者可能对低剂量抗FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物治疗方案有反应的方法,所述方法包括:(a)使包含来自所述卵巢癌或肺癌的细胞的生物样本与结合细胞表面FOLR1蛋白的药剂接触;(b)检测所述药剂对(a)的

所述生物样本的结合；(c) 将分数分配给步骤 (b) 的所述结合，其中所述分数基于与一种或多种参考样本的比较来分配；以及 (d) 将步骤 (c) 中的所述分数与参考组织或细胞的分数进行比较，其中所述卵巢癌或肺癌 FOLR1 水平的分数大于正常或低 FOLR1 表达的参考样本的分数、或者所述卵巢癌或肺癌 FOLR1 水平的分数等于或大于高 FOLR1 表达的参考样本的分数，则确认所述卵巢癌或肺癌可能对低剂量抗 FOLR1 抗体或抗 FOLR1 免疫缀合物有反应。在某些实施方案中，所述方法进一步包括对所述受试者施用治疗有效量的人源化抗 FOLR1 抗体或抗 FOLR1 免疫缀合物。

[0028] 附图简述

[0029] 图1. 手动染色方法：抗 FOLR1 抗体检测转染细胞中的 FOLR1 表达。将 300.19 细胞用编码人 FOLR1 的多核苷酸转染。使用鼠抗体 BN3.2 检测 FOLR1 蛋白表达。Smith AE 等, Hybridoma (Larchmt). 2007 年 10 月; 26 (5): 281-8。

[0030] 图2. 手动染色方法：抗 FOLR1 抗体可以区分不同水平的 FOLR1 表达。将抗体 BN3.2 用于检测不同异种移植细胞中的 FOLR1 表达。BN3.2 抗体的检测限度大约是每个细胞结合 4000 个抗体 (ABC)。

[0031] 图3. 手动染色方法：抗 FOLR1 抗体可以区分组织样本中不同水平的 FOLR1 表达。将 BN3.2 用于检测卵巢肿瘤 (A) 以及非小细胞肺癌肿瘤 (B) 二者中的 FOLR1 表达。

[0032] 图4. 手动染色方法：在卵巢肿瘤和 NSCLC 肿瘤中的均匀的 FOLR1 表达。FOLR1 表达在很多测试的卵巢癌以及肺腺癌和细支气管肺泡癌中较高。大部分卵巢癌样本在浆液细胞或子宫内膜样细胞中具有最高的染色强度。在 NSCLC 肿瘤中，在细支气管肺泡癌和乳头状腺癌中发现最高的 ABC 值。

[0033] 图5. 手动染色方法：FOLR1 表达大体上局限在 NSCLC 细胞的膜上。高分辨率显微术显示大部分 FOLR1 染色局限于 NSCLC 肿瘤中的膜上。

[0034] 图6. 手动染色方法：FOLR1 表达大体上局限在卵巢癌细胞的膜上。高分辨率显微术显示大部分 FOLR1 染色局限于卵巢肿瘤中的膜上。

[0035] 图7. 在 KB 异种移植模型中 huMov19 靶向的缀合物的体内功效。使用所建立的皮下植入到 SCID 小鼠中的 KB 细胞的异种移植模型来测试与非 FOLR1 靶向性 huC242-SPDB-DM4 (D) 相比的 FOLR1 靶向性可裂解缀合物 huMov19-SPDB-DM4 (B)、以及与非靶向性 huC242-PEG4Mal-DM4 (E) 相比的不可裂解缀合物 huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C)。由 huMov19 靶向 FOLR1 导致平均肿瘤体积的显著减小。

[0036] 图8. 在 OVCAR-3 人卵巢癌异种移植物中 IMG853 处理的剂量-反应抗肿瘤活性。通过单次静脉内注射 1.2mg/kg、2.5mg/kg 或 5.0 mg/kg 的 IMG853 来处理小鼠。对照组的动物接受 PBS 的单次静脉内注射。

[0037] 图9. 在 IGROV-1 人卵巢癌异种移植物中 IMG853 处理的剂量-反应抗肿瘤活性。通过单次静脉内注射 1.2mg/kg、2.5mg/kg 或 5.0 mg/kg 的 IMG853 来处理小鼠。对照组的动物接受 PBS 的单次静脉内注射。

[0038] 图10. 在 OV-90 人卵巢癌异种移植物中 IMG853 处理的剂量-反应抗肿瘤活性。通过单次静脉内注射 1.2mg/kg、2.5mg/kg 或 5.0 mg/kg 的 IMG853 来处理小鼠。对照组的动物接受 PBS 的单次静脉内注射。

[0039] 图11. 在 SKOV-3 人卵巢癌异种移植物中 IMG853 处理的剂量-反应抗肿瘤活性。通

过单次静脉内注射1.2mg/kg、2.5mg/kg或5.0 mg/kg的IMGN853来处理小鼠。对照组的动物接受PBS的单次静脉内注射。

[0040] 图12.在KB人宫颈腺癌异种移植物中IMGN853处理的剂量-反应抗肿瘤活性。通过单次静脉内注射1.0mg/kg、2.5mg/kg或5.0 mg/kg的IMGN853来处理小鼠。对照组的动物接受PBS的单次静脉内注射。

[0041] 图13.自动化染色方法:代表性照片和直方图描绘了通过IHC和流式细胞术测得的细胞系中的FOLR1表达。SW620、T47D、Igrov-1、300.19/FR1、HeLa以及KB细胞均进行FOLR1染色强度和均匀度的评分。SW630和IGROV-1细胞被评分为1-3异质、T47D被评分为1-2异质、HeLa被评分为2-3异质,而300.19/FR1和KB被评分为3均质。

[0042] 图14.自动化染色方法:在浆液性卵巢癌中的代表性FOLR1染色。通过IHC,来自浆液性卵巢癌的组织切片显示了展现3均质、2-3均质、2均质以及2异质染色的染色模式。

[0043] 图15.自动化染色方法:在子宫内膜样卵巢癌中的代表性FOLR1染色。通过IHC,来自子宫内膜样癌的组织切片显示了展现3均质、2-3均质、3局部以及1-2异质染色的染色模式。

[0044] 图16.自动化染色方法:在腺癌亚型(细支气管肺泡癌除外)的NSCLC中的代表性FOLR1染色。通过IHC,来自非小细胞肺癌、腺癌亚型的组织切片显示了展现3均质、2-3均质、2异质、2均质以及1-2异质染色的染色模式。

[0045] 图17.自动化染色方法:在子宫内膜腺癌中的代表性FOLR1染色。通过IHC,来自子宫内膜腺癌的组织切片显示了展现3异质、2异质以及1异质染色的染色模式。

[0046] 图18.自动化染色方法:在肾透明细胞癌中的代表性FOLR1染色。通过IHC,来自肾细胞癌的组织切片显示了展现2均质、2异质以及1异质染色的染色模式。

[0047] 图19.IMGN853在体外的细胞毒性活性。分析了五种FOLR1阳性细胞系(KB、IGROV-1、JEG-3、SKOV-3和OVCAR-3)和两种FOLR1阴性细胞系(Nama1wa和SW2)对IMGN853的细胞毒性作用的敏感性。使细胞持续5天暴露于IMGN853(实线)或暴露于IMGN853加上0.5 μM非缀合huMov19(M9346A)(虚线),并且通过基于WST-8的测定来确定细胞存活率。示出了代表性数据。绘制了存活细胞的百分比与IMGN853浓度的以10为底的对数的关系图。

[0048] 图20.FOLR1阳性细胞系对IMGN853的敏感性与FOLR1表达水平的关系。分析了IMGN853针对具有广泛范围的FOLR1表达的FOLR1阳性细胞系的效力和特异性。将细胞系与IMGN853一起孵育,并且KB、Igrov-1和Jeg-3对IMGN853特别敏感,而非缀合的huMov19(M9346A)显示缀合物的降低的活性。Skov-3和Ovcar-3对IMGN853不敏感并且非缀合的huMov19(M9346A)不改变缀合物的活性。

[0049] 图21.自动化染色方法:对于FOLR1的染色的卵巢癌异种移植功效模型。通过IHC,来自卵巢癌异种移植物的组织切片显示了展现1-3异质(Ovcar 3)、1-3均质(Igrov 1)、1-2异质(Ov 90)以及阴性(SKOV 3)的染色模式。

[0050] 图22.自动化染色方法:小鼠异种移植模型。示出了NSCLC(A)、子宫内膜癌(B)和宫颈癌(C)细胞系的异种移植物中的FOLR1染色模式。NSCLC样本展现2-3均质或2均质染色,子宫内膜癌展现2异质/3局部染色,并且宫颈癌展现3均质染色。

[0051] 图23.测定对照组织的自动化染色指南。如通过自动化IHC所测定,示出了阴性(食管0)和阳性对照样本(唾液腺1-2异质、肺2均质、胰腺3均质)的染色模式。

[0052] 图24. 肿瘤组织的自动化染色指南。如通过自动化IHC所测定, 在对照组织上示出了3级、2级和1级染色的代表性染色模式。

[0053] 图25. 肿瘤组织的自动化染色指南。如通过自动化IHC所测定, 在对照组织上示出了3级、2级、和1级/阴性染色的代表性染色模式。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明提供用于增加治疗其特征在于FOLR1过度表达的癌症的功效或者增加所述癌症对所述治疗的反应可能性的方法。本发明基于相对于正常组织的在肿瘤组织中FOLR1表达的动态范围的发现以及以下发现: 具有增加水平的FOLR1表达的肿瘤对用抗FOLR1抗体或抗FOLR1免疫缀合物进行的治疗更具反应性。我们还发现了在自动化方法和手动方法之间动态范围的敏感性和检测的差异。进一步提供包括适用于实践本发明方法的一种或多种试剂的试剂盒。

[0056] I. 定义

[0057] 为了有助于本发明的理解, 在下文中定义了一些术语和短语。

[0058] 如本文使用的术语“人叶酸受体1”或“FOLR1”除另外指明外, 是指任何天然的人FOLR1。术语“FOLR1”涵盖了“全长的”未加工的 FOLR1以及由细胞内的加工所引起的任何形式的FOLR1。所述术语还涵盖天然存在的FOLR1变体, 例如剪接变体、等位基因变体以及同工型。本文所述的FOLR1多肽可以从多种来源如人组织类型或另一种来源中分离, 或者通过重组或合成的方法来制备。FOLR1序列的实例包括但不限于NCBI参考号P15328、NP_001092242.1、AAX29268.1、AAX37119.1、NP_057937.1以及NP_057936.1, 以及在SEQ ID NO:1和2中所示的那些。

[0059] 术语FOLR1的“增加的表达”是指含有升高的FOLR1表达水平的样本。在一个实例中, FOLR1表达通过IHC来测量并且通过与显示限定分数的对照(例如校准的对照)进行比较来给出染色强度分数或染色均匀度分数(例如如果强度与3级的校准的对照可比则将3分的强度分数给予测试样本、或者如果强度与2级的校准的对照可比则将2分的强度给予测试样本)。例如, 通过免疫组织化学法测得的1、2、3或3+或更大的分数指示增加的FOLR1表达。异质或均质的染色均匀度也指示增加的FOLR1表达。染色强度和染色均匀度分数可以单独或组合(例如, 2均质、2异质、3均质、3异质等)使用。在另一个实例中, FOLR1表达的增加可以通过检测相对于对照值(例如, 在来自未患有癌症或患有FOLR1值未升高的癌症的受试者组织或细胞中的表达水平)至少2倍、至少3倍或至少5倍)的增加来测定。

[0060] “参考样本”可以用于关联并比较以本发明的方法从测试样本中获得的结果。参考样本可为细胞(例如, 细胞系、细胞团块)或组织。在“参考样本”中的FOLR1水平可为FOLR1的绝对量或相对量、一个范围的量、最小和/或最大量、平均量和/或中位量。本发明的诊断方法涉及测试样本中的FOLR1表达水平与“参考值”之间的比较。在一些实施方案中, 所述参考值是参考样本中的FOLR1表达水平。参考值可为预先确定的值并且还可以从与测试样本同时进行测试的参考样本(例如对照生物样本)来测定。参考值可为单一截止值, 如中位值或平均值或一个范围的值, 如置信区间。可以为个体的不同亚组建立参考值, 所述个体如易患癌症的个体、患有早期或晚期癌症的个体、男性和/或女性个体、或者经受癌症治疗的个体。本文描述了正常参考样本或值和阳性参考样本或值的实例。

[0061] 在一些实施方案中, 所述参考样本是来自健康组织、特别是不受癌症影响的相应

组织的样本。这些类型的参考样本被称为阴性对照样本。在其它实施方案中,所述参考样本是来自表达FOLR1的肿瘤组织的样本。这些类型的参考样本被称为阳性对照样本。阳性对照样本还可以用作与FOLR1表达水平相关的染色强度的均匀度(异质对均质)和/或程度(1、2、3、3+)的比较指标。阳性对照比较样本还可以被称为展现染色强度或均匀度动态范围的校准的参考样本。如实施例1至9所示,无FOLR1表达的参考样本包括人食管组织;低FOLR1参考包括唾液腺(特别是闰管)和肺(特别是呼吸上皮)组织;并且高FOLR1表达的组织包括胰腺(特别是胰管细胞)。对于细胞系,低表达者包括但不限于OVCAR3和T47D,中等表达者包括但不限于SW620、IGROV-1、JEG3,并且高表达者包括但不限于KB和IGROV1。特别理想的阳性高FOLR1参考是用叶酸受体1稳定或瞬时转染的细胞系(例如,300.19/FR1)。用于特定癌症的适当阳性和阴性参考的FOLR1水平可以通过测量一个或多个适当受试者中的FOLR1水平来确定,并且可以为受试者的特定人群来定制这些参考水平(例如,参考水平可为年龄相匹配的,以使得可以在来自一定年龄的受试者的样本中的FOLR1水平与一定年龄组中关于特殊疾病状态、表型或其缺乏的参考水平之间作出比较)。可以为用于测量生物样本中的FOLR1水平的特定技术(例如,免疫测定法等)定制这些参考水平,其中FOLR1水平可以基于所使用的所述特定技术而不同。

[0062] 在本文中术语“一抗”是指特异性地结合组织样本中的靶蛋白抗原的抗体。一抗通常是免疫组织化学(IHC)程序中使用的的第一种抗体。在一个实施方案中,所述一抗是在IHC程序中使用的唯一抗体。本文中的术语“二抗”是指特异性地结合一抗从而在一抗与后续试剂(如果有的话)之间形成桥的抗体。所述二抗通常是免疫组织化学程序中使用的的第二种抗体。

[0063] 在具体实施方案中,本发明的“样本”或“生物样本”来源于生物,例如来自真核生物。在优选实施方案中,所述样本是人样本,但是动物样本也可以用于本发明的实践中。用于在本发明中使用的样本的非限制性来源例如包括实体组织、活检抽吸物、腹水、流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤的外部切片、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、泪液、唾液、乳汁、肿瘤、器官、细胞培养物和/或细胞培养物成分。本发明特别适用于癌症样本,所述癌症样本大体上包含实体组织样本或其中可用材料量很少的其它体液如腹水。所述方法可以用于检测FOLR1的表达方面或样本的状态,包括但不限于:比较细胞或组织的不同类型、比较不同发育阶段、以及检测或确定疾病或异常的存在和/或类型。

[0064] 出于本文的目的,组织样本的“切片”是指组织样本的单一部分或一片,例如从组织样本切下的组织薄片或细胞。应了解,根据本发明可以取得组织样本的多个切片并对其进行分析。在一些情况下,所选择的组织部分或切片包括同源细胞群。在其它情况下,所选择的部分包括组织的一个区域,例如作为非限制性实例的管腔。例如,所选择的部分可以像一个细胞或两个细胞那样小,或者可以代表成千上万个细胞。在大多数情况下,细胞的收集是重要的,并且虽然已经描述了本发明用于在细胞组分的检测中使用,但所述方法还可以用于检测生物的非细胞组分(例如作为非限制性实例的在血液中的可溶性组分)。

[0065] 通过“关联(correlate)”或“关联(correlating)”意指以任何方式对第一次分析的性能和/或结果与第二次分析的性能和/或结果进行比较。例如,可以将第一次分析的结果用于执行第二次分析、和/或可以将第一次分析的结果用于确定是否应该进行第二次分析、和/或可以将第一次分析的结果与第二次分析的结果进行比较。在一个实施方案中,增

加的FOLR1表达与FOLR1靶向性抗癌治疗的增加的效力可能性相关联。

[0066] 术语“抗体”意指通过在免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点来识别并特异性地结合靶标(如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述的组合)的所述免疫球蛋白分子。如本文使用的术语“抗体”涵盖了完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体(如由至少两个完整抗体产生的双特异性抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白,以及包含抗原识别位点的任何其它修饰的免疫球蛋白分子,只要所述抗体显示所需的生物活性。抗体可为以下五种主要类别的免疫球蛋白中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM(基于其重链恒定区的鉴定而分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ),或其亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。不同类别的免疫球蛋白具有不同的且众所周知的亚单位结构和三维构型。抗体可为裸的或者与其它分子如毒素、放射性同位素等缀合。

[0067] “封闭性”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或减小其结合的抗原如 FOLR1的生物活性的抗体。在某个实施方案中,封闭性抗体或拮抗剂抗体大致上或完全抑制抗原的生物活性。理想地,生物活性降低 10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0068] 术语“抗FOLR1抗体”或“结合FOLR1的抗体”是指能够以足够的亲和力结合FOLR1的抗体,所述结合使得抗体适用于在靶向FOLR1 中作为诊断剂和/或治疗剂。抗FOLR1抗体与不相关的非FOLR1蛋白的结合程度小于约10%的抗体与FOLR1的结合,如例如通过放射性免疫测定法(RIA)所测定的。在某些实施方案中,结合FOLR1的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。抗FOLR1抗体的实例在本领域中已知并且公开在美国申请公布号 2012/0009181中,所述申请以引用方式并入本文。

[0069] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和 Fv片段、线性抗体、单链抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0070] “单克隆抗体”是指涉及单一抗原决定簇或表位的高特异性识别和结合的同质性抗体群。这与通常包含针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体形成对照。术语“单克隆抗体”涵盖完整单克隆抗体和全长单克隆抗体二者以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白、和包含抗原识别位点的任何其它修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指以任何数量的方式形成的这些抗体,包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达以及转基因动物。

[0071] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可互换使用并且是指能够被特定抗体识别并特异性结合的抗原的部分。当所述抗原是多肽时,可以由连续氨基酸和通过蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸来形成表位。由连续氨基酸形成的表位通常在蛋白质变性时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在蛋白质变性时丧失。在独特的空间构象中,表位通常包含至少3个并且更通常至少5个或8-10个氨基酸。

[0072] “结合亲和力”总体上是指一个分子(例如,抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价键相互作用的总数的强度。除非另外指明,否则如本文使用的“结合亲和力”是指反映了结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以通过解离常数(Kd)来表示。可以通过本领域

域已知的常用方法来测量亲和力,包括本文所述的那些方法。低亲和力抗体通常结合抗原较慢并且倾向于容易解离,而高亲和力的抗体通常结合抗原更快并且倾向于更长时间保持结合。测量结合亲和力的多种方法在本领域已知,其中的任何方法可以用于本发明的目的。具体的说明性实施方案在下文进行描述。

[0073] 在本文中提及结合亲和力时使用的“或更好”是指在分子与其结合配偶体之间更强的结合。在本文中使用的“或更好”是指更强的结合,由更小的数字Kd值来表示。例如,对抗原具有“0.6nM或更好”的亲和力的抗体,所述抗体对抗原的亲和力是<0.6nM,即0.59nM、0.58nM、0.57nM等,或小于0.6nM的任何值。

[0074] 如本文使用的短语“大致上相似”或“大致上相同”表示在两个数值(通常一个数值与本发明的抗体相关并且另一个数值与参考/比较抗体相关)之间的足够高的相似度,以使得本领域技术人员将会认为在通过所述值(例如,Kd值)测量的生物学特性的背景下这两个值之间的差异几乎没有或没有生物学和/或统计性显著性。所述两个值之间的差异随着参考/比较抗体的值的变化而小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%。

[0075] 被“分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是处于在自然界未发现的形式多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已纯化到不再处于它们在自然界被发现的形式的程度的那些。在一些实施方案中,被分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是大致上纯的。

[0076] 如本文使用的“大致上纯的”是指至少50%纯的(即没有污染物)、至少90%纯的、至少95%纯的、至少98%纯的或至少99%纯的。

[0077] 如本文使用的术语“免疫缀合物”或“缀合物”是指连接细胞结合剂(即抗FOLR1抗体或其片段)并由以下通式定义的化合物或其衍生物:C-L-A,其中C=细胞毒素,L=接头,并且A=细胞结合剂或抗FOLR1抗体或抗体片段。免疫缀合物还可以由以下相反顺序的通式来定义:A-L-C。

[0078] “接头”是能够将化合物(通常是药物,如美登木素)以稳定的共价方式连接细胞结合剂如抗FOLR1抗体或其片段的任何化学部分。在化合物或抗体保持活性的条件下,接头可以易感于或大致上抵抗酸诱导的裂解、光诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、酯酶诱导的裂解以及二硫键裂解。合适的接头在本领域众所周知并且包括例如二硫基、硫醚基、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团以及酯酶不稳定基团。接头还包括如本文所述的和在本领域已知的带电接头及其亲水形式。

[0079] 术语“癌”和“癌的”是指或描述其中细胞群具有未调节的细胞生长的特征的哺乳动物中的生理状况。癌的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤以及白血病。这些癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌(liver cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)以及各种类型的头颈部癌。

[0080] “肿瘤(Tumor)”和“赘生物(neoplasm)”是指由过度细胞生长或增殖所引起的任何质量的组织,是良性的(非癌的)抑或恶性的(癌的),包括癌前病变。

[0081] 术语“癌细胞”、“肿瘤细胞”以及语法同等术语是指来源于肿瘤或癌前病变的总细胞群,包括非致瘤性细胞(包括肿瘤细胞群块)和致瘤性干细胞(癌干细胞)二者。如本文使用的术语“肿瘤细胞”当仅仅是指缺乏更新和分化能力的那些肿瘤细胞时,将由术语“非致瘤性”修饰,以区分那些肿瘤细胞和癌干细胞。

[0082] 术语“受试者”是指待成为具体治疗的接受者的任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类、啮齿类等。通常,提及人受试者时术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0083] 与一种或多种另外的治疗剂“联合”施用包括同时(并行)施用和以任何顺序的连续施用。

[0084] 术语“药物制剂”是指处于允许活性成分的生物活性有效的形式并且不含有对进行所述制剂施用的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制剂。这些制剂可为无菌的。

[0085] 本文所公开的抗体的“有效量”是足够执行特别说明的目的的量。根据所说明的目的,“有效量”可以凭经验并按常规方式来确定。

[0086] 术语“治疗有效量”是指有效“治疗”在受试者或哺乳动物中的疾病或病症的抗体或其它药物的量。在癌症的情况下,药物的治疗有效量可以减少癌细胞的数量;减小肿瘤的尺寸;抑制(即,在某种程度上减慢并且在某一实施方案中停止)癌细胞对周边器官的浸润;抑制(即,在某种程度上减慢并在某一实施方案中停止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤生长;和/或在某种程度上减轻与癌症有关的一种或多种症状。参见本文中“治疗”的定义。在药物可以防止生长和/或杀死现有的癌细胞的程度上,它可为细胞抑制的和/或细胞毒性的。在某些实施方案中,增加的FOLR1水平的确认允许施用减少量的 FOLR1靶向性治疗剂,以实现与更高剂量所见到的相同的治疗效果。“预防有效量”是指在剂量和持续时间上有效实现所需预防结果所需要的量。通常但不一定地,由于预防剂量在疾病前或在疾病早期阶段用于受试者,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0087] 术语“良好反应”通常是指在受试者中引起有利的状态。关于癌症治疗,所述术语是指在受试者身上提供治疗效果。在癌症中的积极治疗效果可以按许多方式来测量(参见, W.A.Weber, J.Nucl.Med. 50:1S-10S(2009))。例如,肿瘤生长抑制、分子标记物表达、血清标记物表达以及分子成像技术全部都可以用来评定抗癌治疗的治疗功效。关于肿瘤生长抑制,根据NCI标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被认为是高抗肿瘤活性水平,其中 $T/C(\%) = \text{处理物的中位肿瘤体积} / \text{对照物的中位肿瘤体积} \times 100$ 。

[0088] 词语“标记”当用于本文中时是指直接或间接与抗体缀合以便产生“标记的”抗体的可检测化合物或组合物。所述标记本身是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学变化。

[0089] “化学治疗剂”是适用于癌症治疗的化学化合物,不管其作用机制是什么。化学治疗剂的类别包括但不限于:烷化剂、抗代谢物、纺锤体毒物植物生物碱、细胞毒性/抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、抗体、光敏剂以及激酶抑制剂。化学治疗剂包括在“靶向治疗”和常规化学治疗中使用的化合物。

[0090] 例如“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“治疗(to treat)”、或“缓和(alleviating)”或“缓和(to alleviate)”的术语是指:1)治愈、减慢、减轻所诊断的病理状况或病症的症状和/或阻止其进展的治疗措施,和2)防止和/或减慢所靶向的病理状况或

病症的发展的预防性或防止性措施。因此,有治疗需要的那些受试者包括已经患有所述病症的那些;易患所述病症的那些;以及其中待防止所述病症的那些。在某些实施方案中,如果患者显示以下一种或多种,则受试者根据本发明的方法而成功“治疗”了癌症:恶病质减少、存活时间增加、肿瘤进展时间延长、肿瘤块减小、肿瘤负荷减小,和/或肿瘤转移时间、肿瘤复发时间、肿瘤反应、完全反应、部分反应、稳定疾病、进行性疾病、无进展生存期(PFS)、总生存期(OS)的延长,各自如通过由国家癌症研究所和批准新药的美国食品和药品管理局所设定的标准来测量。参见 Johnson等,(2003) J.Clin.Oncol.21(7):1404-1411。

[0091] “无进展存活期”(PFS)又被称为或“肿瘤进展时间”(YIP),表示在治疗之中和之后癌症不生长的时间长度。无进展存活期包括患者已经历完全反应或部分反应的时间量、以及患者经历稳定疾病的时间量。

[0092] “无病生存期”(DFS)是指在治疗之中或之后患者保持无病的时间长度。

[0093] “总生存期”(OS)是指相对于原初或未治疗的个体或患者而言预期寿命的延长。

[0094] 除非上下文另外明确规定,否则如本公开和权利要求书使用的单数形式“一个(a)”、“一种(an)”以及“所述(the)”包括复数形式。

[0095] 应了解,无论本文何处用语言“包括”来描述实施方案,都还提供以“由…组成”和/或“主要由…组成”的措辞来描述的其它相似实施方案。

[0096] 在本文中如短语“A和/或B”中使用的术语“和/或”旨在包括“A和 B”二者、“A或B”、“A”以及“B”。同样地,如短语“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下每种实施方案:A、B和C;A、B 或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独); B(单独);以及C(单独)。

[0097] II. 生物样本

[0098] 生物样本常常用固定剂来固定。通常使用醛固定剂如福尔马林(甲醛)和戊二醛。使用其它固定技术如醇浸渍(Battifora和Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095)来固定的组织样本也是合适的。所使用的样本还可以包埋在石蜡中。在一个实施方案中,组织样本既用福尔马林固定,又用石蜡包埋(FFPE)。在另一个实施方案中,FFPE 块在选择一个或多个部分用于分析之前用苏木精和曙红染色,以便为 FFPE核心样本选择特定区域。从这些微粒试样制备组织块的方法已经在以前的多种预后因子的IHC研究中使用、和/或对于本领域的技术人员是熟知的(参见,例如,Abbondanzo等,Am J Clin Pathol.1990 May;93(5):698-702;Allred等,Arch Surg.1990Jan;125(1):107-13)。

[0099] 简要来说,可以将任何完整的器官或组织切成相当小的片并在各种固定剂(例如,福尔马林、醇等)中孵育不同的时间段,直到所述组织被“固定”。样本实际上可为从身体中手术移除的任何完整的组织。可以将样本切成适合装在组织病理学实验室中常规使用的设备上的适度小的片。切割的片的尺寸范围通常从几毫米到几厘米。

[0100] III. 检测抗体缀合物

[0101] 本发明进一步提供通常是单克隆类型的抗FOLR1的抗体,其连接至少一种试剂以形成检测抗体缀合物。为了增加抗体分子作为诊断剂的功效,常规的是连接或共价结合或复合至少一个所需的分子或部分。这种分子或部分可为但不限于至少一个报道分子。报道分子被定义为可以使用测定来检测的任何部分。已经与抗体缀合的报道分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、光亲和分子、有色粒子和/或配体,例如生物素。

[0102] 具有足够选择性、特异性或亲和力的任何细胞结合剂(例如,抗体或多肽)可以用作检测FOLR1多肽的基础。这些性质可以使用本领域技术人员已知的常规免疫性筛选方法来评价。除了典型的抗原结合位点外,抗体分子中用于结合生物活性分子的位点还包括居于可以结合所述抗原的可变区内的位点。此外,所述可变区涉及抗体自结合(Kang等,1988)且含有由抗-抗体识别的表位(独特位)(Kohler等,1989)。

[0103] 蛋白质结合(例如,抗体)缀合物的某些实例为其中蛋白质结合剂(例如,抗体)连接可检测标记的那些缀合物。“可检测标记”为由于它们的特定功能性质和/或化学特性而可以检测的化合物和/或元素,其使用允许与其连接的抗体被检测,和/或如果需要则进一步被定量。

[0104] 很多适当的成像剂在本领域是已知的,用于它们连接抗体的方法也一样(参见,例如美国专利号5,021,236;4,938,948;和4,472,509,各自以引用方式并入本文)。所使用的成像部分可为例如顺磁离子;放射性同位素;荧光染料;NMR可检测的物质;和/或X-射线成像。

[0105] 被涵盖来作为蛋白质结合(例如,抗体)缀合物使用的示例性荧光标记包括例如Alexa 350、Alexa 430、Alexa 488、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、Dylight 488、异硫氰酸荧光素、绿色荧光蛋白(GFP)、HEX、6-JOE、俄勒冈绿(Oregon Green) 488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514、太平洋蓝(Pacific Blue)、藻红蛋白、REG、罗丹明绿、罗丹明红、四甲基罗丹明(TMR)、肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明、德克萨斯红(Texas Red)以及这些标记的衍生物(即卤化类似物、用异硫氰酸盐修饰或用于缀合的其它接头等)。示例性放射性标记是氚。

[0106] 涵盖在本发明中的蛋白质结合(例如,抗体)检测缀合物包括体外使用的那些,其中所述抗体连接第二结合配体和/或与显色底物接触时将产生有色产物的酶(例如,酶标签)。合适的酶的实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶和/或葡萄糖氧化酶。优选的第二结合配体是生物素和/或抗生物素蛋白以及链霉抗生物素蛋白化合物。这些标记的使用对于本领域技术人员是熟知的并且被描述在例如美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149 以及4,366,241中;各自以引用方式并入本文。

[0107] 含有叠氮基团的分子还可以通过经由低强度紫外线所产生的反应性氮宾中间体(Potter&Haley,1983)而用于与蛋白质形成共价键。具体来说,嘌呤核苷酸的2-和8-叠氮基类似物已用作定点光探针来识别在细胞粗提物中的核苷酸结合蛋白(Owens&Haley,1987;Atherton等,1985)。所述2-和8-叠氮基核苷酸还已用于绘制纯化蛋白的核苷酸结合区的图谱(Khattoon等,1989;King等,1989;以及Dholakia等,1989)并且可以用作抗体结合剂。

[0108] 用于抗体连接或缀合其缀合部分的若干方法在本领域是已知的。一些连接方法涉及金属螯合物的使用,例如采用连接所述抗体的有机螯合剂,如二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA);亚乙基三胺四乙酸;N-氯-对-甲苯磺酰胺;和/或四氯-3 α -6 α -二苯基甘脲-3(美国专利号4,472,509和4,938,948,各自以引用方式并入本文)。单克隆抗体还可以在偶联剂如戊二醛或高碘酸盐的存在下与酶反应。具有荧光素标记物的蛋白质结合(例如,抗体)缀合物在这些偶联剂存在下或通过与异硫氰酸盐反应来制备。在美国专利号4,938,948中,乳

腺瘤的成像例如使用单克隆抗体来实现,并且使用接头如对-羟基苯酰亚胺酸甲酯(methyl-p-hydroxybenzimidate)或3-(4-羟基苯基)-丙酸N-琥珀酰亚胺酯来将可检测的成像部分结合到所述抗体。

[0109] 在其它实施方案中,涵盖了通过使用不改变抗体结合位点的反应条件来选择性地在免疫球蛋白Fc区域内引入巯基而进行的免疫球蛋白的衍生化作用。发现根据此方法而产生的抗体缀合物显示了改进的寿命、特异性和敏感性(美国专利号5,196,066,其以引用方式并入本文)。其中报道分子或效应分子与Fc区域内的碳水化合物残基缀合的所述效应分子或报道分子的位点特异性连接也已经公开在文献中(O'Shannessy等,1987)。

[0110] 在本发明的其它实施方案中,免疫球蛋白用核素如氚进行放射性标记。在另外的实施方案中,采用纳米金粒子(如约0.5nm至40nm的尺寸)和/或量子点(Hayward, Calif.)。

[0111] IV. 酶和底物(发色团)

[0112] 例如,在如下文提供的示例性实施方案中,涵盖了用于检测 FOLR1的底物和指示剂的使用。

[0113] 辣根过氧化物酶(HRP)是首先与过氧化氢形成复合物并且然后引起其分解以生成水和原子氧的酶。像很多其它酶一样,HRP和一些HRP样活性可以由过量底物抑制。在HRP与过量过氧化氢之间形成的复合物是无催化活性的并且在缺乏电子给体(例如,显色物质)的情况下被可逆地抑制。过量过氧化氢和电子给体的缺乏带来内源性HRP活性的淬灭。

[0114] 当在测定系统中使用时,HRP还可以用于使限定的底物转变为其活化的发色团,从而引起颜色变化。所述HRP酶可以通过很多方法与抗体、蛋白质、肽、聚合物或其它分子缀合。这些方法在本领域是已知的。将戊二醛添加到含有HRP和抗体的混合物的溶液中会导致同与所述酶缀合相比更多抗体分子彼此缀合。在两步骤的程序中,HRP首先与双功能试剂反应。在第二个阶段,只将活化的HRP与所述抗体混合,从而引起更加有效的标记且没有聚合。还使用两步骤的戊二醛程序来将HRP与(链霉)抗生物素蛋白缀合。这种形式用于例如LAB和LSAB是底物的程序中。与生物素的缀合也涉及两个步骤,因为生物素在可以与HRP酶的ε氨基反应之前首先必须衍生化为生物素基-N-羟基琥珀酰亚胺酯或生物素酰肼。

[0115] 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)是对于如HRP的酶而言产生在醇和其它有机溶剂中高度不可溶的棕色最终产物的底物。DAB的氧化还引起聚合,从而引起与四氧化钼反应的能力并因此增加其染色强度和电子密度。在用于使聚合的DAB的光密度增强的若干金属和方法中,氯化金与硫化银组合似乎是最成功的。

[0116] 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)是如HRP的酶的底物。在氧化时,形成醇中可溶的玫瑰红色最终产物。因此,用AEC处理的试样一定不能浸入醇或醇溶液中(例如,哈里斯氏(Harris)苏木精)。相反,应该使用水性复染剂和封固剂。不幸的是AEC容易进一步氧化并且在暴露于过量光时强度将减退。因此建议储存在黑暗中。

[0117] 4-氯-1-萘酚(CN)是如HRP的酶的底物并且作为蓝色最终产物而沉淀。因为CN在醇和其它有机溶剂中是可溶的,所以试样一定不能脱水、暴露在醇复染剂中或用含有有机溶剂的封固剂以载玻片覆盖。与DAB不同,CN倾向于从沉淀位点扩散。

[0118] 对-亚苯基二胺二盐酸盐/邻苯二酚(Hanker-Yates试剂)是如HRP的酶的电子给体底物并且得到在醇和其它有机溶剂中不可溶的蓝-黑色反应产物。与聚合的DAB一样,这种反应产物可以被钼酸化(osmicated)。在免疫过氧化物酶技术中使用Hanker-Yates试剂

已经实现了不同结果。

[0119] 牛小肠碱性磷酸酶(AP) (分子量100kD) 是通过破坏P-O键而从有机酯上移除(通过水解作用)并转移磷酸基的酶;暂时形成中间的酶-底物键。用于AP的主要金属活化剂是Mg⁺⁺、Mn⁺⁺和Ca⁺⁺。

[0120] 在免疫组织化学法中还没有广泛使用AP,直到公布了未标记的碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶(APAAP)程序。在这个程序中利用的可溶性免疫复合物具有大约560kD的分子量。APAAP程序相对于PAP技术的主要优点是没有由内源性过氧化物酶活性所带来的干扰。由于内源性过氧化物酶活性对PAP染色的潜在干扰,推荐将所述APAAP技术用于血液涂片和骨髓涂片方面的使用。来自骨骼、肾脏、肝脏和一些白细胞中的内源性碱性磷酸酶的活性可以通过将1mM左旋咪唑(尽管已经发现5mM更有效)添加到底物溶液中来抑制。肠道碱性磷酸酶未通过左旋咪唑得到足够抑制。

[0121] 在免疫碱性磷酸酶染色方法中,所述酶将磷酸萘酯(底物)水解为酚类化合物和磷酸。所述酚与无色重氮盐(发色团)偶联以产生不可溶的有色偶氮染料。已经成功使用底物和发色团的若干不同组合。

[0122] AS-MX磷酸萘酯可以按其酸形式或作为钠盐来使用。发色团固红TR和固蓝BB分别产生亮红色或亮蓝色最终产物。二者都可溶于醇和其它有机溶剂,因此必须使用水性封固剂。当染色细胞涂片时优选固红TR。

[0123] 另外的示例性底物包括AS-BI磷酸萘酯、AS-TR磷酸萘酯和磷酸5-溴-4-氯-3-吡啶酯(BCIP)。其它可能的发色团包括例如固红LB、固深红GBC、氮蓝四唑(NBT)、碘硝基四唑紫(INT)以及所述结构的衍生物。

[0124] V. 免疫检测方法

[0125] 仍然在另外的实施方案中,本发明涉及用于结合、纯化、移除、定量和/或通常另外检测如本发明所涵盖的生物组分如配体的免疫检测方法。可以采用根据本发明制备的所述抗体来检测野生型和/或突变型配体蛋白、多肽和/或肽。如贯穿本申请所述的,涵盖了野生型和/或突变型配体特异性抗体的使用。一些免疫检测方法包括(举几个例子)流式细胞术、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射性免疫测定法(RIA)、免疫放射性测定法、荧光免疫测定法、化学发光测定法、生物发光测定法以及蛋白质印迹。各种适用的免疫检测方法的步骤已经描述在科学文献中,例如像Doolittle M H和Ben-Zeev O, *Methods Mol Biol.* 1999; 109:215-37; Gulbis B和Galand P, *Hum Pathol.* 1993 Dec; 24(12):1271-85; 以及De Jager R等, *Semin Nucl Med.* 1993 Apr; 23(2):165-79,各自以引用方式并入本文。

[0126] 通常,免疫结合方法包括获得疑似包含配体蛋白、多肽和/或肽的样本,以及根据情况,在有效允许形成免疫复合物的条件下,使所述样本与根据本发明的第一配体结合肽(例如,抗配体抗体)接触。

[0127] 在抗原检测方面,所分析的生物样本可为疑似包含野生型或突变型配体蛋白特异性抗原的任何样本,如组织切片或试样、均化组织提取物、活检抽吸物、细胞、任何以上野生型或突变型含FOLR1组合物的分离和/或纯化形式、或甚至与组织接触的任何生物流体(包括血液和/或血清),尽管优选组织样本或提取物。

[0128] 使所选择的生物样本与所述抗体在有效条件下接触足够允许免疫复合物(初次免疫复合物)形成的一段时间总体上是这样一件事:简单地将抗体组合物添加到样本中,并且

孵育所述混合物足够长的一段时间以便所述抗体与所存在的任何配体蛋白抗原形成(即与其结合)免疫复合物。这段时间之后,通常会洗涤样本-抗体组合物如组织切片、ELISA板、斑点印迹或蛋白质印迹,以除去任何非特异性结合的抗体种类,从而仅仅允许检测特异性结合在初次免疫复合物内的那些抗体。

[0129] 一般而言,免疫复合物形成的检测在本领域是众所周知的并且可以通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于标记或标记物的检测,如那些放射性、荧光、生物和酶标签中的任一种。涉及这些标记的使用的美国专利包括美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149和4,366,241,各自以引用方式并入本文。当然,通过使用如本领域已知的第二结合配体如二抗和/或生物素/抗生物素蛋白配体结合安排,可以发现另外的优点。

[0130] 在所述检测中采用的抗配体抗体本身可以连接可检测的标记,其中然后会简单地检测这个标记,从而允许测定组合物中的初次免疫复合物的量。或者,变成结合在初次免疫复合物内的第一抗体可以通过具有对所述抗体的结合亲和力的第二结合剂来检测。在这些情况下,所述第二结合剂可以连接可检测的标记。所述第二结合剂自身常常是抗体,因此它可以被称为“二”抗或聚合物检测系统。使所述初次免疫复合物与标记的第二结合剂或抗体/聚合物检测系统在有效条件下接触足够允许第二免疫复合物形成的一段时间。然后通常洗涤所述第二免疫复合物以除去任何非特异性结合的标记的二抗或配体,并且然后检测在第二免疫复合物中的余下标记。

[0131] 另外的方法包括通过两步方法检测初级免疫复合物。如上文所述,使用具有对所述抗体的结合亲和力的第二结合剂如抗体来形成第二免疫复合物。洗涤之后,使所述第二免疫复合物与具有对二抗的结合亲和力的第三结合剂或抗体再次在有效条件下接触足够允许免疫复合物(第三免疫复合物)形成的一段时间。使第三配体或抗体连接可检测的标记,以允许检测因此形成的第三免疫复合物。如果需要,这个系统可以提供信号放大。

[0132] 在另一个实施方案中,生物素化的单克隆或多克隆抗体用于检测靶抗原,并且然后将第二步骤抗体用于检测连接复合生物素的生物素。在所述方法中,待测试的样本首先在包含第一步骤抗体的溶液中孵育。如果存在靶抗原,则一部分所述抗体结合所述抗原以形成生物素化抗体/抗原复合物。然后通过链霉抗生物素蛋白(或抗生物素蛋白)、生物素化DNA和/或互补的生物素化DNA的连续溶液中孵育来扩增抗体/抗原复合物,其中每个步骤将另外的生物素位点添加到抗体/抗原复合物中。重复扩增步骤直到实现合适水平的扩增,在此时,在包含抗生物素的第二步骤抗体的溶液中孵育所述样本。这个第二步骤抗体例如用一种酶来标记,所述酶可以通过使用发色团底物的组织酶学来用于检测抗体/抗原复合物的存在。在合适扩增的情况下,可以产生肉眼可见的蛋白质结合(例如,抗体)缀合物。

[0133] 免疫检测的另一种已知的方法利用了免疫-PCR(聚合酶链反应)的方法论。PCR方法使用了以释放所述抗体的低pH或高盐缓冲液洗涤出来的DNA/生物素/链霉抗生物素蛋白/抗体复合物。然后将所得的洗液用于执行采用合适引物且在适当控制下的PCR反应。在具体实施方案中,可以利用PCR的巨大扩增能力和特异性来检测单个抗原分子。这种检测可以实时地发生。例如,涵盖了定量的实时PCR的使用。

[0134] 在患有不同形式疾病的患者的临床诊断和/或监控中,FOLR1突变体的检测和/或FOLR1水平相对于在来自正常受试者的相应生物样本中的水平而言的改变,指示患者患有

所述疾病。然而,如本领域技术人员所已知的,这样的临床诊断不一定要孤立地按照这个方法来进行。本领域技术人员对区分生物标记物的类型和/或数量的显著差异非常熟悉,所述差异代表生物标记物的阳性识别、和/或低水平和/或背景变化。实际上,背景表达水平经常用于形成“界限值”,在所述界限值之上增加的检测将被评分为显著的和/或阳性的。

[0135] 在一个实施方案中,通过FOLR1的免疫学检测(通过免疫组织化学法)来为强度和均匀度二者(染色细胞百分比——仅细胞膜)评分。FOLR1表达强度的比较标尺的相关性为0—阴性、0-1—很弱、1—弱、1-2—弱至中等、2—中等、2-3—中等至强、3—强。定量地,分数0代表在肿瘤细胞中没有观察到膜染色。分数1代表在肿瘤细胞中模糊/几乎没有可辨的膜染色。对于分数2,则在肿瘤细胞中观察到中等的膜染色。最后,分数3或3+代表在肿瘤细胞中的中等至强的膜染色。具有0分或1分的FOLR1表达的那些样本可以表征为没有过度表达FOLR1,而具有2分或3分的那些样本可以表征为过度表达FOLR1。过度表达FOLR1的样本还可以通过每个细胞表达的FOLR1分子的拷贝数量相对应的免疫组织化学分数来评级,并且已经按生物化学方式来测定:0=0-10,000拷贝/细胞、1=至少约200,000拷贝/细胞、2=至少约500,000拷贝/细胞以及3=至少约2,000,000拷贝/细胞。FOLR1 百分比细胞膜染色均匀度的比较标尺相关性如下:0—阴性、局部—<25%、异质性(异质)—25%-75%以及均质性(均质)—>75%。

[0136] VI. 核酸杂交

[0137] 原位杂交通常在固定到载片上的细胞或组织切片上来执行。可以通过若干常规方法(参见例如Leitch等*In situ Hybridization: a practical guide*, Oxford BIOS Scientific Publishers, *Microscopy handbooks v.27* (1994))来进行原位杂交。在一个原位程序中,使用荧光染料(如在由氩离子激光器刺激时发绿色荧光的异硫氰酸荧光素(FITC))来标记与细胞中的靶核苷酸序列互补的核酸序列探针。包含所述靶核苷酸序列的每个细胞将结合所述标记的探针,从而在所述细胞暴露给具有适合用于所使用的特定荧光染料的激发的波长的光源时产生荧光信号。

[0138] 可以采用不同的杂交严格度。由于杂交条件变得更加严格,所以在探针与靶之间要求更大程度的互补性以形成并维持稳定的双链体。通过升高温度、降低盐浓度或升高甲酰胺浓度来增加严格度。添加硫酸葡聚糖或升高其浓度也可以增加标记探针的有效浓度,以增加杂交率和最终的信号强度。杂交之后,在通常包含与杂交溶液中发现的那些试剂相似的试剂的溶液中洗涤载片,其中根据所要求的严格度洗涤时间从分钟到小时而不同。更长或更严格的洗涤通常减少了非特异性背景但是具有减小总体敏感度的风险。

[0139] 在核酸杂交分析中使用的探针可为RNA或DNA寡核苷酸抑或多核苷酸并且可以不仅含有天然存在的核苷酸而且含有它们的类似物,例如像地高辛dCTP、生物素dcTP 7-氮鸟嘌呤核苷、叠氮胸苷、肌苷或尿苷。其它适用的探针包括例如肽探针及其类似物、分支基因DNA、拟肽物、肽核酸(PNA)和/或抗体。

[0140] 探针应该具有对所关注的靶核酸序列的足够互补性,以使得稳定的和特异性的结合发生在靶核酸序列与探针之间。稳定杂交所要求的同源性程度随着杂交介质和/或洗涤介质的严格度而变化。优选地,在本发明中采用完全同源的探针,但是本领域技术人员将容易认识到,显示更少但足够的同源性的探针可以用于本发明中(参见例如 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring

Harbor Press, (1989))。

[0141] 探针还可以通过若干手段来形成并选择,所述手段包括但不限于通过原位杂交、体细胞杂交板或分选染色体的斑点印迹进行图谱绘制;染色体连锁分析;或者从来自人细胞系或具有人染色体的体细胞杂种、辐射体细胞杂种、染色体区域的显微解剖的分选染色体文库中、或从由对独特染色体位点特异的PCR引物所识别的酵母人工染色体(YAC)中克隆和分离,或者像相邻YAC克隆的其它合适方式。探针可为在质粒、噬菌体、粘粒、YAC、细菌人工染色体(BAC)、病毒载体或任何其它合适载体中克隆的基因组DNA、cDNA或RNA。探针可以通过常规方法来克隆或化学合成。克隆时,通常将分离的探针核酸片段插入到载体中,如 λ 噬菌体、pBR322、M13或含有SP6或T7启动子的载体,并且在细菌宿主中作为文库来克隆。[参见例如 Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)]。

[0142] 优选对探针进行标记,例如像用荧光体来进行。荧光团的实例包括但不限于稀土螯合物(钆螯合物)、德克萨斯红、罗丹明、荧光素、丹酰、丽丝胺(Lissamine)、伞形酮、藻红蛋白、藻蓝蛋白或可商购的荧光体如SPECTRUM ORANGE™和SPECTRUM GREEN™和/或以上任何一种或多种的衍生物。在测定中使用的多个探针可以用一种以上的可区分的荧光色或颜料色来标记。这些色差提供用于识别特定探针的杂交位置的手段。此外,空间上未分离的探针可以通过由混合两种另外的颜色(例如,淡红色+绿色=黄色)颜料(例如,蓝色+黄色=绿色)而形成的不同色光或颜料或者通过使用一次只能穿过一种颜色的过滤器设置来识别。

[0143] 可以利用本领域技术人员已知的常规方法,用荧光团对探针进行直接或间接标记。

[0144] VII. 检测试剂盒和组合物

[0145] 本发明还提供用于在如本文所公开的本发明的实践中使用的试剂盒。这些试剂盒可以包括容器,每个容器具有在所述方法中使用的一种或多种不同试剂(通常以浓缩的形式),所述试剂包括例如一种或多种结合剂(抗体),其已经连接标记物,或者任选地具有用于将结合剂偶联到抗体或核酸分子(以及标记物自身)的试剂;缓冲液、适当的三磷酸核苷酸(例如,dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP、ATP、CTP、GTP和UTP)、逆转录酶、DNA聚合酶、RNA聚合酶,以及一种或多种序列特异性或简并引物以用于通过扩增来检测核酸分子;和/或用于分离(优选通过显微解剖)以支持本发明的实践的试剂和仪器。通常还将包括描述本发明的配体检测方法中的试剂盒组件的或关于其使用的一组说明的标签或指示物,其中所述说明可以与包装说明书和/或试剂盒或其组件的包装关联。

[0146] 仍然在另外的实施方案中,本发明涉及用于与上文所述的免疫检测方法一起使用的免疫检测试剂盒。由于抗体通常用于检测野生型和/或突变型蛋白质、多肽和/或肽,所以所述抗体将优选包括在所述试剂盒中。因此免疫检测试剂盒将在合适的容器工具中包含结合野生型和/或突变型蛋白质、多肽和/或肽的第一抗体、和/或任选的免疫检测试剂、和/或另外任选的野生型和/或突变型蛋白质、多肽和/或肽。

[0147] 试剂盒的免疫检测试剂可为多种形式中的任一种,包括与给定抗体相关联和/或连接其的那些可检测标记。还涵盖了与第二结合配体相关联和/或连接其的可检测标记。示范性第二配体是具有对第一抗体的结合亲和力的那些二抗或聚合物。

[0148] 用于在本发明试剂盒中使用的另外的合适免疫检测试剂包括双组分试剂,其包含

具有对第一抗体的结合亲和力的二抗、连同具有对二抗的结合亲和力的三抗或聚合物一起的双组份试剂,所述三抗连接可检测标记。如上文所述,很多示例性标记在本领域是已知的和/或所有这些标记适合与本发明一起使用。

[0149] 所述试剂盒可以进一步包括适当等分的无论标记和/或未标记的野生型和/或突变型蛋白质、多肽和/或多肽的组合物,因其可以用来制备用于检测测定的标准曲线。所述试剂盒可以含有处于完全缀合的形式、处于中间体的形式和/或作为待由试剂盒的使用者来缀合的单独部分的抗体-或聚合物-标记缀合物。所述试剂盒的组分可以在水性介质中包装和/或包装成冻干的形式。

[0150] 所述试剂盒的容器工具通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器和/或其它容器工具,在其中可以放入所述抗体和/或优选适当等分所述抗体。本发明的试剂盒通常还将包括用于将抗体、抗原和/或任何其它试剂容器容纳在密封限制中用于商业销售的工具。这些容器可以包括注射和/或吹塑成型塑料容器,在这些容器中保持有所需的小瓶。

[0151] 所述试剂盒可以进一步包括用于治疗癌症的一种或多种治疗剂,如FOLR1免疫缀合物和/或化学治疗剂。

[0152] 所述试剂盒可以进一步包括用来测量受试者中的FOLR1表达的 FOLR1检测试剂,所述试剂盒包含FOLR1检测试剂和使用说明书。在一个实施方案中,所述FOLR1检测试剂包括FOLR1结合肽、蛋白质或分子探针(即核酸)。在另一个实施方案中,所述FOLR1检测试剂是抗FOLR1抗体。在另一个实施方案中,试剂盒进一步包括结合抗FOLR1抗体的二抗。在一个实施方案中,FOLR1特异性抗体被包括的浓度为0.5至7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选0.9至3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在另一个实施方案中,抗体被包括的浓度为1.0 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.5 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.9 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.5 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.0 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.5 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或高达4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在另一个实施方案中,抗体以浓溶液包括在内,具有稀释说明以实现0.9至3.8 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的最终浓度。在另一个实施方案中,试剂盒进一步包括选自由以下组成的组的检测试剂:酶、荧光团、放射性标记以及发光团。在另一个实施方案中,所述检测试剂选自由以下组成的组:生物素、地高辛、荧光素、氘以及罗丹明。

[0153] 所述试剂盒还包括用于FOLR1表达的检测和评分的说明书。试剂盒还可以包括对照或参考样本。对照或参考样本的非限制性实例包括来源于正常(正常对照)样本或肿瘤(阳性对照)样本的细胞团块或组织培养细胞系。示例性细胞系包括KB、NCI-H2110、Igrov-1、Ishikawa、Jeg-3、Skov-3、Hela、T47D、Caco2、SW620、0AW28、HCC827、Ovcar-8和Ovcar-3、Ov-90、已知表达FOLR1的其它肿瘤细胞系、以及用表达FOLR1的表达载体稳定或瞬时转染的细胞系。还可以在实施例9-11中找到阳性对照组织的其它实例。所述试剂盒还可以包括直观上描绘阳性和正常参考样本的染色强度和均匀度的染色指南。这些染色指南可以具有来自正常肺部、胰腺和/或唾液腺、以及具有标准化分数的染色肿瘤(例如,卵巢癌、肺癌、肾癌和子宫内膜癌,以及在实施例和图23-25中所述的那些)的参考样本。

[0154] VIII.FOLR1结合剂

[0155] 结合FOLR1的任何抗体可以用于本发明的检测方法中。在治疗上有效的抗FOLR1抗体的实例可以在美国申请公布号US 2012/0009181中找到,所述申请以引用方式并入本文。FOLR1的全长氨基酸(aa)和核苷酸(nt)序列在本领域是已知的并且在本文中还可分别由SEQ ID NO:1和2所代表来提供。用于FOLR1检测的特别适用的抗体是小鼠单克隆抗-

huFOLR1克隆BN3.2 (Leica# NCL-L-FR α)。治疗上有效的抗FOLR1抗体的实例是huMov19 (M9346A)。SEQ ID NO:3-5的多肽分别包括huMov19 (M9346A) 重链的可变区、以及huMov19的可变区轻链型1.00、可变区轻链型1.60。在某些实施方案中,huMov19 (M9346A) 抗体通过在2010年4月7日根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 保藏在美国典型培养物保藏中心ATCC (位于10801University Boulevard,Manassas,VA 20110) 并具有 ATCC保藏号PTA-10772的质粒(分类命名:重组质粒DNA: phMov19HCv1.0CTK) 和ATCC保藏号PTA-10773的质粒(分类命名:重组质粒DNA: phMov19LCv1.0) 或ATCC保藏号10774(分类命名:重组质粒DNA: phMov19LCv1.6) 的质粒来编码。下文提供适用于本发明的治疗方法中的FOLR1免疫缀合物的实例。

[0156] IX.FOLR1免疫缀合物

[0157] 本发明还包括用于增加缀合物(在本文中还被称为免疫缀合物) 功效的方法,所述缀合物包括连接或缀合细胞毒素(药物)或前药的抗 FOLR1抗体、抗体片段、功能等效物、改进的抗体以及其如本文所公开的方面。示例性FOLR1免疫缀合物可以在美国申请公布号US 2012/0009181中找到,所述申请以引用方式并入本文。本发明的特别有效的治疗免疫缀合物包括上文所述的huMov19抗体。

[0158] 合适的药物或前药在本领域是已知的。在某些实施方案中,药物或前药是细胞毒性剂。在本发明的细胞毒性缀合物中使用的细胞毒性剂可为导致细胞死亡、或诱导细胞死亡、或以某种方式减小细胞生存力的任何化合物,并且包括例如美登木素和美登木素类似物、苯二氮䓬类、紫杉烷类、CC-1065和CC-1065类似物、倍癌霉素和倍癌霉素类似物、烯二炔类(如卡奇霉素)、多拉司他汀和多拉司他汀类似物(包括奥利斯他汀)、托马霉素衍生物、来普毒素衍生物、甲氨蝶呤、顺铂、卡铂、道诺霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、长春新碱、长春碱、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥以及吗啉代阿霉素。在某些实施方案中,细胞毒性剂可为美登木素和美登木素类似物。

[0159] 所述药物或前药可以例如通过二硫键而连接抗FOLR1抗体(如 huMov19)或其片段。接头分子或交联剂包含可以与抗FOLR1抗体或其片段反应的反应性化学基团。在某些实施方案中,用于与细胞结合剂反应的反应性化学基团是N-琥珀酰亚胺酯和N-磺基琥珀酰亚胺酯。此外,接头分子包含反应性化学基团,在某些实施方案中为可以与药物反应以形成二硫键的二硫代吡啶基。在某些实施方案中,接头分子包括例如3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)(参见例如,Carlsson等,Biochem.J.,173:723-737(1978))、4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDB)(参见例如,美国专利号4,563,304)、4-(2-吡啶基二硫代)2-磺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(磺基-SPDB)(参见美国公布号20090274713)、4-(2-吡啶基二硫代)戊酸N-琥珀酰亚胺酯(SPP)(参见例如CAS登记号341498-08-6)、2-亚氨基硫烷或乙酰基琥珀酸酐。

[0160] 还可以制备具有不可裂解的接头的抗体-美登木素缀合物。这些交联剂在本领域中已描述(参见ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbook和美国专利申请公布号2005/0169933),并且包括但不限于4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷羧酸N-琥珀酰亚胺酯(SMCC)、为SMCC“长链”类似物的N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸-(6-氨基己酸酯)(LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺基十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、 β -马来酰亚胺基丙酸N-琥珀酰亚胺酯(BMPS)、 γ -马来酰亚胺基丁酸N-琥珀酰亚胺

酯 (GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯 (EMCS)、m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS)、N-(α -马来酰亚胺基乙酰基)-琥珀酰亚胺酯 (AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯 (SMPH)、4-(p-马来酰亚胺基苯基)-丁酸N-琥珀酰亚胺酯 (SMPB)、以及N-(p-马来酰亚胺基苯基)异氰酸酯 (PMPI)、4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸N-琥珀酰亚胺酯 (SIAB)、碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯 (SIA)、溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯 (SBA)、以及3-(溴乙酰胺基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯 (SBAP)。在某些实施方案中,抗体用如文献所述的交联剂(如4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC)、磺基-SMCC、马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS)、磺基-MBS或碘乙酸琥珀酰亚胺酯)来修饰,以引入1-10个反应性基团(Yoshitake等, *Eur. J. Biochem.*, 101:395-399 (1979); Hashida等, *J. Applied Biochem.*, 56-63 (1984); 以及Liu等, *Biochem.*, 18:690-697 (1979))。

[0161] 本发明包括以下方面,其中约2个至8个药物分子(“药物负载数”) (例如美登木素) 连接抗FOLR1抗体或其片段,与更少或更多数量的药物连接至相同细胞结合剂的药物负载数的情况相比,所述缀合物的抗肿瘤效果更加有效。如本文使用的“药物负载数”是指可以连接细胞结合剂(如抗FOLR1抗体或其片段)的药物分子(例如,美登木素)的数量。在一方面,可以连接细胞结合剂的药物分子的数量平均可为约2至约8(例如,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)。在某些实施方案中,所述药物是N²-脱乙酰基-N²-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1)或N²-脱乙酰基-N²-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。因此,在某一实施方案中,抗体huMov19与DM1或DM4缀合。在另一个实施方案中,抗体FR-1-21与DM1或DM4缀合。在另一个实施方案中,抗体FR-1-48与DM1或DM4缀合。在另一个实施方案中,抗体FR-1-49与DM1或DM4缀合。在另一个实施方案中,抗体FR-1-57与DM1或DM4缀合。在另一个实施方案中,抗体FR-1-65与DM1或DM4缀合。

[0162] X.FOLR1表达与治疗功效的相关性

[0163] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于确认具有增加的对FOLR1靶向性抗癌治疗的反应可能性的受试者的方法。本发明部分基于以下发现:升高的FOLR1表达水平与FOLR-1靶向性抗癌治疗的功效相关。

[0164] 使用异种移植模型对患者样本和与体内功效的相关性进行的评价表明了表达分析用于选择更可能对治疗有反应的受试者的能力。IHC提供在肿瘤细胞中FOLR1表达的分數:0(无表达)至3+(非常高水平的表达)。使用异种移植模型的体内数据表明FOLR1表达评分为1、2、3或3+、优选分數为2、3或3+的样本在FOLR1免疫缀合物的临床相关剂量下(例如, FOLR1免疫缀合物的5mg/kg异种移植剂量可近似于患者中的185mg/m²)对FOLR-1靶向性抗癌治疗具有增加的反应可能性。因此,确认具有升高的FOLR1分數的个体将帮助确认可能对临床相关剂量有反应的那些个体。如下文中更详细描述,对FOLR1治疗的敏感度与2分或更高分數、特别是3分级别的FOLR1评分相关。此外,FOLR1的更均匀水平的表达提供与治疗益处的更好相关性。因此,优选均质的染色均匀度,但是增加的染色强度与异质的染色均匀度的组合也指示了增加的FOLR1表达。例如,大于2异质的分數是用FOLR1治疗剂治疗的

患者选择标准。

[0165] FOLR1表达分析还确认了其中减低水平的FOLR1靶向性抗癌治疗(“低剂量治疗”)可以有效引起抗肿瘤反应的患者。如本领域已了解的,化合物通常以实现所需治疗反应的最小剂量来施用。这对于引起临床且常常是不需要的副作用的治疗是特别重要的。识别具有升高的 FOLR1表达水平的那些受试者的能力允许FOLR-1靶向性治疗的剂量最小化,从而减少可能的副作用且同时维持治疗功效。

[0166] 如本文所示,2异质或更大的FOLR1表达分数与对于抗FOLR1 免疫缀合物的增加的反应性相关。在某些实施方案中,增加的反应性是恶病质、存活时间的增加、肿瘤进展时间的延长、肿瘤块的减小、肿瘤负荷减轻,和/或肿瘤转移时间、肿瘤复发时间、肿瘤反应、完全反应、部分反应、稳定疾病、进行性疾病、无进展存活期(PFS)或总存活期(OS)的延长。在某些实施方案中,2异质或更大的FOLR1 表达分数与增加的PFS、DFS或OS相关。

[0167] 用于在所述检测方法中使用并与参考/对照样本相关的试剂盒可以包括对照(阳性和/或阴性)或参考样本。阳性对照或阳性参考样本可以来源于组织培养细胞系、正常组织或肿瘤组织。阳性和阴性参考样本可以来源于包括SW620、T47D、IGROV-1、HeLa、KB、JEG-3的细胞系、其它肿瘤细胞系、以及用编码FOLR1的表达载体稳定或瞬时转染的细胞系。正常或肿瘤组织样本和组织培养细胞系还可以用作阴性对照参考样本。对于其它样本,参见实施例9-11和图23-25。

[0168] XI. 药物组合物和治疗方法

[0169] FOLR1结合剂(包括抗体、免疫缀合物和多肽)适用于各种各样的应用,包括但不限于治疗性的治疗方法,如癌症治疗。在某些实施方案中,所述药剂适用于抑制肿瘤生长、诱导分化、减小肿瘤体积和/或减小肿瘤的致癌性。使用的方法可为体外、离体或体内方法。在某些实施方案中,FOLR1结合剂或抗体或免疫缀合物或多肽是它结合的人FOLR1的拮抗剂。

[0170] 在某些实施方案中,用FOLR1结合剂或拮抗剂(例如,huMov19 抗体或免疫缀合物)治疗的疾病是癌症。在某些实施方案中,所述癌症的特征为表达FOLR1结合剂(例如,抗体)所结合的叶酸受体1的肿瘤。

[0171] 本发明提供治疗癌症的方法,所述方法包括对受试者(例如,需要治疗的受试者)施用治疗有效量的FOLR1结合剂。在某些实施方案中,所述癌症是选自由以下组成的组的癌症:结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、脑癌、肾癌、前列腺癌、胃肠癌、黑色素瘤、宫颈癌、膀胱癌、胶质母细胞瘤以及头颈部癌。在某些实施方案中,所述癌症是卵巢癌。在某些实施方案中,所述癌症是肺癌。在某些实施方案中,所述受试者是人。

[0172] 本发明进一步提供用于使用本文所述的抗体或其它药剂来抑制肿瘤生长的方法。在某些实施方案中,抑制肿瘤生长的方法包括使细胞在体外与FOLR1结合剂(例如,抗体)接触。例如,在其中加入了所述抗体或其它药剂以抑制肿瘤生长的培养基中培养表达FOLR1的永生细胞系或癌细胞系。在一些实施方案中,从例如像组织活检切片、胸腔积液或血液样本的患者样本中分离肿瘤细胞并将其在添加 FOLR1结合剂以抑制肿瘤生长的培养基中培养。

[0173] 在一些实施方案中,抑制肿瘤生长的方法包括使肿瘤或肿瘤细胞在体内与FOLR1结合剂(例如,抗体)接触。在某些实施方案中,肿瘤或肿瘤细胞与FOLR1结合剂的接触在动

物模型中进行。例如,可以对表达一种或多种FOLR1的异种移植物施用FOLR1结合剂以抑制肿瘤生长,所述异种移植物已在免疫受损的小鼠(例如,NOD/SCID 小鼠)中生长。在一些实施方案中,在将致瘤性细胞引入到动物中的同时或不久之后施用FOLR1结合剂以防止肿瘤生长。在一些实施方案中,在致瘤性细胞已长到指定尺寸之后施用FOLR1结合剂以作为治疗剂。

[0174] 在某些实施方案中,抑制肿瘤生长的方法包括对受试者施用治疗有效量的FOLR1结合剂。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,受试者具有肿瘤或已切除肿瘤。

[0175] 在某些实施方案中,所述肿瘤是选自由以下组成的组的肿瘤:脑肿瘤、结肠直肠癌、胰腺肿瘤、肺肿瘤、卵巢肿瘤、肝肿瘤、乳腺肿瘤、肾肿瘤、前列腺肿瘤、胃肠肿瘤、黑色素瘤、宫颈肿瘤、膀胱肿瘤、胶质母细胞瘤以及头颈部肿瘤。在某些实施方案中,肿瘤是卵巢肿瘤。

[0176] 在某些实施方案中,本发明提供使用低剂量FOLR1结合剂来抑制肿瘤生长的方法。如本文使用的术语“低剂量”是指少于产生治疗效果所需要的常用剂量或常规剂量的FOLR1结合剂的治疗有效量。

[0177] 因此,在某些实施方案中,本发明提供使用huMov19抗体和免疫缀合物治疗癌症的方法。在某些实施方案中,所述huMov19免疫缀合物是huMov19-SPDB-DM4;huMov19-磺基-SPP-DM1; huMov19-SPP-DM1;或huMov19-PEG4-Mal-DM4。在某一实施方案中,所述huMov19免疫缀合物是huMov19-SPDB-DM4,其又称为 IMG853。

[0178] 在某些实施方案中,通过将本发明的纯化抗体或药剂与药学上可接受的媒介物(例如载体、赋形剂)组合来制备制剂进行储存和使用(Remington, The Science and Practice of Pharmacy第20版Mack Publishing, 2000)。合适的药学上可接受的媒介物包括但不限于:无毒缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐以及其它有机酸;盐类如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如,十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;氯化苯甲烷铵;氯化苄乙氧铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷酯类,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量多肽(例如,小于约10个氨基酸残基);蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;碳水化合物,如单糖、双糖、葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);以及非离子型表面活性剂,如TWEEN或聚乙二醇(PEG)。

[0179] 本发明的药物组合物可以按任何数量的方式施用以用于局部治疗抑或全身治疗。施用可为局部施用(如对黏膜,包括阴道递送和直肠递送),如透皮贴剂、软膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和散剂;肺部施用(例如,通过吸入或吹入散剂或气雾剂,包括通过喷雾器;气管内的、鼻内的、表皮的以及经皮的);口服施用;或肠胃外施用,包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;或颅内(例如,鞘内或心室内)施用。

[0180] 本发明的抗体或免疫缀合物可以在药物组合制剂中或作为联合治疗的给药方案中与具有抗癌性质的第二化合物联合。所述药物组合制剂或给药方案的第二化合物优选具有对组合的ADC的补充活性以使得它们不会不利地彼此影响。还提供包含FOLR1结合剂和第

二抗癌剂的药物组合物。

[0181] 对于疾病的治疗,本发明的抗体或药剂的适当剂量取决于待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和阶段、疾病的反应性、施用抗体或药剂是出于治疗目的或是预防目的、先前的治疗、患者临床病史等,均由治疗医师判断。所述抗体或药剂可以施用一次或在持续若干天至若干月的一系列治疗内施用、或施用直到生成了曲线或实现了疾病状态的减轻(例如肿瘤尺寸减小)。最佳给药时间表可以从患者体内的药物积累的测量值来计算,并且将根据单个抗体或药剂的相对效力而变化。施用医师可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。在某些实施方案中,剂量是0.01 μ g/kg体重至100mg/kg体重,并且可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次。在某些实施方案中,抗体或其它FOLR1结合剂是每两个星期给予一次或每三个星期给予一次。在某些实施方案中,抗体或其它FOLR1结合剂的剂量是约0.1mg/kg 体重至约20mg/kg体重。治疗医师可以基于在体液或组织中测量的药物停留时间和浓度来判断给药的重复率。

[0182] 联合治疗可以提供“协同作用”并且证明是“协同性的”,即活性成分一起使用时实现的效果大于分别使用所述化合物所引起的效果的总和。在活性成分为以下所述时可以获得协同作用:(1)以组合的单位剂量制剂的形式共同配制并同时施用或递送;(2)作为单独的制剂交替地或并行地递送;或(3)通过其它的某些方案。在交替治疗中递送的情况下,例如通过在单独注射器中的不同注射液来按顺序施用或递送化合物时,可以获得协同作用。通常,在交替治疗期间,按顺序即连续地施用有效剂量的每种活性成分,而在联合治疗中,则一起施用有效剂量的两种或更多种活性成分。

[0183] 本公开的实施方案可以进一步通过参考以下非限制性实施例来限定,所述实施例详细描述了本公开的某些抗体的制备和用于使用本公开的抗体的方法。对于本领域技术人员而言将清楚的是在不背离本公开的范围的情况下可以实践对材料和方法二者的很多修改。

实施例

[0184] 应理解,本文所述的这些实施例和实施方案仅仅是出于说明的目的,并且将对本领域技术人员暗示根据其产生的各种修改或变化且这些修改或变化包括在本申请的精神和权限之内。

[0185] 已经报道了叶酸受体-1 (FOLR1) 在卵巢肿瘤中高度表达,并且在脑、乳腺、膀胱、子宫内膜、肺、胰腺以及肾癌中高度至中等水平地表达。然而,FOLR1的表达在正常组织中有限并且所述正常组织包括肾脏、肺部(lung)、脉络丛、胰腺、乳腺、甲状腺、卵巢、前列腺以及肺部(lung)。

[0186] 已报道了使用新鲜冷冻的组织匀浆来定量FOLR1的方法。整个组织匀浆不能从细胞膜相关联的表达中区分细胞质的表达,并且新鲜冷冻的样本在临床环境中是不适合的。然而,在临床上可以为患者保存福尔马林固定石蜡包埋的(FFPE)样本。

[0187] 实施例1

[0188] 在细胞样本中FOLR1的免疫组织化学染色—手动方法:在以下染色试剂和条件下,将福尔马林固定石蜡包埋的细胞团块和组织用作测试样本。

IHC 抗体

测试物
■小鼠单克隆抗-huFOLR1 克隆 BN3.2 (Leica # NCL-L-FR α)
免疫原: 原核重组蛋白, 与叶酸受体 α 分子的外部域的 189 个氨基酸相对应
对照物
■ muIgG1 (Coulter) 克隆, 目录号 6602872
二抗
■生物素化马抗小鼠(Vector, 目录号 PK-6100)

[0189]

FFPE 测定条件

步骤	条件
抗原修复	Borg (Biocare) pH 9.0
封闭步骤	抗生物素蛋白/生物素: 过氧化物
测试物或对照物	2.0 μ g/mL
稀释液	含有 2% 马血清的 PBS
二抗	10 μ g/mL
检测系统*	抗生物素蛋白-生物素-过氧化物-复合物; ABC (Vector Labs)
发色团	DAB (Dako)
DAB 发育时间	\geq 5 min

[0190] 用鼠抗FOLR1抗体克隆BN3.2 (Leica, 目录号NCL-L-FR α) 和来自Coulter的对照muIgG1染色福尔马林固定石蜡包埋的 (FFPE) 患者卵巢肿瘤活检切片和卵巢异种移植肿瘤。在pH 9.5缓冲液中进行抗原修复之后, 用加有抗生物素蛋白的2% 马血清封闭载片。在PBS中洗涤载片, 并将其在室温与抗FOLR1或对照muIgG1抗体孵育60分钟, 随后与生物素化的抗小鼠IgG孵育30分钟并与抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物孵育40分钟, 以检测结合的二抗。与 DAB (3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐) 孵育5分钟导致产生颜色信号。用苏木精复染色载片。

[0191] 相对于对照IgG染色 (非特异性), 对FOLR1染色强度和分布模式进行评分。将强度在0至3 (0=无染色、1=弱、2=中等以及3=强) 的标尺上评分, 并且将分布评分为局部 (< 25%的细胞染色)、异质 (25%-75%的细胞染色) 以及均质 (>75%的细胞染色)。

[0192] FFPE样本来源于肿瘤微阵列, 并且人组织块来源于七种不同肿瘤, 如下文所概括。

[0193] FFPE测试样本

[0194]

人肿瘤微阵列(TMA)	描述	商业来源
■混合肿瘤	来自 33 种类型癌症的 96 个核心	Biomax 目录号 MC961
■卵巢肿瘤	64 个核心	Biochain 目录号 T8235725
■NSCLC	80 个核心	Biomax 目录号 LC806
■结肠直肠癌	85 个复制核心	Biomax 目录号 BC000110
人组织块	数量	商业来源
■乳腺肿瘤	4	CHTN
■结肠直肠癌	4	
■卵巢肿瘤	4	
■NSCLC	8	
■胰腺肿瘤	1	
■肾肿瘤	8	
■SCCHN	14	

[0195] 测试FOLR1测试物即鼠抗FOLR1克隆BN3.2,以确定对huFOLR1抗原的结合特异性。使用所报道的IHC染色方法,对300-19 的FFPE切片和用huFOLR1 (300-10/FOLR1) 细胞团块转染的300-19 的FFPE切片进行染色并针对FOLR1进行评价。FOLR1测试物特异性地染色300-19/FOLR1+细胞并且在300-19细胞中恢复为未染色(分别为3均质和阴性)。这些结果表明克隆BN3.2特异性地靶向huFOLR1 抗原。(图1)。

[0196] BN3.2抗体还用于检测组织样本上的FOLR1表达。具有组织和细胞团块的每种测试物和对照物的免疫反应性由会诊的病理学家 David Dorfman博士来测定。首先评价细胞团块对照,然后评价组织样本。对于评价的每种组织,报告了染色强度和染色均匀度的描述。在下文中描述了染色强度分数和均匀度标尺。所评价的每种组织样本的最终报告分数是测试物分数减去相应对照物的分数。通过将染色分数与校准的细胞团块对照进行比较来评估每种样本的ABC水平。

强度(染色的量)		均匀度(染色细胞的数量)	
0	阴性	0	阴性
1	弱	局部	<25%
2	中等	异质性(异质)	25-75%
3	强	均质性(均质)	>75%
3+	非常强		

[0199] 使用抗FOLR1-藻红蛋白、BD Quantibrite微珠和流式细胞术来为 FOLR1阳性肿瘤细胞系(KB、IGROV1、JEG3以及OVCAR3) 测定每个细胞结合抗体(ABC)值,并且所述值显示具有不同的ABC值。(图 2)。为FOLR1优化染色条件,以使得从FOLR1阳性肿瘤细胞系制备的细胞团块通过IHC测定而显示不同水平的染色强度。KB细胞团块显示非常强(3+)的均质染色和高强度,IGROV1细胞团块显示强(3)的染色,JEG3细胞团块显示中等(2-3)的异质染色,而

OVCAR3细胞团块的染色显示低强度(1-2)异质染色。从细胞团块观察到的FOLR1染色强度趋势与报告的ABC值相对应,其中KB细胞显示1,700,000的最高ABC值,IGROV-1细胞显示260,000的次最高ABC值,JEG-3显示41,000ABC的较低ABC值,而OVCAR3细胞显示4,000的最低ABC值。染色结果和相应的ABC值列在下表中。

[0200] 在细胞系和相应细胞团块上huFOLR1的ABC值和相应染色结果。

细胞系	FOLR1	
	ABC	分数
KB	1,700,000	3+均质
IGROV1	260,000	3均质
JEG3	41,000	2-3异质
OVCAR3	4,000	1-2异质

[0201] [0202] 测试另外的细胞系,包括Capan-1、Jar、Hec-1-A、Hec-1-B、Ishikawa、NCI H292、BT474EEI、PA-1、OV-90、CaOv-4、CaOv-3、A2780、Ovcar-5、Ovcar-4、HCT-15、786-0、NCI H838、NCI H 522、NCI H2110、NCI H1734、NCI H228以及FU.OV-3,并发现其为FOLR1阳性,但是FOLR1表达水平和对抗FOLR1免疫缀合物活性的敏感度是变化的。出于参考的目的,优选具有一致的FOLR1表达和对抗FOLR1免疫缀合物的敏感度的细胞系。

[0203] 特别重要的是,IHC方法能够可靠地检测卵巢癌和非小细胞肺癌(NSCLC)组织样本中的FOLR1表达。如图3所示,可以可靠地检测在评分为2异质至3均质的卵巢癌和NSCLC样本中的FOLR1表达。这些样本的ABC值的范围在评分为2异质的样本的大约41,000至大于评分为3均质的样本的260,000内。如图4所示,高染色强度和染色均匀度还在卵巢癌、肺腺癌以及细支气管肺泡癌中观察到。此外,还发现在NSCLC样本(图5)和在卵巢癌(图6)中的FOLR1表达主要集中在组织样本中的细胞膜上。在来自相同以及不同的肿瘤样本的多个样本中检测表达。有趣的是,来自结肠直肠癌、乳腺肿瘤或小细胞肺癌的样本无一评分为大于2异质。

[0204] 实施例2

[0205] huMov19-PEG4Ma1-DM4和huMov19-SPDB-DM4缀合物与相似的非靶向性缀合物相比在KB异种移植模型中的体内功效

[0206] 使用所建立的皮下植入到SCID小鼠中的KB细胞的异种移植模型(通过手动IHC测得非常高的FOLR1表达、3+纯合的),来测试与非靶向性huC242-SPDB-DM4相比的FOLR1靶向性可裂解缀合物 huMov19-SPDB-DM4、以及与非靶向性huC242-PEG4Ma1-DM4相比的不可裂解的缀合物huMov19-PEG4-Ma1-DM4。将小鼠按体重随机分为处理组,并且单次地在细胞接种后第3天、抑或三次地在细胞接种后每周第3、10和17天分别用5mg/kg和10mg/kg缀合物处理(SPDB缀合物)。在图7中描绘了不同处理组的中位肿瘤体积。用 huMov19-SPDB-DM4抑或 huMov19-PEG4Ma1-DM4进行处理导致中位肿瘤体积相对于PBS对照有所减小,而用相应的非靶向性缀合物中任一者进行处理没有产生任何显著效果。

[0207] 实施例3

[0208] 在OVCAR-3人卵巢癌异种移植物中IMGN853处理的剂量-反应抗肿瘤活性

[0209] 在建立的卵巢癌皮下异种移植模型中评价IMGN853的抗肿瘤效果。通过皮下注射到右腹部的OVCAR-3卵巢癌细胞(1×10^7 细胞/动物)来接种SCID小鼠。当肿瘤在尺寸上达到约100mm³(肿瘤细胞接种后21天)时,将小鼠随机地分成四组(每组6只动物)。通过单次静脉内注射1.2mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg的IMGN853来处理小鼠。对照组的动物接受PBS的单次静脉内注射。通过每周两次测量肿瘤尺寸来监控肿瘤生长。肿瘤尺寸用以下公式计算:长度 \times 宽度 \times 高度 \times 1/2。

[0210] 在2.5mg/kg和5.0mg/kg两个剂量水平下的IMGN853针对 OVCAR-3肿瘤(使用手动IHC方法的IHC分数为3纯合的)具有肿瘤生长抑制(T/C=0%)方面的高活性(图8)。用5.0mg/kg的IMGN853处理的6/6只小鼠中出现完全肿瘤消退(CR)。用2.5mg/kg剂量水平下的IMGN853处理的6/6只小鼠中出现部分肿瘤消退(PR)并且4/6只小鼠中出现CR。IMGN853在1.2mg/kg剂量水平下有活性,导致了18%的T/C以及2/6个PR和1/6个CR。根据NCI标准,在10%至42%范围内的T/C值被认为有活性,小于10%的T/C被认为有高活性。

[0211] 实施例4

[0212] 在IGROV-1人卵巢癌异种移植物中IMGN853处理的剂量-反应抗肿瘤活性

[0213] 在建立的卵巢癌皮下异种移植模型中评价IMGN853的抗肿瘤效果。通过皮下注射到右腹部中的IGROV-1卵巢癌细胞(1×10^7 细胞/动物)来接种SCID小鼠。当肿瘤在尺寸上达到约100mm³(肿瘤细胞接种后7天)时,将小鼠随机地分成四组(每组6只动物)。通过单次静脉内注射1.2mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg的IMGN853来处理小鼠。对照组的动物接受PBS的单次静脉内注射。通过每周两次测量肿瘤尺寸来监控肿瘤生长。肿瘤尺寸用以下公式计算:长度 \times 宽度 \times 高度 \times 1/2。

[0214] 在2.5mg/kg和5.0mg/kg剂量水平下的IMGN853具有针对 IGROV-1肿瘤(通过手动方法的IHC分数为3纯合的)的高活性,两个剂量水平都产生了5%的T/C值(图9)。在2.5mg/kg和5.0mg/kg组中分别有5/6只和6/6只小鼠出现部分肿瘤消退。IMGN853在1.2 mg/kg剂量下无活性(T/C=47%)。

[0215] 实施例5

[0216] 在OV-90人卵巢癌异种移植物中IMGN853处理的剂量-反应抗肿瘤活性

[0217] 在建立的卵巢癌皮下异种移植模型中评价IMGN853的抗肿瘤效果。通过皮下注射到右腹部中的OV-90卵巢癌细胞(1×10^7 细胞/动物)来接种SCID小鼠。当肿瘤在尺寸上达到约100mm³(肿瘤细胞接种后13天)时,将小鼠随机地分成四组(每组6只动物)。通过单次静脉内注射1.2mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg的IMGN853来处理小鼠。对照组的动物接受PBS的单次静脉内注射。对照组的动物接受以相同时间表静脉内施用的PBS。通过每周两次测量肿瘤尺寸来监控肿瘤生长。肿瘤尺寸用以下公式计算:长度 \times 宽度 \times 高度 \times 1/2。

[0218] 在2.5mg/kg和5.0mg/kg剂量水平下的IMGN853具有针对 OV-90肿瘤(通过手动方法的IHC分数为3异质-均质)的活性,分别产生了36%和18%的T/C值(图10)。在5.0mg/kg组中两只动物出现部分肿瘤消退;在任何其它处理组中没有出现其它肿瘤消退。IMGN853 在1.2mg/kg剂量下无活性(T/C=77%)。

[0219] 实施例6

[0220] 在SKOV-3人卵巢癌异种移植物中IMGN853处理的剂量-反应抗肿瘤活性

[0221] 在建立的卵巢癌皮下异种移植模型中评价IMGN853的抗肿瘤效果。通过皮下注射到右腹部中的SKOV-3卵巢癌细胞 (1×10^7 细胞/动物) 来接种SCID小鼠。当肿瘤在尺寸上达到约100mm³ (肿瘤细胞接种后26天) 时, 将小鼠随机地分成四组 (每组6只动物)。通过单次静脉内注射1.2mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg的IMGN853来处理小鼠。对照组的动物接受PBS的单次静脉内注射。通过每周两次测量肿瘤尺寸来监控肿瘤生长。肿瘤尺寸用以下公式计算: 长度 \times 宽度 \times 高度 \times 1/2。

[0222] 所有剂量的IMGN853针对SKOV-3肿瘤 (通过手动方法的IHC 分数为1-3局部) 无活性, 其中IMGN853处理的肿瘤的生长与PBS 对照组平行 (图11)。没有进行数据分析, 并且基于这个模型中的 IMGN853无活性而提早结束了研究。

[0223] 实施例7

[0224] 在KB人宫颈腺癌异种移植植物中IMGN853处理的剂量-反应抗肿瘤活性。

[0225] 在建立的皮下异种移植宫颈腺癌模型中评价IMGN853的抗肿瘤效果。通过皮下注射到右腹部中的KB宫颈腺癌细胞 (1×10^7 细胞/动物) 来接种SCID小鼠。当肿瘤在尺寸上达到约100mm³ (肿瘤细胞接种后7天) 时, 将小鼠随机地分成四组 (每组6只动物)。通过单次静脉内注射1.0mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg的IMGN853来处理小鼠。对照组的动物接受PBS的单次静脉内注射。通过每周两次测量肿瘤尺寸来监控肿瘤生长。肿瘤尺寸用以下公式计算: 长度 \times 宽度 \times 高度 \times 1/2。

[0226] 在2.5mg/kg和5.0mg/kg两个剂量水平下的IMGN853针对KB 肿瘤具有肿瘤生长抑制 (T/C=0%) 方面的高活性 (图12)。5.0mg/kg处理组的六只小鼠中的六只和2.5mg/kg处理组的六只小鼠中的五只出现CR, 并且保持无肿瘤直到研究结束 (第120天)。1.0mg/kg剂量有活性, 产生了37%的T/C, 但是没有出现部分或完全消退。

[0227] 实施例8

[0228] 在福尔马林固定石蜡包埋的 (FFPE) 样本中FOLR1的免疫组织化学染色—自动化方法。

[0229] IHC染色测定使用了IVD I类试剂 (包括作为测试物的Novocastra FOLR1抗体 (Novocastra/Leica, 目录号NCI-L-FR α , 克隆BN3.2)) 和 Leica Bond RX自动化染色仪。通过用包括后初级试剂 (兔抗小鼠 IgG)、随后为聚合物试剂 (羊抗兔聚合物) 和3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) 发色团的Leica Bond Refine检测系统进行孵育, 来检测结合的测试物或对照物。将FFPE样本用如下所概括的指定浓度的一抗 (通过在Leica稀释液中稀释FOLR1来制备) 染色。

[0230] IHC抗体

测试物 ¹⁾	叶酸受体 α (Novocastra/Leica, 目录号 NCI-L-FR α , 批号 159506), 鼠类, 克隆 BN3.2, 液体浓度: 75 μ g/mL
[0231]	IgG1 (Beckman Coulter, 目录号 6602872, 批号 2S7SPS04-23 和 2S7SPS04-26) 储备液浓缩: 1 mg/mL, 鼠类, 克隆 2T8-2F5

[0232] 使用Leica Bond RX的FFPE测定方法

步骤 ⁱ⁾	条件	时间
烘烤	温度: 60°C	30 分钟
脱蜡	Bond 脱蜡液	固定
	100%乙醇	固定
抗原修复	Bond ER2	20 分钟
[0233] 内源性过氧化物酶块	过氧化物(Refine 试剂盒组分)	5 分钟
测试物	在 Leica 稀释液中的 1.9 μg/mL 的 FOLR1	15 分钟
检测	后初级试剂(Refine 试剂盒)	8 分钟
	聚合物(Refine 试剂盒)	8 分钟
	混合的 DAB (Refine 试剂盒)	10 分钟

步骤 ⁱ⁾	条件	时间
[0234] 复染色	苏木精(Refine 试剂盒)	5 分钟

[0235] 对所有的染色样本进行评价和评分。首先评价对照样本,随后评价测试样本(来自TMA的整个切片和单个核心)。对于所评价的每个肿瘤组织或细胞团块,报告了所染色的肿瘤细胞的染色强度和相应比例的描述。为每种样本报告了细胞膜相关的染色。当从一位患者评价重复分数时,仅将较高的分数包括在分析中。如果分数仅描述了细胞质染色,则最终分数报告为零(0)。如下文概括的表所述,将强度和均匀度给予每种样本。相对于对照IgG染色(非特异性),对染色强度和分布模式进行评分。将强度在0至3(0=无染色、1=弱、2=中等以及3=强)的标尺上评分,并且将分布评分为局部(<25%的细胞染色)、异质(25-75%的细胞染色)以及均质(>75%的细胞染色)。在正常组织中,当计算强度和比例时只评价了限定的亚结构。

[0236] 由强度和均匀度标尺组成的IHC评分系统

强度(染色的亮度)		
观察的强度	强度分类	报告的强度
0	阴性	0
0-1	非常弱	1
1	弱	
1-2	弱至中等	2
2	中等	
2-3	中等至强	3
3	强	
均匀度(染色细胞百分比——仅细胞膜)		
0		阴性
局部		<25%
异质性(异质)		25-75%
均质性(均质)		>75%

[0237] [0238] FFPE肿瘤样本来源于肿瘤微阵列,并且人组织块来源于七种不同肿瘤,如下文所概括。

[0239] FFPE测试样本:TMA

[0240]

解剖部位	供应商	目录号	代码	每位患者的核心数量	患者总数
肾脏	Pantomics	KIC1501	P-T-ARR-KID-122711-1	2	69
肺部	Pantomics	LUC1501	P-T-ARR-LN G-122711-1	2	70
肺部	Tristar	69571059/TA1249	P-T-ARR-OV A-122711-1	1	110
卵巢	Biochain	T8235725-5	P-T-ARR-OV A-122111-1	1	62
卵巢	Pantomics	OVC1501	P-T-ARR-OV A-122711-1	2	70
卵巢	Tristar	69571091/TA1322	P-T-ARR-OV A-010912-1	2	96
子宫(子宫内膜)	Pantomics	EMC1501	P-T-ARR-EM E-122711-1	2	70
各种的	Pantomics	MTU481	P-T-ARR-122711-1	1	48

[0241] FFPE测试样本:整个切片

[0242]

器官	代码	来源	诊断(每份来源文件编制)
卵巢	1	未知	子宫内膜样腺癌
	2	Proteogenex	子宫内膜样腺癌
	3	CHTN	腺癌, 混合有子宫内膜样、浆液性以及透明的特征
	4	CHTN	腺癌, 高级别, 具有混合的乳头状、浆液性、子宫内膜样和透明细胞区域
	5	CHTN	浆液性乳头状腺癌
	6	Proteogenex	浆液性腺癌
	7	Proteogenex	浆液性乳头状腺癌
	8	Proteogenex	浆液性乳头状腺癌
	9	CHTN	浆液性乳头状腺癌
	10	Proteogenex	浆液性乳头状腺癌
肺部	1	CHTN	腺癌, 分化不良
	2	CHTN	腺癌, 腺泡的、良好分化、具有细支气管肺泡特征
	3	CHTN	腺癌, 粘液性特征
	4	CHTN	腺癌

[0243]

器官	代码	来源	诊断(每份来源文件编制)
	5	CHTN	腺癌
	6	CHTN	腺癌(细支气管肺泡)癌
	7	CHTN	腺癌
	8	CHTN	腺癌, 适度分化、具有透明细胞特征
	9	CHTN	腺癌
	10	CHTN	鳞状细胞癌

[0244] 用福尔马林固定并用石蜡包埋 (FFPE) 细胞 (肿瘤细胞或转染细胞)。在此研究中使用通过流式细胞术而显示展现不同的FOLR1表达范围的FFPE细胞团块样本和正常人组织, 以表征阳性和阴性对照并用于特异性的分析。下文报告了展现不同水平FOLR1的细胞团块和相应分数。在细胞团块中的染色分数与相应FOLR1表达水平 (通过校准的流式细胞仪来测定的每个细胞结合的抗体, 即ABC) 之间存在弱相关性。例如, 将1-3异质的分数给予了分别展现40,098和565,481 ABC值的SW620和IGROV-1。此外, 显示1.5百万ABC值的HeLa 细胞导致2-3异质的分数, 而显示830,003ABC的300.19/FR1恢复到 3均质的更高分数。

[0245] 在测试物浓度为1.9 μ g/mL时细胞团块的最终分数

[0246]

细胞系	^a ABC值	染色分数
SW620	40,098	1-3异质
T47D	97,576	1-2异质
IGROV-1	565,481	1-3异质
300.19/FR1	830,003	3均质
HELA	1,500,587	2-3异质
KB	4,000,000	3均质

[0247] ^a报告的ABC值是细胞群中每个细胞所结合的抗体的平均值并且如以下来测定:使用流式细胞术和Quantibrite™微珠(BD Biosciences)来将浓度为 1.0×10^{-8} M的抗FOLR1-PE (1:1)用于测定相应细胞系上的ABC值。

[0248] 流式细胞术直方图代表细胞分布与每个细胞结合的抗FOLR1的数量(FOLR1表达水平)的关系。直方图和相应IHC染色结果二者表明每一种的这些细胞系都含有具有广泛FOLR1表达范围的异质性细胞群。例外为显示均匀的流式细胞术直方图和IHC染色分数二者的300.19/FR1细胞系。这个数据表明各自表达更均匀水平的FOLR1的细胞系可以在ABC值与相应染色分数之间提供更好的相关性。虽然测定表明了在所有FOLR1阳性细胞团块对照中的阳性染色,但是在来自大多数的这些细胞团块的染色分数与相应FOLR1表达水平之间存在弱相关性。因此,来自这个组的细胞团块不会被确认为高表达、中等表达以及低表达的对照。图13示出了描绘通过IHC和流式细胞术测得的在细胞系中的FOLR1表达的代表性照片和直方图。

[0249] 为了确定测定条件,对测试物和对照物的一系列稀释液进行测试,以选择显示适当水平的灵敏度的条件。在一组FFPE样本上进行实验,所述样本包括FOLR1阳性细胞团块和由以下组成的TMA: FOLR1阳性和阴性正常组织(肾上腺(皮质/髓质)、乳腺(导管和小叶/结缔组织)、输卵管(表面上皮/肌肉壁)、肾脏(小管/肾小球)、肺(I/II型肺细胞/牙槽间结缔组织)、胰腺(导管/朗格汉氏岛)、唾液腺(导管/基质)、皮肤(分泌腺/表皮)、胃部(表面上皮/粘膜下层))、以及肿瘤组织的整个切片(10个卵巢肿瘤样本和10个肺肿瘤样本)。用连续稀释的测试物浓度(0.25 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.9 μ g/mL、1.9 μ g/mL、3.8 μ g/mL以及7.5 μ g/mL)或1.9 μ g/mL或3.8 μ g/mL的对照物浓度将每种样本染色。比较每种样本的每种稀释液的相对染色强度以确定最佳稀释液。最佳稀释液的标准为以下稀释液:1)在用同种型对照染色的样本中不引起背景染色;2)在用测试物染色的阴性组织对照中不引起染色;并且3)在代表所关注的指标的测试样本(卵巢肿瘤、子宫内膜肿瘤、NSCLC肿瘤以及肾肿瘤FFPE组织)之间区分细胞膜相关的FOLR1表达的不同水平。所评价的测试物的五种稀释液中,使用Leica Bond RX自动化方法(烘烤和脱蜡方案,使用ER2的HIER持续20分钟的方案、以及染色方案IHC F-具有额外冲洗),1.9 μ g/mL的浓度显示染色结果的最好动态范围。

[0250] 实施例9

[0251] 特征为测定的动态范围的对照的确认和表征——自动化染色方法

[0252] 质量对照:将人正常唾液腺、肺和胰腺确认为待用于每个测定中的阳性组织对照以验证染色程序如预期而进行。人正常食管确认为阴性对照。将这些对照如下进行表征:为

了建立覆盖测定的动态范围的对照,将由预期显示测定的动态范围的若干FOLR1阳性和阴性正常组织样本组成的组织微阵列(TMA)用作优化和验证阶段期间的测定验证对照。在这个TMA中具有确定结构的四种正常组织被确认为如下的合适测定对照:正常人肺部的呼吸上皮(分数为2均质);正常人胰腺的导管(分数为3均质顶端);正常人唾液腺的闰管(分数为1-2异质);以及正常人食管(分数为0)。对于总共4次测定运行,来自这个TMA的确认的合适测定对照给出一致的结果。这些结果表明所选择的对照给出一致的结果并且跨越了测定的动态范围。

[0253] 在确认为跨越测定的动态范围的对照的正常组织中的结构

[0254]

正常器官	亚结构	染色分数(对照物)	染色分数(测试物)
食管	所有结构	0(阴性)	0(阴性)
唾液腺	闰管	0(阴性)	1-2异质
肺部	呼吸上皮	0(阴性)	2均质
胰腺	导管	0(阴性)	3均质顶端

[0255] 顶端染色被定义为极化的不均匀膜染色

[0256] 实施例10

[0257] 自动化染色方法的性能分析

[0258] 此测定的预期用途是特异性地检测FOLR1可再现性并且在有适当灵敏度的情况下区分卵巢、子宫内膜、NSCLC以及肾FFPE肿瘤组织中膜相关的FOLR1表达的不同水平和不同均匀度(最佳动态范围)。因此,特异性、可重现性以及灵敏度被视为性能标准。

[0259] 通过将研究测定中的正常组织染色与先前所报道的结果进行比较来评价研究测定的特异性和灵敏度。将来自此研究的染色结果与来自使用FFPE正常组织的Scorer等2010(A Full Immunohistochemical Evaluation of a Novel Monoclonal Antibody to Folate Receptor-alpha. The Novocastra Journal of Histopathology, REAGENTS:2010(3):8-12, 描述相同的抗体克隆BN3.2)以及来自在新鲜冷冻的正常组织上使用 IMG853(huMov19(M9346A)抗体)进行的组织交叉反应性(TCR)研究(ImmunoGen Report IMH28-003)的相应染色结果进行比较。对来自每种方法的染色结果进行的比较表明三种测定在相对灵敏度不同的情况下显示大体上相似的正常组织染色曲线,其中Scorer测定最不灵敏,研究测定(IMH28-011)具有中等灵敏度,并且TCR研究方法最灵敏。一些结构仅在两种更灵敏的方法(研究测定和TCR测定)中显示阳性染色。由Scorer使用的最不灵敏的测定中没有出现阳性染色实例,其在研究测定和TCR方法中也不为阳性。这些结果表明研究测定的特异性和灵敏度适合用于评价正常组织中的FOLR1表达。

[0260] 研究测定的特异性和灵敏度进一步通过对由卵巢、子宫内膜、NSCLC以及肾肿瘤组成的一组肿瘤TMA(代表测定的预期临床用途的样本集合)进行染色和评价来表征。阳性染色一致地集中于具有正常邻近组织组分的肿瘤组织,所述正常邻近组织组分包括基质、血管、淋巴细胞以及如预期地阴性或阳性染色的正常器官组织。对于卵巢癌抑或NSCLC的每种亚型,在来自不同供应商的TMA之间的染色分数分布显示相似的分数的分布,提示此方法对不同固定和处理条件不敏感。因为分布模式在TMA之间相似,所以将来自不同阵列的数据组合并将分数分类。每种亚型含有20个或更多个样本的肿瘤亚型的这些分数的概括列在下表

中。如这些表中所概括的,为每种肿瘤类型标注了分数的动态范围,并且所述动态范围指示此测定显示了对区分卵巢、子宫内膜、NSCLC以及肾FFPE肿瘤组织中膜相关的FOLR1表达的不同水平和不同均匀度的适当敏感度。图14至图18中提供了浆液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌、NSCLC癌、子宫内膜癌以及肾透明细胞癌的代表性照片。图23至图25示出了适用于例如染色指南或诊断试剂盒中的其它代表性照片。这些研究表明所述测定是特异性的并且具有用作诊断试剂或伴随诊断试剂的适当灵敏度。

[0261] 卵巢肿瘤的主要亚型的染色分数的概括

[0262]

亚型	样本数 (%)						
	总数	≥3 异质 ^a	≥2 异质 ^a	≥1 异质 ^a	1-3 局部	任何 阳性	阴性
子宫内膜样	35	15	18	20	6	26	9
	(100)	(43)	(51)	(57)	(17)	(74)	(26)
粘液性	29	2	4	5	0	5	24
	(100)	(7)	(14)	(17)	(0)	(17)	(83)
浆液性	129	44	92	92	8	100	29
	(100)	(34)	(71)	(71)	(6)	(78)	(22)

[0263] ⁱ⁾排除局部染色模式

[0264] NSCLC肿瘤的染色分数的概括

[0265]

类型	亚型	样本数 (%)						
		总数	≥3 异质 ⁱ⁾	≥2 异质 ^a	≥1 异质 ^a	1-3 局部	任何 阳性	阴性
腺癌	全部 ^b	67	17	39	42	5	47	20
		(100)	(25)	(58)	(63)	(7)	70	30
	指定细支气管肺泡癌	7	2	5	5	0	5	2
		(100)	(29)	(71)	(71)	(0)	(71)	(29)
鳞状细胞癌	全部	74	1	4	6	6	12	62
		(100)	(1)	(5)	(8)	(8)	(16)	(84)

[0266] ⁱ⁾排除局部染色模式

[0267] 包括除指定的细支气管肺泡癌样本之外的所有腺癌样本

[0268] 子宫内膜腺癌和肾透明细胞肿瘤的染色分数的概括

肿瘤/亚型	样本数 (%)						
	总数	≥3 异质 ^a	≥2 异质 ^a	≥1 异质 ^a	1-3 局部	任何 阳性	阴性
[0269] 子宫内膜/ 腺癌	58 (100)	5 (9)	23 (40)	30 (52)	10 (17)	40 (69)	18 (31)
肾/透明细 胞	34 (100)	0 (0)	9 (26)	23 (68)	6 (18)	29 (85)	5 (15)

[0270] 排除局部染色模式

[0271] 通过使用卵巢、NSCLC或肾肿瘤三种FFPE肿瘤组织样本(其中每种样本显示高的、中等的或低的分数)评价测定的批内和批间的再现性,来探讨研究测定的精密度。对于批内再现性,将各自含有肺、卵巢和肾肿瘤的切片的九个载片放置在Leica Bond RX上的九个随机位置处。对于批间再现性,在不同的三天,对含有来自相同样本的切片的三个载片进行染色。评价来自批内和批间再现性实验二者的所有载片,并且每种相应的样本显示相等的染色结果:肺肿瘤(高:3均质)、卵巢肿瘤(中等:2异质)以及肾肿瘤(低:1-2异质)。此数据证明了跨越具有低水平、中等水平以及高水平的表达的组织类型的再现性。

[0272] 实施例11

[0273] 通过IHC测得为≥2异质的FOLR1表达分数是用IMGN853治疗的患者选择标准。

[0274] 使用抗体-PE缀合物(FR1-24-PE)和QuantiBRITE系统来测定肿瘤细胞系中FOLR1表达的水平。在研究中包括了三种卵巢癌细胞系(Igrov-1、Skov-3和Ovar-3)、一种绒毛膜癌细胞系Jeg-3以及一种宫颈癌细胞系KB。为了获得可靠的ABC值,应该在饱和浓度(在所述浓度下,所有可用的结合位点都由缀合物占据)下进行使用抗体-PE缀合物的结合实验。为了确定用于FR1-24-PE缀合物的这种浓度,我们在具有不同FOLR1表达的一组FOLR1阳性细胞系上进行结合实验。将所述细胞与广泛浓度范围的FR1-24-PE缀合物在冰上孵育两个小时、用FACS缓冲液(具有1%BSA的PBS)洗涤、用PBS中1%的甲醛固定并在FACSCalibur流式细胞仪上分析。在 1×10^{-8} M的浓度下,缀合物使所有测试的细胞系Igrov-1、Jeg-3、Skov-3、Ovar-3以及KB上的细胞表面结合位点饱和。在随后的结合ABC-实验中,在 1×10^{-8} M浓度下使用FR1-24-PE缀合物。重复三次分析每种样本;在每种细胞系上进行若干独立的实验。在具有大约 $4,000,000 \pm 300,000$ 的ABC值的KB细胞上发现最高的表达,然后是分别具有 $400,000 \pm 85,000$ 和 $150,000 \pm 75,000$ 的ABC值的Igrov-1和Jeg-3细胞系。两种细胞系Skov-3和Ovar-3具有低FOLR1表达,分别为 $20,000 \pm 10,000$ 和 $7,000 \pm 4,000$ 的ABC。Jeg-3细胞中观察到ABC值的显著的实验与实验间的变化,其中ABC值从40,000变为300,000。这个可变性可能反映了所述细胞系的一些生物学特性而不是测定可变性,因为对其它分析的细胞系所获得的ABC值是较不可变的(参见下表)。

细胞系	ABC (平均值±SD, n) ¹⁾	实验与实验间的变化	
		登记的最高 ABC	登记的最低 ABC
[0275] KB	4,000,000 ± 300,000, 4	4,500,000	3,800,000
Igrov-1	400,000 ± 85,000, 5	480,000	280,000
Jeg-3	150,000 ± 75,000, 14	260,000	40,000
Skov-3	20,000 ± 10,000	28,000	10,000
Ovcar-3	7,000 ± 4,000	10,000	4,000

[0276] ¹⁾SD-标准偏差;n-独立实验的次数

[0277] 通过使用FR1-24 PE标记抗体和Quant iBRITE系统进行的基于 FACS的测定来确定ABC值。为独立实验计算平均值±标准偏差(SD)。

[0278] 针对具有广泛范围的FOLR1表达的FOLR1阳性细胞系(上文提供了细胞系的ABC值)分析IMG N853的效力和特异性。此外,在实验中包括了FOLR1阴性细胞系Nama lwa和SW2。IMG N853针对具有高FOLR1表达的细胞KB(4,000,000±300,000ABC)、Igrov-1(400,000±85,000ABC)以及Jeg-3(150,000±75,000ABC)具有高细胞毒性,其IC₅₀值分别为0.10±0.01nM、0.50±0.07nM和1.00±0.05 nM。针对所有三种细胞系的细胞杀伤活性是FOLR1依赖性的,因为过量的未修饰huMov19(M9346A)抗体(0.5μM)将缀合物的效力显著降低到典型的非特异性水平(10至20倍)。IMG N853针对低FOLR1 表达者Skov-3和Ovcar-3细胞(分别为20,000±10,000和7,000±4,000 ABC)以及针对FOLR1阴性细胞Nama lwa和SW2仅具有少量活性,其IC₅₀值大于2nM。IMG N853针对这些细胞系的细胞毒性活性较低且不是FOLR1依赖性的,因为用huMov19(M9346A)封闭不会影响它。参见图19和图20。

[0279] 使用上文所述的优化和验证测定来评价从小鼠异种移植肿瘤模型中制备的FFPE样本的FOLR1阳性。在用对照物染色的任何异种移植样本的肿瘤细胞中没有看到染色。来源于以下细胞系的FFPE小鼠异种移植组织显示以下染色模式:Igrov-1、KB和NCI-H2110显示均质染色模式和3级强度;Ishikawa和Ovcar 3显示异质染色模式和 3级强度;LXFA737显示均质染色模式和2级强度;OV-90显示异质染色和2级强度;并且SKOV3为阴性。图21和图22中提供了肿瘤异种移植物的代表性照片。

亲代细胞系和肿瘤片段	疾病指征	最终分数	染色分类
IGROV-1	卵巢癌	1-3 均质	3 均质
		1-3 均质	
		1-3 均质	
Ishikawa	子宫内膜癌	2-3 异质	3 异质
		1-2 异质/3 局部	
		2 异质/3 局部	
		2 异质/3 局部	
KB	宫颈癌	3 均质	3 均质
		3 均质	
LXFA737	NSCLC	2 均质	2 均质
		2 均质	
NCI-H2110	NSCLC	2-3 均质	3 均质
		2 均质	
OV-90	卵巢癌	1-2 异质	2 异质
		阴性 ^a	
OVCAR3	卵巢癌	1-3 异质	3 异质

亲代细胞系和肿瘤片段	疾病指征	最终分数	染色分类
		1-3 异质	
SKOV-3	卵巢癌	阴性	阴性
		阴性	

[0282] 染色阈值 (≥2异质) 既要求表达的最低水平 (染色强度) 又要求染色的最小分布 (表达FOLR1的肿瘤细胞的百分比)。临床前数据为卵巢癌中的这个阈值提供了理由。具有≥2异质的IHC分数的小鼠异种移植肿瘤样本在体内显示了对IMGN 853的敏感度。使用上文所述的优化和验证的测定来评价从小鼠异种移植卵巢肿瘤模型中制备的FFPE 样本的FOLR1阳性。两种卵巢癌异种移植模型OVCAR-3和IGROV-1 显示异质或均质染色模式和3级强度。来源于OV-90卵巢癌细胞的异种移植模型显示异质染色模式和2级强度; Skov-3卵巢癌模型为 FOLR1阴性。IMGN853在具有3级FOLR1强度的两种卵巢模型中有高活性, 并且在具有2级FOLR1强度的OV-90模型中有活性。在 SKOV-3模型中没有观察到活性。还评价了用于包括肺、子宫内膜和宫颈肿瘤的其它疾病指征的异种移植模型, 并且虽然在活性和 FOLR1染色分数之间检测到了相关性, 但必须测试另外的样本。

[0283] 卵巢肿瘤异种移植模型对IMGN853的敏感度与FOLR1表达水平的关系

异种移植植物	体内活性 (5 mg/kg 的 IMGN853, 单次剂量)	强度分数, 分布
OVCAR3	高活性	3 异质
IGROV-1	高活性	3 均质
OV-90	有活性	2 异质
SKOV-3	无活性	阴性

[0285] 其它肿瘤异种移植模型对IMGN853的敏感性与FOLR1表达水平的关系

[0286]	异种移植	肿瘤类型	体内活性 (5 mg/kg 的 IMGN853, 单次剂量)	强度分数, 分布
	NCI-H2110	NSCLC	高活性	3 均质

[0287]	异种移植	肿瘤类型	体内活性 (5 mg/kg 的 IMGN853, 单次剂量)	强度分数, 分布
	Ishikawa	子宫内 膜	无活性	2 均质
	KB	宫颈	高活性	3 均质

[0288] 本文引用的所有出版物、专利、专利申请、互联网网址以及登录号/数据库序列 (包括多核苷酸和多肽序列二者) 出于所有的目的以引用方式整体并入本文, 其程度犹如明确地并单独地指出将每个单个出版物、专利、专利申请、互联网网址以及登录号/数据库序列以引用方式如此并入本文。

[0289] 序列

[0290] SEQ ID NO:1-人叶酸受体1

MAQRMTTQLLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTYELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLLHEQCR
PWRKNACCSTNTISQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDIDLCECSPNLGPWI
[0291] QQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWVEDCRTSYTCKSNWHKGNWNTSGFNKCAVGA
ACQPFHFYFPIPTVLCNEIWTHTSYKVSNSYRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM
SGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

[0292] SEQ ID NO:2-人叶酸受体1核酸序列

atggctcagggatgacaacacagctgctgctcctcctcagtgagggtgctgtagtaggggaggctcagacaaaggaitgcatggcccaggact
gagcttcacaaigctgcatgaaacgccaagcaccacaaaggaaaagccaggcccgaggaacagttgcatgagcagtgicgacctggaggga
agaatgctgctgctgcttaccaacaccagccaggaagccataaggatgctcctacacatataagatcaactggaaccactgtggagagatggca
cctgctgcaaaaggcaatcaccaggaacactgctcctacagagctcctcccaactggggccctgcatcagcaggtggatcagagctgg
[0293] cgcacaagaggcgggactgaactgctccctgctgcaaaaggaggactgtgagcaatggtgggaagattgctgcacctctacacctgcaagagcaa
ctggcacaagggcctggaactggactcagggtttaacaagctgcgcagtgaggagctgctgcaaaccttccattctactcccccaaccactg
ttctgtgcaatgaatcgggactcactcctacaggtcagcaaacacagccgagggagtgccgctgcatccagatgctgctggaaccagccca
gggcaaccctaatgaggaggtggcaggttctatgctgcagccatgagtgaggctggccctggggcagccctggccttctctgcttagcctgg
ccctaatgtgctgctgctgctcagc

[0294] SEQ ID NO:3-huMov19vHC

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASQYTFYGFYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDIFY
[0295] NQKPFQKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVVYCTRYDGSRAMDYWQQGTTVTVSS

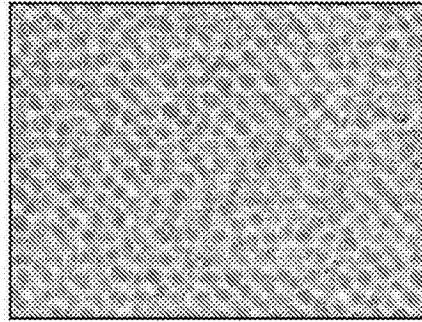
[0296] SEQ ID NO:4-huMov19vLCv1.00

DIVLTQSPFLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHTWYHQQKPGQQRLLIYRASNLVAGV
[0297] PDRFSGSGSKTDFLTNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR

[0298] SEQ ID NO:5-huMov19vLCv1.60

DIVLTQSPFLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQQKPGQQRLLIYRASNLVAGV
[0299] PDRFSGSGSKTDFLTNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR

A. 300-19细胞



B. 用FOLR1转染的300-19细胞

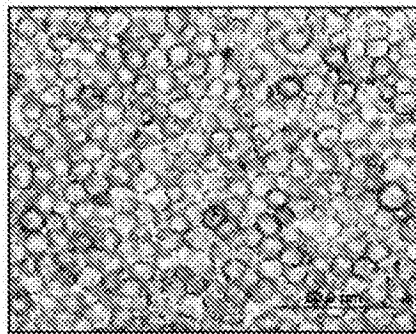


图1

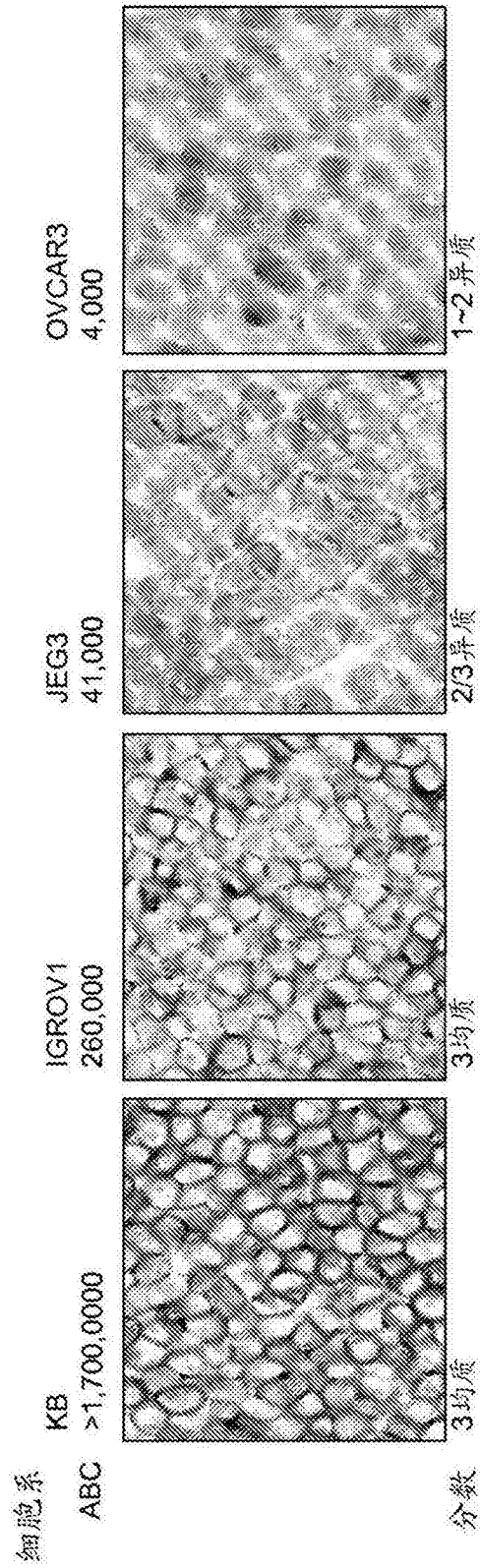


图2

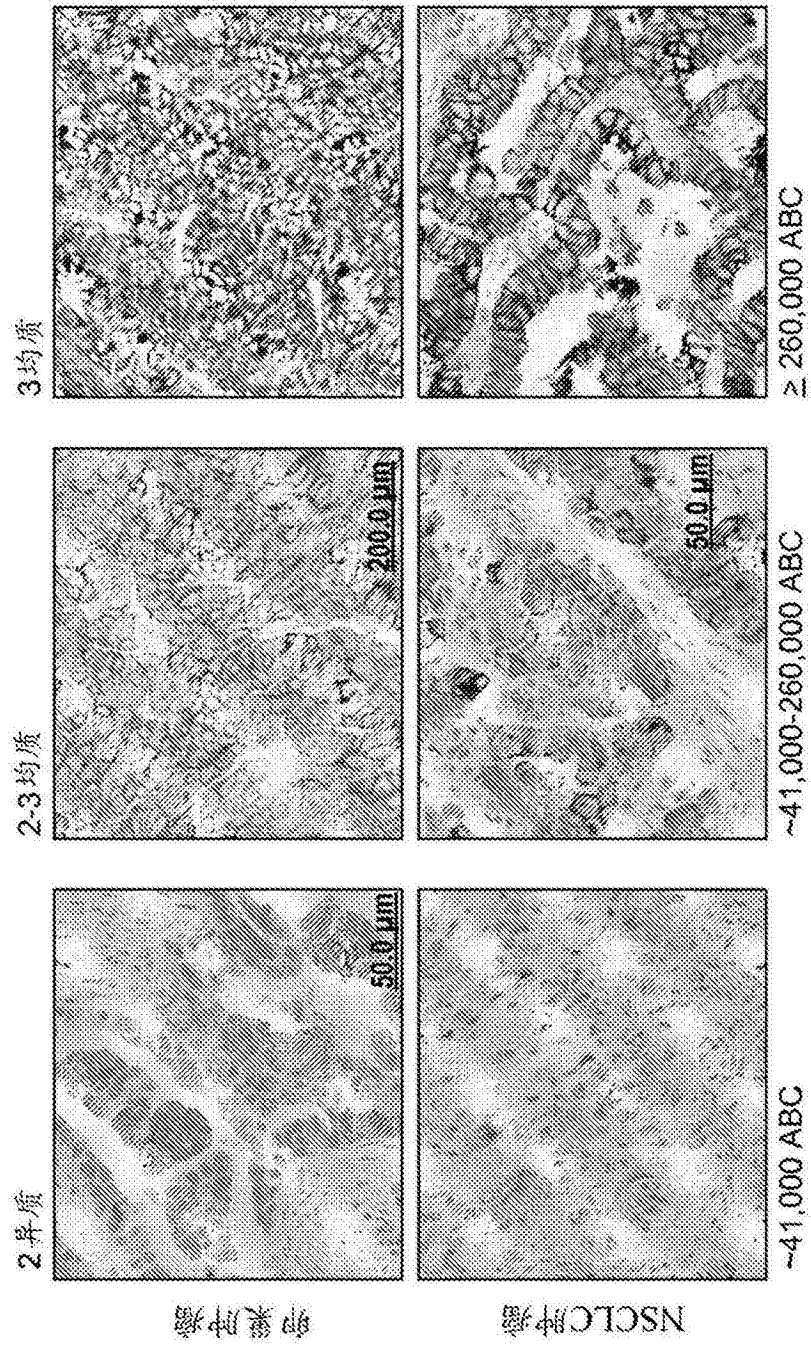


图3

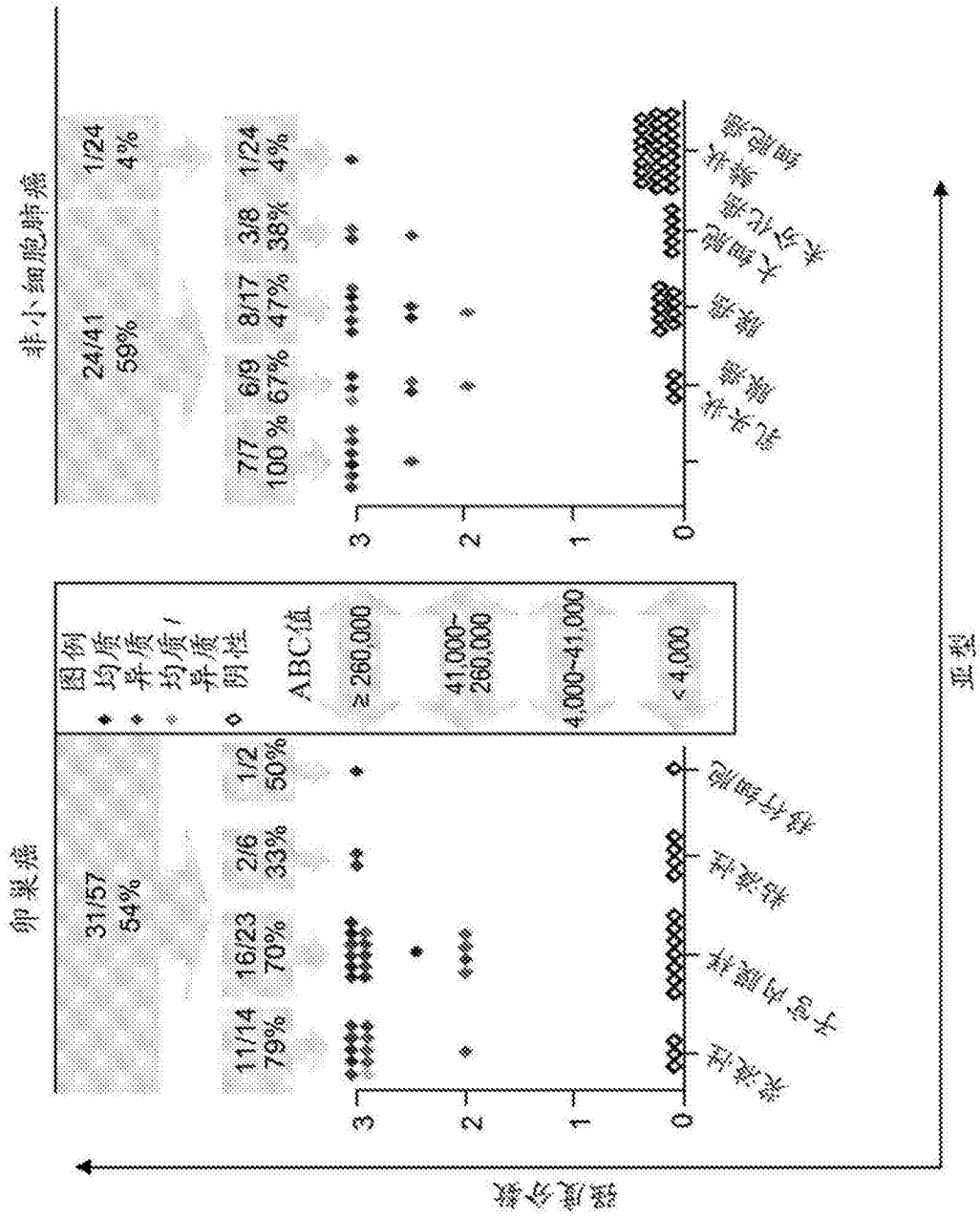


图4

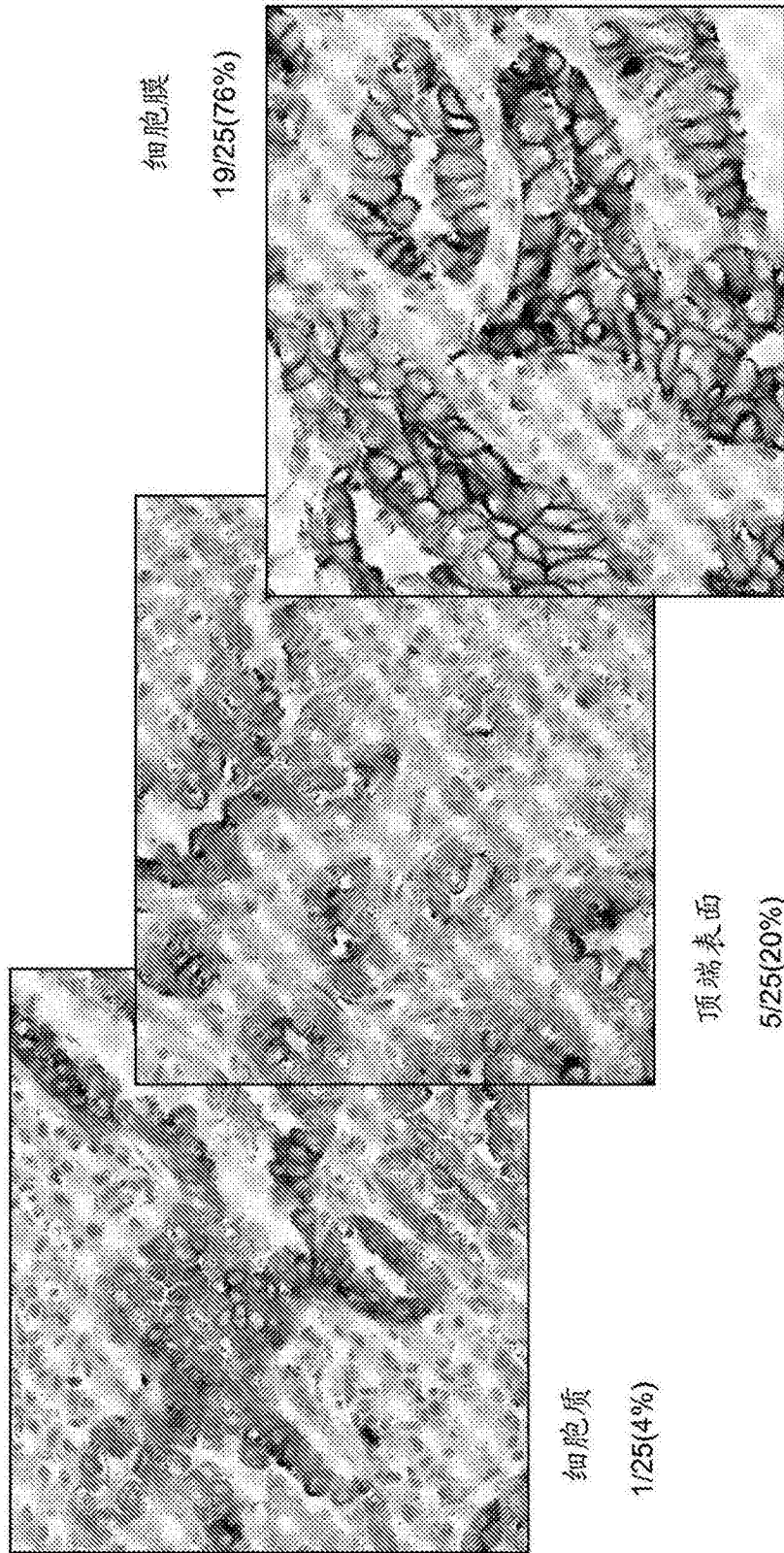


图5

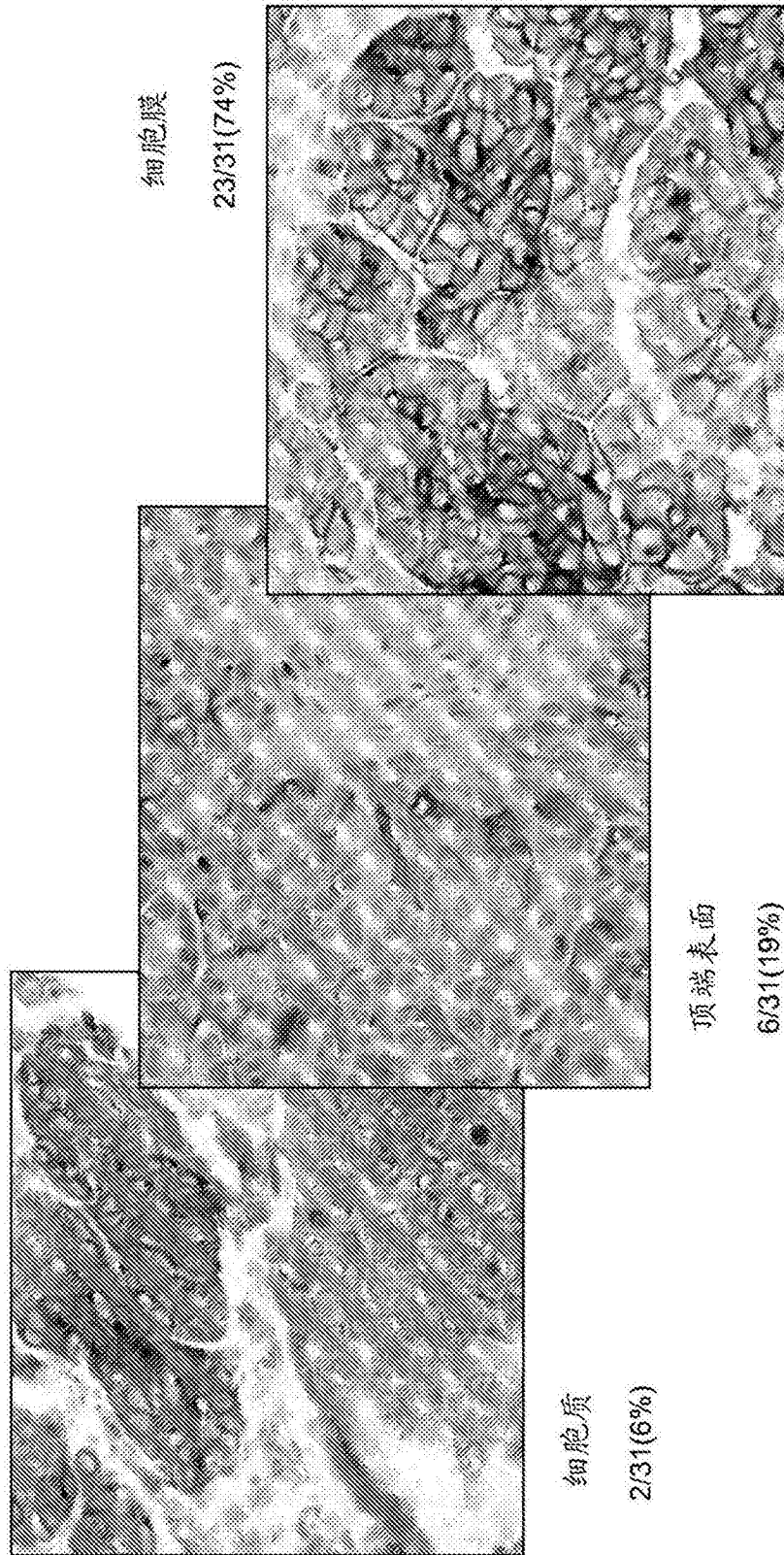


图6

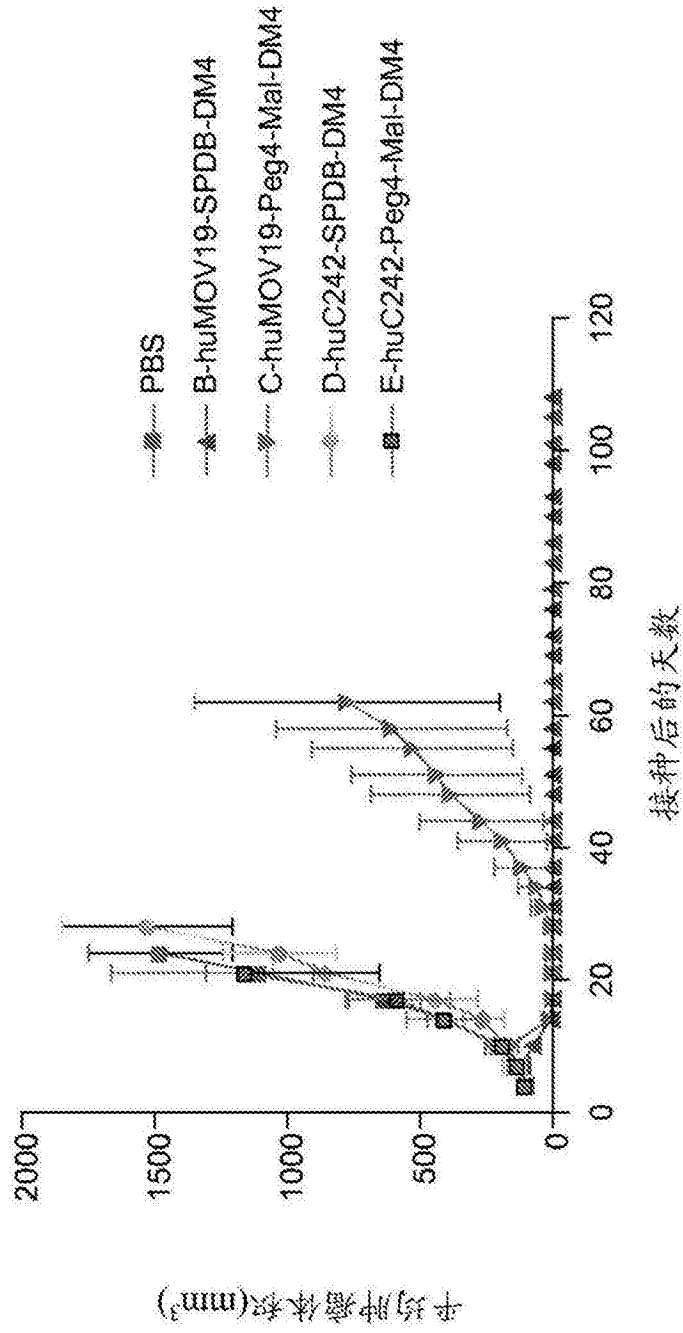


图7

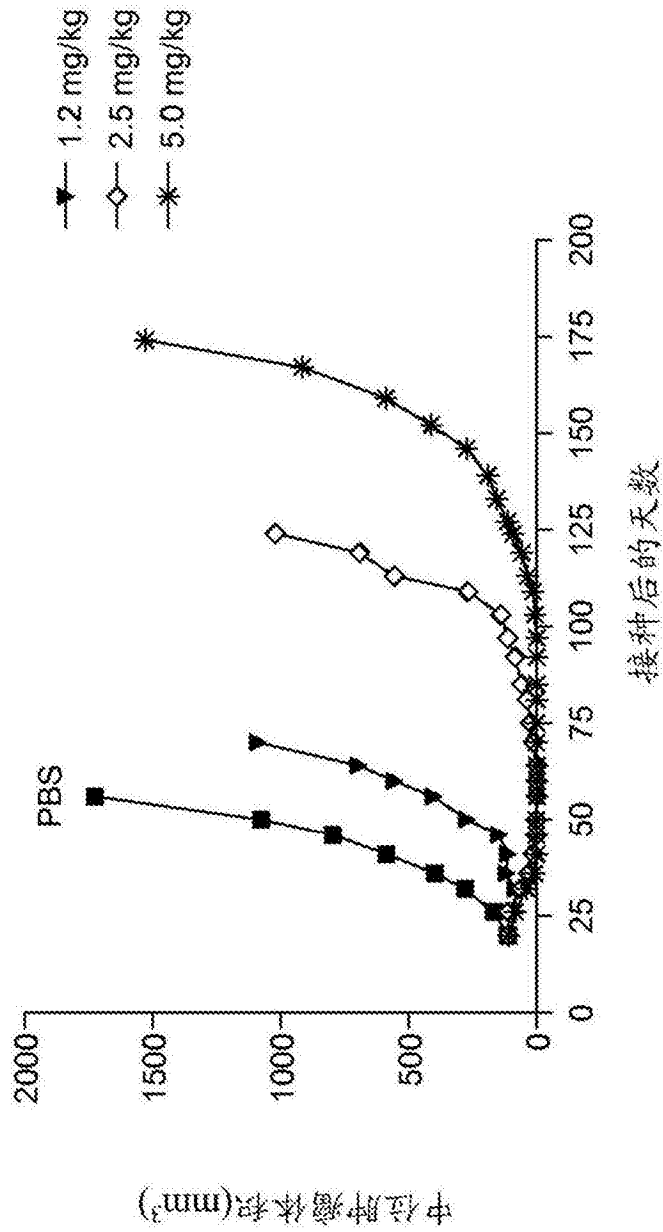


图8

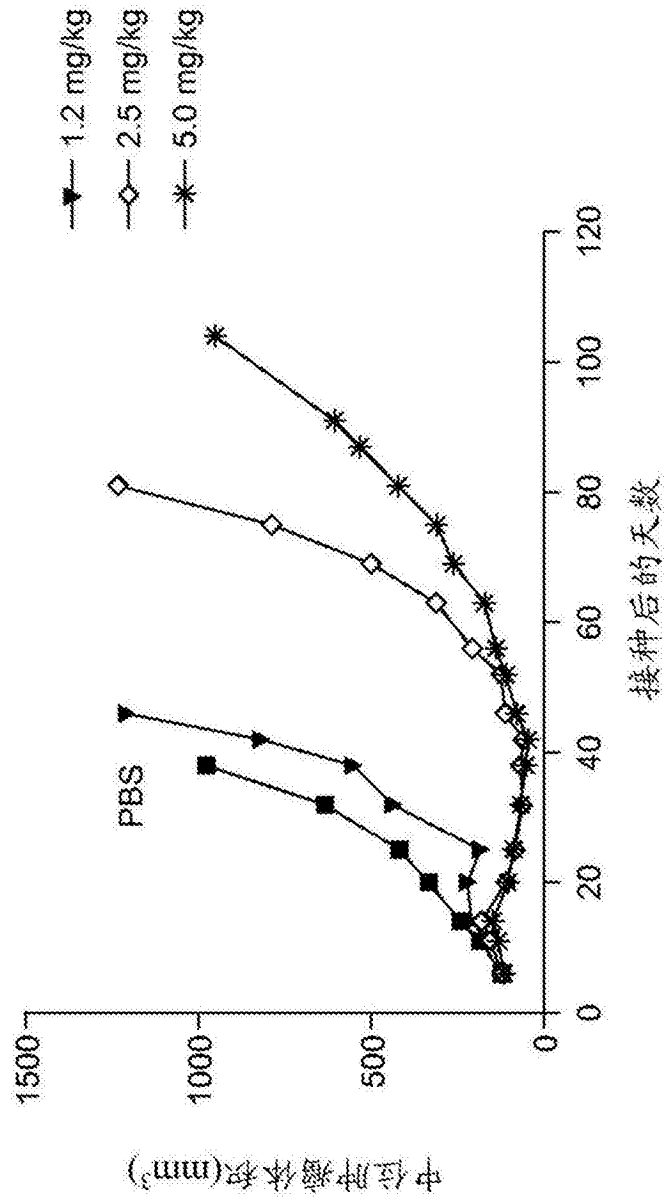


图9

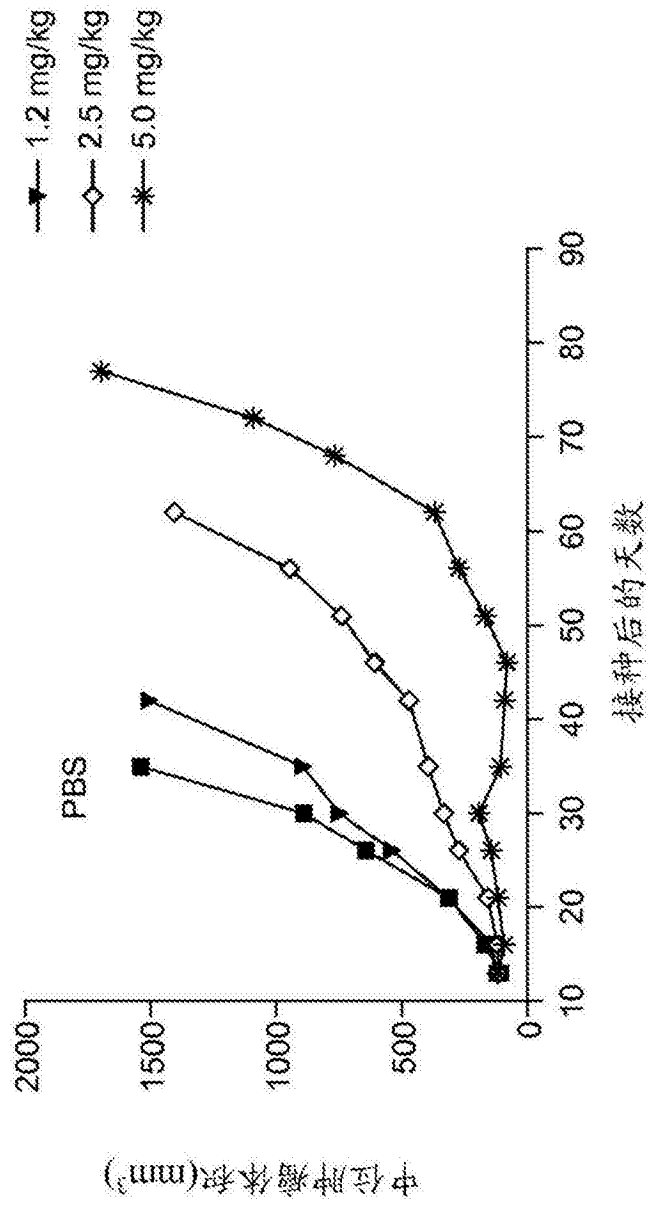


图10

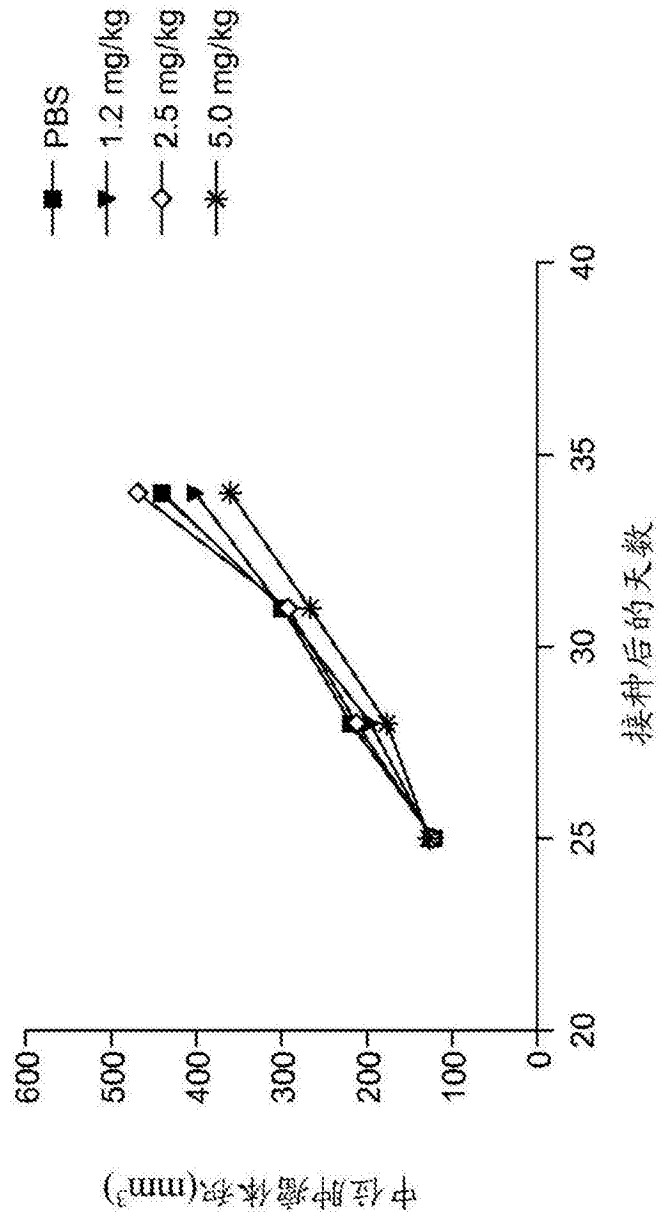


图11

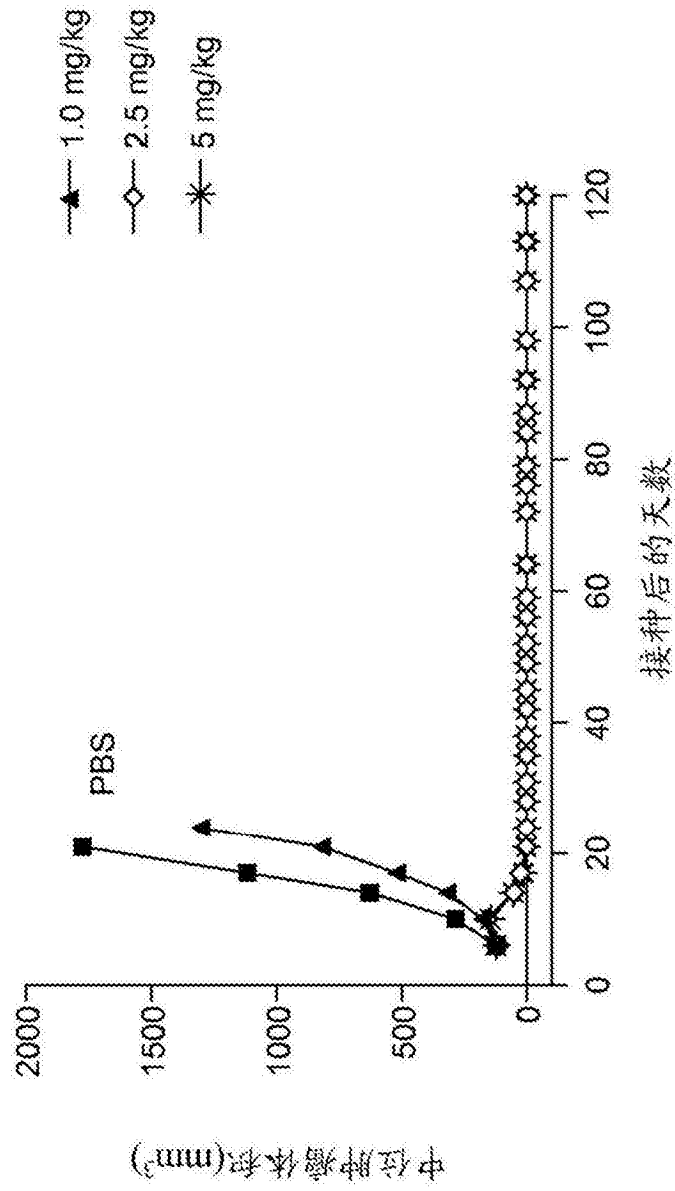


图12

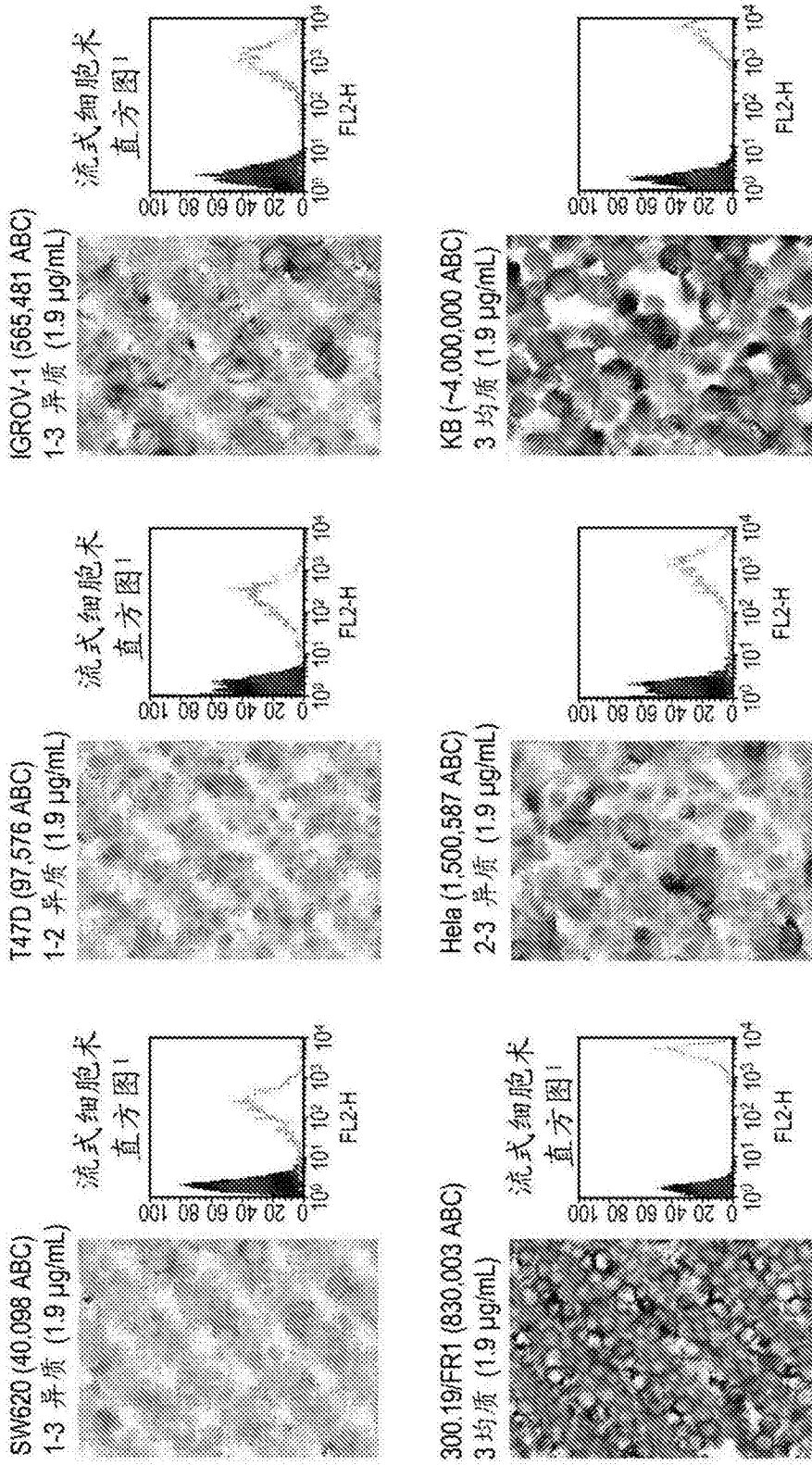


图13

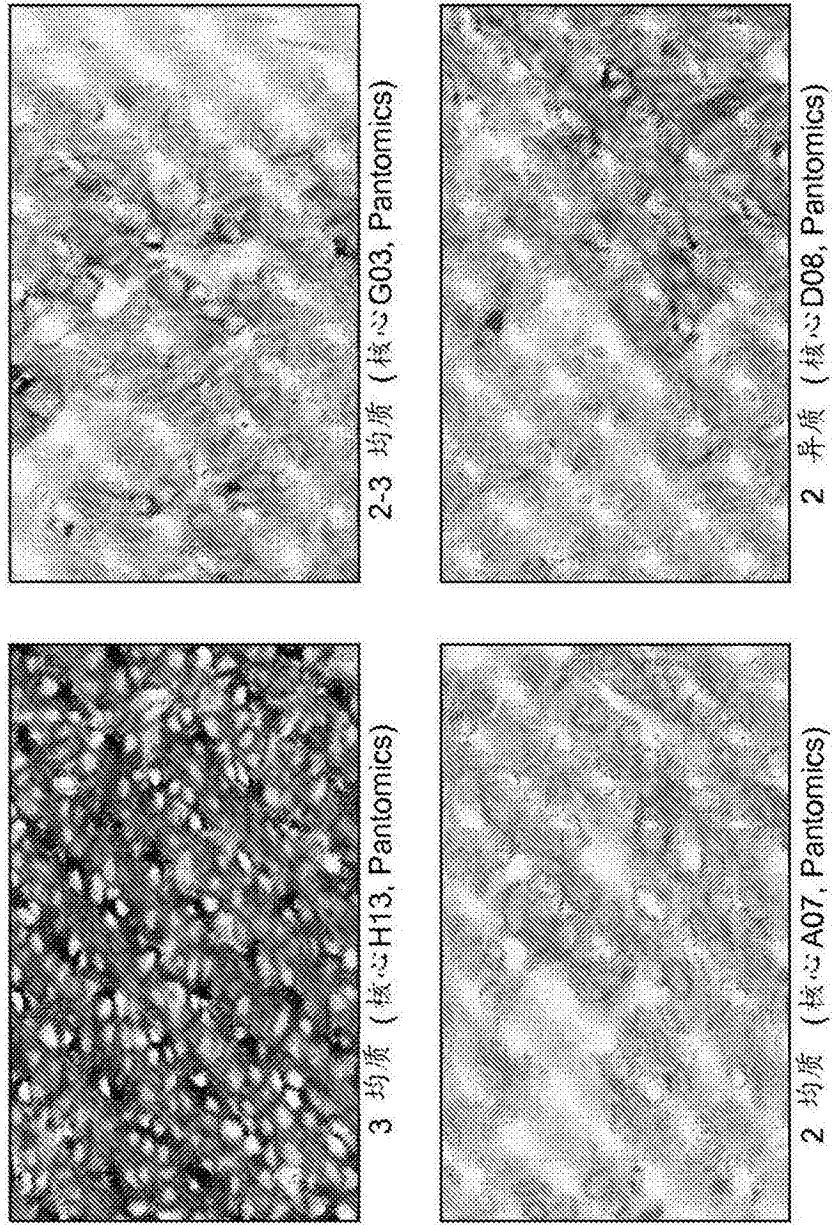


图14

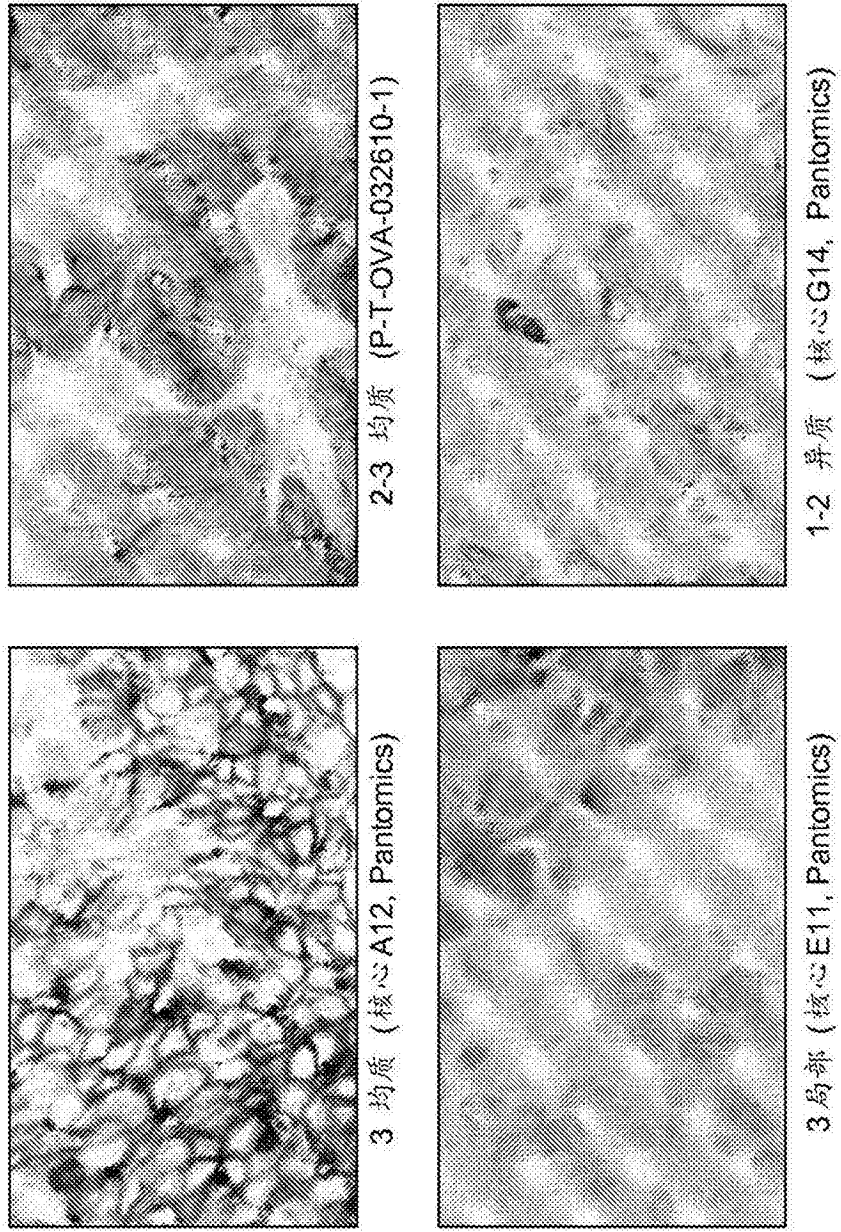


图15

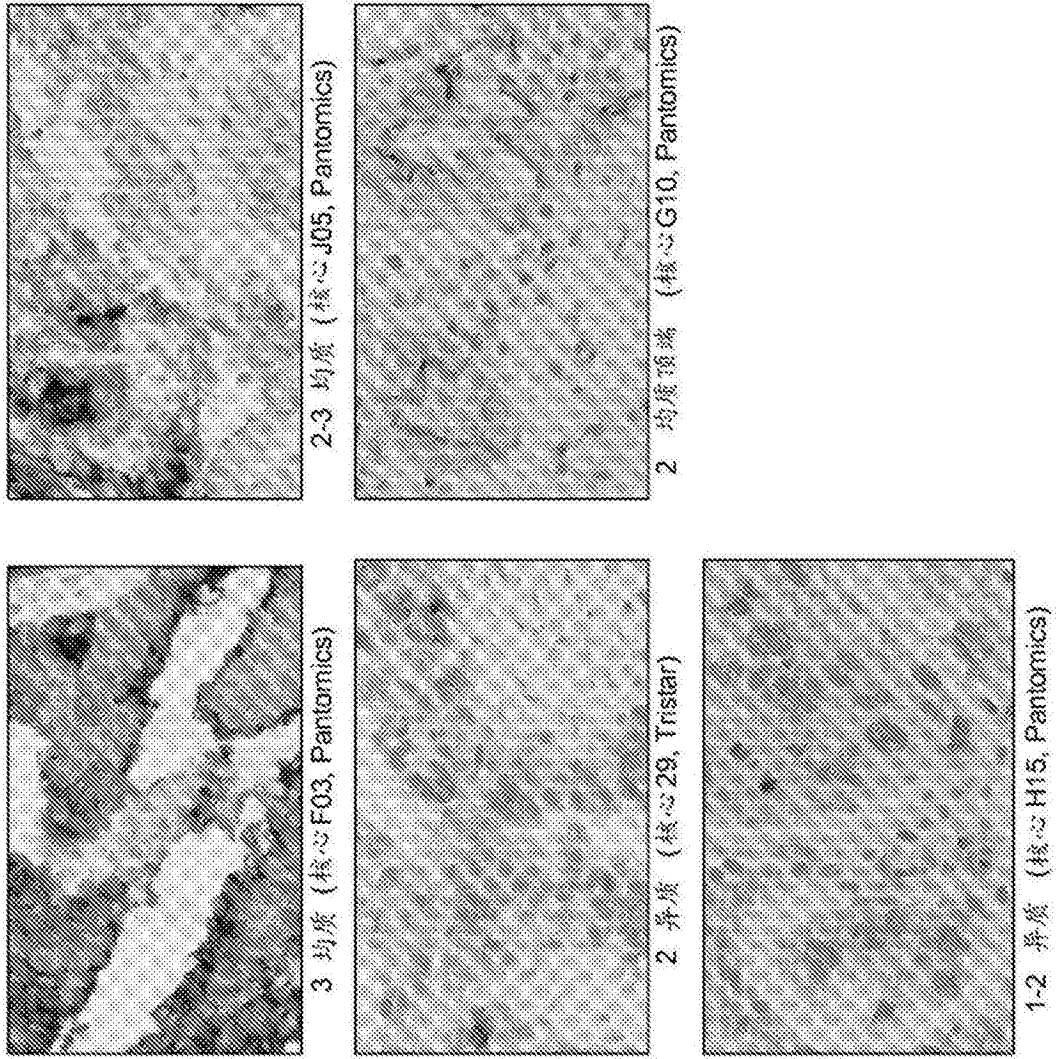


图16

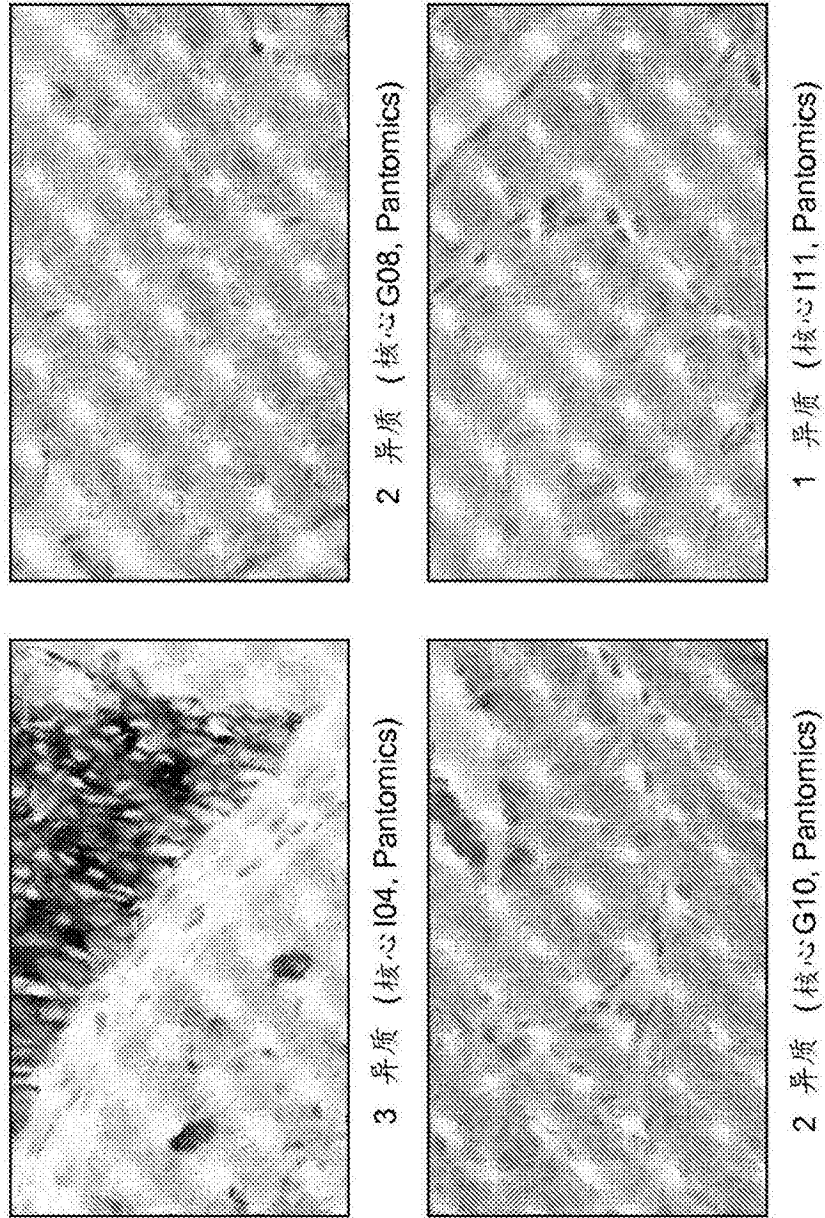


图17

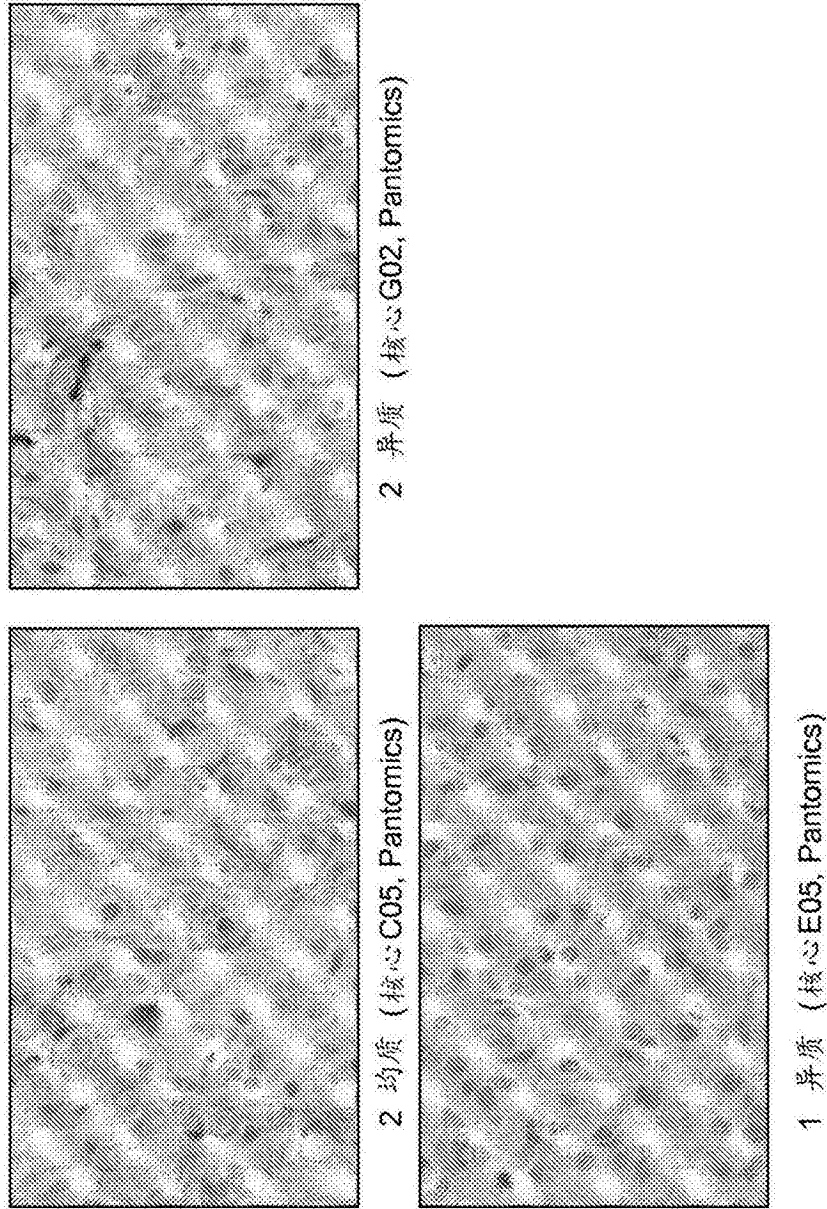


图18

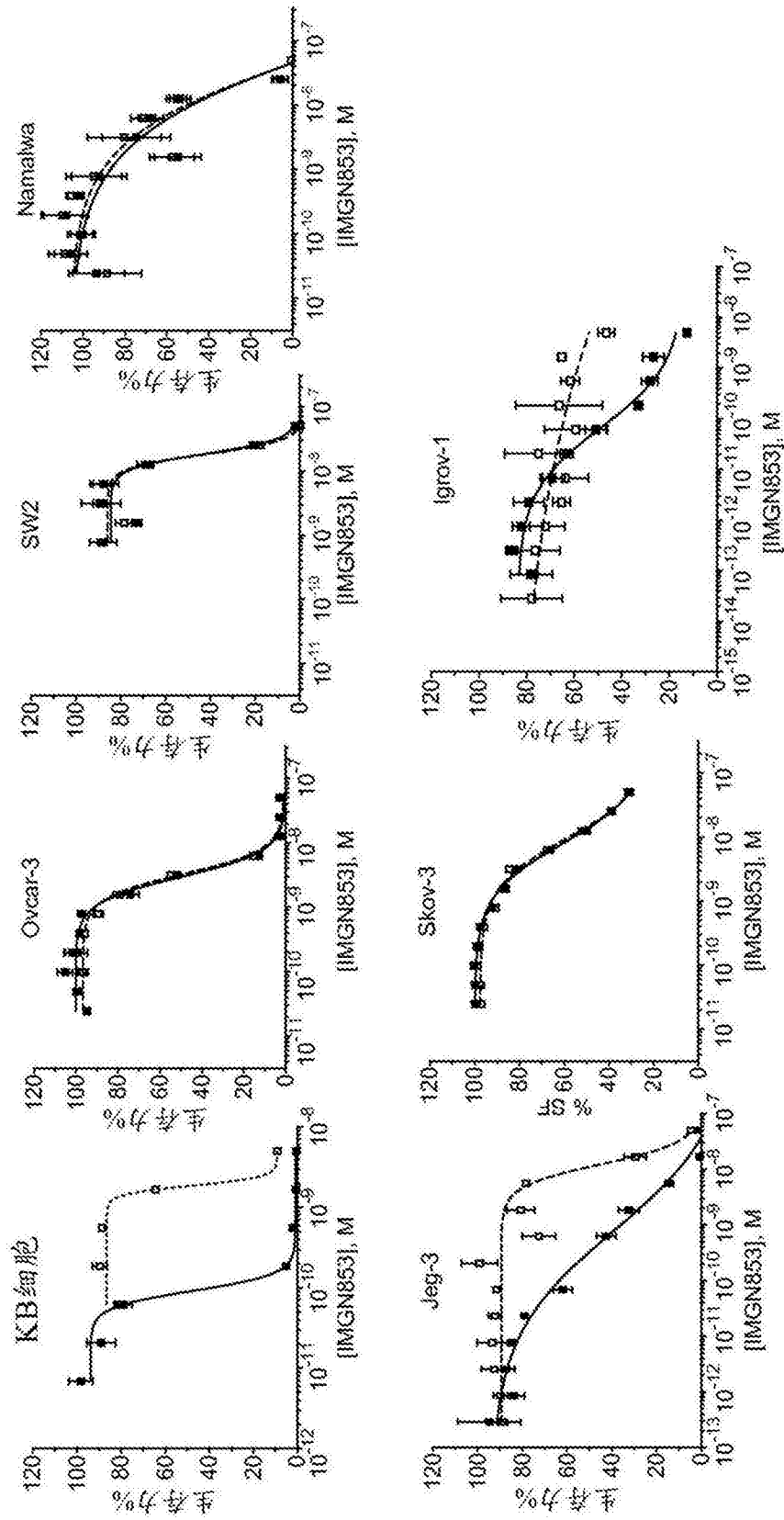


图19

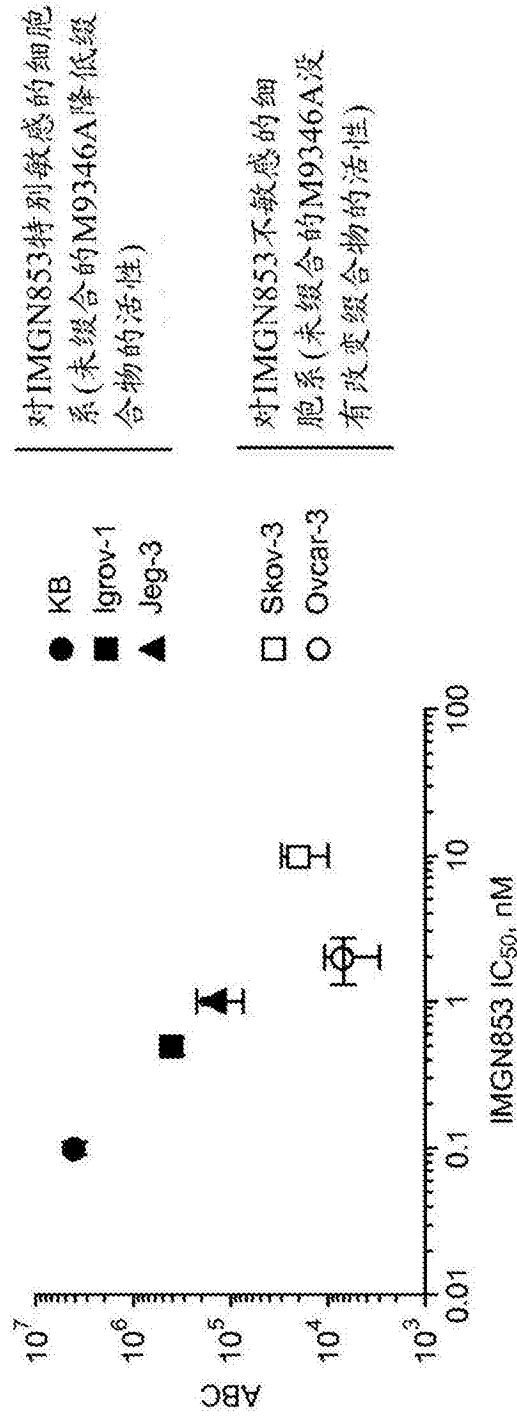


图20

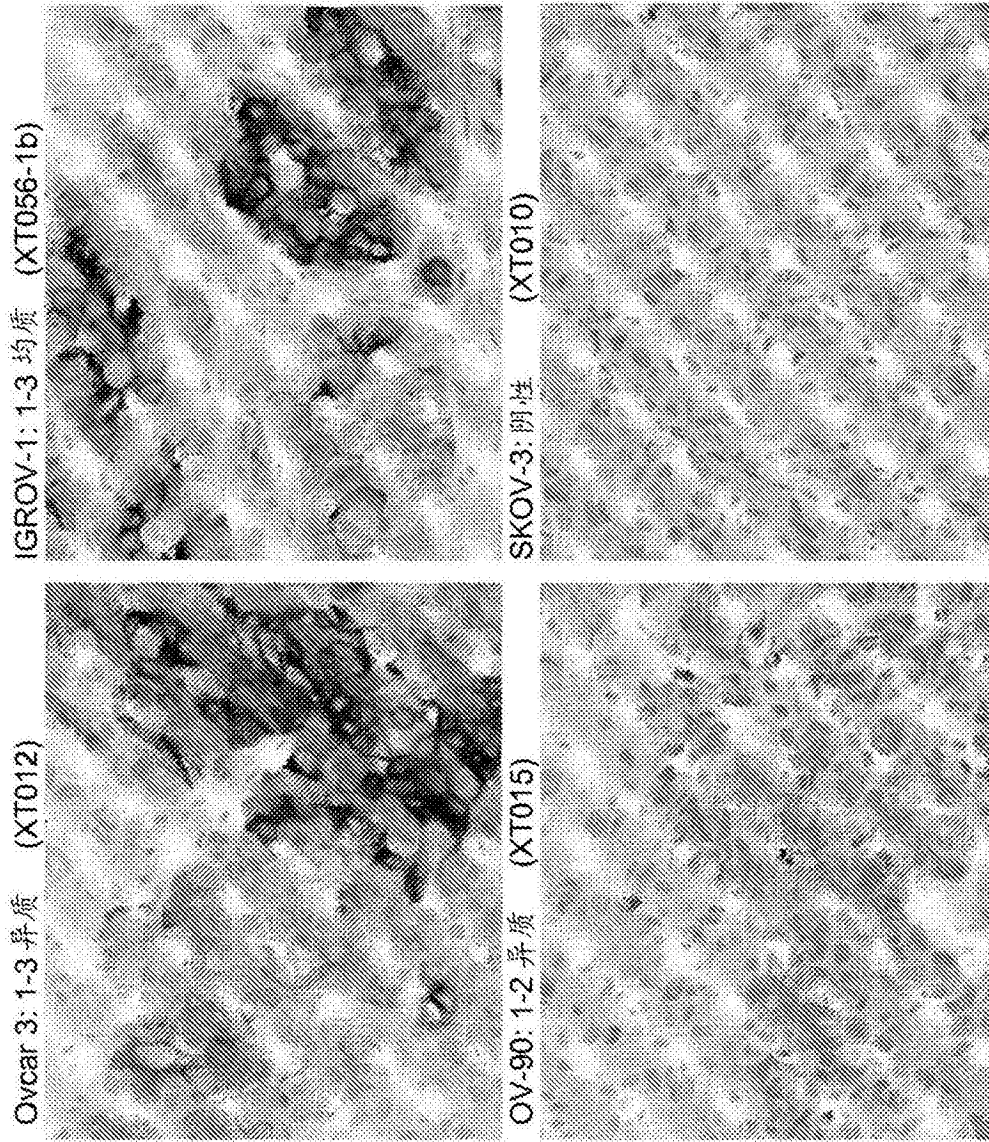


图21

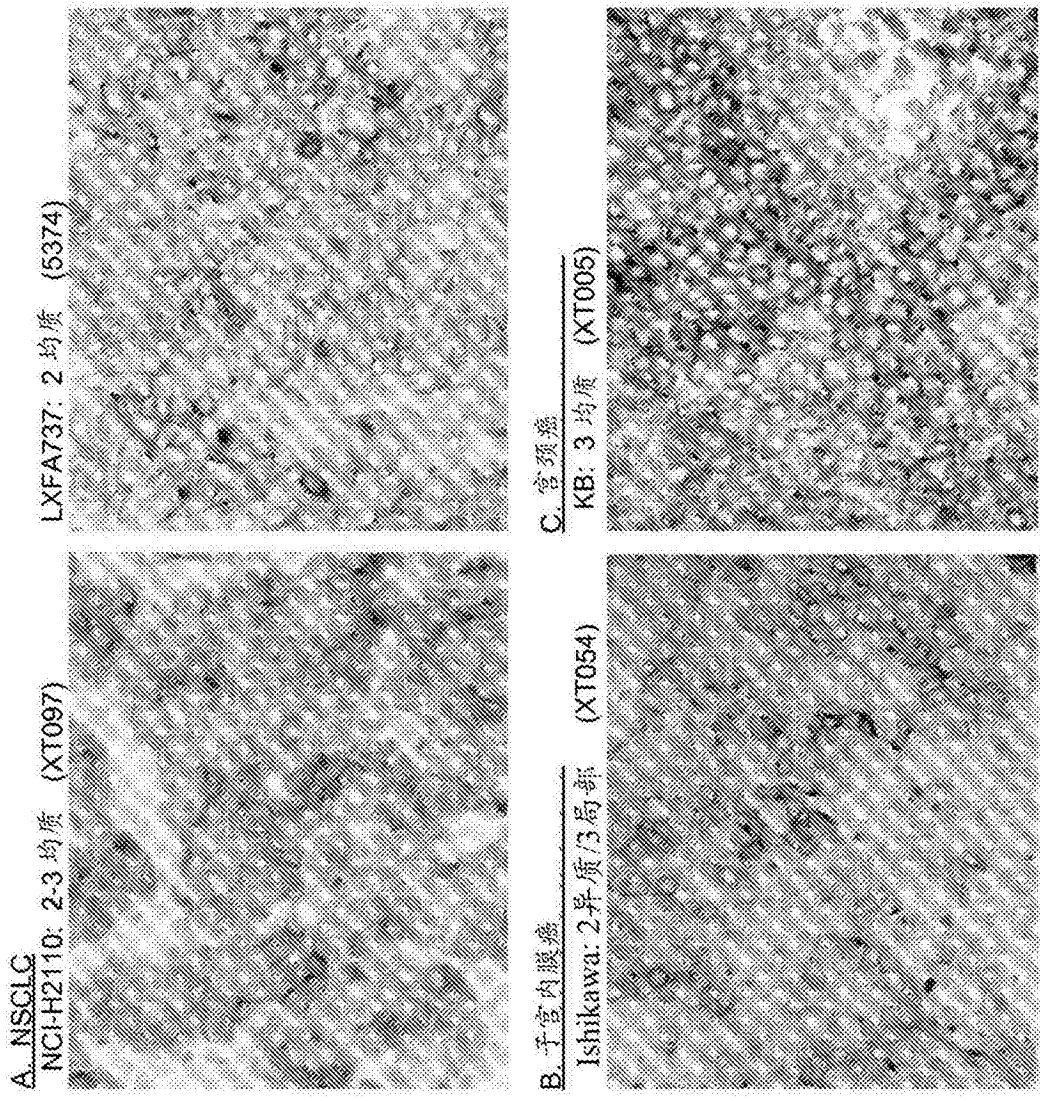


图22

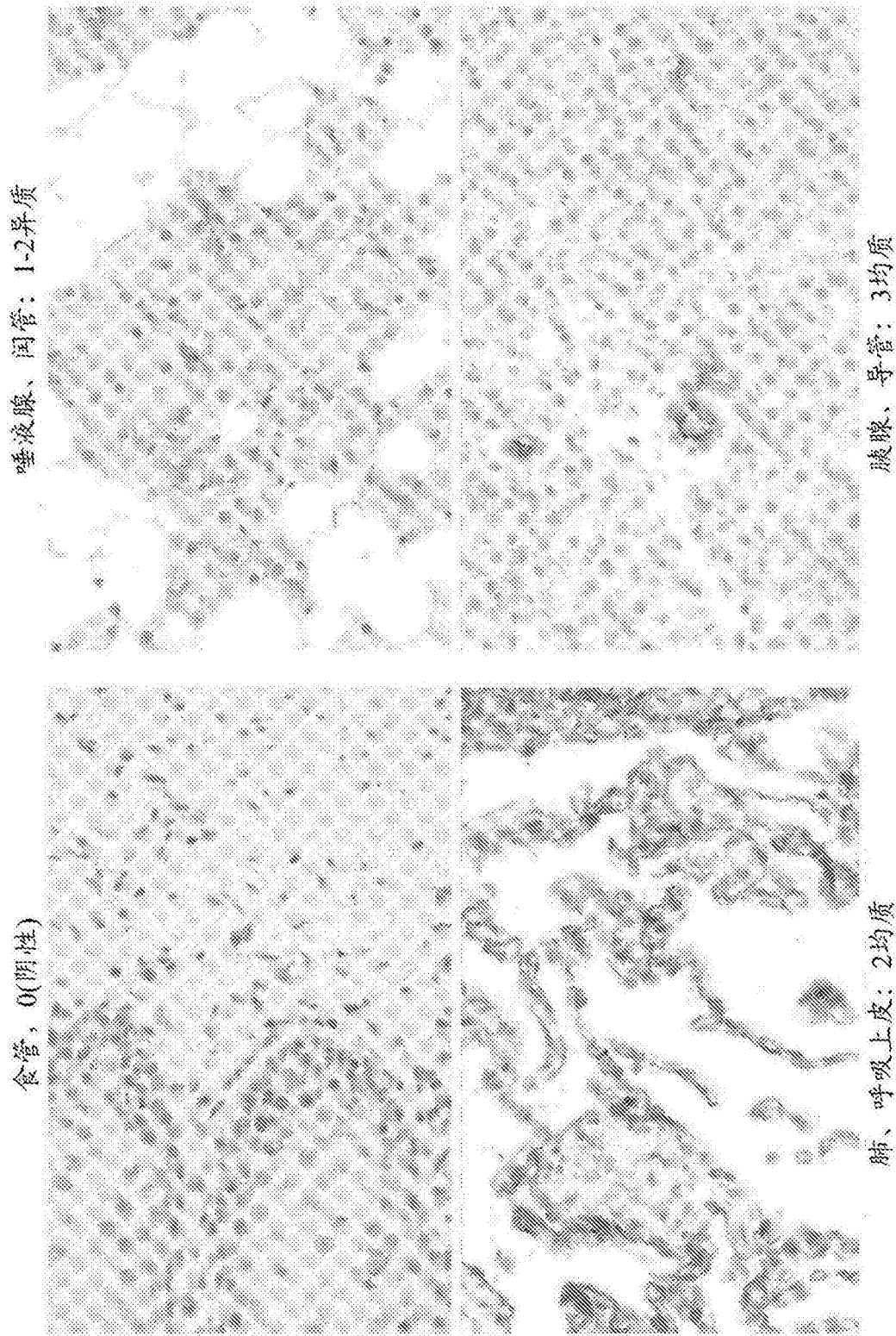


图23

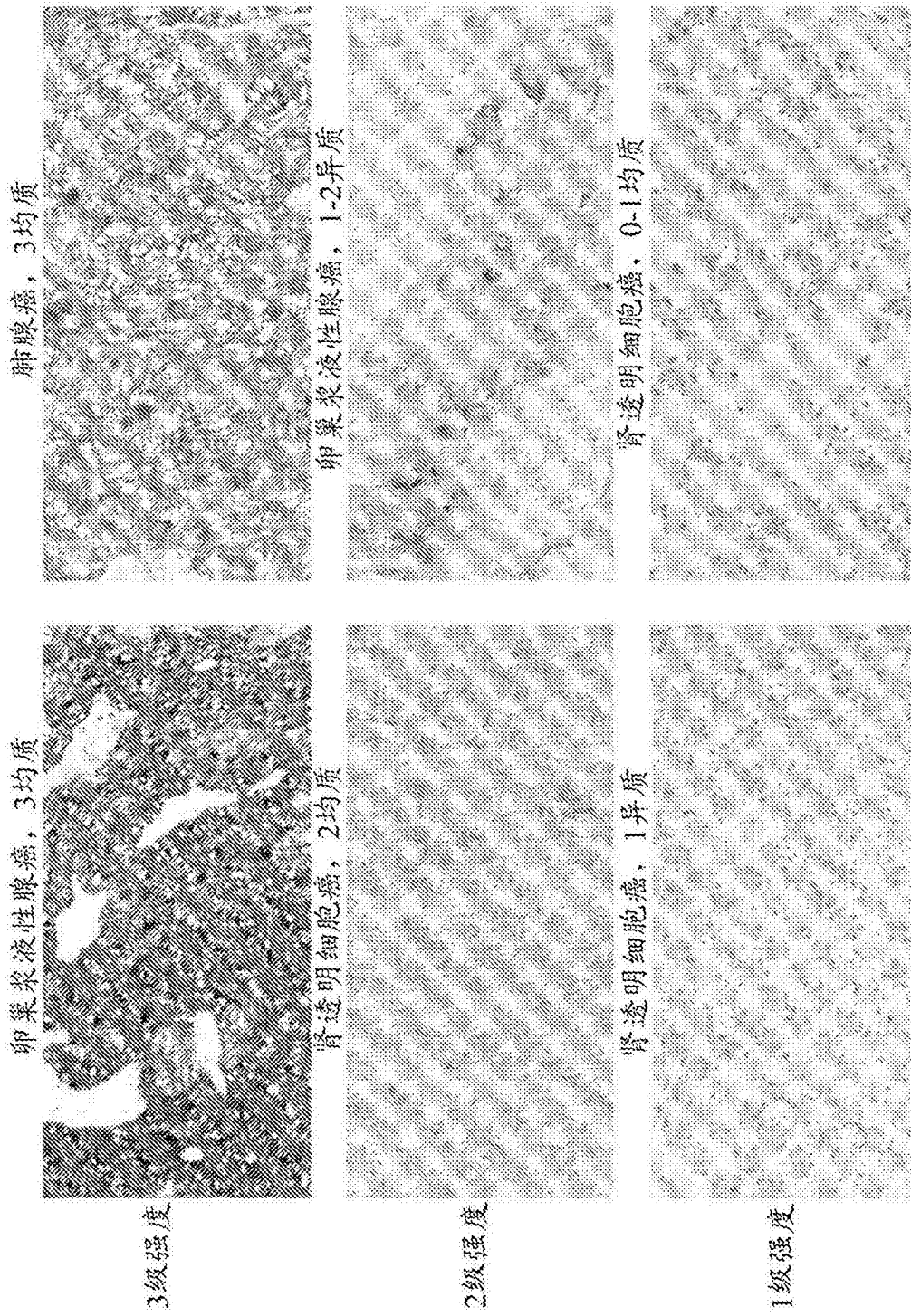


图24

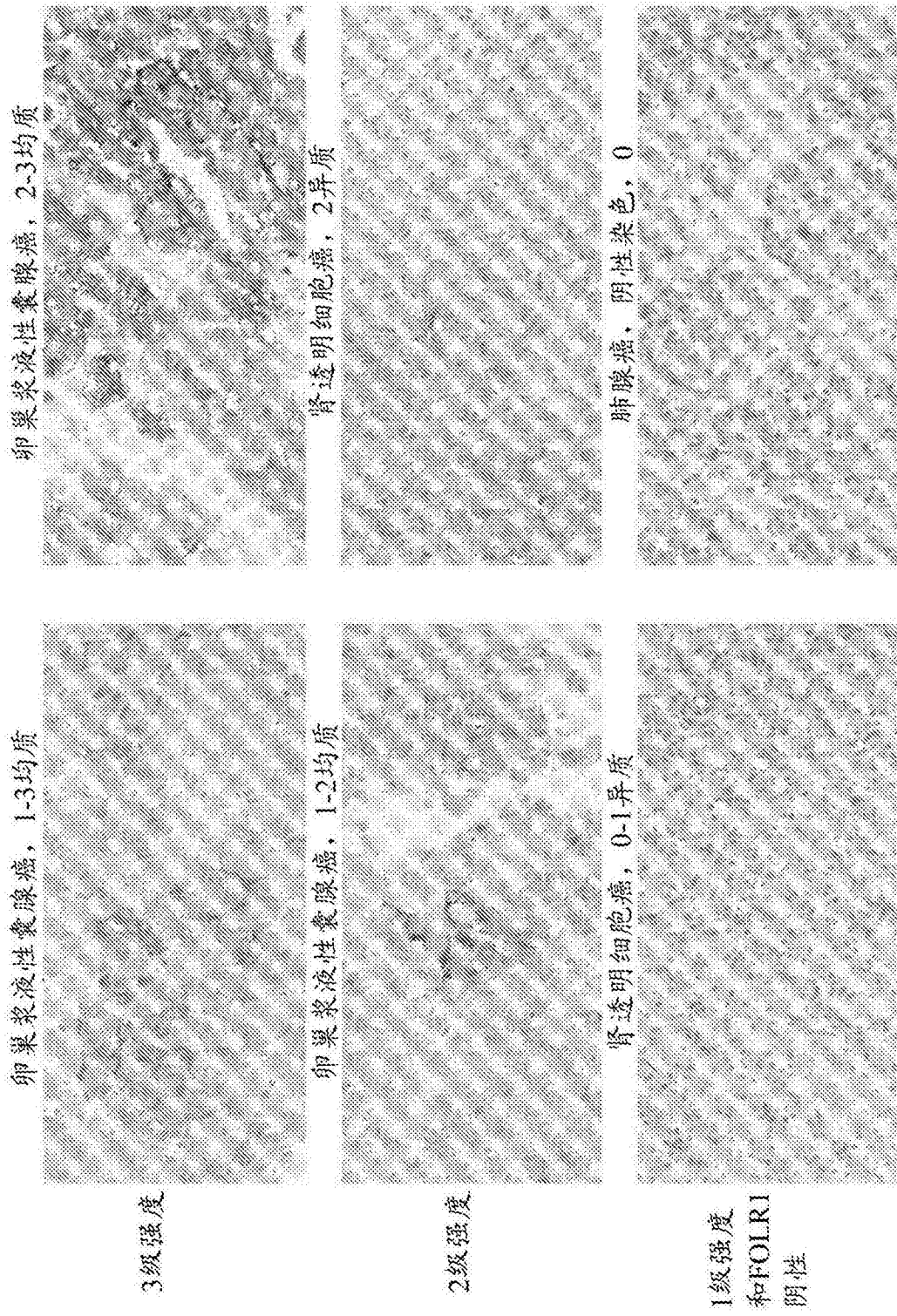


图25