



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112955548 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 24

(21) 申请号 201980058510.5  
 (22) 申请日 2019.06.26  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 112955548 A  
 (43) 申请公布日 2021.06.11  
 (30) 优先权数据  
 62/695,535 2018.07.09 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2021.03.08  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/IB2019/000873 2019.06.26  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02020/016661 EN 2020.01.23  
 (73) 专利权人 普众发现医药科技(上海)有限公司  
 地址 200233 上海市徐汇区桂平路333号4  
 号楼132室邮编:200233  
 (72) 发明人 侯冰 王娜 孟逊

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
 11105  
 专利代理师 易方方

(51) Int.Cl.  
 C12N 15/09 (2006.01)  
 C12N 1/15 (2006.01)  
 C12N 5/10 (2006.01)  
 C07K 16/28 (2006.01)  
 A61K 39/395 (2006.01)  
 A61P 35/00 (2006.01)  
 G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件  
 CN 107922473 A, 2018.04.17  
 WO 2011106528 A1, 2011.09.01  
 CN 103037900 A, 2013.04.10  
 CN 105777907 A, 2016.07.20  
 Minsung Kim. Folate receptor 1 (FOLR1)  
 targeted chimeric antigen receptor (CAR)  
 T cells for the treatment of gastric  
 cancer.《PLOS ONE》.2018,

审查员 李召

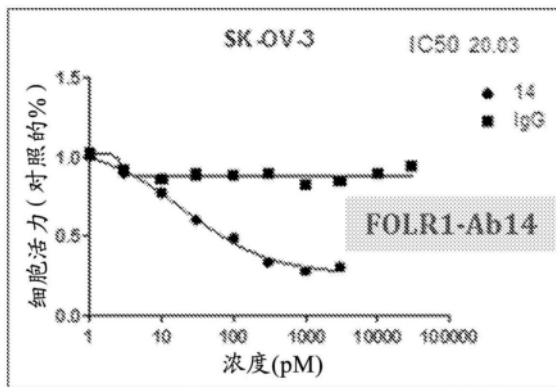
权利要求书3页 说明书29页  
 序列表22页 附图7页

(54) 发明名称

叶酸受体  $\alpha$  特异性抗体

(57) 摘要

叶酸受体  $\alpha$  (亦即,叶酸受体1或FOLR1) 特异性抗体及其在治疗及诊断中的用途。本文还提供了嵌合抗原受体(chimeric antigen receptors, CARs), 其包含与FOLR1结合的一胞外抗原结合片段以及表达该片段的免疫细胞。



1. 一种与FOLR1结合的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区( $V_H$ )和轻链可变区( $V_L$ ),所述 $V_H$ 包含如GYTFTSYW所示的重链互补决定区1(HC CDR 1)、如INPYDSET所示的重链互补决定区2(HC CDR2)以及如ARSGGYAWFAY所示的重链互补决定区3(HC CDR3);所述 $V_L$ 包含如QSLLYSSSQKNY所示的轻链互补决定区1(LC CDR 1),如WAS所示的轻链互补决定区2(LC CDR 2)以及如QQYYSYPWT所示的轻链互补决定区3(LC CDR 3)。

2. 权利要求1的抗体,其中所述抗体特异性结合人类FOLR1。

3. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体与人类FOLR1以及非人类FOLR1交叉反应。

4. 权利要求3的抗体,其中所述非人类FOLR1为啮齿动物FOLR1或灵长类动物FOLR1。

5. 权利要求1、2或4中任一项的抗体,其中所述抗体为全长抗体或其抗原结合片段,或单链抗体。

6. 权利要求5的抗体,其中所述抗体为IgG分子。

7. 权利要求1、2、4或6中任一项的抗体,其中所述抗体为人类抗体、人源化抗体,或嵌合抗体。

8. 权利要求1的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 $V_H$ 及/或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 $V_L$ 。

9. 一种核酸或核酸组,其共同编码权利要求1至8中任一项的抗FOLR1抗体。

10. 一种载体或载体组,其包含权利要求9的核酸。

11. 权利要求10的载体或载体组,其中所述载体为表达载体。

12. 一种宿主细胞,其包含权利要求10或11的载体或载体组。

13. 一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

i. 权利要求1至8中任一项的抗体;以及

ii. 至少一种治疗剂;

其中所述抗体与所述至少一种治疗剂共价偶联。

14. 权利要求13的抗体-药物偶联物,其中所述抗体与所述治疗剂通过接头偶联。

15. 权利要求14的抗体-药物偶联物,其中所述接头为可裂解或不可裂解的接头。

16. 权利要求15的抗体-药物偶联物,其中所述可裂解的接头为蛋白酶敏感的接头、pH敏感的接头,或谷胱甘肽敏感的接头。

17. 权利要求16的抗体-药物偶联物,其中所述接头为蛋白酶敏感的接头,其包含2-5个氨基酸的肽序列。

18. 权利要求17的抗体-药物偶联物,其中所述2-5个氨基酸包含天然存在的氨基酸残基、非天然存在的氨基酸残基,或其组合。

19. 权利要求17的抗体-药物偶联物,其中所述肽序列包含缬氨酸-瓜氨酸。

20. 权利要求15的抗体-药物偶联物,其中所述接头为不可裂解的接头,其包含任选经取代的烷烃或硫醚。

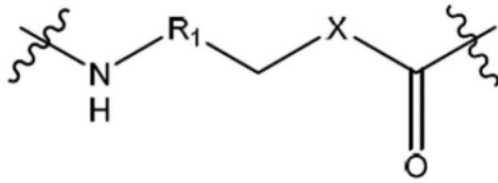
21. 权利要求15至20中任一项的抗体-药物偶联物,其中所述接头包含官能基团,其与所述抗体以及所述接头形成共价键。

22. 权利要求21的抗体-药物偶联物,其中所述官能基团包含马来酰亚胺基团、碘乙酰胺基团、乙烯基砜基团、丙烯酸酯基团、丙烯酰胺基团、丙烯腈基团,或甲基丙烯酸酯基团。

23. 权利要求16至20或22中任一项的抗体-药物偶联物,其中所述接头进一步包含式I

的分子间隔基:

(式I)



其中

R1为任选经取代的C1-6烷基、任选经取代的苯基、任选经取代的C2-6亚烷基、任选经取代的C2-6亚烯基、任选经取代的C2-6亚炔基,或任选经取代的三唑;以及

X为O、S,或N。

24. 权利要求13至20或22中任一项的抗体-药物偶联物,其中所述至少一种治疗剂为细胞毒性剂。

25. 权利要求24的抗体-药物偶联物,其中所述细胞毒性剂为单甲基澳瑞他汀E。

26. 一种嵌合抗原受体,包含:

(i) 胞外结构域,其包含结合FOLR1的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段包含重链可变区( $V_H$ )和轻链可变区( $V_L$ ),所述 $V_H$ 包含如GYTFTSYW所示的重链互补决定区1(HC CDR 1)、如INPYDSET所示的重链互补决定区2(HC CDR2)以及如ARSGGYAWFAY所示的重链互补决定区3(HC CDR3);所述 $V_L$ 包含如QSLLYSSSQKNY所示的轻链互补决定区1(LC CDR 1),如WAS所示的轻链互补决定区2(LC CDR 2)以及如QQYYSYPWT所示的轻链互补决定区3(LC CDR 3);

(ii) 跨膜结构域;以及

(iii) 一个或多个细胞内刺激结构域。

27. 权利要求26的嵌合抗原受体,其中所述抗原结合片段包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 $V_H$ 及/或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 $V_L$ 。

28. 权利要求26至27中任一项的嵌合抗原受体,其中所述跨膜结构域包含衍生自CD28或CD8受体的跨膜结构域。

29. 权利要求26至27中任一项的嵌合抗原受体,其中(iii)包含来自CD3 $\zeta$ 的信号传导结构域。

30. 权利要求26至27中任一项的嵌合抗原受体,其中(iii)包含共刺激信号传导结构域。

31. 权利要求30的嵌合抗原受体,其中所述共刺激信号传导结构域来自4-1BB、CD7、CD27、CD28、CD40、OX40、ICOS、GITR、HVEM、TIM1,或LFA-1受体。

32. 一种核酸,其包含编码权利要求26至31中任一项的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

33. 一种载体,其包含权利要求32的核酸。

34. 一种宿主细胞,其表达权利要求26至31中任一项的嵌合受体。

35. 权利要求34的宿主细胞,其为免疫细胞。

36. 权利要求35的宿主细胞,其中所述免疫细胞为T细胞。

37. 一种医药组合物,其包含(i)权利要求1至8中任一项的抗体、权利要求9至11中任一项的核酸或核酸组、权利要求13至25中任一项的抗体-药物偶联物,或权利要求35或权利要

求36的宿主细胞;以及(ii)医药上可接受的载体。

38.有效量的权利要求37的医药组合物在制备用于减少有此需要的受试者中FOLR1<sup>+</sup>细胞数量的药物中的用途。

39.权利要求38的用途,其中所述受试者患有或怀疑患有癌症。

40.权利要求1至8中任一项的抗体在制备用于检测FOLR1<sup>+</sup>细胞存在的套组中的用途,其中所述抗体与标记剂偶联,并且所述套组用于以下方法,所述方法包括:

- i.使怀疑具有FOLR1<sup>+</sup>细胞的样品与权利要求1至8中任一项的抗体接触;以及
- ii.基于所述抗体与所述样品中细胞的结合,检测所述样品中FOLR1<sup>+</sup>细胞的存在。

## 叶酸受体 $\alpha$ 特异性抗体

### 背景技术

[0001] 叶酸受体 $\alpha$ ,亦称为叶酸受体1(folate receptor 1,FOLR1),属于叶酸受体家族,其成员对叶酸及/或其衍生物(例如,5-甲基四氢叶酸)具有高结合亲和力。根据报导,FOLR1在许多上皮来源的肿瘤中过度表达,例如卵巢癌、乳腺癌、肾癌、肺癌、结直肠癌,以及脑癌。因此,该受体可为治疗这类上皮来源的肿瘤的目标。

[0002] 因此,开发有效的FOLR1拮抗剂,例如用于癌症治疗及诊断的抗FOLR1抗体非常重要。

### 发明内容

[0003] 本发明至少部分基于对FOLR1具有特异性的多种抗体的开发。此类抗体显示出对目标FOLR1抗原的高结合亲和力及/或对FOLR1<sup>+</sup>细胞的高抑制活性。

[0004] 因此,本发明的一方面的特征在于一种与FOLR1结合的分离的抗体(抗FOLR1抗体),其中该抗体与参照抗体结合相同的人类FOLR1表位,即FOLR1-Ab1、FOLR1-Ab4、FOLR1-Ab14、FOLR1-Ab20,或FOLR1-Ab23,于本文提供它们各自的结构特征。

[0005] 在一些具体实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体可包含重链可变区( $V_H$ ),其包含以下一种或多种:

[0006] (a) 一重链互补决定区1(heavy chain complementary determining region

[0007] 1,HC CDR 1),表示为 $X_1YTFX_2YX_3$ ,其中 $X_1$ 为G或I, $X_2$ 为D或S,且 $X_3$ 为W、N,或S;

[0008] (b) 一重链互补决定区2(HC CDR2),表示为 $INX_1X_2X_3X_4X_5X_6$ ,其中 $X_1$ 为P或T, $X_2$ 为N、Y,或E, $X_3$ 为N、D,或T, $X_4$ 为G或S, $X_5$ 为G或E,且 $X_6$ 为T或P;以及

[0009] (c) 一重链互补决定区3(HC CDR3),表示为

[0010]  $ARX_1X_2X_3YX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ ,其中 $X_1$ 为S、K或M, $X_2$ 为G或P, $X_3$ 为G或Y, $X_4$ 为G或不存在, $X_5$ 为P或不存在, $X_6$ 为A、R,或K, $X_7$ 为W、Y或I, $X_8$ 为F或M, $X_9$ 为D或A,且 $X_{10}$ 为Y或V。

[0011] 这样的抗FOLR1抗体可包含一重链可变区( $V_H$ ),其中HC CDR1、HC CDR2,以及HC CDR3共同与该参照抗体的HC CDR1、HC CDR2,以及HC CDR3至少85%(例如,至少90%,至少95%,至少98%或更多)相同。在一些情况下,该抗体可包含一 $V_H$ ,该 $V_H$ 包括与上述参照抗体之一相同的HC CDR1、HC CDR2,以及HC CDR3。在其他具体实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体可以包含一 $V_H$ ,其包含HC CDR1、HC CDR2,以及HC CDR3,它们共同包含相对于参照抗体的HC CDR1、HC CDR2,以及HC CDR3最多5、4、3、2或1个突变。

[0012] 替代地或另外地,本文所述的抗FOLR1抗体可包含一轻链可变区( $V_L$ ),其包含以下一种或多种:

[0013] (a) 一轻链互补决定区1(LC CDR 1),表示为ESVDNYGISF或QSLLYSSSQKNY;

[0014] (b) 一轻链互补决定区2(LC CDR 2),表示为 $X_1AS$ ,其中 $X_1$ 为V、A或W;以及

[0015] (c) 一轻链互补决定区3(LC CDR 3),表示为 $QQX_1X_2X_3X_4PX_5T$ ,其中 $X_1$ 为Y或S, $X_2$ 为Y或K, $X_3$ 为E或S, $X_4$ 为Y或V,且 $X_5$ 为W、Y,或不存在。

[0016] 这样的抗体可包含 $V_L$ ,其中LC CDR1、LC CDR2,以及LC CDR3共同与该参照抗体的

LC CDR1、LC CDR2,以及LC CDR3至少85% (例如,至少90%,至少95%,至少98%或更多)相同。在一些情况下,该抗体可包含与上述参照抗体之一相同的LC CDR1、LC CDR2,以及LC CDR3。在其他具体实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体可以包含LC CDR1、LC CDR2,以及LC CDR3,它们共同包含相对于参照抗体的LC CDR1、LC CDR2,以及LC CDR3最多5、4、3、2或1个突变。

[0017] 在一些实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体包含与上述参照抗体之一相同的重链及/或轻链CDRs。在一些情况下,这样的抗FOLR1抗体可包含与该参照抗体相同的 $V_H$ 及/或 $V_L$ 。

[0018] 本文所述的任何抗FOLR1抗体可特异性结合人类FOLR1。在一些情况下,该抗FOLR1抗体可与人类FOLR1以及非人类FOLR1,例如啮齿类动物FOLR1或灵长类动物FOLR1交叉反应。该抗体可为人类抗体或人源化抗体。在一些实施例中,它可为嵌合抗体。

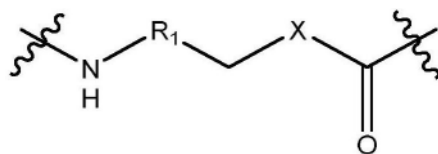
[0019] 在一些具体实施例中,该抗FOLR1抗体可为全长抗体(例如,一IgG分子)或其抗原结合片段。或者,其可为单链抗体。

[0020] 在另一方面,本发明内容特征在于共同编码本文所述的任何抗FOLR1抗体的核酸或核酸组(例如,两个核酸),以及包含编码该抗FOLR1抗体的核酸的载体或载体组(例如,两个载体)。在某些情况下,该载体或载体组可为表达载体。本文还提供了包含该核酸或载体的宿主细胞。此外,本发明提供了制备如本文所述的抗FOLR1抗体的方法,包含培养该宿主细胞,其包含带有该抗体的编码序列的载体或载体组,其中该编码序列与一合适的启动子可操作地连接,并从例如该宿主细胞或该培养基中收获产生的抗体。

[0021] 另外,本发明提供了抗体-药物偶联物(antibody-drug conjugate,ADC),其包含:本文所述的任何抗FOLR1抗体,以及至少一种治疗剂,其与该抗体共价结合。在一些实施例中,该治疗剂可为细胞毒性剂,例如,单甲基澳瑞他汀E。

[0022] 在一些具体实施例,该抗体与该治疗剂可透过接头结合。在一些实施例中,该接头可为可裂解的接头,例如,蛋白酶敏感的接头、pH敏感的接头,或一谷胱甘肽敏感的接头。在一些情况下,该接头可为蛋白酶敏感的接头,其可包含具有2-5个氨基酸的肽。该肽可包含天然存在的氨基酸残基、非天然存在的氨基酸残基,或其组合。在一实施例中,该肽可包含缬氨酸-瓜氨酸。在其他实施例中,该接头可为不可裂解的接头。这种不可裂解的接头可包含任选经取代的烷烃或硫醚。

[0023] 在一些具体实施例中,该接头可包含在该抗体与该接头之间形成共价键的官能基团。示例性的官能基团包括,但不限于,马来酰亚胺基团、碘乙酰胺基团、乙烯基砜基团、丙烯酸酯基团、丙烯酰胺基团、丙烯腈基团,以及甲基丙烯酸酯基团。在一实施例中,该接头可进一步为式I的分子间隔基:



[0024]

(式 I)

[0025] 其中

[0026] R1为任选经取代的C1-6烷基、任选经取代的苯基、任选经取代的C2-6亚烷基、任选

经取代的C2-6亚烯基、任选经取代的C2-6亚炔基,或任选经取代的三唑;且X为O、S,或N。

[0027] 此外,本发明提供一种嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR),其可包含:(i)胞外结构域,包含结合FOLR1的抗原结合片段,(ii)跨膜结构域,以及(iii)或多个细胞内刺激结构域。该抗原结合片段可结合与本文所述的任何参照抗体相同的人类FOLR1表位。在一些实施例中,该抗原结合片段可包含与任何该参照抗体相同的HC CDRs及/或LC CDRs。这样的抗原结合片段可包含与该参照抗体相同的 $V_H$ 及 $V_L$ 。在一些实施例中,该抗原结合片段可为单链抗体(scFv)。

[0028] 在本文所述的任何嵌合抗原受体(CARs)中,该跨膜结构域可包含衍生自CD28或CD8的跨膜结构域。作为另外一种选择或除此之外,一个或多个细胞内刺激结构域可包含来自CD3 $\zeta$ 的信号传导结构域以及任选的共刺激信号传导结构域,其可来自4-1BB、CD7、CD27、CD28、CD40、OX40、ICOS、GITR、HVEM、TIM1,或LFA-1。编码本文所述的任何CAR的核酸,包含这样的核酸的载体,以及表达该CAR的宿主细胞也在本发明的范围内。在一些实施例中,表达该CAR的宿主细胞为免疫细胞,例如T细胞。

[0029] 在另一方面,本发明提供了一种医药组合物,其包含(i)一种或多种本文所述的抗FOLR1抗体、编码该抗体的核酸或核酸组,如本文所述的抗体-药物偶联物,或表达本文所述任何该CAR构建体的宿主细胞,以及(ii)一医药上可接受的载体。

[0030] 此外,本发明的特征在于一种减少FOLR1<sup>+</sup>细胞数量的方法,该方法包含对有此需要的受试者施用有效量的本文所述的任何医药组合物。在一些具体实施例中,该受试者可为患有或怀疑患有癌症,例如,上皮癌的人类患者。同样在本发明的范围内的是如本文所述的医药组合物,其用于治疗也如本文所述的任何目标疾病(例如,癌症,例如上皮癌)或用于制造用于治疗该目标疾病的药物。

[0031] 另外,本发明的特征在于一种检测FOLR1<sup>+</sup>细胞存在的方法,该方法包含:(i)使怀疑具有FOLR1<sup>+</sup>细胞的样品与本文所述的任何抗FOLR1抗体接触,该抗体与标记剂结合;以及(ii)基于该抗体与该样品中细胞的结合来检测样品中FOLR1<sup>+</sup>细胞的存在。在某些情况下,该样品来自患有癌症或被怀疑患有癌症,例如上皮癌,的人类患者。

[0032] 在以下的描述中阐述了本发明之一或多个具体实施例的细节。从以下附图以及几个具体实施例的详细描述,以及从所附申请专利范围,本发明的其他特征或优点将变得显而易见。

[0033] 图式简单说明

[0034] 图1A-1E包括显示许多抗FOLR1抗体的图,包括FOLR1-Ab1、FOLR1-Ab4、FOLR1-Ab14、FOLR1-Ab20,以及FOLR1-Ab23,它们与表达表面FOLR1的细胞结合。

[0035] 图2A-2D包括显示示例性抗FOLR1抗体对SK-OV-3细胞的抑制作用的图,该SK-OV-3细胞为FOLR1<sup>+</sup>。

[0036] 实施方式

[0037] 本文公开了许多抗FOLR1抗体,其显示出优异的特征,包括对目标FOLR1抗原的高结合亲和力及/或对FOLR1<sup>+</sup>细胞的高抑制活性。

[0038] 因此,本文提供了能够结合FOLR1的抗体,编码这类抗体的核酸,包含抗FOLR1抗体的抗体-药物偶联物(ADCs)与嵌合抗原受体(CARs),以及其在治疗及诊断目的用途。本文还提供了使用抗体及/或ADCs与包含这些的CARs的治疗及/或诊断用途的套组,以及用于产

生该抗FOLR1抗体的方法。

[0039] 与FOLR1结合的抗体

[0040] 本发明提供结合叶酸受体 $\alpha$ ,亦称为叶酸受体1 (FOLR1),的抗体。作为叶酸受体家族的成员,FOLR1对叶酸及其衍生物具有高结和亲和力。在人类中,FOLR1由FOLR1基因所编码。FOLR1被发现在多种上皮肿瘤,例如,卵巢癌中过度表达。因此,该受体可作为治疗及诊断目标癌症的靶及/或生物标记。因此,本文所公开的抗FOLR1抗体可单独或与其他部分结合用于治疗及/或诊断本文所述的目标癌症,例如,与治疗剂结合以形成抗体-药物偶联物或在嵌合抗原受体中作为胞外抗原结合结构域。

[0041] 抗体(与复数形式可互换使用)为一种免疫球蛋白分子,其能够透过位于该免疫球蛋白分子的可变区的至少一个抗原识别位点特异性结合至目标,例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等。如本文所用,“抗体”一词不仅涵盖完整的(即,全长)多克隆或单克隆抗体,还包括其抗原结合片段(例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、单链(scFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、双抗体、纳米抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)以及该免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型,其包含具有所需特异性的抗原识别位点,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体,以及共价修饰的抗体。抗体包括任何类别的抗体,例如IgD、IgE、IgG、IgA,或IgM(或其亚类),且该抗体不必为任何特定类别。根据其重链恒定结构域的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同类别。免疫球蛋白有五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG,以及IgM,其中一些可进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1与IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ ,以及 $\mu$ 。不同种类的免疫球蛋白的次单元结构与立体构型为众所周知的。

[0042] 典型的抗体分子包含重链可变区( $V_H$ )以及轻链可变区( $V_L$ ),其通常与抗原结合有关。该 $V_H$ 与 $V_L$ 区域可进一步细分为高变区,亦称为“互补决定区”(“complementarity determining regions”,“CDR”),散布着较为保守的区域,即「框架区」(“framework regions”,“FR”)。每个 $V_H$ 与 $V_L$ 通常由三个CDRs以及四个FRs所组成,它们按以下顺序从胺基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。可使用本领域已知的方法,例如透过Kabat定义,Chothia定义,AbM定义,及/或接触定义来精确地识别框架区与CDRs的程度,所有这些在本领域中为众所周知的技术。参见,例如,Kabat,E.A.等人(1991年)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,美国卫生暨人力服务部,NIH出版编号91-3242,Chothia等人(1989年)Nature 342:877;Chothia,C.等人(1987年)J.Mol.Biol.196:901-917,A1-lazikani等人(1997年)J.Molec.Biol.273:927-948;以及Almagro,J.Mol.Recognit.17:132-143(2004年)。亦参见hgmp.mrc.ac.uk以及bioinf.org.uk/abs。

[0043] 在一些具体实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体可结合并抑制FOLR1的活性至少50%(例如,60%,70%,80%,90%,95%或更高)。表观抑制常数( $K_i^{app}$ 或 $K_i^{app}$ )提供了抑制剂效力的量度,与降低酶活性所需的抑制剂浓度有关,而与酶浓度无关。可通过本领域已知的常规方法确定本文所述的抗FOLR1抗体的抑制活性。

[0044] 抗体的 $K_i^{app}$ 值可通过测量不同浓度的抗体对反应程度(例如,酶活性)的抑制作用来确定;将假一阶速率常数( $v$ )的变化随抑制剂浓度的函数拟合到修改后的Morrison方程(方程式1)可得出表观 $K_i$ 值的估计值。对于竞争性抑制剂,可从y截距中获得 $K_i^{app}$ ,该截距

为从 $K_i^{app}$ 对基质浓度的图的线性回归分析中得到的。

$$[0045] \quad v = A \cdot \frac{([E] - [I] - K_i^{app}) + \sqrt{([E] - [I] - K_i^{app})^2 + 4[E] \cdot K_i^{app}}}{2}$$

(方程式 1)

[0046] 其中A等于 $v_0/E$ ,不存在抑制剂(I)时酶促反应的初始速度( $v_0$ )除以总酶浓度(E)。

[0047] 在一些具体实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体的 $K_i^{app}$ 值对于FOLR1抗原或其表位可为1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5pM或更小。在一些具体实施例中,相对于第二目标,抗FOLR1抗体对于第一目标可具有较低的 $K_i^{app}$ 。 $K_i^{app}$ 的差异(例如,针对特异性或其他比较)至少可以为1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000或 $10^5$ 倍。

[0048] 本文所述的抗体可为小鼠、大鼠、人类或任何其他来源的抗体(包括嵌合或人源化抗体)。此类抗体为非天然存在的,即在没有人行为(例如,以所需抗原或其片段免疫此类动物)的情况下不会在动物中产生。

[0049] 本文所述的任何抗体可为单克隆的或多克隆抗体。“单克隆抗体”系指同质抗体群,“多克隆抗体”系指异质抗体群。这两个术语并不限制抗体的来源或制备方式。

[0050] 在一实施例中,本文所述的方法所用的抗体为人源化抗体。人源化抗体系指非人类(例如,鼠)形式的抗体,其为含有来自非人类免疫球蛋白的最小序列的特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链,或其抗原结合片段。在大多数情况下,人源化抗体为人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自非人类物种(供体抗体)的CDR的残基替代,例如具有所需特异性、亲和力与能力的小鼠、大鼠,或兔。在一些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人类残基代替。此外,人源化抗体可包含不在受体抗体中,也不在进口的CDR或框架序列中发现的残基,而是被包括以进一步改进及优化抗体性能。通常,人源化抗体将包含基本上所有至少一个,通常为二个可变结构域,其中所有或基本上所有的CDR区域对应于非人类免疫球蛋白与全部或基本上所有的FR区域为人类免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最佳还将包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分,通常为人类免疫球蛋白的恒定区或结构域(Fc)。抗体可以具有如WO 99/58572中所述的修饰的Fc区。其他形式的人源化抗体具有相对于原始抗体改变的一或多个CDR(一个、二个、三个、四个、五个,及/或六个),其也被称为一或多个“衍生自”一个或多个来自原始抗体的CDR。人源化抗体也可能涉及亲和力成熟作用。

[0051] 在另一实施例中,本文所述的抗体可为嵌合抗体,其可包括来自人类抗体的重链恒定区与轻链恒定区。嵌合抗体系指具有来自第一物种的可变区或可变区的一部分以及来自第二物种的恒定区的抗体。通常,在这些嵌合抗体中,轻链及重链的可变区都模仿衍生自一种哺乳动物(例如,非人类哺乳动物,例如小鼠、兔,以及大鼠)的抗体的可变区,而恒定部分与来自另一种哺乳动物,例如人类抗体中的序列同源。在一些具体实施例中,可以在该可变区及/或恒定区中进行氨基酸修饰。

[0052] 在一些具体实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体特异性结合相应的目标抗原或其表位。“特异性结合”抗原或表位的抗体为本领域众所周知的术语。若某个分子与特定目标

抗原的反应比与其他目标抗原的反应更频繁、更快速、持续时间更长,及/或具有更大的亲和力,则该分子将表达出“特异性结合”。若一抗体以比与其他物质结合的更大的亲和力、结合性、更容易,及/或以更长的持续时间结合,则与一目标抗原或表位“特异性结合”。例如,特异性地(或优先地)结合于FOLR1抗原或其中的表位的抗体为与该目标抗原结合的抗体,其结合性比其结合其他抗原或同一抗原中的其他表位的亲和力、结合性更大,更容易,及/或持续时间更长。通过该定义还应理解的是,例如,特异性结合第一目标抗原的抗体可以或可以非特异性结合或优先结合一第二目标抗原。如此,“特异性结合”或“优先结合”并不一定需要(尽管可以包括)排他结合。在一些实施例中,“特异性结合”目标抗原或其表位的抗体可能不结合其他抗原或相同抗原中的其他表位。在一些具体实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体特异性结合人类FOLR1。在一些实施例中,其与非人类FOLR1抗原的结合活性在常规测定中不可检测或非常低,以致如本领域技术人员所知,其将不具有显著的生物学意义。在其他实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体可与来自不同物种的FOLR1交叉反应,例如,在人类FOLR1与非人类FOLR1之间(例如,来自实验动物例如非人类的灵长类、小鼠或大鼠的FOLR1)。

[0053] 如本文所用,“叶酸受体 $\alpha$ ”、“叶酸受体1”,或“FOLR1”等词是指任何合适种类的叶酸受体 $\alpha$ 蛋白,例如人类、非人类哺乳动物,例如非人类灵长类动物或啮齿动物(例如,小鼠或大鼠)。FOLR1为一种单链膜蛋白,能够与叶酸及其衍生物结合。以下提供了示例性人类FOLR1的氨基酸序列(亦参见GenBank登录号P15328):

```
[0054] 1      maqrmttqll lllvwvavvg eaqtriawar tellnvcjna khhkekpge dklheqcrpw
        61      rknaccstnt sqeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyecs pnlgpwiqqv
        121     dqswrkervl nvplckedce qwedcrtsty tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaacqpfhf
        181     yfptptvlcn eiwthsykvs nysrgsgrci qmwfdpaqgn pneevarfya aamsgagpwa
        241     awpflslal mllwlls
```

[0055] 来自其他物种的FOLR1分子在本领域中为众所周知的,且其氨基酸序列可从公众可获得的数据库,例如GenBank中检索。

[0056] 在一些具体实施例中,本文所述的抗FOLR1抗体对目标抗原(例如,人类FOLR1)或其表位具有合适的结合亲和力。如本文所用,“结合亲和力”是指表观缔合常数或 $K_A$ 。 $K_A$ 为解离常数( $K_D$ )的倒数。本文所述的抗FOLR1抗体对目标抗原或表位的结合亲和力( $K_D$ )至少为 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ M或更低。结合亲和力增加对应于 $K_D$ 降低。相对于一第二抗原,一抗体对一第一抗原的更高亲和力结合可通过与结合该第二抗原的 $K_A$ (或数值 $K_D$ )相比,与第一抗原结合的 $K_A$ 更高(或较小数值的 $K_D$ )。在这样的情况下,该抗体相对于该第二抗原(例如,第二构象或其模拟的相同的第一蛋白质;或第二蛋白)对该第一抗原(例如,具有第一构象或其模拟的第一蛋白质)具有特异性。在一些具体实施例中,相较于一不同物种的对FOLR1的结合亲和力,本文所述的抗FOLR1抗体对人类FOLR1具有更高的结合亲和力(更高的 $K_A$ 或较小的 $K_D$ )。结合亲和力的差异(例如,针对特异性或其他比较)可至少为1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000或 $10^5$ 倍。在一些具体实施例中,任何抗FOLR1抗体可进一步亲和力成熟以增加抗体对目标抗原或其表位的结合亲和力。

[0057] 结合亲和力(或结合特异性)可通过多种方法确定,包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子共振,或光谱法(例如,使用荧光测定法)。用于评估结合亲和力的示例性条件为在HBS-P缓冲液(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl,0.005% (v/v)界面活性剂P20)中。这些技术可用于测量结合的结合蛋白的浓度作为目标蛋白浓度的函数。结合的

结合蛋白 ([Bound]) 的浓度通常与游离的目标蛋白 ([Free]) 的浓度有关, 其关系式如下:

$$[0058] \quad [Bound] = [Free] / (K_d + [Free])$$

[0059] 但是, 并非总是必须精确地确定  $K_A$ , 因为有时足以获得亲和力的定量测量 (例如, 使用 ELISA 或 FACS 分析等方法测定) 与  $K_A$  成正比, 因此可用于比较, 例如确定较高的亲和力是否例如高 2 倍, 以获取对亲和力的定性测量, 或例如通过功能测定, 例如体外或体内分析, 的活性来推断亲和力。

[0060] 在一些具体实施例中, 本文所述的抗 FOLR1 抗体与本文提供的参照抗体之一结合于一 FOLR1 抗原 (例如, 人类 FOLR1) 中的相同表位, 或与参照抗体竞争结合至该 FOLR1 抗原。本文提供的参照抗体包括 FOLR1-Ab217、FOLR1-Ab218、FOLR1-Ab220、FOLR1-Ab221, 以及 FOLR1-Ab222, 其各自的结构特征在本文中提供。与本文所述的参照抗体结合相同表位的抗体可以与完全相同的表位或基本上重迭的表位结合 (例如, 包含少于 3 个非重迭氨基酸残基, 少于 2 个非重迭氨基酸残基, 或仅 1 个非重迭氨基酸残基) 作为参照抗体。两种抗体是否由于结合同源抗原而彼此竞争, 可通过竞争测定法来确定, 这是本领域众所周知的。可以如本领域技术人员已知的来鉴定此类抗体, 例如, 具有基本相似的结构特征的抗体 (例如, 互补决定区), 及/或通过本领域已知的测定法鉴定的抗体。例如, 可使用参照抗体之一进行竞争测定, 以确定候选抗体是否与参照抗体结合相同的表位或竞争其与 FOLR1 抗原的结合。

[0061] 本文所述的抗 FOLR1 抗体可包含一重链可变区 ( $V_H$ ), 其可包含 (a) 一重链互补决定区 1 (HC CDR 1), 表示为  $X_1YTFX_2YX_3$ , 其中  $X_1$  为 G 或 I,  $X_2$  为 D 或 S, 且  $X_3$  为 W、N, 或 S; (b) 一重链互补决定区 2 (HC CDR2), 表示为  $INX_1X_2X_3X_4X_5X_6$ , 其中  $X_1$  为 P 或 T,  $X_2$  为 N、Y, 或 E,  $X_3$  为 N、D, 或 T,  $X_4$  为 G 或 S,  $X_5$  为 G 或 E, 且  $X_6$  为 T 或 P; (c) 一重链互补决定区 3 (HC CDR3), 表示为  $ARX_1X_2X_3YX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ , 其中  $X_1$  为 S、K 或 M,  $X_2$  为 G 或 P,  $X_3$  为 G 或 Y,  $X_4$  为 G 或不存在,  $X_5$  为 P 或不存在,  $X_6$  为 A、R, 或 K,  $X_7$  为 W、Y 或 I,  $X_8$  为 F 或 M,  $X_9$  为 D 或 A, 且  $X_{10}$  为 Y 或 V; 或 (d) (a) - (c) 中任何一项的组合。在一些情况下, 该抗体可包含 (a) 的一 HC CDR1、(b) 的一 HC CDR2, 以及 (c) 的一 HC CDR3。

[0062] 在一些实施例中, 该 HC CDR1 基序  $X_1YTFX_2YX_3$  可包含在位置  $X_1$  处的 G, 在位置  $X_2$  处的 D, 及/或在位置  $X_3$  处的 N。替代地或另外地, HC CDR2 基序  $INX_1X_2X_3X_4X_5X_6$  可包含在位置  $X_1$  处的 P, 在位置  $X_2$  处及/或在位置  $X_3$  处的 N, 在位置  $X_4$  处的 G, 在位置  $X_5$  处的 G 或 S, 及/或在位置  $X_6$  处的 T。替代地或另外地, HC CDR3 基序  $ARX_1X_2X_3YX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$  可包括在位置  $X_1$  处的 K, 在位置  $X_2$  处的 P 或 G, 在位置  $X_3$  处的 Y, 在位置  $X_4$  处的 G, 在位置  $X_5$  处的 P, 在位置  $X_6$  处的 K 或 R, 在位置  $X_7$  处的 Y, 在位置  $X_8$  处的 F, 在位置  $X_9$  处的 D, 及/或在位置  $X_{10}$  处的 Y 或 V。

[0063] 表 1 提供了示例性抗 FOLR1 抗体的重链 CDR 的氨基酸序列 (通过 IMGT 定义)。具有与那些示例性抗 FOLR1 抗体相同的重链 CDR1、CDR2, 以及 CDR3 区域的抗体也在本发明的范围内。

[0064] 表 1: 抗 FOLR1 抗体的重链 CDR 序列

[0065]

示例性抗体	CDR1	CDR2	CDR3
FOLR1-Ab1	GYTFTSYW	INPYDSET	ARSGGYAWFAY
FOLR1-Ab4	IYTFTDYS	INTETGEP	ARMGYGPKIMDY
FOLR1-Ab14	GYTFTDYN	INPNNGGT	ARKPYGPRYFDV
FOLR1-Ab20	GYTFTDYN	INPNNGGT	ARKPYGPRYFDV

FOLR1-Ab23	GYTFTDYN	INPNNGGT	ARKPYYGPRYFDV
------------	----------	----------	---------------

[0066] 替代地或另外地,本文所述的抗FOLR1抗体可包含一轻链可变结构域( $V_L$ ),其包含一轻链可变区( $V_L$ ),其包含(a)一轻链互补决定区1(LC CDR 1),表示为ESVDNYGISF或QSLLYSSSQKNY;(b)一轻链互补决定区2(LC CDR 2),表示为 $X_1AS$ ,其中 $X_1$ 为V、A或W;(c)一轻链互补决定区3(LC CDR 3),表示为 $QQX_1X_2X_3X_4PX_5X_6$ ,其中 $X_1$ 为Y或S, $X_2$ 为Y或K, $X_3$ 为E或S, $X_4$ 为Y或V, $X_5$ 为W、Y、或T,且 $X_6$ 为T,或(d) (a) - (c)的任何组合。

[0067] 在一些实施例中,该抗FOLR1抗体的LC CDR1为ESVDNYGISF。在其他实施例中,该抗体的LC CDR1为QSLLYSSSQKNY。替代地或另外地,该LC CDR2基序 $X_1AS$ 包含在位置 $X_1$ 处的V。替代地或另外地,该LC CDR3基序 $QQX_1X_2X_3X_4PX_5T$ 包含在位置 $X_1$ 的S,在位置 $X_2$ 处的K,在位置 $X_3$ 处的E,在位置 $X_4$ 处的V,及/或在位置 $X_5$ 处无残基。

[0068] 表2提供了示例性抗FOLR1抗体的轻链CDR的氨基酸序列。具有与那些示例性抗FOLR1抗体相同的轻链CDR1、CDR2,以及CDR3区域的抗体也在本发明的范围内。

[0069] 表2:抗FOLR1抗体的轻链CDR序列

示例性抗体	CDR1	CDR2	CDR3
FOLR1-Ab217	QSLLYSSSQKNY	WAS	QQYYSYPWT
FOLR1-Ab218	ESVDNYGISF	AAS	QQSKEVPYT
FOLR1-Ab220	ESVDNYGISF	VAS	QQSKEVPT
FOLR1-Ab221	ESVDNYGISF	VAS	QQSKEVPT
FOLR1-Ab222	ESVDNYGISF	VAS	QQSKEVPT

[0071] 本文提供的参照抗体的重链及轻链CDR基于IMGT方法确定,这是本领域众所周知的。在一些情况下,本文公开的抗FOLR1抗体可包含与本文公开的任何参照抗体相同的重链及轻链CDR。具有相同 $V_H$ 及/或 $V_L$  CDR的两种抗体表示,当通过相同方法测定时,它们的CDR是相同的(例如,本文所述及/或本领域已知的那些)。

[0072] 在一些实施例中,本文公开的抗FOLR1抗体可包含与该参照抗体之一相同的 $V_H$ 及/或VL序列,其在以下提供(CDRs以粗体字表示):

[0073] FOLR1-Ab1:

[0074]  $V_H$ :

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKAS**GYTFTSYW**MNWKQRPEQGLEWIGRIN

[0075] **PYDSETHSNQKFKDKAIL**

TVDKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYC**CARSGGYAWFAYWGQGLTVTVSA**

[0076]  $V_L$ :

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSS**QSLLYSSSQKNY**LAWYQQKPGQSPKL

[0077] **LIYWASTRESGVPDRFTGS**

GSQTDFTLTISSVKAEDLAVYYC**QQYYSYPWTFGGG**TKLEIK

[0078] FOLR1-Ab4

[0079]  $V_H$ :

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS**IYTFDYS**IQWVKQAPGKGLKWMGWIN

[0080] **TETGEPTYADDFKGRFAFS**

LESSASTAFLQINNLKNEDTATYFC**ARMGYYGPKIMDYWGQGS**VTVSS

[0081]  $V_L$ :

[0082] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASE**ESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLI**  
**YAASNQGS**GVPARFSDSGS  
 GTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC**QQSKEVPYT**FGGGTKLEIK

[0083] FOLR1 - Ab14

[0084] VH:

[0085] EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKAS**GYTFTDYN**MDWVKQSHGKSLEWIGDIN  
**PNNGGT**IYNQKFKGKATLT  
 VDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYC**ARKPYYGPRYFDVWGA** GTT<sup>1</sup>TVSS

[0086] VL:

[0087] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASE**ESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLI**  
**YVASN**QGS<sup>1</sup>GVPARFSGSGS  
 GTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC**QQSKEVPT**FGGGTKLEIK

[0088] FOLR1 - Ab20

[0089] VH:

[0090] EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKAS**GYTFTDYN**MDWVKQSHGKSLEWIGDIN  
**PNNGGT**IYNQKFKGKATLT  
 VDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYC**ARKPYYGPRYFDVWGA** GTT<sup>1</sup>TVSS

[0091] VL:

[0092] DIVLTQFPASLAVSLGQRATISCRASE**ESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLI**  
**YVASN**QGS<sup>1</sup>GVPARFSGSGF  
 GTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC**QQSKEVPT**FGGGTKLEIK

[0093] FOLR1 - Ab23

[0094] VH:

[0095] EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKAS**GYTFTDYN**MDWVKQSHGKSLEWIGDIN  
**PNNGGT**IYNQKFKGKATLT  
 VDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYC**ARKPYYGPRYFDVWGA** GTT<sup>1</sup>TVSS

[0096] VL:

[0097] DIVLTQFPAFLAVFLGQRATISCRASE**ESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLI**  
**YVASN**QGS<sup>1</sup>GVPARFSGSGF  
 GTEFSLNIHPMEEDDSAMYFC**QQSKEVPT**FGGGTKLEIK

[0098] 同样在本发明内容的范围内的是本文公开的任何参考抗-FOLR1抗体的功能变体(例如,以上表1与表2中列出的那些)。功能变体可在参照抗体的一个或多个重链及轻链CDR区域中包含多达5个(例如4、3、2或1个)氨基酸残基变异,并结合FOLR1抗原的相同表位且具有基本相似的亲和力(例如,具有相同顺序的 $K_D$ 值)。在一些情况下,相对于参照抗体中的对应CDR,功能变体中的每个重链及/或轻链CDR包含不超过2个氨基酸残基变异。在一些实施例中,相对于参照抗体中的对应CDR,功能变体中的每个重链及/或轻链CDR包含不超过1个氨基酸残基变异。

[0099] 在一实施例中,该氨基酸残基变异为保守的氨基酸残基取代。如本文所用,“保守氨基酸取代”是指不改变进行氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或大小特征的氨基酸取代。可根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备变体,例如在编译此类方法的参考文献中可以找到的,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,

J.Sambrook等人编辑,第二版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1989年,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人编辑,John Wiley&Sons公司,纽约。氨基酸的保守取代包括在以下组内的氨基酸之间进行的取代:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;以及(g)E、D。

[0100] 在一些具体实施例中,该抗FOLR1抗体包含与参照抗体的重链CDRs共同至少80%(例如,85%、90%、95%或98%)相同的重链CDRs,及/或与该参照抗体的轻链CDRs共同至少80%(例如,85%、90%、95%或98%)相同的轻链CDRs。在一些具体实施例中,该抗FOLR1抗体包含与任何参照抗体的重链可变区至少80%(例如,85%、90%、95%或98%)相同的一重链可变区( $V_H$ ),及/或与该参照抗体的轻链可变区至少80%(例如,85%、90%、95%或98%)相同的轻链可变区( $V_L$ )。

[0101] 使用Karlin与Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990年,修改为Karlin与Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993年的算法确定两个氨基酸序列的“同一性百分比”。这种算法被并入Altschul等人J.Mol.Biol.215:403-10,1990年的NBLAST与XBLAST程序(2.0版)中。可以使用XBLAST程序,分数=50,字长=3,执行BLAST蛋白检索,以获得与目标蛋白分子同源的氨基酸序列。在两个序列之间存在缺口的情况下,可以如Altschul等人在Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997年中所述利用有缺口的BLAST。当使用BLAST与Gapped BLAST程序(例如,XBLAST与NBLAST)时,可使用各个程序的默认参数。

[0102] 本发明还提供了本文公开的任何参考抗FOLR1抗体的种系变体。种系变体相对于其朝向对应种系序列的亲本抗体而言,在框架区中包含一或多个突变。为了产生种系变体,可将亲本抗体或其一部分的重链或轻链可变区序列(例如,框架序列)作为对抗体种系序列数据库的查询(例如,bioinfo.org.uk/abs/,www.vbase2.org,或imgt.org),以鉴定亲本抗体使用的相应种系序列以及种系序列与亲本抗体之间一或多个框架区中的氨基酸残基变异。然后可以基于种系序列将一或多个氨基酸取代引入亲本抗体中以产生种系变体。

[0103] 在一些具体实施例中,本文所述的任何抗FOLR1抗体的重链可进一步包含一重链恒定区(CH)或其部分(例如,CH1、CH2、CH3,或其组合)。该重链恒定区可为任何合适的来源,例如,人类、小鼠、大鼠,或兔。在一特定实施例中,该重链恒定区来自人类IgG( $\gamma$ 重链)。当需要时,本文所述的抗FOLR1抗体可包含一修饰的恒定区。例如,其可包含免疫学上惰性的修饰的恒定区,例如不触发补体调节的裂解,或不刺激抗体依赖性细胞调节的细胞毒性(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity,ADCC)。可以使用在美国专利号5,500,362中公开的方法评估ADCC活性。在其他具体实施例中,该恒定区以如Eur.J.Immunol.(1999年)29:2613-2624;PCT申请号PCT/GB99/01441;及/或英国专利申请号9809951.8所述方式进行修饰。

[0104] 本文所述的任何抗FOLR1抗体可进一步包含轻链,其包括轻链可变区以及任选地轻链恒定区(CL),其可为本领域已知的任何CL。在一些实施例中,该CL为 $\kappa$ 轻链。在其他实施例中,该CL为 $\lambda$ 轻链。抗体重链与轻链恒定区为本领域众所周知的,例如,在IMGT数据库(www.imgt.org)或在www.vbase2.org/vbstat.php中提供的那些,其均通过引用并入本文。

[0105] 抗FOLR1抗体的制备

[0106] 如本文所述的能够结合FOLR1的抗体可通过本领域已知的任何方法来制备。参见,

例如,Harlow与Lane,(1998年)Antibodies:A Laboratory Manual,冷泉港实验室,纽约。

[0107] 在一些具体实施例中,可通过常规杂交瘤技术制备对目标FOLR1抗原(例如,人类FOLR1)具有特异性的抗体。全长目标抗原或其片段,任选地与载体蛋白如KLH偶联,可用于免疫宿主动物以产生与该抗原结合的抗体。如本文进一步所述,宿主动物的免疫途径及时间表通常与建立的且常规的抗体刺激及产生技术一致。产生小鼠抗体、人源化抗体,以及人类抗体的通用技术为本领域已知的,并在本文中进行描述。预期可操纵包括人类或由此产生抗体的细胞在内的任何哺乳动物受试者,以作为包括人类杂交瘤细胞株在内的哺乳动物产生的基础。通常,以一定量的免疫原对宿主动物进行腹膜内、肌肉内、口服、皮下、足底内,及/或皮内接种,包括本文所述者。

[0108] 可以使用Kohler、B.与Milstein,C.(1975年)Nature 256:495-497所述的一般体细胞杂交技术从淋巴细胞与不朽化骨髓瘤细胞制备融合瘤,或由Buck,D.W.等人,In Vitro,18:377-381(1982年)所修改的方式进行。可用的骨髓瘤细胞株包括,但不限于,X63-Ag8.653与来自美国加州圣地亚哥细胞分布中心的Salk研究所的那些骨髓瘤细胞株,可被用于杂交。通常,该技术涉及使用融合蛋白原,如聚乙二醇,或以本领域技术人员熟知的电子方式,来融合骨髓瘤细胞与淋巴细胞。融合后,将细胞与融合培养基分离,并在选择性生长培养基如次黄嘌呤-胺基蝶呤-胸腺核苷(HAT)培养基中生长,以除去未杂交的亲本细胞。如本文所述的任何补充有或不含血清的培养基可用于培养分泌单克隆抗体的融合瘤。作为细胞融合技术的另一替代方法为,EBV不朽化B细胞可用于产生如本文所述的抗FOLR1的单克隆抗体。如果需要,扩增并次克隆该融合瘤,并以常规免疫分析程序(例如,放射免疫分析、酵素免疫分析,或荧光免疫分析)测定上清液的抗免疫原活性。

[0109] 可作为抗体来源的融合瘤包括产生能够干扰FOLR1活性的单克隆抗体的所有衍生物、亲本融合瘤的后代细胞。产生这种抗体的融合瘤可使用已知的方法在体外或体内生长。如果需要,可通过常规的免疫球蛋白纯化方法,如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色层分析,以及超滤从培养基或体液中分离出单克隆抗体。如果存在不期望的活性,则可除去之,例如,通过在与固相连接的免疫原所制成的吸附剂上跑该制剂,并将所需的抗体从免疫原中洗脱或释放出来。以目标抗原或含有与在待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质(例如,匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白,牛甲状腺球蛋白,或使用双功能或衍生剂的黄豆胰蛋白酶抑制剂,例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基的结合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过离氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl<sub>2</sub>,或R<sub>1</sub>N=C=NR,其中R与R<sub>1</sub>为不同的烷基)结合的目标氨基酸序列的片段免疫一宿主动物,可产生一群抗体(如,单克隆抗体)。

[0110] 如果需要,可以测序有兴趣(例如,由融合瘤产生)的抗体(单克隆或多克隆),然后将该多核苷酸序列克隆至用于表达或增殖的载体中。编码该有兴趣的抗体的序列可以在宿主细胞中的载体内被维持,然后可扩增并冷冻该宿主细胞以供将来使用。或者,该多核苷酸序列可用于遗传操作以使抗体「人源化」或提高抗体的亲和力(亲和力成熟作用)或该抗体的其他特征。例如,若该抗体被用于人类的临床试验及治疗,则恒定区可被改造为更类似于人类的恒定区以避免免疫反应。可能需要遗传操纵抗体序列以获得对目标抗原的更大亲和力,并在抑制FOLR1活性方面具有更大的功效。对本领域技术人员而言显而易见的是,可对抗体进行一或多种多核苷酸的改变,且仍保持其与目标抗原的结合特异性。

[0111] 在其他具体实施例中,可通过使用已经被工程化以表达特定的人类免疫球蛋白的

市售小鼠来获得全人类抗体。设计用于产生更理想(例如,全人类抗体)或更强健的免疫反应的转基因动物亦可用于产生人源化或人类抗体。这种技术的实施例为来自Amgen公司(Fremont,加州)的Xenomouse<sup>RTM</sup>以及来自Medarex公司(Princeton,纽泽西州)的HuMAb-Mouse<sup>RTM</sup>与TC Mouse<sup>TM</sup>。在另一个替代方案中,可通过噬菌体展示技术或酵母菌技术重组抗体。参见,例如,美国专利第5,565,332号;第5,580,717号;第5,733,743号;以及第6,265,150号;以及Winter等人(1994年)Annu.Rev.Immunol.12:433-455。或者,可使用噬菌体展示技术(McCafferty等人,(1990年)Nature 348:552-553)从来自未被免疫的供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库中体外产生人类抗体与抗体片段。

[0112] 在一些具体实施例中,可从抗体库,例如噬菌体展示抗体库或酵母展示抗体库中分离能够结合FOLR1抗原的抗体。在一实施例中,例如,可依照美国专利公开号2015/0153356中公开的方法,从单克隆抗体库中分离本文所述的抗FOLR1抗体,出于相关目的或主题,将其相关公开内容通过引用并入本文。

[0113] 可通过常规方法制备完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段。例如,可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生F(ab')<sub>2</sub>片段,以及可通过还原F(ab')<sub>2</sub>片段的二硫键以产生Fab片段。

[0114] 遗传工程改造的抗体,如人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体,以及双特异性抗体可通过例如常规重组技术产生。在一实施例中,可使用常规方法(例如,通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链与轻链的基因的寡核苷酸探针)而容易地分离并测序编码针对目标抗原特异性的单克隆抗体的DNA。融合瘤细胞是作为这种DNA的较佳来源。一经分离,可将该DNA置于一或多个表达载体中,然后将其转染至宿主细胞内,如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以获得重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。参见,例如,PCT公开号WO 87/04462。然后可以修饰该DNA,例如,通过以编码序列取代人类重链与轻链恒定结构域代替同源鼠序列,Morrison等人(1984年)Proc.Nat.Acad.Sci.81:6851,或通过共价连接到免疫球蛋白编码序列全部或部分的非免疫球蛋白多肽的编码序列。以这样的方式,遗传工程化抗体,例如“嵌合”或“杂合”抗体;可被制备,而具有目标抗原的结合特异性。

[0115] 为生产“嵌合抗体”所开发的技术为本领域熟知的。参见,例如,Morrison等人(1984年)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,6851;Neuberger等人(1984年)Nature 312,604;以及Takeda等人(1984年)Nature 314:452。

[0116] 构建人源化抗体的方法也是本领域熟知的。参见,例如,Queen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:10029-10033(1989年)。在一实施例中,依照本领域已知的方法,对亲本非人抗体的V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>的可变区进行立体分子模型分析。接着,使用相同的分子模型分析来鉴定预测对正确的CDR结构的形成重要的框架氨基酸残基。平行地,使用亲本V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列作为搜索查询,从任何抗体基因数据库中鉴定具有与亲本非人类抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列的人类V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>链。然后选择人类V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>受体基因。

[0117] 所选择的人类受体基因内的CDR区域可被来自亲本非人类抗体或其功能变体的CDR区域所取代。必要时,可使用预计在与CDR区域相互作用中具有重要作用的亲本链框架区域内的残基(参见上述说明)以取代人类受体基因中的相应残基。

[0118] 通过连接编码重链可变区的核苷酸序列与编码轻链可变区的核苷酸序列,可以通

过重组技术制备单链抗体。优选地,在二个可变区之间并入柔性接头。或者,描述用于生产单链抗体的技术(美国专利第4,946,778号与第4,704,692号)可适用于产生噬菌体或酵母菌scFv文库以及对FOLR1具有特异性的scFv克隆株,其可依照常规程序从文库中鉴定出。可对阳性克隆株进行进一步筛选以鉴定出抑制FOLR1活性者。

[0119] 可以使用本领域熟知的方法对遵循本领域已知的方法及本文所述的方法所获得的抗体进行确定特征。例如,其中一种方法为鉴定抗原所结合的表位或“表位作图”。本领域已知的许多方法用于测定及确定蛋白质上的表位的位置特征,包括解决抗体-抗原复合物、竞争测定、基因片段表达测定,以及基于合成肽的分析,例如,如Harlow与Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, 冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1999年,一书第11章所述者。在另一实施例中,表位作图可用于确定抗体结合的序列。该表位可为线性表位,即,包含在单链氨基酸中,或由不一定包含在单链(主要结构线性序列)中的氨基酸的立体相互作用形成的构象表位。可以分离或合成不同长度(例如,至少4-6个氨基酸长)的肽,并用于与一抗体的结合分析。在另一个实施例中,抗体结合的表位可通过使用衍生自目标抗原序列的重叠肽在系统筛选中确定,并以该抗体确定结合。根据该基因片段表达分析,编码目标抗原的开放阅读框架随机地或通过特异性遗传构建进行片段化,并确定抗原表达的片段与待测抗体的反应性。基因片段可以,例如,通过PCR产生,然后在放射性氨基酸存在下在体外转录并转译为蛋白质。然后通过免疫沉淀与凝胶电泳测定抗体与放射性标记的抗原片段的结合。还可通过使用噬菌体颗粒表面上显示的大量随机肽序列库(噬菌体文库)来鉴定某些表位。或者,可以在简单结合分析中测试定义的重叠肽片段文库与测试抗体的结合。在另外的实施例中,可以进行抗原结合结构域的诱变、结构域交换实验,以及丙氨酸扫描诱变,以鉴定表位结合所需的、足够的,及/或必需的残基。例如,可以使用目标抗原的突变体进行结构域交换实验,其中FOLR1多肽的各个片段已被来自紧密相关但抗原性不同的蛋白质的序列替换(交换)。通过评估抗体与突变体FOLR1的结合,可以评估特定抗原片段对抗体结合的重要性。

[0120] 或者,竞争分析可以使用已知结合相同抗原的其它抗体来进行,以确定抗体是否与其它抗体结合在相同的表位上。竞争分析为本领域技术人员所周知的。

[0121] 在一些实施例中,抗FOLR1抗体通过如下所例示的重组技术制备。

[0122] 编码如本文所述的抗FOLR1抗体的重链与轻链的核酸可以克隆至一个表达载体中,每个核苷酸序列可操作地连接到合适的启动子。在一实施例中,编码重链与轻链的每个核苷酸序列可操作地连接到不同的启动子。或者,编码重链与轻链的核苷酸序列可以与单个启动子可操作地连接,使得重链与轻链都可由相同的启动子表达。必要时可在重链与轻链编码序列的间插入内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES)。

[0123] 在一些实施例中,编码抗体两条链的核苷酸序列被克隆到二个载体中,其可以被引入至相同或不同的细胞中。当两条链在不同的细胞中表达时,每一条都可以从表达该链的宿主细胞中分离出来,并将分离的重链与轻链混合且在允许形成抗体的合适条件下培养作用。

[0124] 通常,使用本领域已知的方法,可以将编码抗体的一条链或所有链的核酸序列克隆到与合适的启动子可操作地连接的合适的表达载体中。例如,核苷酸序列与载体可以在合适的条件下与限制酶接触,以在每个分子上产生互补末端,其可以彼此配对并以连接酶

连接在一起。或者,合成的核酸接头可以连接到基因的末端。这些合成的接头含有对应于载体中特定限制酶位点的核酸序列。表达载体/启动子的选择取决于用于产生抗体的宿主细胞的类型。

[0125] 多种启动子可被用于如本文所述的抗体的表达,包括但不限于,巨细胞病毒(CMV)中间体早期启动子、一种病毒LTR,例如劳斯肉瘤(Rous sarcoma)病毒LTR、HIV-LTR、HTLV-1LTR、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、大肠杆菌lac UV5启动子,以及单纯疱疹病毒启动子。

[0126] 亦可使用可调节的启动子。这些可调节的启动子包括使用来自大肠杆菌的lac抑制物作为转录调节剂,以调节来自带有lac操纵子的哺乳动物细胞启动子的转录物“Brown, M.等人,Cell,49:603-612(1987年)”,使用四环霉素抑制物(tetR)的那些“Gossen, M.与Bujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551(1992年); Yao, F.等人, Human Gene Therapy, 9:1939-1950(1998年); Shockelt, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6522-6526(1995年)”。其他系统包括FK506二元体、VP16, 或p65, 使用天竺葵醇、RU486、二苯酚莽草酮, 或雷帕霉素。可诱导的系统可获自Invitrogen、Clontech以及Ariad公司。

[0127] 可以使用含有带有一操纵子的抑制物的可调节启动子。在一具体实施例中,来自大肠杆菌的lac抑制物可作为转录调节剂,以调节来自具有lac操纵子的哺乳动物细胞启动子的转录“M. Brown等人, Cell, 49:603-612(1987年)]; Gossen与Bujard(1992年)”; “M. Gossen等人, Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992年)”将四环霉素抑制物(tetR)与转录活化剂(VP16)组合以产生tetR-哺乳动物细胞转录活化剂融合蛋白, tTa(tetR-VP16), 带有源自人类巨细胞病毒(hCMV)的主要实时早期启动子的携带有tetO的最小启动子,以产生用于控制哺乳动物细胞中的基因表达的tetR-tet操纵子系统。在一具体实施例中,使用四环霉素诱导型开关。当四环霉素抑制物(tetR)单独,而非tetR-哺乳动物细胞转录因子融合衍生物,可以作为有效的反式调节剂,以调节哺乳动物细胞中的基因表达,当四环霉素操纵子适当地位于CMV启动子的TATA组件的下游时(Yao等人, Human Gene Therapy)。这种四环霉素诱导型转换的一个特别的优点是不需使用四环霉素抑制物-哺乳动物细胞反式活化剂或抑制物融合蛋白,其在一些情况下可能对细胞具有毒性(Gossen等人, Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992年); Shockett等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6522-6526(1995年)),以实现其可调节的作用。

[0128] 此外,载体可以包含,例如,以下的一些或全部:选择性标记基因,例如用于在哺乳动物细胞中选择稳定或瞬间转染子的新霉素基因;用于高量转录的来自人类CMV的实时早期基因的增强子/启动子序列;用于mRNA稳定性的来自SV40的转录终止与RNA加工讯息;用于适合的附加型复制的SV40多瘤复制起始点与ColE1;内部核糖体结合位点(IRESes)、多样化多克隆位点;以及用于体外转录正义与反义RNA的T7及SP6 RNA启动子。用于生产含有转基因的载体的合适的载体及方法为本领域所公知且可被使用的。

[0129] 可用于实施本文所述的方法的聚腺苷酸化讯息的实施例包括,但不限于,人类胶原蛋白I聚腺苷酸化讯息、人类胶原蛋白II聚腺苷酸化讯息,以及SV40聚腺苷酸化讯息。

[0130] 可将包含编码任何该抗体的核酸的一或多种载体(例如,表达载体)引入合适的宿主细胞中以产生抗体。宿主细胞可以在合适的条件下培养以表达抗体或其任何多肽链。这些抗体或其多肽链可通过常规方法,例如,亲和性纯化,而由培养的细胞(例如,来自细胞或

培养物上清液)回收。如果需要,抗体的多肽链可以在合适的条件下培养合适的一段时间,以使其产生抗体。

[0131] 在一些具体实施例中,如本文所述的用于制备抗体的方法涉及编码抗FOLR1抗体的重链与轻链两者的重组表达载体,亦如本文所述者。可通过常规方法,例如,磷酸钙调节的转染作用,将重组表达载体引入合适的宿主细胞(例如,dhfr-CHO细胞)中。可在合适的条件下选择及培养阳性转换体宿主细胞,进而允许形成抗体的两条多肽链的表达,其可以从细胞或培养基中回收。必要时,从宿主细胞回收的两条链可以在允许形成抗体的合适条件下培养作用。

[0132] 在一实施例中,提供了两个重组表达载体,一个编码抗FOLR1抗体的重链,另一个编码抗FOLR1抗体的轻链。可通过常规方法,例如,磷酸钙调节的转染作用,将两种重组表达载体导入合适的宿主细胞(例如,dhfr-CHO细胞)中。或者,可将每个表达载体引入合适的宿主细胞中。可在允许表达抗体多肽链的合适条件下选择并培养阳性转换体。当两个表达载体被引入相同的宿主细胞时,其中产生的抗体可以从宿主细胞或培养基中回收。如果需要,可以从宿主细胞或培养基中回收多肽链,然后在允许形成抗体的合适条件下培养作用。当两个表达载体被引入不同的宿主细胞时,它们之中的每一个可以从相应的宿主细胞或相应的培养基中回收。然后可以在合适的条件下培养作用该两条多肽链以形成抗体。

[0133] 使用标准分子生物学技术来制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转换体、培养宿主细胞并从培养基中回收抗体。例如,可以通过蛋白A或蛋白G偶联基质的亲和性色谱分析法分离一些抗体。

[0134] 编码如本文所述的抗FOLR1抗体的重链、轻链或二者的任何核酸,含有此类抗体的载体(例如,表达载体);以及包含该载体的宿主细胞皆在本发明的范围内。

[0135] 抗体-药物偶联物

[0136] 本发明内容还提供了包含本文所述的任何抗FOLR1抗体的抗体-药物偶联物,其为一治疗剂共价连接。本文所用的“抗体-药物偶联物”或“ADC”等词是指结合物,其中本文所述的抗FOLR1抗体以及治疗剂共价连接。通常,该抗体-药物偶联物可以包括该抗FOLR1抗体、该治疗剂,以及任选地介于该抗体与该治疗剂之间的接头。通过将治疗剂递送至抗体作为标靶的FOLR1<sup>+</sup>细胞,具体而言是FOLR1<sup>+</sup>癌细胞,该ADC可以提高治疗效果。该抗体-药物偶联物可通过本领域已知的多种制备抗体-药物偶联物的方法来制备。

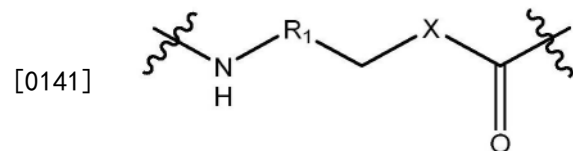
[0137] 本文所述的ADC中的治疗剂可为毒素、化学治疗剂、抗生素、ADP-核糖基转移酶、放射性同位素或溶核酶。在某些情况下,该治疗剂为细胞毒性剂。示例包括,但不限于,葱环类、奥利他汀(auristatin)(例如,奥利他汀E)、喜树碱、康普他汀(combretastatin)、多拉司他汀(dolastatin)、倍癌霉素(duocarcincin)、烯二炔、格尔德霉素(geldanamycin)、吡啶-苯二氮杂二元体、美登素(maytansine)、嘌呤霉素、吡咯并苯二氮杂二元体、紫杉烷、长春花生物碱、微管溶素、半胱氨酸、剪枝抑素、普拉二烯内酯,以及加利车霉素(calicheamicin)。

[0138] 在一些具体实施例中,该抗FOLR1抗体与该治疗剂通过一接头连接。这样的接头可为可裂解的接头,例如,在一定pH条件下可裂解(pH敏感的接头),可被蛋白酶裂解(蛋白酶敏感的接头),或在谷胱甘肽存在下可裂解(对谷胱甘肽敏感的接头)。在一些实施例中,该接头包含一蛋白酶切割位点,其可包含2-5个氨基酸残基,其可被合适的蛋白酶识别及/或切割。这样的肽可包含天然存在的氨基酸残基、非天然存在的氨基酸残基或其组合。在一实

施例中,该肽接头可为二肽接头。实施例包括缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)接头、苯丙氨酸-离氨酸(phe-lys)接头,或马来酰亚胺基己二酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(vc)接头。可选择地,该接头可为不可裂解的,例如,包含任选经取代的烷烃或硫醚的接头。

[0139] 在一些实施例中,该接头可包含可与该抗体形成共价键的官能基团。示例性的官能基团包括,但不限于,马来酰亚胺基团、碘乙酰胺基团、乙烯基砜基团、丙烯酸酯基团、丙烯酰胺基团、丙烯腈基团,或甲基丙烯酸酯基团。在一些情况下,该接头可包含一种或多种反应性胺,包括,但不限于,乙酰基离氨酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(AcLys-VC-PABC)或氨基PEG6-丙酰基。参见,例如,PCT专利公开号W02012/059882。其他示例性的接头包括磺基琥珀酰亚胺基-4-[N马来酰亚胺甲基]环己烷-1-甲酸(Sulfosuccinimidyl-4-[Nmaleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate,smcc)。磺基-smcc的共轭反应系通过马来酰亚胺基团进行的,该基团与巯基(硫醇,-SH)反应,而其磺基-NHS酯则对一级胺具有反应性(在离氨酸与蛋白质或肽N端中发现)。

[0140] 在一些实施例中,该接头可包含一分子间隔基,例如式I的部分:



[0142] 其中 $R_1$ 可为任选经取代的 $C_{1-6}$ 烷基(例如, $C_{1-3}$ 烷基),任选经取代的苯基,任选经取代的 $C_{2-6}$ 亚烷基,任选经取代的 $C_{2-6}$ 亚烯基,任选经取代的 $C_{2-6}$ 亚炔基,或任选经取代的三唑;及/或X可为O、S或N。

[0143] 将细胞毒剂或其他治疗剂与抗体结合的方法为本领域已知的,并且已在各种出版物中描述。例如,可通过离氨酸侧链胺或通过为结合反应发生而还原链间二硫键而活化的半胱氨酸巯基对抗体进行化学修饰。参见,例如,Tanaka等人,FEBS Letters 579:2092-2096,(2005年),以及Gentle等人,Bioconjug.Chem.15:658-663(2004年)。还描述了在抗体的特定位置工程化的反应性半胱氨酸残基,用于通过定义的化学计量比进行特异性药物结合。参见,例如,Junutula等人,Nature Biotechnology,26:925-932,(2008年)。在PCT专利公开号W02012/059882、Strop等人Chem.Biol.20(2):161-167(2013年),以及Farias等人,Bioconjug.Chem.25(2):245-250(2014年)中也描述了使用在转酰胺酶以及一胺(例如,以反应性胺修饰的细胞毒性剂)存在下通过多肽工程化而使之具有酰基供体的含酰胺标签及/或内源性酰胺的结合。出于参考目的及主题,将这些出版物的相关公开内容通过引用并入本文。

[0144] 嵌合抗原受体(CAR)与表达这种受体的免疫细胞

[0145] 本发明内容的特征还在于以FOLR1为标靶的嵌合抗原受体以及表达该受体的免疫细胞。本文所公开的嵌合抗原受体(CARs)为人造细胞表面受体,其将表达这种受体的免疫细胞(例如,T细胞)的结合特异性复位向至FOLR1<sup>+</sup>细胞,例如上皮来源的癌细胞,进而通过例如,该免疫细胞的效应子活性来消除目标疾病细胞。CAR构建体通常包含至少与细胞内信号传导结构域融合的胞外抗原结合结构域。Cartellieri等人,J Biomed Biotechnol 2010:956304,2010年。该胞外抗原结合结构域可为一单链抗体片段(scFv),对FOLR1抗原具有特异性,且细胞内信号传导结构域可以调节导致免疫细胞活化的细胞信号传导。如此,

表达对FOLR1具有特异性的CAR构建体的免疫细胞可与表达FOLR1的患病细胞(例如,肿瘤细胞)结合,导致免疫细胞的活化与患病细胞的消除。

[0146] 本文所述的任何抗FOLR1抗体均可用于产生本文所述的CAR构建体。例如,可使用常规重组技术将抗FOLR1抗体的V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>结构域融合至细胞内信号传导结构域以产生CAR构建体。在一些实施例中,抗FOLR1的V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>结构域通过肽接头连接以形成scFv片段。

[0147] 本文公开的CAR构建体可包含一或多个细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,CAR包含细胞内信号传导结构域,其包括基于免疫受体酪氨酸的激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)。这样的细胞内信号传导结构域可来自CD3 $\zeta$ 。另外,该CAR构建体可进一步包含一或多个共刺激信号传导结构域,其可来自一共刺激受体,例如4-1BB(CD137)、CD7、CD27、CD28、CD40、OX40、ICOS、GITR、HVEM、TIM1,或LFA-1。

[0148] 本文公开的CAR构建体可进一步包含跨膜铰链结构域,其可获自合适的细胞表面受体,例如CD28或CD8。

[0149] 还提供编码本文公开的任何抗-FOLR1 CARs的分离的核酸分子及载体,以及包含该核酸分子或载体的宿主细胞,例如宿主免疫细胞(例如,T细胞以及天然杀手细胞)。包含FOLR1特异性抗体结合片段的表达抗FOLR1 CARs的免疫细胞可用于治疗表达FOLR1的癌症。因此,本文还提供了通过选择患有表达FOLR1的癌症的受试者,并对该受试者施用一治疗有效量的表达以FOLR1为标靶的CARs的免疫细胞来治疗该患有FOLR1<sup>+</sup>癌症的受试者的方法。

[0150] 医药组合物

[0151] 如本文所述,抗FOLR1抗体、编码的核酸或核酸组、含有这些的载体,或包含该载体的宿主细胞,以及包含该抗FOLR1抗体的ADCs,及/或表达以FOLR1为标靶的CARs的免疫细胞,可与医药上可接受的载体(赋形剂)混合,以形成用于治疗目标疾病的医药组合物。“可接受”系指载体必须与组合物的活性成分(优选地,能够稳定活性成分)兼容,且对待治疗的对象无害。医药上可接受的赋形剂(载体),包括本领域熟知的缓冲液。参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000年)Lippincott Williams and Wilkins出版社,K.E.Hoover编辑。

[0152] 用于本发明方法的医药组合物可包含冻干制剂或水溶液形式的医药上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。(Remington:The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000年)Lippincott Williams and Wilkins出版社,K.E.Hoover编辑。)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂所使用的剂量及浓度对受体无毒,并可包含缓冲液,例如,磷酸盐、柠檬酸盐,以及其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸与甲硫氨酸;防腐剂(例如,十八烷基二甲基苄基氯化铵;六氯化铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚,丁基或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如,血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷胺酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或离氨酸;单糖、二糖以及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖,或山梨糖醇;盐形成的抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白复合物);及/或非离子表面活性剂,如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

[0153] 在一些实施例中,如本文所述的医药组合物包括含有可通过本领域已知的方法制备的抗体(或编码核酸,或该ADCs)的脂质体,如Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA

82:3688(1985年);Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030(1980年);以及美国专利第4,485,045号以及第4,544,545号。具有增强的循环时间的脂质体被描述于美国专利第5,013,556号。特别有用的脂质体可通过含有磷脂酰胆碱、胆固醇以及PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物的反相蒸发法产生。脂质体通过规定的孔径的过滤器挤出,以产生具有所需直径的脂质体。

[0154] 抗体、编码核酸,或该ADCs也可包埋在微胶囊中,该微胶囊通过,例如,凝聚技术或界面聚合分别制备,例如,羟甲基纤维素或明胶微胶囊以及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒,以及纳米胶囊)或在大量乳液中。这些技术为本领域已知的,参见,例如,Remington,The Science and Practice of Pharmacy第20版,Mack出版社(2000年)。

[0155] 在其它实施例中,如本文所述的医药组合物可以缓释形式配制。持续释放制剂的合适实施例包括,含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品,例如,薄膜或微胶囊形式。持续释放基质的实施例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸与7-乙基-L-谷氨酸盐的共聚物、无法降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,例如,LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物与醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球体)、蔗糖乙酸异丁酸酯,以及聚-D(-)-3-羟基丁酸。

[0156] 用于体内给药的医药组合物必须为无菌的。这通过,例如,通过无菌过滤膜过滤而容易被实现。治疗性抗体组合物通常放置在具有无菌入口的容器中,例如,具有可被皮下注射针刺穿的瓶塞的静脉内溶液袋或小瓶。

[0157] 如本文所述的医药组合物可以为单位剂型,例如,用于口服、肠胃外或直肠给药的片剂、丸剂、胶囊、粉末、颗粒、溶液或悬浮液或栓剂,或通过吸入或吹入给药。

[0158] 为了制备固体组合物,如片剂,可将主要活性成分与医药载体混合,例如,常规压片成分,如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶,以及其它医药稀释剂,例如水,以形成含有本发明化合物或其无毒的医药上可接受的盐的均匀混合物的固体预处理组合物。当将这些预制组合物被称为均匀时,是指活性成分均匀地分散在整个组合物中,使得组合物可以容易地分成同样有效的单位剂型,例如片剂、丸剂,以及胶囊剂。然后将该固体预制组合物细分为上述类型的单位剂量,其含有0.1至约500mg本发明的活性成分。新组合物的片剂或丸剂可以被包衣或以其它方式复合,以提供具有延长作用的优点的剂型。例如,片剂或丸剂可包含内部剂量与外部剂量组分,后者是在前者上的封套的形式。两种组分可以被肠溶层分开,其用于抵抗在胃中的崩解,并允许内部组分完整地进入十二指肠或被延迟释放。有许多材料可被用于这种肠溶层或涂层,这些材料包括许多聚合酸以及聚合酸与虫胶、鲸蜡醇以及乙酸纤维素等材料的混合物。

[0159] 合适的表面活性剂特别包括非离子试剂,例如,聚氧乙烯脱水山梨糖醇(例如,Tween™ 20、40、60、80或85)以及其它脱水山梨糖醇(例如,Span™ 20、40、60、80或85)。具有表面活性剂的组合物将方便地包含0.05至5%的表面活性剂,并可在0.1至2.5%之间。应当理解的是,如果需要,可以加入其它成分,例如,甘露醇或其它医药上可接受的载体。

[0160] 合适的乳剂可使用市售的脂肪乳剂制备,例如,Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™,以及Lipiphysan™。活性成分可溶解在预混合乳液组合物中,

或可溶解在油中(例如,黄豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油),且混合后形成的乳液与磷脂(例如,卵磷脂、黄豆磷脂或黄豆卵磷脂)及水。应当理解的是,可以加入其它成分,例如,甘油或葡萄糖,以调节乳液的张力。合适的乳液通常含有高达20%的油,例如,5至20%。

[0161] 乳液组合物可为通过将抗体与Intralipid™或其组分(黄豆油、卵磷脂、甘油及水)混合而制成。

[0162] 用于吸入或吹入的医药组合物包括在医药上可接受的水性或有机溶剂,或其混合物与粉末中的溶液及悬浮液。液体或固体组合物可含有如上所述的合适的医药上可接受的赋形剂。在一些具体实施例中,组合物通过口服或鼻呼吸途径施用以获得局部或全身效应。

[0163] 较佳的无菌医药上可接受的溶剂中的组合物可通过使用气体进行雾化。喷雾溶液可直接从喷雾装置通气,或雾化装置可附着至面罩、帐篷或间歇正压呼吸机上。溶液、悬浮液或粉末组合物可从以适当的方式递送制剂的装置施用,较佳为口服或鼻腔给药。

[0164] 治疗与诊断方法

[0165] 如本文所述,任何抗FOLR1抗体、编码核酸或核酸组、包含该核酸的载体、包含抗FOLR1抗体的ADCs,以及表达以FOLR1为靶的CARs的免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞),可用于抑制及/或消除FOLR1<sup>+</sup>疾病细胞,例如FOLR1<sup>+</sup>癌细胞,进而有益于治疗与FOLR1<sup>+</sup>疾病细胞相关的疾病或病症。

[0166] 为了实施本文公开的方法,可以将有效量的如本文所述的医药组合物施用于需要经由合适途径进行治疗的受试者(例如,人类),合适途径,例如,静脉内给药,例如,通过一段时间的快速单次静脉注射或连续输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、吸入或局部途径。用于液体制剂的市售喷雾器,包括喷射式喷雾器以及超音波雾化器对于给药是有用的。液体制剂可以直接雾化,且冻干粉末可以在重组后雾化。或者,如本文所述的抗体可使用氟碳制剂与一计量剂量吸入器雾化,或作为冻干及研磨的粉末吸入。

[0167] 通过本文描述的方法治疗的受试者可为一哺乳动物,更佳为一人类。哺乳动物包括,但不限于,农场动物、运动动物、宠物、灵长类动物、马、狗、猫、小鼠,以及大鼠。需要治疗的人类受试者可为患有、处于危险之中,或被怀疑患有与FOLR1<sup>+</sup>疾病细胞相关的目标疾病/病症的人类患者。在一些具体实施例中,FOLR1<sup>+</sup>疾病细胞为癌细胞,例如上皮癌细胞(即,衍生自上皮细胞)。实施例包括,但不限于,卵巢癌细胞、乳腺癌细胞、肾癌细胞、肺癌细胞、结肠直肠癌细胞,以及脑癌细胞。可通过常规医学检查,例如实验室检查、器官功能检查、计算机断层扫描,或超音波来鉴定具有目标疾病或病症的对象。怀疑患有任何此类目标疾病/病症的受试者可能显示出该疾病/病症的一或多种症状。具有疾病/病症风险的受试者可为具有该疾病/病症的一或多种风险因素的受试者。

[0168] 如本文所用,“有效量”是指对受试者赋予治疗效果所需的每种活性剂的量,不论是单独或组合地与一种或多种其它活性剂施用。在一些具体实施例中,治疗效果为降低FOLR1活性或FOLR1<sup>+</sup>细胞的活性。确定抗体或包含抗体或抗体的其他治疗剂(例如,ADC或CAR-T细胞)的量是否达到治疗效果对于本领域技术人员而言是显而易见的。如本领域技术人员所认识的,有效量取决于所治疗的特定病症、病症的严重程度,包括年龄、身体状况、大小、性别,以及体重的受试者患者参数、治疗持续时间、合并治疗的性质(如果有)、特定的给

药途径,以及卫生从业人员的知识及专长内的类似因素。这些因素为本领域普通技术人员众所周知的,并且仅通过常规实验即可解决。通常较佳使用单个组分或其组合的最大剂量,即根据合理医学判断的最高安全剂量。

[0169] 经验上的考虑,如半衰期,通常会有助于剂量的确定。例如,可使用与人类免疫系统兼容的抗体(例如,人源化抗体或全人类抗体)来延长抗体的半衰期,并防止抗体被宿主的免疫系统攻击。可在治疗过程中确定并调整施用频率,且通常,但不是必需,基于目标疾病/病症的治疗及/或抑制及/或改善及/或延迟。或者,抗体的持续连续释放制剂可能是合适的。用于实现持续释放的各种制剂及装置为本领域已知的。

[0170] 在一实施例中,如本文所述的抗体的剂量可以在施用一种或多种抗体的受试者中依照经验来确定。给予受试者增量的剂量的拮抗剂。为了评估拮抗剂的功效,可以遵循疾病/病症的指标。

[0171] 通常,为了施用如本文所述的任何抗FOLR1抗体或包含这些抗体的ADCs,初始候选剂量可为约2mg/kg。为了本发明的目的,典型的日剂量可为0.1 $\mu$ g/kg至3 $\mu$ g/kg至30 $\mu$ g/kg至300 $\mu$ g/kg至3mg/kg、至30mg/kg至100mg/kg以上,取决于上述因素。对于几天或更长时间的反复给药,取决于病症,治疗持续到发生所需的症状抑制,或达到足够的治疗程度以减轻目标疾病或病症或其症状为止。示例性的给药方案包含施用约2mg/kg的初始剂量,随后每周维持剂量为约1mg/kg的抗体,或每隔一周施用约1mg/kg的维持剂量。然而,其他剂量方案可能是有用的,这取决于从事者希望实现的药物动力学衰变的模式。例如,预期每周四次给药。在一些具体实施例中,给药范围为约3 $\mu$ g/mg至约2mg/kg(例如,约3 $\mu$ g/mg、约10 $\mu$ g/mg、约30 $\mu$ g/mg、约100 $\mu$ g/mg、约300 $\mu$ g/mg、约1mg/kg,以及约2mg/kg)。在一些具体实施例中,给药频率为每周一次、每2周、每4周、每5周、每6周、每7周、每8周、每9周或每10周一次;或每月一次、每2个月、或每3个月或更长时间一次。通过常规技术与测定法容易监测该疗法的进展。给药方案(包括使用的抗体)可随时间变化。

[0172] 为了本发明的目的,如本文所述的抗体的合适剂量将取决于所使用的特异性抗体、抗体及/或非抗体肽(或其组合物),疾病/病症的类型以及严重程度、是否为预防或治疗目的施用抗体、先前的治疗、患者的临床病史及对拮抗剂的反应,以及主治医师的判断。通常,临床医师将施用抗体,直到达到期望结果的剂量。在一些具体实施例中,期望的结果为血栓形成的减少。确定剂量是否导致所需结果的方法对于本领域技术人员将是显而易见的。一种或多种抗体的施用可为连续的或间歇的,这取决于,例如,接受者的生理状况、施用的目的为治疗性或是预防性的,以及熟练的从事者已知的其它因素。抗体的施用可以在预选的时间段内基本连续的,或者可为一系列间隔的剂量,例如,在目标疾病或病症发展之前、期间或之后。

[0173] 如本文所用,“治疗”一词是指包括一或多种活性剂的组合物应用或施用于一受试者,该受试者患有目标疾病或病症、疾病/病症的症状,或对该疾病/病症的倾向,且其目的为治愈、治疗、缓解、减轻、改变、补救、改善、增进,或影响疾病、疾病症状,或对该疾病或病症的倾向。

[0174] 缓解目标疾病/病症包括推迟疾病的发展或进展,或降低疾病严重程度。缓解疾病并不一定需要治疗结果。如其中所使用的,“延迟”目标疾病或病症的发展意指推迟、阻止、缓慢、妨碍、稳定,及/或推迟疾病进展。这样的延迟可为不同的时间长度,这取决于疾病的

历史及/或被治疗的受试者。一种“延迟”或减轻疾病发展,或推迟疾病发病的方法,为减少在给定时间内发展一或多种疾病症状的可能性,及/或在给定的时间框架内减少症状程度的方法,与未使用该方法者进行比较。这种比较通常基于临床研究,使用足以给出统计学显著结果的多个受试者。

[0175] 疾病的“发展”或“进展”意指疾病的初始表现及/或随后的进展。可使用本领域熟知的标准临床技术检测并评估疾病的发展。然而,发展亦指可能无法检测的进展。为了本发明的目的,发展或进展系指该症状的生物学过程。“发展”包括发生、复发及发病。如本文所用,目标疾病或病症的“发作”或“发生”包括初始发作及/或复发。

[0176] 在一些具体实施例中,如本文所述的抗体以足以将一种或两种目标抗原的活性抑制至少20% (例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高) 的量,施用于需要治疗的受试者。在其它具体实施例中,该抗体以有效将一种目标抗原的活性程度降低至少20% (例如30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或以上) 的量施用。

[0177] 医学领域的普通技术人员已知的常规方法,可用于根据待治疗的疾病的类型或疾病的部位,而向受试者施用医药组合物。该组合物亦可通过其它常规途径施用,例如,口服、肠胃外、通过吸入喷雾、局部性、直肠、鼻腔、口腔、阴道,或经由植入的储库给药。本文所用的“肠胃外”一词包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、脑内,以及颅内注射或输注技术。此外,其可通过可注射的贮库途径施用于受试者,例如使用1-、3-或6个月储存罐注射或可生物降解的材料及方法。在一些实施例中,该医药组合物在眼内或玻璃体内施用。

[0178] 可注射的组合物可含有各种载体,如植物油、二甲基乳酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、肉苈蔻酸异丙酯、乙醇,以及多元醇(甘油、丙二醇、液体聚乙二醇及其类似物)。对于静脉注射,可通过滴注法施用水溶性抗体,由此输入含有抗体及生理学上可接受的赋形剂的药物制剂。生理学上可接受的赋形剂可包括,例如,5%葡萄糖、0.9%盐水、林格氏溶液,或其它合适的赋形剂。可将肌内制剂,例如,抗体的合适的可溶性盐形式的无菌制剂溶解,并施用医药赋形剂,例如注射用水、0.9%盐水或5%葡萄糖溶液。

[0179] 在一具体实施例中,通过位点特异性或目标局部递送技术施用抗体。位点特异性或目标局部递送技术的实施例包括,该抗体的各种可植入式储库来源或局部递送导管,例如输注导管、留置导管或针导管、合成移植物、外膜包裹物、分流器和支架或其它可植入装置,位点特异性载体,直接注射,或直接应用。参见,例如,PCT公开号W0 00/53211以及美国专利第5,981,568号。

[0180] 还可使用含有反义多核苷酸、表达载体或次基因组多核苷酸的治疗组合物的目标递送。受体调节的DNA递送技术被描述于,例如,Findeis等人,Trends Biotechnol. (1993年) 11:202;Chiou等人,Gene Therapeutics:Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A.Wolff编辑) (1994年);Wu等人,J.Biol.Chem. (1988年) 263:621;Wu等人,J.Biol.Chem. (1994年) 269:542;Zenke等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1990年) 87:3655;Wu等人,J.Biol.Chem. (1991年) 266:338。

[0181] 在基因治疗方案中,含有多核苷酸(例如,编码如本文所述的抗体的那些)的治疗组合物在约100ng至约200mg的DNA范围内施用,以进行局部给药。在一些具体实施例中,亦可在基因治疗方案中使用约500ng至约50mg、约1 $\mu$ g至约2mg、约5 $\mu$ g至约500 $\mu$ g,以及约20 $\mu$ g

至约100 $\mu$ g的DNA,或更多的浓度范围。

[0182] 如本文所述的治疗性多核苷酸及多肽可使用基因递送载体递送。基因递送载剂可为病毒或非病毒来源的(通常,参见,Jolly,Cancer Gene Therapy(1994年)1:51;Kimura,Human Gene Therapy(1994年)5:845;Connelly,Human Gene Therapy(1995年)1:185;以及Kaplitt,Nature Genetics(1994年)6:148)。可使用内源哺乳动物或异源启动子及/或增强子来诱导这些编码序列的表达。编码序列的表达可为组成型或调节型。

[0183] 用于递送所需多核苷酸的病毒载体与在所需细胞中的表达为本领域熟知的。示例性的基于病毒的载体包括,但不限于,重组逆转录病毒(参见,例如,PCT公开号W0 90/07936;W0 94/03622;W0 93/25698;W0 93/25234;W0 93/11230;W0 93/10218;W0 91/02805;美国专利第5,219,740号以及第4,777,127号;英国专利第2,200,651号,以及欧洲专利第0 345 242号),基于甲病毒的载体(例如,辛德毕斯病毒载体、塞尔比奇森林病毒(ATCC VR-67;ATCC VR-1247)、罗氏河流病毒(ATCC VR-373;ATCC VR-1246),以及委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923;ATCC VR-1250;ATCC VR1249;ATCC VR-532)),以及腺相关病毒(AAV)载体(参见,例如,PCT公开号W0 94/12649、W0 93/03769;W0 93/1919;W0 94/28938;W0 95/11984,以及W0 95/00655)。亦可使用与灭活的腺病毒相连的DNA的施用,如Curiel, Hum. Gene Ther. (1992年)3:147所述者。

[0184] 亦可使用非病毒递送载体及方法,包括,但不限于,与单独杀死的腺病毒连接或未连接的聚阳离子缩合DNA(参见,例如,Curiel, Hum. Gene Ther. (1992年)3:147);配体连接的DNAZ(参见,例如,Wu, J. Biol. Chem. (1989年)264:16985);真核细胞递送载体细胞(参见,例如,美国专利第5,814,482号;PCT公开号W0 95/07994;W0 96/17072;W0 95/30763,以及W0 97/42338)以及核电荷中和或与细胞膜融合。亦可使用裸DNA。示例性的裸DNA引入方法如PCT公开号W0 90/11092以及美国专利第5,580,859号所述。可作为基因递送载体的脂质体则被描述于美国专利第5,422,120号;PCT公开号W0 95/13796;W0 94/23697;W0 91/14445;以及欧洲专利第0524968号中。其它的方法被描述于Philip, Mol. Cell. Biol. (1994年)14:2411,以及Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994年)91:1581。

[0185] 本文所述方法中使用的特定剂量方案,即剂量、时间,周期,将取决于特定受试者及该受试者的病史。

[0186] 当将表达以FOLR1为标靶的CAR的免疫细胞用于疾病治疗时,可通过注入治疗有效剂量的此类免疫细胞,例如T淋巴细胞或NK细胞,至每公斤体重约 $10^5$ 至 $10^{10}$ (个细胞/Kg)或更多细胞来治疗患者。输液重复的次数可根据患者的耐受性进行,直到达到所需的反应。适当的输注剂量及时间表因患者而异,但可由治疗医师针对特定患者确定。通常,将注入大约 $10^6$ 个细胞/Kg的初始剂量,升级到 $10^8$ 个或更多细胞/Kg。IL-2可共同给药以扩增输注的细胞。IL-2的量约为每平方米体表 $1-5 \times 10^6$ 国际单位。

[0187] 在一些具体实施例中,可将一种以上的抗体或抗体与另一种合适的治疗剂的组合施用于需要该治疗的受试者。该抗体、ADC及/或包含该ADC的CAR-T细胞也可与用于增强及/或补充该试剂效力的其他试剂联合使用。

[0188] 可通过本领域公知的方法评估针对目标疾病/病症的治疗功效。

[0189] 本文所述的任何抗FOLR1抗体亦可用于检测样品中FOLR1<sup>+</sup>细胞的存在或含量。这种诊断测定可在体外或体内进行。

[0190] 对于诊断用途,可将本文所述之一抗FOLR1抗体与可检测的标记(例如,成像剂,例如造影剂)结合,以用于体内或体外之诊断目的。如本文所用,“结合的”或“附接的”是指二个实体相关联,优选地具有足够的亲和力以实现两个实体之间的关联的治疗/诊断益处。两个实体之间的缔合可为直接的,亦可通过接头,例如聚合物接头。结合或附着可包括共价或非共价键以及其他形式的缔合,例如包埋,例如,在另一实体上或在另一实体之内,或这二个实体其中之一或二者皆在一第三实体之上或之内,例如微胶粒。

[0191] 在一实施例中,如本文所述的抗FOLR1抗体可附着于可检测标记,该可检测标记为能够直接或间接释放可检测讯号的化合物,进而该配适体可于体外或体内被检测、测量,及/或定性。这种“可检测标记”的实例目的在于包括,但不限于,荧光标记、化学发光标记、比色标记、酶标记、放射性同位素,以及亲和标记,如生物素。可通过常规方法将此类标记物直接或间接地结合至该配适体。

[0192] 在一些具体实施例中,该可检测标记为适合于体内对FOLR1<sup>+</sup>细胞成像的试剂,其可为放射性分子、放射性药物,或氧化铁颗粒。适用于体内成像的放射性分子包括,但不限于,<sup>122</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>18</sup>F、<sup>75</sup>Br、<sup>76</sup>Br、<sup>76</sup>Br、<sup>77</sup>Br、<sup>211</sup>At、<sup>225</sup>Ac、<sup>177</sup>Lu、<sup>153</sup>Sm、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>67</sup>Cu、<sup>213</sup>Bi、<sup>212</sup>Bi、<sup>212</sup>Pb,以及<sup>67</sup>Ga。适用于体内成像的示例性放射性药物包括<sup>111</sup>In羟喹啉、<sup>131</sup>I碘化钠、<sup>99m</sup>Tc美洛芬宁、<sup>99m</sup>Tc红血球、<sup>123</sup>I碘化钠、<sup>99m</sup>Tc依美他嗪、<sup>99m</sup>Tc巨聚合白蛋白、<sup>99m</sup>Tc亚甲基二磷酸、<sup>99m</sup>Tc巯替肽、<sup>99m</sup>Tc羟亚甲基二磷酸盐、<sup>99m</sup>Tc喷替酸、<sup>99m</sup>Tc过镓酸盐、<sup>99m</sup>Tc Sestamibi、<sup>99m</sup>Tc硫胶体、<sup>99m</sup>Tc替曲膦、铊-201,以及氙-133。报导剂还可为染料,例如荧光基团,其可用于检测由组织样品中的FOLR1<sup>+</sup>细胞调节的疾病。

[0193] 为了进行体外诊断测定,可使抗FOLR1抗体与怀疑含有FOLR1<sup>+</sup>细胞的样品接触。该抗体及样品可在合适的条件下作用一段合适的时间,以使抗体与该FOLR1抗原结合。然后可通过常规方法例如ELISA或FACS检测这种相互作用。为了在体内进行诊断测定,可将适量的与标记物偶联的抗FOLR1抗体给予需要检查的对象。可通过常规方法基于从标记释放的讯号来检测标记抗体的存在。

[0194] 用于治疗与诊断的套组

[0195] 本发明还提供用于抑制及/或消除FOLR1<sup>+</sup>疾病细胞进而减轻与这种疾病细胞有关的疾病/病症的套组。这样的套组可包括一个或多个包含抗FOLR1抗体的容器,包含这样的抗体的ADC,或表达以FOLR1为标靶的CAR多肽的免疫细胞,例如本文所述的任何的那些。

[0196] 在一些具体实施例中,该套组可包含用于根据如本文所述的任何方法的指示说明。所包括的指示说明可包含抗FOLR1抗体、ADC,或免疫细胞的施用的描述,以治疗、推迟发作或减轻如本文所述的目标疾病。该套组还可包含基于鉴定该受试者是否具有该目标疾病来选择适合于治疗该受试者的描述。在其他具体实施例中,该指示说明包含对具有该目标疾病风险的受试者施用抗体、ADC,或免疫细胞的描述。

[0197] 关于使用抗FOLR1抗体、包含这样的抗体的ADC,或表达以FOLR1为标靶的CAR的免疫细胞的指示说明,通常包括关于预期治疗的剂量、给药方法,以及给药途径的信息。该容器可为单位剂量、批量包装(例如,多剂量包装)或次单位剂量。在本发明的套组中提供的指示说明通常是在标签或包装插页(例如,套组中包括的纸张)上的书面指示,但是机器可读的指示(例如,磁性或光学存储碟上携带的指示)也是可以接受的。

[0198] 卷标或包装插页指示该组合物用于治疗、推迟发作,及/或减轻与FOLR1<sup>+</sup>细胞有关

的疾病或病症,例如上皮癌,的发作。可以提供说明以实施如本文所述的任何方法。

[0199] 本发明的套组置于合适的包装中。合适的包装包括,但不限于,小瓶、瓶子、罐、软性包装(例如,密封的聚酯薄膜或塑料袋)及其类似物。还包括用于与特定装置组合使用的包装,例如,吸入器、鼻部给药装置(例如,雾化器)或例如微型帮浦的输注装置。套组可具有无菌入口(例如,容器可为静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的瓶塞的小瓶)。容器还可以具有无菌入口(例如,容器可为静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的瓶塞的小瓶)。该组合物中的至少一种活性剂为抗FOLR1抗体、包含这种抗体的ADC,或表现如本文所述的以FOLR1为标靶的CAR的免疫细胞。

[0200] 套组可选择性地提供附加组件,例如,缓冲液以及解释信息。通常,该套组包含在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。在一些具体实施例中,本发明提供了包含上述套组的内容物的制品。

[0201] 本文还提供用于检测一样品中的FOLR1<sup>+</sup>细胞的套组。这样的套组可包含本文所述的任何抗FOLR1抗体。在一些情况下,该抗FOLR1抗体可与如本文所述的可检测标记结合。如本文所用,“结合的”或“附接的”是指二个实体相关联,优选地具有足够的亲和力以实现两个实体之间的关联的治疗/诊断益处。两个实体之间的缔合可为直接的,亦可通过接头,例如聚合物接头。结合或附着可包括共价或非共价键以及其他形式的缔合,例如包埋,例如,在另一实体上或在另一实体之内,或这二个实体其中之一或二者皆在第一第三实体之上或之内,例如微胶粒。

[0202] 替代地或另外地,该套组可包含能够结合抗FOLR1抗体的第二抗体。该套组可进一步包含使用抗FOLR1抗体检测FOLR1<sup>+</sup>的说明书。

[0203] 一般技术

[0204] 除非另有说明,本发明的实践将使用在本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学,以及免疫学的常规技术。在文献中完全解释了这样的技术,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等人,1989年)冷泉港出版社;寡核苷酸合成(M.J.Gait编辑,1984年);Methods in Molecular Biology,Humana出版社;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1989年)Academic出版社;动物细胞培养(R.I.Freshney编辑,1987年);细胞与组织培养介绍(J.P.Mather与P.E.Roberts,1998年)Plenum出版社;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle、J.B.Griffiths,以及D.G.Newell编辑,1993-8年)J.Wiley and Sons出版社;酵素学方法(Academic出版社公司);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir与C.C.Blackwell编辑);哺乳动物细胞的基因转移载体(J.M.Miller与M.P.Calos编辑,1987年);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel,等人编辑,1987年);PCR:聚合酶连锁反应(Mullis等人编辑,1994年);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编辑,1991年);Molecular Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons出版社,1999年);免疫生物学(C.A.Janeway与P.Travers,1997年);抗体(P.Finch,1997年);抗体:一种实用的方法(D.Catty编辑,IRL出版社,1988-1989年);单克隆抗体:一种实用的方法(P.Shepherd与C.Dean编辑,Oxford University出版社,2000年);使用抗体:实验室手册(E.Harlow与D.Lan(冷泉港实验室出版社,1999年);The Antibodies(M.Zanetti与J.D.Capra编辑,

Harwood Academic出版社,1995年);DNA Cloning:A practical Approach,第I及II卷(D.N.Glover编辑,1985年);Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames与S.J.Higgins编辑,1985年);Transcription and Translation(B.D.Hames与S.J.Higgins编辑,1984年);Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑,1986年);Immobilized Cells and Enzymes(1RL出版社)(1986年);以及B.Perbal,A practical Guide To Molecular Cloning(1984年);F.M.Ausubel等人(编辑)。

[0205] 无需进一步的阐述,相信本领域技术人员可基于上述描述最大限度地利用本发明。因此,以下特定具体实施例将被解释为仅仅是说明性的,而非以任何方式限制本发明其余的部分。本文所引用的所有出版物系通过引用方式并入,为了本文参考的目的或主题。

## 实施例

[0206] 实施例1:抗FOLR1抗体的产生

[0207] 试剂与一般方法

[0208] 杂交瘤细胞培养基(PFHM-II无蛋白杂交瘤培养基型号12040077)购自Thermo Fisher公司。

[0209] 使用标准方法以及Thermo Fisher公司(型号15596018)的TRIzol试剂分离RNA。使用来自Takara公司的cDNA合成套组(PrimeScript II第一链cDNA合成套组;型号6210A)产生所得的cDNA分子。使用Takara公司的Premix Taq(型号RR901A)进行抗体V区扩增。标准PCR引物组(Ig-Primer Sets型号TB326)获自Novagen公司。使用标准技术将基因克隆到pET28a载体(Novagen公司;型号69864)中,包括使用EcoRI、HindIII、SalI,以及T4连接酶(均来自NEB公司)。使用QIAEX II凝胶萃取套组(QIAgen公司,型号20021)以纯化部分而非全部寡核苷酸分子。

[0210] SK-OV-3与Daudi细胞培养物在37°C以及5% CO<sub>2</sub>的环境中作为单层培养物体外培养。根据需要定期继代肿瘤细胞。

[0211] 筛选抗体库以发现抗FOLR1抗体

[0212] 如之前在美国专利公开号US2015/0153356中所述,使用蛋白质组以及肽抗原的混合物生成巨大的单克隆抗体库(总计>100,000)。该抗体库被分为一系列高密度抗体数组,然后再针对癌症肿瘤样品以及FDA正常组织组进行筛选。

[0213] 从该抗体库中分离出许多抗体,包括FOLR1-Ab1、FOLR1-Ab4、FOLR1-Ab14、FOLR1-Ab20,以及FOLR1-Ab23,被发现差异地以SK-OV-3细胞株作为标靶。通过以该抗体进行免疫沉淀,然后进行质谱分析,确认FOLR1为目标抗原。随后使用标准反义寡核苷酸技术敲除FOLR1,并过度表达FOLR1,确认FOLR1为这些抗体结合的目标抗原。

[0214] 抗体克隆株的生产

[0215] 将单颗杂交瘤克隆株培养于T25烧瓶中,以10mL杂交瘤细胞培养基(不含PFHM-II蛋白的杂交瘤培养基)一起培养。细胞于37°C下生长直至80%满。然后除去该培养基,并以1x PBS洗涤细胞二次。将TRIzol试剂(1mL体积)直接加入到该烧瓶中,并通过移液管混合而将细胞裂解。然后从该T25烧瓶中回收细胞裂解物,并使用标准方法分离总RNA。随后以Nanodrop 2000(Thermo Fisher公司)测量RNA浓度。然后根据Takara PrimeScript II第一链cDNA合成套组方法从分离的RNA中产生链cDNA。然后按照Novagen公司的使用者方法

TB326进行所得cDNA的杂交瘤V区的扩增。如下表3所示的引物对用于扩增：

[0216] 表3. 用于扩增编码抗FOLR1抗体的核酸的引物

	引子	序列(5' 至 3')
	MuIgVH5'-A	GGGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRITTT
	MuIgVH5'-B	GGGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWYCTCTT
	MuIgVH5'-C1	ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCT
	MuIgVH5'-C2	ACTAGTCGACATGGCTGTCYTRGBGCTGYTCYCTG
	MuIgVH5'-C3	ACTAGTCGACATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCYATTCCT
[0217]	MuIgVH5'-D1	ACTAGTCGACATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT
	MuIgVH5'-D2	ACTAGTCGACATGGRCAGRCTTACWYTYTCATTCCT
	MuIgVH5'-D3	ACTAGTCGACATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT
	MuIgVH5'-E1	ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
	MuIgVH5'-E2	ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAACCTGGRT
	MuIgVH5'-E3	ACTAGTCGACATGGRATGGASCKKIRTCTTTMTCT
	MuIgVH5'-F1	ACTAGTCGACATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRTTT
	MuIgVH5'-F2	ACTAGTCGACATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT

	MuIgVH5'-F3	ACTAGTCGACATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
	MuIgVH5'-F4	ACTAGTCGACATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
	MuIgMVH3'-1	CCCAAGCTTACGAGGGGAAGACATTTGGGAA
	MuIgGVH3'-2	CCCAAGCTTCCAGGGGCCARKGGATARACIGRTGG
	MuIgL5'-A	GGGAATTCATGRAGWCACAKWCYCAAGTCTTT
	MuIgL5'-B	GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT
	MuIgL5'-C	ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT
	MuIgL5'-D1	ACTAGTCGACATGAGGRCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT
	MuIgL5'-D2	ACTAGTCGACATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYYCWGG
	MuIgL5'-E1	ACTAGTCGACATGAGTGTGCYCACTCAGGTCTGGSGTT
	MuIgL5'-E2	ACTAGTCGACATGTGGGGAYCGKTTYAMMCTTTCAATTG
[0218]	MuIgL5'-E3	ACTAGTCGACATGGAAGCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
	MuIgL5'-F1	ACTAGTCGACATGAGIMMKTCTMTCAITTCYTGGG
	MuIgL5'-F2	ACTAGTCGACATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG
	MuIgL5'-F3	ACTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
	MuIgL5'-F4	ACTAGTCGACATGTATATATGTTTGTGTCTATTCT
	MuIgL5'-G1	ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT
	MuIgL5'-G2	ACTAGTCGACATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT
	MuIgL5'-G3	ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG
	MuIgL5'-G4	ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG
	MuIgL3'-1	CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA
	MuIglVL5'-A	GGGAATTCATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT
	MuIglVL3'-1	CCCAAGCTTAGCTCYTCWGWGAIGGYGGRAA

[0219] 以1%琼脂凝胶检查PCR产物。使用QIAgen凝胶萃取套组回收阳性PCR产物，然后使用对应于引物序列的限制酶(来自NEB公司)将其克隆到pET28a载体中。将插入有PCR产物的pET28a载体转型到DH5 $\alpha$ 细菌细胞中，并在氨苄青霉素阳性琼脂盘上进行培养。使用MuIglVH3'-2、MuIglVL3'-1，或MuIglVL3'-1引物将每个细菌克隆株以Sanger测序。比较获得的序列的一致性，以分别确认目标V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列。然后在IGMT数据库(<http://www.imgt.org/>)上分析V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列，以提供V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>的V区域、框架区，以及CDR元素。

[0220] 实施例2: 抗FOLR1抗体的评估

[0221] 使用胰蛋白酶-EDTA部分消化,然后以1000rpm离心5分钟,收集过度表达FOLR1的SK-OV-3细胞(FOLR1<sup>+</sup>SK-OV-3)以及对FOLR1表达阴性的Daudi细胞(FOLR1<sup>-</sup>Daudi)。将细胞重新悬浮于冷的PBS中并等分。将抗FOLR1抗体以PBS稀释,并添加至FOLR1<sup>+</sup>SK-OV-3细胞或FOLR1<sup>-</sup>Daudi细胞。混合细胞溶液,在黑暗中于4℃作用,并以PBS洗涤,然后添加二级抗体偶联物(用于检测)。作用后,将细胞以PBS洗涤,以固定剂固定,然后进行FACS分析。如图1A-1E所示,这些抗体表现出与FOLR1<sup>+</sup>SK-OV-3的饱和结合。这些抗体未表现出与FOLR1<sup>-</sup>Daudi的饱和结合。

[0222] 使用ELISA滴定实验在抗原结合测定中测试抗体。将抗体与不同浓度的重组FOLR1蛋白(rProtein)一起培养。所有抗体以0.39至12.5nM亲和力结合,如下表4所示。

[0223] 给SK-OV-3细胞全部四个抗FOLR1抗体克隆株。为了该实验的目的,单独施用IgG作为对照实验。给药后,确定细胞活力以评估所有抗体克隆株的间接细胞毒性。在两种细胞株中,抗FOLR1抗体引起细胞生存力的降低,降低至总存活率的26-32%,IC<sub>50</sub>值在26-33.73pM之间,如下表4以及图2A-2D所示。IgG对照抗体不会导致细胞存活率的重大损失。

[0224] 表4. 抗FOLR1抗体的特征

	間接細胞毒性		重組蛋白 ELISA
	IC <sub>50</sub> (pM)	細胞存活率%	親和力(nM)
[0225] FOLR1-Ab14	20.03	28	3.125
FOLR1-Ab4	33.73	32	0.78
FOLR1-Ab20	27	27	12.5
FOLR1-Ab23	26	26	6.25
FOLR1-Ab1	X	X	0.39

[0226] 其他实施例

[0227] 本说明书中公开的所有特征可以任何组合形式来进行组合。本说明书中公开的每个特征可以由作用于相同、等同或相似目的的替代特征所代替。因此,除非另有明确说明,否则所公开的每个特征仅仅为等效或类似特征的通用系列的示例。

[0228] 从上面的描述中,本领域技术人员可以轻易地确定本发明的基本特征,并且在脱离本发明的精神及范围的情况下,可以对本发明进行各种改变与修改,以使其适应各种用途及条件。因此,其它实施例也在申请专利范围内。

[0229] 等同

[0230] 虽然本文已描述并阐明了几个发明实施例,但是本领域普通技术人员将容易想出用于执行功能及/或获得结果的各种其他手段及/或结构及/或所述之一或多个优点,且这些变化及/或修改中的每一个被认为包含在本文所述的发明实施例的范围内。更一般地,本领域技术人员将容易理解到,如本文所述的所有参数、尺寸、材料及配置目的为示例性的,且实际参数、尺寸、材料及/或配置将取决于具体应用或应用使用本发明的教导。本领域技术人员将认识到或能够使用不超过常规实验来确定如本文所述的具体创造性实施例的许多等同物。因此,应当理解的是,前述实施例仅以示例的方式呈现,且在所附的申请专利范

围及其等同物的范围内,发明实施例可以不同于具体描述及请求保护的方式实施。本发明的发明实施例涉及如本文所述的每个单独特征、系统、制品、材料、套组及/或方法。此外,如果这些特征、系统、物品、材料、套组及/或方法不相互矛盾,则二个或更多个这样的特征、系统、制品、材料、套组及/或方法的任何组合都包括在本发明的发明范围内。

[0231] 本文定义及使用的所有定义应理解为掌控字典定义、通过引用并入的文献中的定义,及/或定义术语的普通含义。

[0232] 本文中公开的所有参考文献、专利及专利申请均通过引用方式并入本文,并涉及每个被引用的主题,在某些情况下其可包含整个文件。

[0233] 在本说明书及申请专利范围中使用的定冠词“一”以及“一个”,除非明确指出相反意思,否则应理解为“至少一个”。

[0234] 在本说明书及申请专利范围中使用的词组“及/或”应被理解为系指所结合的组件中的“一个或二个”,亦即,在某些情况下该些组件结合存在,而在另一情况下则分开存在。以“及/或”列出的多个组件应该以相同的方式来解释,亦即,“一个或多个”组件如此地连接。除了以“及/或”子句特别标识的组件外,其他组件可选择性地存在,不论与这些特别标识的组件相关或不相关。因此,作为非限制性的示例,当结合诸如“包含”的开放式语言使用时,对“A及/或B”的引用可以于一实施例中仅指A(选择性地包括除了B之外的组件);在另一具体实施例中,则仅指B(选择性地包括除了A之外的组件);在另一具体实施例中,则指A与B(选择性地包括其它组件);等等。

[0235] 如本说明书及申请专利范围中所使用的,“或”应理解为具有与上述定义的“及/或”相同的含义。例如,当在一列表中分离项目时,“或”或“及/或”应被解释为包括的,亦即,包括数量或组件列表中的至少一个,但也包括多于一个,以及选择性地,额外未列出的项目。只有明确指示出相反的意思,例如“只有一个”或“确切为一个”,或,当用于申请专利范围中,“由...组成”时,将指的是仅列出之一或多个组件。一般而言,当前面放有排他性术语,例如“任一”、“之一”、“只有之一”或“确切为一个”时,本文所用之术语“或”应仅被解释为表示排他性的替代品(亦即,“一个或另一个,但不是二者”)。当“主要由...组成”用于申请专利范围中时,应具有其在专利法领域所使用的普通含义。

[0236] 如本说明书及申请专利范围中所使用的,词组“至少一个”对于一个或多个组件的列表,应当被理解为系指从组件列表中的任何一个或多个组件选择出的至少一个组件,但不一定包括具体列在组件列表中的各个及每个组件中的至少一个,且并不排除组件列表中的组件的任何组合。该定义还允许选择性地存在除了在词组“至少一个”所指的组件列表中具体标识的组件之外的组件,无论是与这些特定标识的组件相关或不相关的组件。因此,作为非限制性的实施例,“A和B中的至少一个”(或等效地,“A或B中的至少一个”或等同地“A及/或B中的至少一个”),在一具体实施例中,可以指至少一个,选择性地包括多于一个,A,而没有B的存在(且任选地包括除了B之外的组件);在另一个具体实施例中,指至少一个,选择性地包括多于一个,B,而没有A的存在(且选择性地包括除了A之外的组件);在另一具体实施例中,指至少一个,选择性地包括多于一个,A,以及至少一个,选择性地包括多于一个,B(且选择性地包括其它组件);等等。

[0237] 还应当理解的是,除非明确地指出相反者,否则在本文所要求的任何包括多于一个步骤或作用的方法中,方法的步骤或动作的顺序不一定限于在所述的该方法的步骤或动

作的顺序。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 普众发现医药科技(上海)有限公司
- [0003] <120> 叶酸受体 $\alpha$ 特异性抗体
- [0004] <130> A1215.70009W000
- [0005] <160> 66
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 8
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <223> 合成多胜肽
- [0013] <220>
- [0014] <221> 其它特征
- [0015] <222> (1) .. (1)
- [0016] <223> 可为 Gly 或 Ile
- [0017] <220>
- [0018] <221> 其它特征
- [0019] <222> (6) .. (6)
- [0020] <223> 可为 Asp 或 Ser
- [0021] <220>
- [0022] <221> 其它特征
- [0023] <222> (8) .. (8)
- [0024] <223> 可为 Trp, Asn, 或 Ser
- [0025] <400> 1
- [0026] Xaa Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr Xaa
- [0027] 1 5
- [0028] <210> 2
- [0029] <211> 8
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 人工序列
- [0032] <220>
- [0033] <223> 合成多胜肽
- [0034] <220>
- [0035] <221> 其它特征
- [0036] <222> (3) .. (3)
- [0037] <223> 可为 Pro 或 Thr
- [0038] <220>

- [0039] <221> 其它特征  
[0040] <222> (4) .. (4)  
[0041] <223> 可为 Asn, Tyr, 或 Glu  
[0042] <220>  
[0043] <221> 其它特征  
[0044] <222> (5) .. (5)  
[0045] <223> 可为 Asn, Asp, 或 Thr  
[0046] <220>  
[0047] <221> 其它特征  
[0048] <222> (6) .. (6)  
[0049] <223> 可为 Gly 或 Ser  
[0050] <220>  
[0051] <221> 其它特征  
[0052] <222> (7) .. (7)  
[0053] <223> 可为 Gly 或 Glu  
[0054] <220>  
[0055] <221> 其它特征  
[0056] <222> (8) .. (8)  
[0057] <223> 可为 Thr 或 Pro  
[0058] <400> 2  
[0059] Ile Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
[0060] 1                    5  
[0061] <210> 3  
[0062] <211> 13  
[0063] <212> PRT  
[0064] <213> 人工序列  
[0065] <220>  
[0066] <223> 合成多胜肽  
[0067] <220>  
[0068] <221> 其它特征  
[0069] <222> (3) .. (3)  
[0070] <223> 可为 Ser, Lys 或 Met  
[0071] <220>  
[0072] <221> 其它特征  
[0073] <222> (4) .. (4)  
[0074] <223> 可为 Gly 或 Pro  
[0075] <220>  
[0076] <221> 其它特征  
[0077] <222> (5) .. (5)



- [0117] Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe  
 [0118] 1 5 10  
 [0119] <210> 5  
 [0120] <211> 12  
 [0121] <212> PRT  
 [0122] <213> 人工序列  
 [0123] <220>  
 [0124] <223> 合成多胜肽  
 [0125] <400> 5  
 [0126] Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr  
 [0127] 1 5 10  
 [0128] <210> 6  
 [0129] <211> 9  
 [0130] <212> PRT  
 [0131] <213> 人工序列  
 [0132] <220>  
 [0133] <223> 合成多胜肽  
 [0134] <220>  
 [0135] <221> 其它特征  
 [0136] <222> (3) .. (3)  
 [0137] <223> 可为 Tyr 或 Ser  
 [0138] <220>  
 [0139] <221> 其它特征  
 [0140] <222> (4) .. (4)  
 [0141] <223> 可为 Tyr 或 Lys  
 [0142] <220>  
 [0143] <221> 其它特征  
 [0144] <222> (5) .. (5)  
 [0145] <223> 可为 Glu 或 Ser  
 [0146] <220>  
 [0147] <221> 其它特征  
 [0148] <222> (6) .. (6)  
 [0149] <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid  
 [0150] <220>  
 [0151] <221> 其它特征  
 [0152] <222> (7) .. (7)  
 [0153] <223> 可为 Tyr 或 Val  
 [0154] <220>  
 [0155] <221> 其它特征

[0156] <222> (8) .. (8)  
 [0157] <223> 可为 Trp, Tyr, 或 无  
 [0158] <400> 6  
 [0159] Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr  
 [0160] 1 5  
 [0161] <210> 7  
 [0162] <211> 257  
 [0163] <212> PRT  
 [0164] <213> Homo sapiens  
 [0165] <400> 7  
 [0166] Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val  
 [0167] 1 5 10 15  
 [0168] Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu  
 [0169] 20 25 30  
 [0170] Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly  
 [0171] 35 40 45  
 [0172] Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala  
 [0173] 50 55 60  
 [0174] Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr  
 [0175] 65 70 75 80  
 [0176] Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys  
 [0177] 85 90 95  
 [0178] Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn  
 [0179] 100 105 110  
 [0180] Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg  
 [0181] 115 120 125  
 [0182] Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu  
 [0183] 130 135 140  
 [0184] Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp  
 [0185] 145 150 155 160  
 [0186] Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln  
 [0187] 165 170 175  
 [0188] Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile  
 [0189] 180 185 190  
 [0190] Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg  
 [0191] 195 200 205  
 [0192] Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu  
 [0193] 210 215 220  
 [0194] Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala

[0195]	225	230	235	240
[0196]	Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu			
[0197]		245	250	255
[0198]	Ser			
[0199]	<210> 8			
[0200]	<211> 8			
[0201]	<212> PRT			
[0202]	<213> 人工序列			
[0203]	<220>			
[0204]	<223> 合成多胜肽			
[0205]	<400> 8			
[0206]	Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp			
[0207]	1	5		
[0208]	<210> 9			
[0209]	<211> 8			
[0210]	<212> PRT			
[0211]	<213> 人工序列			
[0212]	<220>			
[0213]	<223> 合成多胜肽			
[0214]	<400> 9			
[0215]	Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser			
[0216]	1	5		
[0217]	<210> 10			
[0218]	<211> 8			
[0219]	<212> PRT			
[0220]	<213> 人工序列			
[0221]	<220>			
[0222]	<223> 合成多胜肽			
[0223]	<400> 10			
[0224]	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn			
[0225]	1	5		
[0226]	<210> 11			
[0227]	<211> 8			
[0228]	<212> PRT			
[0229]	<213> 人工序列			
[0230]	<220>			
[0231]	<223> 合成多胜肽			
[0232]	<400> 11			
[0233]	Ile Asn Pro Tyr Asp Ser Glu Thr			

[0234]	1	5	
[0235]	<210>	12	
[0236]	<211>	8	
[0237]	<212>	PRT	
[0238]	<213>	人工序列	
[0239]	<220>		
[0240]	<223>	合成多胜肽	
[0241]	<400>	12	
[0242]	Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro		
[0243]	1	5	
[0244]	<210>	13	
[0245]	<211>	8	
[0246]	<212>	PRT	
[0247]	<213>	人工序列	
[0248]	<220>		
[0249]	<223>	合成多胜肽	
[0250]	<400>	13	
[0251]	Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr		
[0252]	1	5	
[0253]	<210>	14	
[0254]	<211>	11	
[0255]	<212>	PRT	
[0256]	<213>	人工序列	
[0257]	<220>		
[0258]	<223>	合成多胜肽	
[0259]	<400>	14	
[0260]	Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr		
[0261]	1	5	10
[0262]	<210>	15	
[0263]	<211>	13	
[0264]	<212>	PRT	
[0265]	<213>	人工序列	
[0266]	<220>		
[0267]	<223>	合成多胜肽	
[0268]	<400>	15	
[0269]	Ala Arg Met Gly Tyr Tyr Gly Pro Lys Ile Met Asp Tyr		
[0270]	1	5	10
[0271]	<210>	16	
[0272]	<211>	13	

- [0273] <212> PRT  
[0274] <213> 人工序列  
[0275] <220>  
[0276] <223> 合成多胜肽  
[0277] <400> 16  
[0278] Ala Arg Lys Pro Tyr Tyr Gly Pro Arg Tyr Phe Asp Val  
[0279] 1 5 10  
[0280] <210> 17  
[0281] <211> 12  
[0282] <212> PRT  
[0283] <213> 人工序列  
[0284] <220>  
[0285] <223> 合成多胜肽  
[0286] <400> 17  
[0287] Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr  
[0288] 1 5 10  
[0289] <210> 18  
[0290] <211> 10  
[0291] <212> PRT  
[0292] <213> 人工序列  
[0293] <220>  
[0294] <223> 合成多胜肽  
[0295] <400> 18  
[0296] Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe  
[0297] 1 5 10  
[0298] <210> 19  
[0299] <211> 9  
[0300] <212> PRT  
[0301] <213> 人工序列  
[0302] <220>  
[0303] <223> 合成多胜肽  
[0304] <400> 19  
[0305] Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr  
[0306] 1 5  
[0307] <210> 20  
[0308] <211> 9  
[0309] <212> PRT  
[0310] <213> 人工序列  
[0311] <220>

[0312]	<223>	合成多胜肽
[0313]	<400>	20
[0314]	Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr	
[0315]	1	5
[0316]	<210>	21
[0317]	<211>	118
[0318]	<212>	PRT
[0319]	<213>	人工序列
[0320]	<220>	
[0321]	<223>	合成多胜肽
[0322]	<400>	21
[0323]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
[0324]	1	5 10 15
[0325]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[0326]		20 25 30
[0327]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0328]		35 40 45
[0329]	Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Ser Asn Gln Lys Phe	
[0330]		50 55 60
[0331]	Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr	
[0332]		65 70 75 80
[0333]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0334]		85 90 95
[0335]	Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
[0336]		100 105 110
[0337]	Leu Val Thr Val Ser Ala	
[0338]		115
[0339]	<210>	22
[0340]	<211>	113
[0341]	<212>	PRT
[0342]	<213>	人工序列
[0343]	<220>	
[0344]	<223>	合成多胜肽
[0345]	<400>	22
[0346]	Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly	
[0347]	1	5 10 15
[0348]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser	
[0349]		20 25 30
[0350]	Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	

[0351]	35	40	45
[0352]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
[0353]	50	55	60
[0354]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0355]	65	70	75
[0356]	Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		
[0357]	85	90	95
[0358]	Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
[0359]	100	105	110
[0360]	Lys		
[0361]	<210> 23		
[0362]	<211> 120		
[0363]	<212> PRT		
[0364]	<213> 人工序列		
[0365]	<220>		
[0366]	<223> 合成多胜肽		
[0367]	<400> 23		
[0368]	Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu		
[0369]	1	5	10
[0370]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
[0371]	20	25	30
[0372]	Ser Ile Gln Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met		
[0373]	35	40	45
[0374]	Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
[0375]	50	55	60
[0376]	Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Phe		
[0377]	65	70	75
[0378]	Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		
[0379]	85	90	95
[0380]	Ala Arg Met Gly Tyr Tyr Gly Pro Lys Ile Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
[0381]	100	105	110
[0382]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
[0383]	115	120	
[0384]	<210> 24		
[0385]	<211> 111		
[0386]	<212> PRT		
[0387]	<213> 人工序列		
[0388]	<220>		
[0389]	<223> 合成多胜肽		

[0390] <400> 24  
 [0391] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0392] 1 5 10 15  
 [0393] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 [0394] 20 25 30  
 [0395] Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 [0396] 35 40 45  
 [0397] Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala  
 [0398] 50 55 60  
 [0399] Arg Phe Ser Asp Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His  
 [0400] 65 70 75 80  
 [0401] Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 [0402] 85 90 95  
 [0403] Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0404] 100 105 110  
 [0405] <210> 25  
 [0406] <211> 120  
 [0407] <212> PRT  
 [0408] <213> 人工序列  
 [0409] <220>  
 [0410] <223> 合成多胜肽  
 [0411] <400> 25  
 [0412] Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0413] 1 5 10 15  
 [0414] Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0415] 20 25 30  
 [0416] Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 [0417] 35 40 45  
 [0418] Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0419] 50 55 60  
 [0420] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0421] 65 70 75 80  
 [0422] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0423] 85 90 95  
 [0424] Ala Arg Lys Pro Tyr Tyr Gly Pro Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala  
 [0425] 100 105 110  
 [0426] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0427] 115 120  
 [0428] <210> 26



[0468]	Ala Arg Lys Pro Tyr Tyr Gly Pro Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
[0469]	100                    105                    110
[0470]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0471]	115                    120
[0472]	<210> 28
[0473]	<211> 110
[0474]	<212> PRT
[0475]	<213> 人工序列
[0476]	<220>
[0477]	<223> 合成多胜肽
[0478]	<400> 28
[0479]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Phe Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0480]	1                    5                    10                    15
[0481]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
[0482]	20                    25                    30
[0483]	Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[0484]	35                    40                    45
[0485]	Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
[0486]	50                    55                    60
[0487]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
[0488]	65                    70                    75                    80
[0489]	Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
[0490]	85                    90                    95
[0491]	Glu Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0492]	100                    105                    110
[0493]	<210> 29
[0494]	<211> 120
[0495]	<212> PRT
[0496]	<213> 人工序列
[0497]	<220>
[0498]	<223> 合成多胜肽
[0499]	<400> 29
[0500]	Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0501]	1                    5                    10                    15
[0502]	Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0503]	20                    25                    30
[0504]	Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[0505]	35                    40                    45
[0506]	Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

[0507]	50	55	60
[0508]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0509]	65	70	75 80
[0510]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0511]	85	90	95
[0512]	Ala Arg Lys Pro Tyr Tyr Gly Pro Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala		
[0513]	100	105	110
[0514]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0515]	115	120	
[0516]	<210> 30		
[0517]	<211> 110		
[0518]	<212> PRT		
[0519]	<213> 人工序列		
[0520]	<220>		
[0521]	<223> 合成多胜肽		
[0522]	<400> 30		
[0523]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Phe Pro Ala Phe Leu Ala Val Phe Leu Gly		
[0524]	1 5 10 15		
[0525]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr		
[0526]	20 25 30		
[0527]	Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
[0528]	35 40 45		
[0529]	Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala		
[0530]	50 55 60		
[0531]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Glu Phe Ser Leu Asn Ile His		
[0532]	65 70 75 80		
[0533]	Pro Met Glu Glu Asp Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys		
[0534]	85 90 95		
[0535]	Glu Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0536]	100 105 110		
[0537]	<210> 31		
[0538]	<211> 33		
[0539]	<212> DNA		
[0540]	<213> 人工序列		
[0541]	<220>		
[0542]	<223> 合成多核苷酸		
[0543]	<400> 31		
[0544]	gggaattcat grasttskkg ytmarctkgr ttt 33		
[0545]	<210> 32		

- [0546] <211> 34  
[0547] <212> DNA  
[0548] <213> 人工序列  
[0549] <220>  
[0550] <223> 合成多核苷酸  
[0551] <400> 32  
[0552] gggaattcat graatgsasc tgggtywtyc tctt 34  
[0553] <210> 33  
[0554] <211> 39  
[0555] <212> DNA  
[0556] <213> 人工序列  
[0557] <220>  
[0558] <223> 合成多核苷酸  
[0559] <400> 33  
[0560] actagtcgac atggactcca ggctcaatth agttttcct 39  
[0561] <210> 34  
[0562] <211> 36  
[0563] <212> DNA  
[0564] <213> 人工序列  
[0565] <220>  
[0566] <223> 合成多核苷酸  
[0567] <400> 34  
[0568] actagtcgac atggctgtcy trgbgctgyt cytctg 36  
[0569] <210> 35  
[0570] <211> 39  
[0571] <212> DNA  
[0572] <213> 人工序列  
[0573] <220>  
[0574] <223> 合成多核苷酸  
[0575] <400> 35  
[0576] actagtcgac atggvttggs tgtggamctt gcyattcct 39  
[0577] <210> 36  
[0578] <211> 36  
[0579] <212> DNA  
[0580] <213> 人工序列  
[0581] <220>  
[0582] <223> 合成多核苷酸  
[0583] <400> 36  
[0584] actagtcgac atgaaatgca gctggrtyat sttctt 36

- [0585] <210> 37  
[0586] <211> 36  
[0587] <212> DNA  
[0588] <213> 人工序列  
[0589] <220>  
[0590] <223> 合成多核苷酸  
[0591] <400> 37  
[0592] actagtcgac atggrcagrc ttacwtyytc attcct 36  
[0593] <210> 38  
[0594] <211> 36  
[0595] <212> DNA  
[0596] <213> 人工序列  
[0597] <220>  
[0598] <223> 合成多核苷酸  
[0599] <400> 38  
[0600] actagtcgac atgatggtgt taagtcttct gtacct 36  
[0601] <210> 39  
[0602] <211> 36  
[0603] <212> DNA  
[0604] <213> 人工序列  
[0605] <220>  
[0606] <223> 合成多核苷酸  
[0607] <400> 39  
[0608] actagtcgac atgggatgga gctratcat sytctt 36  
[0609] <210> 40  
[0610] <211> 33  
[0611] <212> DNA  
[0612] <213> 人工序列  
[0613] <220>  
[0614] <223> 合成多核苷酸  
[0615] <400> 40  
[0616] actagtcgac atgaagwtgt ggbtraactg grt 33  
[0617] <210> 41  
[0618] <211> 34  
[0619] <212> DNA  
[0620] <213> 人工序列  
[0621] <220>  
[0622] <223> 合成多核苷酸  
[0623] <400> 41

- [0624] actagtcgac atggratgga sckkrtcttt mtct 34  
[0625] <210> 42  
[0626] <211> 35  
[0627] <212> DNA  
[0628] <213> 人工序列  
[0629] <220>  
[0630] <223> 合成多核苷酸  
[0631] <400> 42  
[0632] actagtcgac atgaacttyg ggytsagmtt grttt 35  
[0633] <210> 43  
[0634] <211> 35  
[0635] <212> DNA  
[0636] <213> 人工序列  
[0637] <220>  
[0638] <223> 合成多核苷酸  
[0639] <400> 43  
[0640] actagtcgac atgtacttgg gactgagctg tgtat 35  
[0641] <210> 44  
[0642] <211> 33  
[0643] <212> DNA  
[0644] <213> 人工序列  
[0645] <220>  
[0646] <223> 合成多核苷酸  
[0647] <400> 44  
[0648] actagtcgac atgagagtgc tgattctttt gtg 33  
[0649] <210> 45  
[0650] <211> 38  
[0651] <212> DNA  
[0652] <213> 人工序列  
[0653] <220>  
[0654] <223> 合成多核苷酸  
[0655] <400> 45  
[0656] actagtcgac atggattttg ggctgatttt ttttattg 38  
[0657] <210> 46  
[0658] <211> 32  
[0659] <212> DNA  
[0660] <213> 人工序列  
[0661] <220>  
[0662] <223> 合成多核苷酸

- [0663] <400> 46  
[0664] cccaagctta cgaggggaa gacatttggg aa 32  
[0665] <210> 47  
[0666] <211> 34  
[0667] <212> DNA  
[0668] <213> 人工序列  
[0669] <220>  
[0670] <223> 合成多核苷酸  
[0671] <400> 47  
[0672] cccaagcttc cagggrccar kggataracg rtgg 34  
[0673] <210> 48  
[0674] <211> 32  
[0675] <212> DNA  
[0676] <213> 人工序列  
[0677] <220>  
[0678] <223> 合成多核苷酸  
[0679] <400> 48  
[0680] gggaattcat gragwacac wycaggtct tt 32  
[0681] <210> 49  
[0682] <211> 33  
[0683] <212> DNA  
[0684] <213> 人工序列  
[0685] <220>  
[0686] <223> 合成多核苷酸  
[0687] <400> 49  
[0688] gggaattcat ggagacagac acactcctgc tat 33  
[0689] <210> 50  
[0690] <211> 39  
[0691] <212> DNA  
[0692] <213> 人工序列  
[0693] <220>  
[0694] <223> 合成多核苷酸  
[0695] <400> 50  
[0696] actagtcgac atggagwcag acacactsct gytatgggt 39  
[0697] <210> 51  
[0698] <211> 41  
[0699] <212> DNA  
[0700] <213> 人工序列  
[0701] <220>

- [0702] <223> 合成多核苷酸  
[0703] <400> 51  
[0704] actagtcgac atgaggrccc ctgctcagwt tyttggwtct t 41  
[0705] <210> 52  
[0706] <211> 41  
[0707] <212> DNA  
[0708] <213> 人工序列  
[0709] <220>  
[0710] <223> 合成多核苷酸  
[0711] <400> 52  
[0712] actagtcgac atgggcwtca agatgragtc acakwyycw g 41  
[0713] <210> 53  
[0714] <211> 39  
[0715] <212> DNA  
[0716] <213> 人工序列  
[0717] <220>  
[0718] <223> 合成多核苷酸  
[0719] <400> 53  
[0720] actagtcgac atgagtgtgc yactcaggt cctggs gtt 39  
[0721] <210> 54  
[0722] <211> 41  
[0723] <212> DNA  
[0724] <213> 人工序列  
[0725] <220>  
[0726] <223> 合成多核苷酸  
[0727] <400> 54  
[0728] actagtcgac atgtggggay cgktttyamm cttttcaatt g 41  
[0729] <210> 55  
[0730] <211> 38  
[0731] <212> DNA  
[0732] <213> 人工序列  
[0733] <220>  
[0734] <223> 合成多核苷酸  
[0735] <400> 55  
[0736] actagtcgac atggaagccc cagctcagct tctcttcc 38  
[0737] <210> 56  
[0738] <211> 33  
[0739] <212> DNA  
[0740] <213> 人工序列

- [0741] <220>  
[0742] <223> 合成多核苷酸  
[0743] <400> 56  
[0744] actagtcgac atgagmmktc mttcattcyt ggg 33  
[0745] <210> 57  
[0746] <211> 34  
[0747] <212> DNA  
[0748] <213> 人工序列  
[0749] <220>  
[0750] <223> 合成多核苷酸  
[0751] <400> 57  
[0752] actagtcgac atgakgthey cgctcagyty ctrg 34  
[0753] <210> 58  
[0754] <211> 35  
[0755] <212> DNA  
[0756] <213> 人工序列  
[0757] <220>  
[0758] <223> 合成多核苷酸  
[0759] <400> 58  
[0760] actagtcgac atggtrtccw casctcagtt ccttg 35  
[0761] <210> 59  
[0762] <211> 37  
[0763] <212> DNA  
[0764] <213> 人工序列  
[0765] <220>  
[0766] <223> 合成多核苷酸  
[0767] <400> 59  
[0768] actagtcgac atgtatatat gtttgttgtc tatttct 37  
[0769] <210> 60  
[0770] <211> 39  
[0771] <212> DNA  
[0772] <213> 人工序列  
[0773] <220>  
[0774] <223> 合成多核苷酸  
[0775] <400> 60  
[0776] actagtcgac atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 39  
[0777] <210> 61  
[0778] <211> 39  
[0779] <212> DNA

- [0780] <213> 人工序列  
[0781] <220>  
[0782] <223> 合成多核苷酸  
[0783] <400> 61  
[0784] actagtcgac atggatttwc argtgcagat twtcagctt 39  
[0785] <210> 62  
[0786] <211> 37  
[0787] <212> DNA  
[0788] <213> 人工序列  
[0789] <220>  
[0790] <223> 合成多核苷酸  
[0791] <400> 62  
[0792] actagtcgac atggtyctya tvtccttgct gttctgg 37  
[0793] <210> 63  
[0794] <211> 37  
[0795] <212> DNA  
[0796] <213> 人工序列  
[0797] <220>  
[0798] <223> 合成多核苷酸  
[0799] <400> 63  
[0800] actagtcgac atggtyctya tvtrctgct gctatgg 37  
[0801] <210> 64  
[0802] <211> 30  
[0803] <212> DNA  
[0804] <213> 人工序列  
[0805] <220>  
[0806] <223> 合成多核苷酸  
[0807] <400> 64  
[0808] cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 30  
[0809] <210> 65  
[0810] <211> 33  
[0811] <212> DNA  
[0812] <213> 人工序列  
[0813] <220>  
[0814] <223> 合成多核苷酸  
[0815] <400> 65  
[0816] gggaattcat ggcctggayt ycwctywtmy tct 33  
[0817] <210> 66  
[0818] <211> 31

- 
- [0819] <212> DNA  
[0820] <213> 人工序列  
[0821] <220>  
[0822] <223> 合成多核苷酸  
[0823] <400> 66  
[0824] cccaagctta gctcytcwgw ggaggyggra a 31

### FOLR1-Ab14

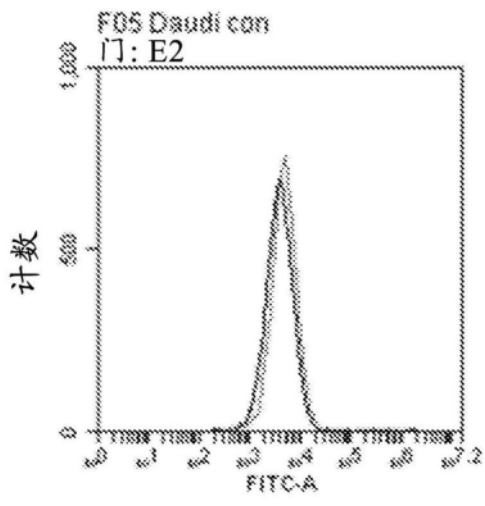
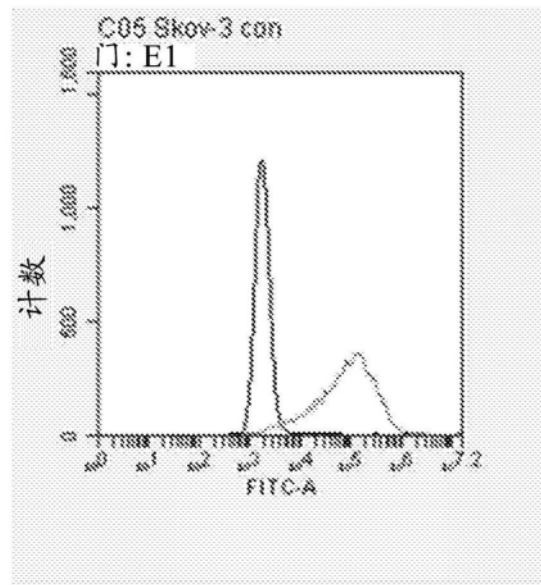


图1A

# FOLR1-Ab4

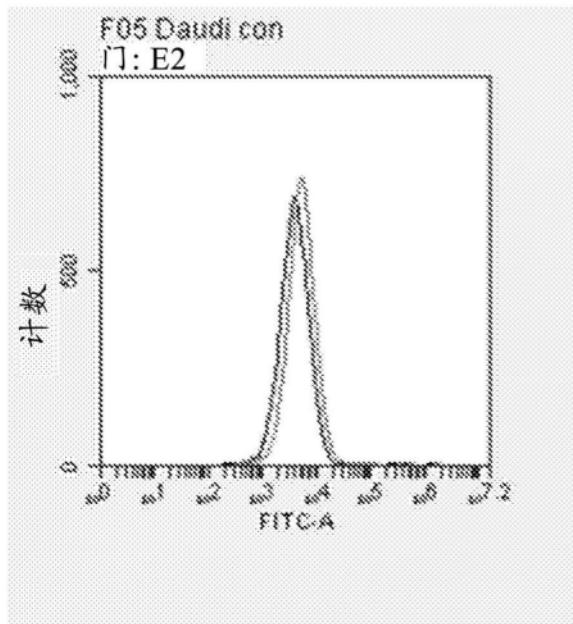
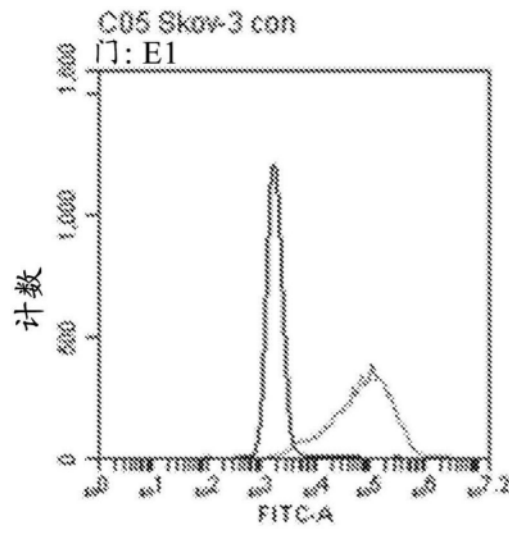


图1B

# FOLR1-Ab20

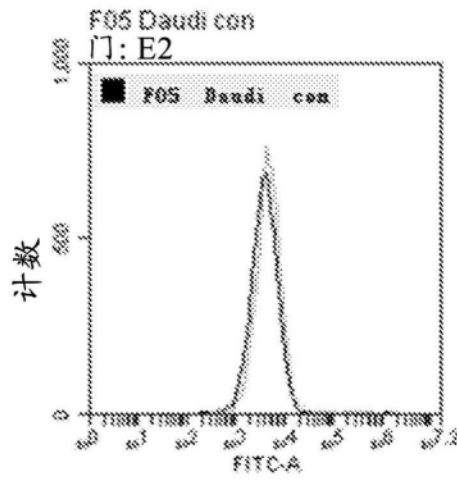
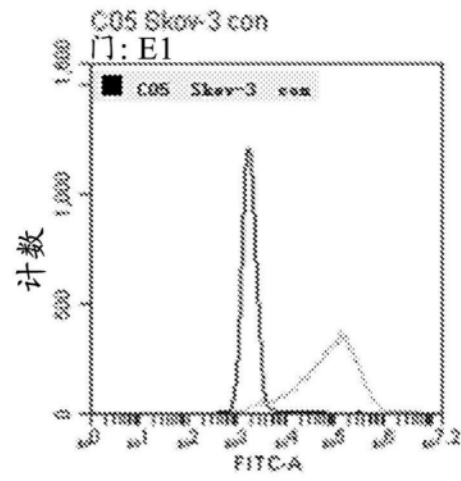


图1C

# FOLR1-Ab23

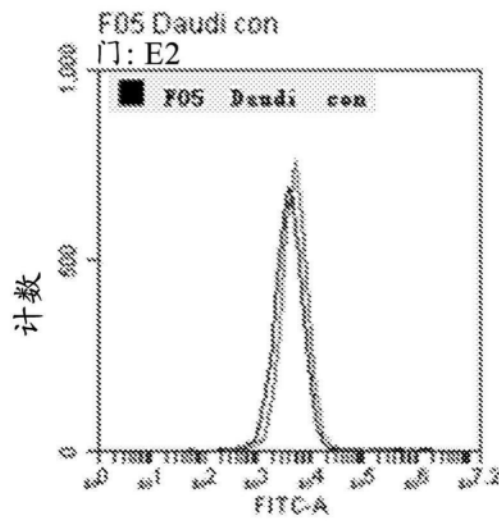
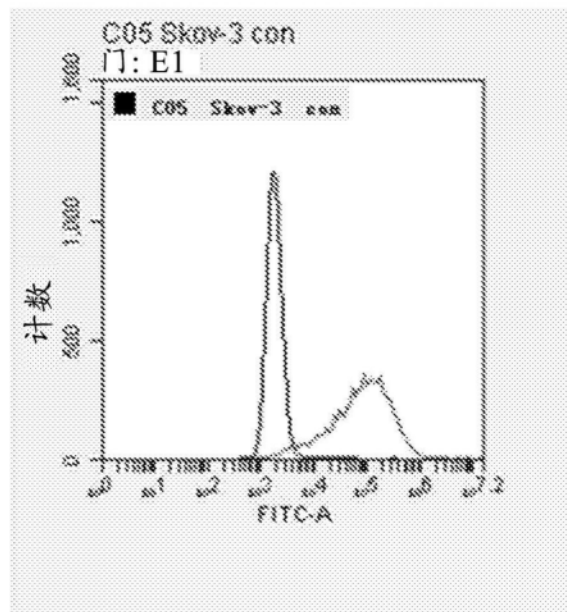


图1D

# FOLR1-Ab1

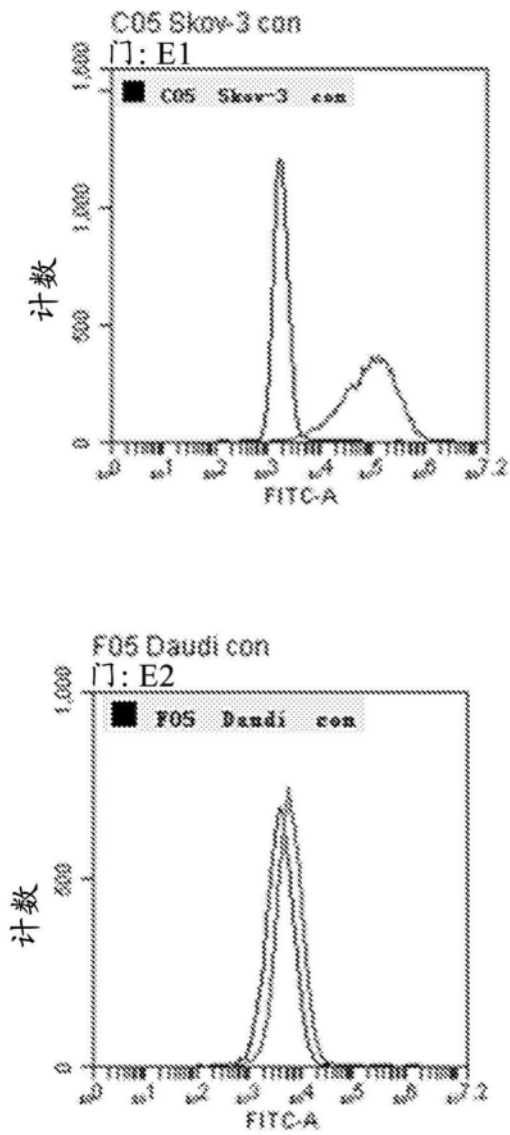


图1E

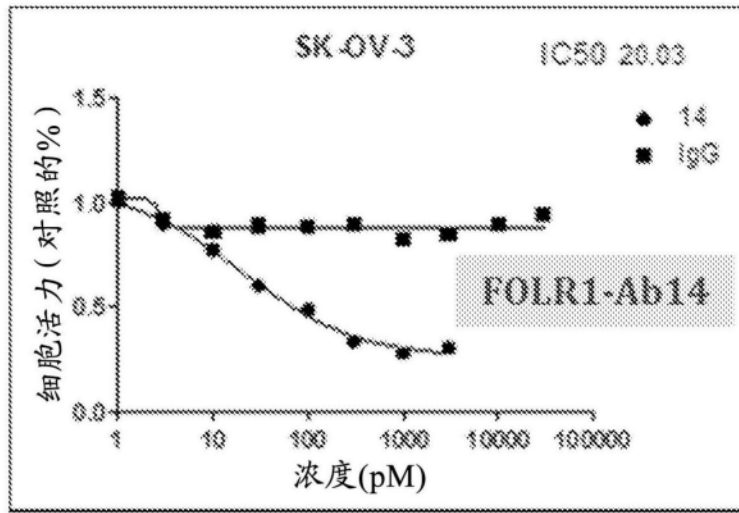


图2A

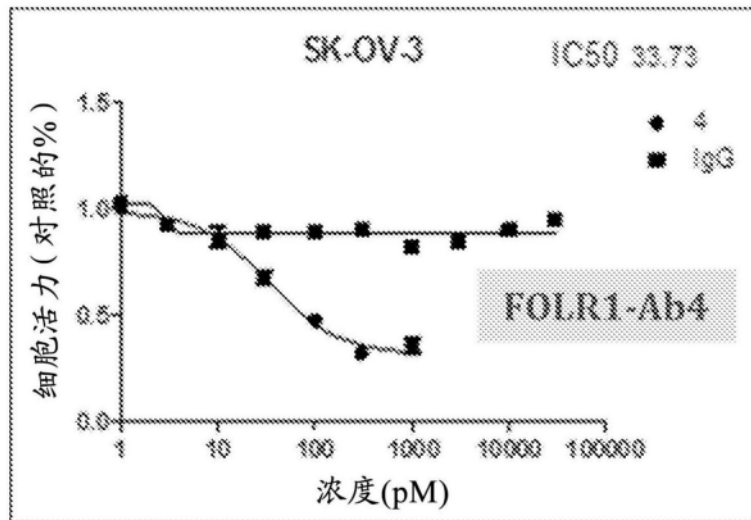


图2B

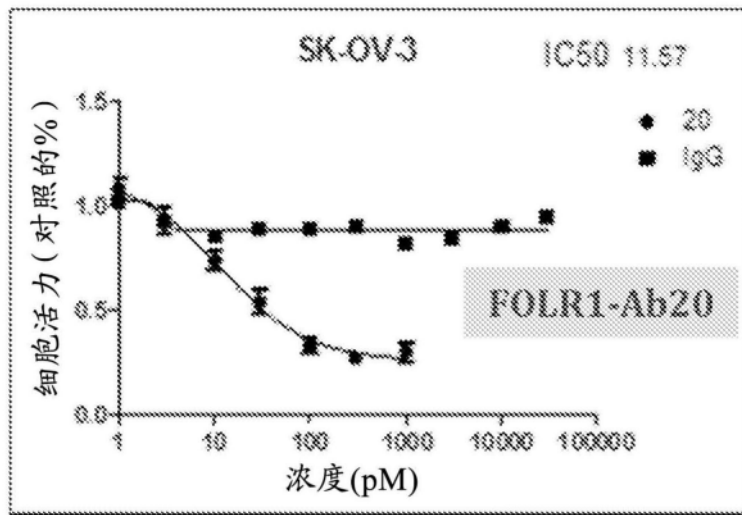


图2C

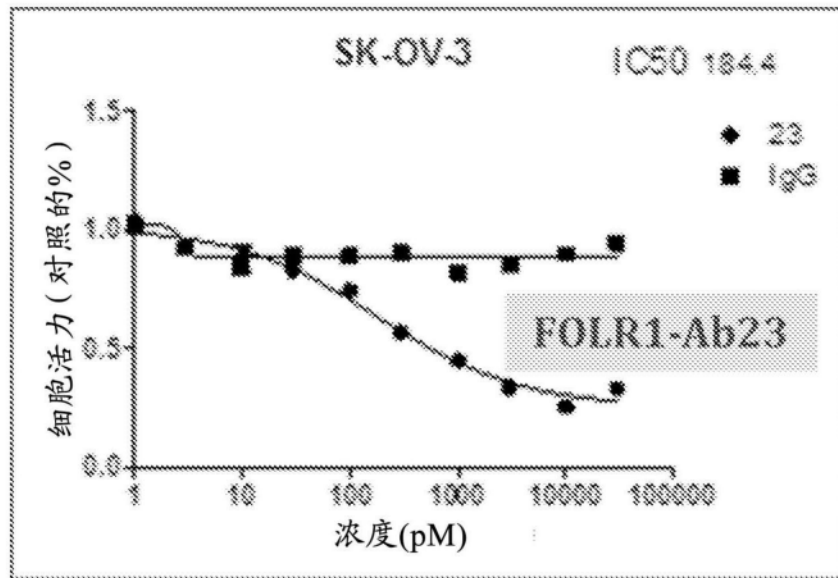


图2D