

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041061**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.05

(21) Номер заявки
201791843

(22) Дата подачи заявки
2012.03.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАКА КАК С ВЕРОЯТНОСТЬЮ РЕАГИРУЮЩЕГО
НА ANTI-FOLR1 ИММУНОКОНЬЮГАТ**

(31) **61/471,007**

(32) **2011.04.01**

(33) **US**

(43) **2017.12.29**

(62) **201391351; 2012.03.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИММЬЮНОДЖЕН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Карриган Кристина Н., Вайтмэн
Кэтлин Р., Пэйн Джиллиан, Лэдд
Шэррон (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A1-20100055034**

US-A1-20090081710

KALLI Kimberly R. et al. Folate receptor
alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer.
Gynecologic Oncology, 2008, 108. pp. 619-626

ALLARD Jay E. et al. Overexpression of
folate binding protein is associated with shortened
progression-free survival in uterine adenocarcinomas.
Gynecologic Oncology, 2007, 107, pp. 52-57

(57) Предоставляются способы повышения возможности успеха при таргетной терапии рака, направленной против человеческого рецептора фолата 1. Также раскрыты реагенты для применения с помощью дополнительно предусмотренных способов.

B1**041061****041061****B1**

Область техники

Область техники в целом относится к повышению эффективности лечения рака, развитие которого характеризуется избыточной экспрессией человеческого рецептора фолата 1 (FOLR1). В частности, изобретение относится к способу повышения эффективности лечения пациентов, склонных к развитию у них рака или с поставленным диагнозом рак, у которых опухолевые клетки избыточно экспрессируют FOLR1, что определяется с помощью анализа экспрессии генов посредством антагониста FOLR1, например иммуноконъюгата FOLR1.

Уровень техники

Рак является одной из ведущих причин смерти в развитых странах мира. Более, чем миллиону людей ставится диагноз рак, являющийся причиной 500000 смертей в год в одних только Соединенных Штатах Америки. Считается, что более, чем у 1 из 3 человек в течение жизни разовьется одна из форм рака. Существует более 200 различных типов рака, на четыре из которых - рак молочной железы, легких, толстой кишки и предстательной железы - приходится более половины всех вновь зарегистрированных случаев заболевания (Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26).

Рецептор фолиевой кислоты 1 (FOLR1), также известный как рецептор фолиевой кислоты альфа или фолат-связывающий белок, представляет собой N-гликозилированный белок, экспрессируемый на плазматической клеточной мембране. FOLR1 обладает высокой степенью сродства к фолиевой кислоте и несколько более низкой - к производным фолиевой кислоты. FOLR1 опосредует доставку внутрь клетки активной формы фолиевой кислоты, 5-метилтетрагидрофолата.

Избыточная экспрессия FOLR1 наблюдается в большинстве случаев рака яичников, а также во многих случаях рака матки, рака эндометрия, поджелудочной железы, почек, легких и молочной железы, в то время как экспрессия FOLR1 в здоровых тканях ограничивается апикальной мембраной эпителиальных клеток в проксимальных почечных канальцах, альвеолярных пневмоцитах легкого, мочевом пузыре, яичках, хороидном сплетении и щитовидной железе (Weitman SD et al, Cancer Res 52: 3396-3401 (1992); Antony AC, Annu Rev Nutr 16: 501-521 (1996); Kalli KR, et al. Gynecol Oncol 108: 619-626 (2008)). Такой паттерн экспрессии FOLR1 делает его желательной мишенью для FOLR1-направленной антираковой терапии.

Из-за обычно бессимптомного развития рака яичников вплоть до поздней стадии, зачастую он поздно диагностируется и имеет плохой прогноз при лечении посредством доступных в настоящее время процедур, как правило, с помощью химиотерапевтических препаратов после хирургической циторедукции (von Gruenigen V et al, Cancer 112: 2221-2227 (2008); Ayhan A et al., Am J Obstet Gynecol 196: 81 e81-86 (2007); Harry VN et al, Obstet Gynecol Surv 64: 548-560 (2009)). Таким образом, существует четкая нереализованная медицинская потребность в более эффективных терапевтических средствах для лечения рака яичников.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на открытии динамического диапазона экспрессии FOLR1 в опухолевой ткани и увеличения чувствительности опухоли к повышенному уровню экспрессии FOLR1 к терапии анти-FOLR1 антителами или анти-FOLR1 иммуноконъюгатами. Настоящее изобретение позволяет успешно производить лечение пациентов, имеющих большую вероятность ответа на терапию, состоящую во введении терапевтических агентов, то есть анти-FOLR1 антител или анти-FOLR1 иммуноконъюгатов пациентам, у которых определяется повышенный уровень экспрессии FOLR1.

Настоящее изобретение представляет способ идентификации субъекта, предрасположенного к положительной реакции на таргетную против рецептора фолата 1 (FOLR1-таргетную) антираковую терапию, причем способ включает обнаружение экспрессии FOLR1 в образце ткани субъекта.

В одном воплощении изобретения степень и равномерность экспрессии FOLR1 определяется с помощью способов иммуногистохимического (ИГХ) анализа, проточной цитометрии или гибридизации нуклеиновых кислот. В другом варианте уровень экспрессии FOLR1 определяется с помощью иммуногистохимического анализа.

Неограничивающие примеры ИГХ включают способы ИГХ, в которых различаются различные уровни FOLR1 и калиброванные ИГХ способы, как описано в данном документе. Экспрессия FOLR1 может быть оценена посредством соответствующих систем, в том числе, но не ограничиваясь ими, посредством способов оценки, описанных в данном документе. Например, экспрессия FOLR1 может быть оценена посредством калиброванного ИГХ способа, который включает в себя диапазон интенсивности окрашивания 0, 1, 2, 3 и 3+, где 0 означает самую низкую интенсивность окрашивания и 3+ - самую высокую интенсивность. В соответствии с другим или дополнительным вариантом, экспрессия FOLR1 может быть оценена посредством калиброванного ИГХ способа, в котором исследуется однородность окрашивания, колеблющаяся от фокальной (<25% окрашенных клеток) до неоднородной (25-75% окрашенных клеток) и однородной (>75% окрашенных клеток), где фокальное окрашивание является наименее равномерным, а однородное - наиболее равномерным.

В еще одном варианте воплощения экспрессия FOLR1 в образце (например, образце опухолевой ткани) измеряется и сравнивается с одним или более референсными образцами и производится специфическая оценка соответствия степени и равномерности экспрессии FOLR1 в образце опухолевой ткани

субъекта, ксенотрансплантата опухоли или клеточной линии по сравнению с одним или более референсными образцами. В различных примерах экспрессия FOLR1 при однородном окрашивании образца ткани или клеточного образца с уровнями интенсивности окрашивания FOLR1, равными 1, 2, 3 или 3+, считается увеличенной; экспрессия FOLR1 также считается увеличенной при интенсивности FOLR1 окрашивания образца ткани или клеточного образца с уровнем 3 при неоднородном или фокальном характере окрашивания. В другом варианте воплощения экспрессия FOLR1 в образце измеряется и сравнивается с одним или более референсными образцами для определения сопоставимого уровня окрашивания. В одном варианте воплощения используется референсный образец с предварительной ИГХ оценкой и/или предварительно установленным количеством антигена на клетку или числом САК (связанных антител на клетку), таким образом, количество антигена или САК для образца ткани может быть определено путем сравнения.

В одном варианте воплощения экспрессия FOLR1 в образце (например, образце опухолевой ткани) измеряется и сравнивается с одним или более контрольными образцами и производится специфическая оценка соответствия степени и равномерности экспрессии FOLR1 в образце опухолевой ткани субъекта, ксенотрансплантата опухоли или клеточной линии по сравнению с одним или более контрольными образцами. В одном варианте воплощения экспрессия FOLR1 в образце сравнивается с образцом для отрицательного контроля, который демонстрирует отсутствие или низкий уровень экспрессии FOLR1. В другом варианте воплощения экспрессия FOLR1 в образце сравнивается с образцом для положительного контроля, обладающего повышенной экспрессией FOLR1 (уровень 1, 2, 3 или 3+). В некоторых вариантах воплощения контрольные образцы включают, но не ограничиваются ими, клеточные образцы Namalwa, SW2, SW620, T47D, IGROV-1, 300,19 FR1, HeLa или KB. В конкретных вариантах воплощения контрольные образцы включают в себя клетки или клеточные конгломераты из клеток, трансфицированных рецепторами фолиевой кислоты (например, 300.19 FR1).

В одном варианте воплощения FOLR1-таргетным антираковым терапевтическим веществом является FOLR1 иммуноконъюгат. В одном варианте воплощения иммуноконъюгат включает анти-FOLR1 антитело, линкер и цитотоксин.

В другом варианте воплощения анти-FOLR1 антитело представляет собой huMOV19. В другом варианте воплощения линкер выбирается из группы, состоящей из расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера и линкера на основе дикарбоновой кислоты. В другом варианте воплощения линкер выбран из группы, включающей: N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP) или N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)-2-сульфопентаноат (сульфо-SPP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB) или N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), N-сукцинимидил 4-(малеимидометил) циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинимидил 4-(малеимидометил) циклогексанкарбоксилат (сульфо-SMCC), N-сукцинимидил-4-(иодоацетил)-аминобензоат (SIAB) и N-сукцинимидил-[(N-малеимидопропионамидо)тетраэтиленгликольный] эстер (NHS-PEG4-малеимид). В другом варианте воплощения линкер представляет собой N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB). В другом варианте осуществления изобретения цитотоксический агент выбран из группы, состоящей из майтанзиноида, аналога майтанзиноида, бензодиазепина, таксоида, CC-1065, аналога CC-1065, дуокармицина, аналога дуокармицина, калихеамицина, доластатина, аналога доластатина, ауристатина, производного томаимидина и производного лептомицина или этих агентов в форме пролекарства. В другом варианте воплощения цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид. В другом варианте воплощения цитотоксическим агентом является N(2')-деацетил-N-(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтансин или N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин. В другом варианте воплощения цитотоксический агент представляет собой N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин (DM4). В еще одном варианте воплощения иммуноконъюгат включает антитело HUMOV19, сульфид-SPDB и DM4 (IMGN853).

Изобретение также относится к способу идентификации рака, как с вероятностью реагирующего на анти-FOLR1 антитело или анти-FOLR1 иммуноконъюгат, который включает: (а) приведение биологического образца, содержащего клетки указанного рака, в контакт с агентом, связывающим FOLR1 белок на поверхности клетки; (б) определение связывания указанного агента, который связывается с FOLR1 белком на клеточной поверхности биологического образца, указанного на стадии (а) с использованием способа обнаружения, различающего интенсивность и однородность окрашивания; и (в) оценку связывания, указанного на стадии (б), причем оценка интенсивности окрашивания FOLR1, составляющая 2 или более в по меньшей мере 25% клеток в образце опухоли от субъекта с использованием способа обнаружения, идентифицирует указанный рак как вероятно реагирующий на анти-FOLR1 антитело или анти-FOLR1 иммуноконъюгат. В некоторых вариантах воплощения рак представляет собой рак яичников или рак легких.

Изобретение также относится к способу идентификации опухоли, чувствительной к терапии анти-FOLR1 антителами или анти-FOLR1 иммуноконъюгатами, причем указанный способ включает: (а) измерение уровня экспрессии FOLR1 в образце опухолевой ткани, полученной из указанной опухоли, где указанное измерение включает использование способа обнаружения, различающего интенсивность или равномерность окрашивания в образце опухолевой ткани, экспрессирующей FOLR1 по сравнению с интенсивностью или равномерностью окрашивания одного или нескольких референсных образцов; (б) оп-

ределение степени интенсивности окрашивания FOLR1 для указанного образца опухолевой ткани; и (в) сравнение интенсивности окрашивания FOLR1, определенной на этапе (б) с относительным значением, которое определяется путем измерения экспрессии белка FOLR1 в, по меньшей мере, одном контрольном образце, где указанный контрольный образец представляет собой ткань, клетки или клеточный конгломерат, который не чувствителен к терапии анти-FOLR1 антителами или анти-FOLR1 иммуноконъюгатами, и в котором интенсивность окрашивания FOLR1 указанного образца определена на этапе (б), и является более высокой, чем указанное относительное значение, идентифицирует данную опухоль как чувствительную к терапии анти-FOLR1 антителами или анти-FOLR1 иммуноконъюгатами. В некоторых вариантах воплощения обнаружение производится вручную или с помощью автоматизированной системы. В одном варианте воплощения способом обнаружения является ИГХ. В другом варианте воплощения используется откалиброванный способ ИГХ, при котором возможно различать различные уровни экспрессии FOLR1.

Изобретение также относится к способу выявления экспрессии FOLR1 на клеточной поверхности раковых клеток образца опухолевой ткани индивидуума, где указанный способ включает: (а) получение образца опухолевой ткани, где образец клеток указанного рака зафиксирован в формалине и залит парафином; (б) контактирование указанного образца с антителом, которое специфически связывается с FOLR1 белком на поверхности клетки; (в) измерение степени связывания указанного в (б) антитела с указанным FOLR1 белком на поверхности клетки в указанном образце опухолевой ткани с помощью способа обнаружения, который может различать интенсивность или равномерность окрашивания при экспрессии FOLR1 в опухолевом образце по сравнению с интенсивностью или равномерностью окрашивания одного или нескольких референсных образцов; и (г) назначение уровня экспрессии FOLR1 указанному FOLR1 после сравнения уровня интенсивности или равномерности окрашивания клеточной поверхности FOLR1 в указанном образце опухолевой ткани с одним или более референсными образцами.

Изобретение также относится к способу идентификации субъекта, страдающего от рака легких или рака яичников, способного ответить на режим терапии низкими дозами анти-FOLR1 антител или анти-FOLR1 иммуноконъюгата, включающий: (а) контактирование биологического образца, включающего в себя клетки указанного рака яичников или легких с агентом, который связывается с FOLR1 белком на клеточной поверхности; (б) определение степени связывания указанного агента для указанного в (а) биологического образца; (в) назначения уровня связывания, указанного на стадии (б), при котором указанный уровень присваивается на основании сравнения с одним или несколькими референсными образцами; и (г) сравнение указанного на стадии (в) уровня с уровнем референсного образца ткани или клеток, при котором оценка для упомянутого уровня FOLR1 при раке яичников или легких больше оценки для нормального или пониженного уровня экспрессии FOLR1 референсного образца или оценка для упомянутого уровня FOLR1 при раке яичников или легких равняется или больше оценки для высокого уровня экспрессии FOLR1 референсного образца, что идентифицирует указанный рак яичников или легких, как способный ответить на низкие дозы анти-FOLR1 антител или анти-FOLR1 иммуноконъюгата. В некоторых вариантах воплощения способ дополнительно включает введение терапевтически эффективного количества гуманизированного анти-FOLR1 антитела или анти-FOLR1 иммуноконъюгата указанному субъекту.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Ручной способ окрашивания. Обнаружение экспрессии FOLR1 с помощью anti-FOLR1 антител в трансфицированных клетках. Клетки серии 300.19 были трансфицированы полинуклеотидом, кодирующим человеческий FOLR1. Экспрессия белка FOLR1 обнаруживалась с применением мышиного антитела BN3.2. Smith AE et al, Hybridoma (Larchmt). 2007 Oct;26(5):281-8.

Фиг. 2. Ручной способ окрашивания. Используя anti-FOLR1 антитела можно выделить различные уровни экспрессии FOLR1. Антитело BN3.2 использовалось для обнаружения экспрессии FOLR1 в различных клетках ксенотрансплантата. Предел обнаружения для антитела BN3.2 составляет приблизительно 4000 антител, связанных с клеткой (САК).

Фиг. 3. Ручной способ окрашивания. Используя anti-FOLR1 антитела можно выделить различные уровни экспрессии FOLR1 в образцах тканей. BN3.2 использовалось для обнаружения экспрессии FOLR1 в опухолях яичников (А) и опухолях не мелкоклеточного рака легких (В).

Фиг. 4. Ручной способ окрашивания. Равномерная экспрессия FOLR1 в опухолях НМРЛ и рака яичников. Экспрессия FOLR1 была высокой во многих образцах карциномы яичников, а также аденокарциномы легких и бронхиолоальвеолярной карциномы. Большинство образцов карциномы яичников показали самые высокие уровни интенсивности окрашивания серозных или эндометриоидных клеток. При исследовании НМРЛ самые высокие значения САК были обнаружены в образцах бронхиолоальвеолярной карциномы и папиллярной аденокарциномы.

Фиг. 5. Ручной способ окрашивания. Экспрессия FOLR1, как правило, ограничивается мембраной клеток НМРЛ. Микроскопическое исследование с высоким разрешением показало, что окрашивание FOLR1 опухоли НМРЛ было ограничено преимущественно клеточными мембранами.

Фиг. 6. Ручной способ окрашивания. Экспрессия FOLR1, как правило, ограничивается мембраной клеток рака яичников. Микроскопическое исследование с высоким разрешением показало, что окраши-

вание FOLR1 опухоли рака яичников было ограничено преимущественно клеточными мембранами.

Фиг. 7. *In vivo* эффективность huMov19-таргетных конъюгатов в KB модели ксенотрансплантата. FOLR1-таргетированный расщепляемый конъюгат huMov19-SPDB-DM4 (B) по сравнению с He-FOLR1-таргетированным huC242-SPDB-DM4 (D), и нерасщепляемым конъюгатом huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C) по сравнению с нетаргетированным huC242-PEG4Mal-DM4 (E) были протестированы посредством установленной модели ксенотрансплантата KB клеток, подкожно имплантированных мышам с ТКИН (тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью). Таргетирование huMov19 по FOLR1 привело к значительному снижению среднего объема опухоли.

Фиг. 8. Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 терапии OVCAR-3 ксенотрансплантата карциномы яичников человека. Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ.

Фиг. 9. Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 терапии IGROV-1 ксенотрансплантата карциномы яичников человека. Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ.

Фиг. 10. Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 терапии OV-90 ксенотрансплантата карциномы яичников человека. Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ.

Фиг. 11. Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 терапии SKOV-3 ксенотрансплантата карциномы яичников человека. Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ.

Фиг. 12. Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 терапии KB ксенотрансплантата аденокарциномы шейки матки человека. Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,0, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ.

Фиг. 13. Автоматизированные способы окрашивания: типичные фотографии и гистограммы, показывающие экспрессию FOLR1 в клеточных линиях, определенную с помощью ИГХ и проточной цитометрии. Клетки линий SW620, T47D, Igrov-1, 300.19/FR1, HeLa и KB оценивались по интенсивности и равномерности окрашивания FOLR1. Степень и равномерность окрашивания клеток SW630 и IGROV-1 были оценены, как 1-3 неоднородная, T47D как 1-2 неоднородная, HeLa как 2-3 неоднородная, в то время как 300.19/FR1 и KB были оценены, как 3 однородная.

Фиг. 14. Автоматизированные способы окрашивания: типичное окрашивание FOLR1 серозного рака яичников. Образцы показали степень и равномерность окрашивания такие, как 3 однородная, 2-3 однородная, 2 однородная и 2 неоднородная, установленные с помощью ИГХ на срезах ткани серозного рака яичников.

Фиг. 15. Автоматизированные способы окрашивания: типичное окрашивание FOLR1 эндометриоидного рака яичников. Образцы показали степень и равномерность окрашивания такие, как 3 однородная, 2-3 однородная, 3 фокальная и 1-2 неоднородная, установленные с помощью ИГХ на срезах ткани эндометриоидного рака.

Фиг. 16. Автоматизированные способы окрашивания: типичное окрашивание FOLR1 HMPJ подтипа аденокарциномы (за исключением бронхиолоальвеолярной карциномы). Образцы показали степень и равномерность окрашивания, такие как 3 однородная, 2-3 однородная, 2 неоднородная, 2 однородная и 1-2 неоднородная, установленные с помощью ИГХ на срезах ткани немелкоклеточного рака легкого, подтипа аденокарциномы.

Фиг. 17. Автоматизированные способы окрашивания: типичное окрашивание FOLR1 аденокарциномы эндометрия. Образцы показали степень и равномерность окрашивания такие, как 3 неоднородная, 2 неоднородная и 1 неоднородная, установленные с помощью ИГХ на срезах ткани аденокарциномы эндометрия.

Фиг. 18. Автоматизированные способы окрашивания: типичное окрашивание FOLR1 почечно-клеточной карциномы. Образцы показали степень и равномерность окрашивания такие, как 2 однородная, 2 неоднородная и 1 неоднородная, установленные с помощью ИГХ на срезах ткани почечно-клеточного рака.

Фиг. 19. Цитотоксическая *in vitro* активность IMGN853. Пять FOLR1-положительных клеточных линий (KB, IGROV-1, JEG-3, SKOV-3 и OVCAR-3) и две FOLR1-отрицательные клеточные линии (Nalmaw и SW2) анализировались на их чувствительность к цитотоксическим эффектам IMGN853. Клетки подвергали воздействию IMGN853 (сплошная линия) или IMGN853 плюс 0,5 мкМ неконъюгированного huMov19 (M9346A) (пунктирная линия) в течение 5 дней, а выживаемость клеток была определена с помощью анализа на основе WST-8. Показаны репрезентативные данные. Процент выживших клеток нанесли на график по сравнению с десятичным логарифмом концентрации IMGN853.

Фиг. 20. Чувствительность FOLR1-положительных клеточных линий к IMG853 против уровня экспрессии FOLR1. Эффективность и специфичность IMG853 была проанализирована на FOLR1-положительных клеточных линиях с широким спектром экспрессии FOLR1. Клеточные линии, инкубированные с IMG853 и KB, Igrov-1 и Jeg-3 показали специфическую чувствительность к IMG853, тогда как неконъюгированные huMov19 (M9346A) показали снижение активности конъюгата. Skov-3 и Ovcар-3 не были чувствительны к IMG853 и неконъюгированные huMov19 (M9346A) не изменили активность конъюгата.

Фиг. 21. Автоматизированные способы окрашивания: модели эффективности ксенотрансплантата карциномы яичников, окрашенные для FOLR1. Образцы показали степень и равномерность окрашивания такие, как 1-3 неоднородная (Ovcар 3), 1-3 однородная (Igrov 1), 1-2 неоднородная (Ov 90) и отрицательный результат (SKOV 3), установленные с помощью ИГХ на срезах ткани ксенотрансплантатов рака яичников.

Фиг. 22. Автоматизированные способы окрашивания: мышинные модели ксенотрансплантатов. Показаны образцы окрашивания для FOLR1 ксенотрансплантатов клеточных линий HMP1 (А), карциномы эндометрия (В) и карциномы шейки матки (С). Образцы HMP1 показали степень и равномерность окрашивания такие, как 2-3 однородная или 2 однородная, карциномы эндометрия 2 неоднородная/3 фокальная, рака шейки матки 3 однородная.

Фиг. 23. Руководство по автоматизированному окрашиванию контрольных образцов тканей. Окрашенные образцы, используемые для отрицательного (пищевод 0) и положительного контроля (слюнная железа 1-2 неоднородная, легкие 2 однородная, поджелудочная железа 3 однородная), показаны подготовленными для автоматизированной ИГХ.

Фиг. 24. Руководство по автоматизированному окрашиванию опухолевых тканей. Типичные образцы окрашивания уровня 3, уровня 2 и уровня 1 показаны на контрольной ткани подготовленными для автоматизированной ИГХ.

Фиг. 25. Руководство по автоматизированному окрашиванию опухолевых тканей. Типичные образцы окрашивания уровня 3, уровня 2 и уровня 1/отрицательного показаны на контрольной ткани подготовленными для автоматизированной ИГХ.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам повышения эффективности или вероятности ответа на лечение рака, характеризующегося избыточной экспрессией FOLR1. Настоящее изобретение основано на открытии существования динамического диапазона экспрессии FOLR1 в опухолевой ткани и увеличения чувствительности опухоли с повышенным уровнем экспрессии FOLR1 к терапии анти-FOLR1 антителами или анти-FOLR1 иммуноконъюгатами. Нами также было обнаружено различия между автоматизированными и ручными способами анализа чувствительности и обнаружения динамических диапазонов. Дополнительно предусмотрены наборы, включающие один или более реагентов, используемых для практического воплощения способов по изобретению.

I. Определения

Для облегчения понимания сути настоящего изобретения, ниже определяется ряд терминов и выражений.

Термин "рецептор фолиевой кислоты 1 человека" или "FOLR1", используемый в данном документе, относится к любому нативному человеческому FOLR1, если не указано иное. Термин "FOLR1" относится к "полноразмерным" необработанным FOLR1, а также к любой форме FOLR1, полученной в результате процессинга внутри клетки. Термин также включает естественно встречающиеся варианты FOLR1, например сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы. Полипептиды FOLR1, описанные в данном документе, могут быть выделены из различных источников, например из человеческих тканей различных типов, или из другого источника, или получены с помощью рекомбинантных или синтетических способов. Примеры последовательностей FOLR1 включают, но не ограничиваются номерами NCBI P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1 и NP_057936.1, и указаны в SEQ ID №: 1 и 2.

Термин "повышенная экспрессия" FOLR1 относится к образцу, показывающему повышенные уровни экспрессии FOLR1. В одном примере экспрессия FOLR1 измеряется с помощью ИГХ и дается оценка интенсивности окрашивания или оценка равномерности окрашивания образца по сравнению с контрольной группой (например, откалиброванных образцов), путем использования определенных значений (например, тестовому образцу присваивается значение интенсивности 3, если интенсивность сравнима с уровнем 3 калиброванного образца или тестовому образцу присваивается значение интенсивности 2, если интенсивность сравнима с уровнем 2 калиброванного образца). Например, показатель 1, 2, 3 и 3+ или выше, определенный с помощью иммуногистохимии показывает повышенную экспрессию FOLR1. Равномерность окрашивания, которая может быть неоднородной или однородной, также свидетельствует о повышенной экспрессии FOLR1. Интенсивность окрашивания и оценки однородности окрашивания могут быть использованы отдельно или в комбинации (например, 2 однородная, 2 неоднородная, 3 однородная, 3 неоднородная и т.п.). В другом примере повышение экспрессии FOLR1 может быть определено путем обнаружения его увеличения по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 5 раз по сравнению с контрольными значениями (например, уровень экспрессии в ткани

или клетке у субъекта без рака или имеющего рак, не вызывающий повышение значений FOLR1).

Термин "референтный образец" может быть использован для корреляции и сравнения результатов, полученных от тестируемого образца при помощи способов, описанных в изобретении. Референтными образцами могут быть клетки (например, клеточные линии, конгломераты клеток) или ткани. Уровни FOLR1 в "референтном образце" могут показывать абсолютные или относительные значения, находиться внутри диапазона значений, принимать минимальное и/или максимальное значение, среднее значение и/или медианное значение FOLR1. Способы диагностики по изобретению включают сравнение уровней экспрессии FOLR1 в тестируемом образце с "референтными значениями". В некоторых вариантах воплощения референтное значение соответствует уровню экспрессии FOLR1 в референтном образце. Референтное значение может быть заранее заданным значением, а также может быть определено из референтных образцов (например, контрольных биологических образцов), исследуемых параллельно с тестовыми образцами. Референтное значение может быть одним пороговым значением, например, медианным или средним, или диапазоном значений, таким, как доверительный интервал. Референтные значения могут быть установлены для различных подгрупп лиц, таких, как лица, предрасположенные к раку, лица, имеющие рак на ранних или поздних стадиях, лица мужского и/или женского пола либо лица во время прохождения антираковой терапии. Примеры нормальных референтных образцов или значений, и положительных референтных образцов или значений, описаны в данном документе.

В некоторых вариантах воплощения референтный образец представляет собой образец здоровой ткани, в частности, соответствующей ткани, которая не поражена раковой опухолью. Этот тип референтных образцов называются образцами для отрицательного контроля. В других вариантах воплощения референтный образец представляет собой образец из опухолевой ткани, которая экспрессирует FOLR1. Этот тип референтных образцов называются образцами для положительного контроля. Образцы для положительного контроля также могут быть использованы в качестве индикатора сравнения для проверки однородности (неоднородная против однородной) и/или степени (1, 2, 3, 3+) интенсивности окрашивания, которая коррелирует с уровнем экспрессии FOLR1. Образцы для сравнительного положительного контроля также называют калиброванными референтными образцами, которые используются для определения динамического диапазона интенсивности или однородности окрашивания. Как показано в примерах 1-9, референтные образцы, не экспрессирующие FOLR1 включают в себя человеческие ткани пищевода; образцы с низким уровнем экспрессии FOLR1 включают ткани слюнной железы (в частности, промежуточных протоков) и легких (в частности дыхательного эпителия), образцы тканей с высоким уровнем экспрессии FOLR1 включают ткани поджелудочной железы (в частности, клетки протоков). Клеточные линии с низкой экспрессией включают, но не ограничиваются OVCAR3 и T47D, умеренной экспрессией включают, но не ограничиваются ими, SW620, IGROV-1, JEG3 и высокой экспрессией включают, но не ограничиваются ими, KB и IGROV1. Особенно желательными образцами для положительного контроля высокой экспрессии FOLR1 являются линии клеток, постоянно или временно трансфицированных фолатным рецептором 1 (например, 300.19/FR1). Соответствующие положительные и отрицательные контрольные уровни FOLR1 для конкретного вида рака могут быть определены путем измерения уровней FOLR1 у одного или нескольких соответствующих субъектов, и такие контрольные уровни могут быть привязаны к конкретным популяциям пациентов (например, контрольный уровень может соответствовать возрастной группе, так что сравнение может быть сделано между уровнями FOLR1 образцов, полученных от субъектов определенного возраста, и контрольными уровнями для конкретного типа заболевания, фенотипа или отсутствия таковых в определенной возрастной группе. Такие контрольные уровни могут быть привязаны к конкретным способам, используемым для измерения уровня FOLR1 в биологических образцах (например, иммунологическим и др. анализам), уровни FOLR1 может отличаться из-за специфической методики, на которой эти измерения базируются.

Термин "первичное антитело" относится к антителу, которое специфически связывается с антигеном белка-мишени в образце ткани. Первичное антитело, как правило, является первым антителом, используемым в процедуре иммуногистохимического (ИГХ) анализа. В одном варианте воплощения первичным антителом является единственное антитело, используемое в процедуре ИГХ. Термин "вторичное антитело" относится к антителу, которое специфически связывается с первичным антителом, образуя мостик между первичным антителом и последующим реагентом, если таковые имеются. Первичное антитело, как правило, является вторым антителом, используемым в процедуре иммуногистохимического анализа.

"Образец" или "биологический образец" по настоящему изобретению имеет биологическое происхождение в конкретных вариантах воплощения, полученный из эукариотических организмов. В предпочтительных вариантах воплощения образец представляет собой образец ткани человека, но в практике настоящего изобретения также могут быть использованы образцы ткани животного. Неограничивающие источники образцов для использования в настоящем изобретении включают, например, плотные ткани, аспираты, полученные при биопсии, асцитическую жидкость, жидкостные экстракты, кровь, плазму, сыроворотку, спинномозговую жидкость, лимфоидную жидкость, внешние участки кожи, дыхательного, кишечного и мочеполового трактов, слезы, слюну, молоко, опухоли, органы, клеточные культуры и/или компоненты клеточной культуры.

Настоящее изобретение особенно эффективно для образцов раковой ткани, которые обычно включают образцы плотных тканей, или различных жидкостей организма, таких как асцитическая жидкость, где количество доступных материалов является небольшим. Данный способ может быть использован для изучения аспектов экспрессии FOLR1 или состояния образца, в том числе, но не ограничиваясь этим, сравнения различных типов клеток или тканей, сравнения различных стадий развития и обнаружения или определения присутствия и/или типа заболевания или аномалии.

Для целей данного изобретения, понятие "срез" образца ткани относится к единичной части или определенному количеству образца ткани, например, тонкому слою ткани или клеток, вырезанных из образца ткани. Следует понимать, что несколько срезов тканевых образцов могут быть получены и подвержены анализу в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых случаях выбранная часть или срез ткани состоит из однородной популяции клеток. В других случаях выбранная часть включает участок ткани, например, в качестве неограничивающего примера просвет. Выбранная часть может состоять из, например, одной клетки или двух клеток, или может представлять много тысяч клеток. В большинстве случаев процесс сбора клеток является важным, и в то время как изобретение описано для использования с целью детекции клеточных компонентов, способ также может быть использован для обнаружения не-клеточных компонентов организма (например, в качестве неограничивающего примера растворимых в крови компонентов).

Под "коррелированием" или "корреляцией" подразумевается сравнение, в любом случае, производительности и/или результатов первого анализа с производительностью и/или результатами второго анализа. Например, можно использовать результаты первого анализа при проведении второго анализа и/или можно использовать результаты первого анализа, чтобы определить, стоит ли проводить второй анализ и/или можно сравнивать результаты первого анализа с результатами второго анализа. В одном варианте воплощения повышенная экспрессия FOLR1 коррелирует с увеличением вероятности эффективности FOLR1-таргетированной противораковой терапии.

Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеуказанного через, по меньшей мере, один сайт распознавания антигена внутри вариативной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "антитело" включает в себя интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты), одноцепочечные Fv (ScFv) мутанты, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, полученные из, по меньшей мере, двух интактных антител, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, составные белки, включающие часть антитела, определяющую антиген и любые другие модифицированные молекулы иммуноглобулина, включающие сайт распознавания антигена при условии, что антитела обладают ожидаемой биологической активностью. Антитело может принадлежать любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), базирующихся на идентичности их тяжелых цепей константных доменов, называемых альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Различные классы иммуноглобулинов обладают различными и хорошо известными структурными субъединицами и трехмерными конфигурациями. Антитела могут быть открытыми или конъюгированными с другими молекулами, такими как токсины, радиоизотопы и тому подобные.

"Блокирующее" антитело или "антитело-антагонист" представляет собой антитело, которое ингибирует или уменьшает биологическую активность антигена, с которым оно связывается, например, FOLR1. В определенном варианте воплощения блокирующие антитела или антитела-антагонисты в значительной степени или полностью ингибируют биологическую активность антигена. Ожидаемая биологическая активность снижается на 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или даже 100%.

Термин "анти-FOLR1 антитело" или "антитело, которое связывается FOLR1" относится к антителу, которое способно связывать FOLR1 с достаточной аффинностью. Данное антитело является эффективным в качестве диагностического и/или терапевтического средства для прицельного воздействия на FOLR1. Степень связывания анти-FOLR1 антитела с неродственным, не FOLR1 белком составляет менее, чем приблизительно 10% от степени связывания антитела с FOLR1, например, измеренной с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах воплощения антитело, которое связывается с FOLR1 имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ. Примеры анти-FOLR1 антител известны в данной области и описаны в патенте США № 2012/0009181, включенном в данный документ посредством ссылки.

Термин "фрагмент антитела" обозначает часть интактного антитела и относится к антиген определяющим вариативным регионам интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты, линейные антитела, одноцепочечные антитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

"Моноклональное антитело" относится к однородной популяции антител, участвующих в высоко-специфическом распознавании и связывании с одной антигенной детерминантой или эпитопом. Этим они отличаются от поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направ-

ленные против различных антигенных детерминант. Термин "моноклональное антитело" включает интактные и полноразмерные моноклональные антитела, а также фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (ScFv), мутанты, составные белки, включающие части антител и любые другие модифицированные молекулы иммуноглобулина, включающие сайт распознавания антигена. Кроме того, понятие "моноклональное антитело" относится к антителам, полученным любым количеством способов, включая, но не ограничиваясь ими, использование гибридом, селекции фагов, рекомбинантной экспрессии и трансгенных животных.

Термины "эпитоп" или "антигенная детерминанта" используются взаимозаменяемо и относятся к той части антигена, который может распознаваться и специфически связывается с конкретным антителом. Если антиген представляет собой полипептид, эпитопы могут быть сформированы из смежных и несмежных аминокислот сопоставлением при третичном складывании белка. Эпитопы, формируемые из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при денатурации белка, тогда как эпитопы, образованные третичным складыванием обычно при денатурации белка теряются. Эпитоп обычно включает в себя по меньшей мере три, а чаще, по меньшей мере, 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

"Аффинность связывания" обычно относится к интенсивности суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, при использовании в данном документе, понятие "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X относительно своего партнера Y обычно может быть представлена с помощью константы диссоциации (Kd). Аффинность может быть измерена общими способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе. Низкоаффинные антитела обычно связываются с антигеном медленно и, как правило, легко диссоциируют, тогда как антитела с высокой аффинностью обычно связываются с антигеном быстрее и, как правило, остаются связанными дольше. Различные способы измерения аффинности связывания хорошо известны в данной области техники, любой из них может быть использован для целей настоящего изобретения. Конкретные демонстративные варианты воплощения описаны далее.

"Или лучше" при использовании в данном документе относится к обозначению аффинности связывания и относится к сильной связи между молекулой и ее партнером по связыванию. "Или лучше" при использовании в данном описании относится к сильной связи, представленной меньшим численным значением Kd. Например, в случае, когда антитело обладает сродством к антигену "0,6 нМ или лучше", сродство антитела к антигену составляет <0,6 нМ, т.е. 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ и т.д., или любое значение менее 0,6 нМ.

Фраза "по существу аналогичный" или "по существу такой же", при использовании в данном документе, обозначает достаточно высокую степень сходства между двумя числовыми значениями (обычно одно связано с антителом по изобретению, другое связано с референсным антителом/антителом для сравнения), так что специалист в данной области техники должен учитывать разницу между двумя значениями, которая может быть малой или вообще не нести биологической и/или статистической значимости в контексте измерения указанных значений биологических характеристик (например, значения Kd). Разница между двумя указанными значениями составляет менее, чем приблизительно 50%, менее, чем приблизительно 40%, менее, чем приблизительно 30%, менее, чем приблизительно 20% или менее чем приблизительно 10% в зависимости от значения для референсного антитела/антитела для сравнения.

Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетки или композиции, которые являются "выделенными", представляют собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетки или композиции, находящиеся в форме, которая не встречается в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что далее они существуют в другой форме по сравнению с той, в которой они встречаются в природе. В некоторых вариантах воплощения выделенные антитело, полинуклеотид, вектор, клетки или композиции являются, по существу, чистыми.

Используемый в данном документе термин "по существу чистый" относится к материалу, который по меньшей мере чистый на 50% (то есть без загрязнений), по меньшей мере чистый на 90%, по меньшей мере чистый на 95%, по меньшей мере чистый на 98% или по меньшей мере чистый на 99%.

Термин "иммуноконъюгат" или "конъюгат", используемый в данном документе, относится к соединению или его производному, которое связано с агентом, связывающимся с клеткой (например, анти-FOLR1 антителу или его фрагменту) и определяется общей формулой C-L-A, где C = цитотоксин, L = линкер, и A = связывающийся с клеткой агент или анти-FOLR1 антитело или фрагмент антитела. Иммуноконъюгаты также могут быть определены общей формулой в обратном порядке: A-L-C.

"Линкер" означает любую химическую группу, которая способна связывать соединение, как правило, лекарственное средство, такое как майтанзиноид, с агентом, связывающимся с клеткой, таким как анти-FOLR1 антитело или его фрагмент, стабильным ковалентным способом. Линкеры могут быть чувствительными или быть практически устойчивыми к кислотно-индуцированному расщеплению, расщеплению, индуцированному светом, расщеплению, индуцированному пептидазой, расщеплению, индуци-

рованному эстеразой и расщеплению дисульфидной связи, в условиях, при которых соединение или антитело остается активным. Подходящие линкеры хорошо известны в данной области техники и включают, например, дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотнo-лабильные группы, фотоллабильные группы, пептидазо-лабильные группы и эстеразо-лабильные группы. Линкеры также включают заряженные линкеры и их гидрофильные формы, известные в данной области техники, как описано выше.

Термины "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, в котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких, плоскоклеточный рак легкого, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рака молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени и различные типы рака головы и шеи.

Термины "опухоль" и "новообразование" относятся к любой массе ткани, которая в результате чрезмерного клеточного роста или пролиферации может быть как доброкачественной (нераковой), так и злокачественной (раковой), включая предраковые поражения тканей.

Термины "раковая клетка", "клетка опухоли" и их грамматические эквиваленты относятся к общей популяции клеток, полученных из опухоли или предраковых поражений, в том числе и неонкогенных клеток, которые составляют большую часть популяции опухолевых клеток, и онкогенных стволовых клеток (раковых стволовых клеток). Термин "клетка опухоли", при использовании в данном документе, будет изменен на термин "неонкогенный", когда речь идет лишь об опухолевых клетках, не способных к обновлению и дифференцированию, чтобы отличить эти опухолевые клетки от раковых стволовых клеток.

Термин "субъект" относится к любому животному (например, млекопитающему), включая, но не ограничиваясь ими, людей, приматов, кроме человека, грызунов и т.п., которое должно получить конкретное лечение. Как правило, термин "субъект" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к субъекту-человеку.

Назначение "в сочетании с" одного или более дополнительных терапевтических агентов включает в себя одновременное (совместное) и последовательное введение в любом порядке.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в форме, обеспечивающей биологическую активность действующего вещества для обеспечения его эффективности, и которая не включает дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому должна быть введена композиция. Такая композиция может быть стерильной.

"Эффективное количество" антитела, как описано в данном документе, означает количество, достаточное для осуществления специфически заявленного предназначения. "Эффективное количество" может быть определено эмпирически и рутинным способом относительно заявленного предназначения.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела или другого лекарственного средства для "лечения" заболевания или расстройства у субъекта или млекопитающего. В случае рака, терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшить число раковых клеток; уменьшить размер опухоли; ингибировать (т.е. замедлить до некоторой степени и, в определенном варианте воплощения, остановить) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. замедлить до некоторой степени и, в определенном варианте воплощения, остановить) развитие метастазов опухоли; ингибировать, в некоторой степени, рост опухоли и/или облегчить до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком. См. далее определение понятия "лечение". В зависимости от способности препарата соответствующим образом предотвращать рост и/или уничтожать существующие раковые клетки, он может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. В некоторых вариантах воплощения определение повышенных уровней

FOLR1 дает возможность назначать пониженную дозу FOLR1-таргетной терапии для достижения такого же терапевтического эффекта, какой был бы при назначении более высоких доз. "Количество, эффективное для профилактики" относится к эффективному количеству, в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, исходя из того, что профилактическая доза используется до начала заболевания или на его ранней стадии, профилактически эффективное количество будет меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

Термин "благоприятно реагировать" обычно относится к вызыванию у субъекта благоприятного состояния. Что касается лечения рака, термин относится к обеспечению у субъекта терапевтического эффекта. Положительный терапевтический эффект при лечении рака может быть измерен несколькими способами (см. W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). Для оценки терапевтической эффективности антираковой терапии могут быть использованы, например, оценка ингибирования роста опухоли, экспрессии молекулярных маркеров, экспрессии сывороточных маркеров и молекулярные способы визуализации. В отношении ингибирования роста опухоли, согласно стандартам NCI, значение соотношения T/C

<42% является минимальным уровнем противоопухолевой активности. Т/С <10% считается высоким уровнем противоопухолевой активности, при том, что формула определения Т/С выглядит, как: $T/C (\%) = \text{Медиана объема опухоли, подвергаемой терапии} / \text{Медиана объема опухоли, используемой для контроля} \times 100$.

Термин "метка", используемый в данном документе, относится к детектируемому соединению или композиции, конъюгированному с антителом непосредственно или опосредованно, таким образом, что образуется "меченое" антитело. Метка может обнаруживаться сама по себе (например, радиоизотопные или флуоресцентные метки) или, в случае ферментной метки, может катализировать химическое изменение субстрата соединения или композиции, которое затем может быть обнаружено.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, используемое для лечения рака, независимо от его механизма действия. Классы химиотерапевтических средств включают, но не ограничиваются ими: алкилирующие агенты, антиметаболиты, растительные алкалоиды, блокирующие митотическое веретено, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизаторы и ингибиторы киназ. Химиотерапевтические средства включают соединения, используемые для "таргетной терапии" и традиционной химиотерапии.

Такие термины как "терапия" или "лечение" или "лечить" или "облегчить состояние" относятся к 1) терапевтическим мерам, позволяющим вылечить, замедлить развитие, уменьшить симптомы и/или остановить прогрессирование диагностированного патологического состояния или расстройства и 2) профилактическим или превентивным мерам, которые предотвращают и/или замедляют развитие возможного патологического состояния или расстройства. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет расстройство; тех, кто склонны к расстройству и тех, у кого расстройства должны быть предотвращены. В некоторых вариантах воплощения субъект считается успешно "вылеченным" от рака в соответствии со способами по настоящему изобретению, если он демонстрирует одно или более из следующего: уменьшение кахексии, увеличение продолжительности жизни, удлинение времени до прогрессирования опухоли, снижение опухолевой массы, снижение опухолевой массы и/или продление отрезка времени до возникновения метастазов опухоли и времени до возникновения рецидива опухоли, ответ опухоли на лечение, полный ответ, частичный ответ, стабилизацию заболевания, устранение прогрессирования заболевания, выживаемость без прогрессирования заболевания (ВБП), общую выживаемость (ОВ); каждый из параметров оценен согласно стандартам, установленным Национальным институтом рака и Администрацией США по пищевым продуктам и лекарственным веществам для утверждения новых лекарств. См. Johnson et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7): 1404-1411.

"Выживаемость без прогрессирования" (ВБП), также называемая "временем до прогрессирования опухоли" (ВДП) указывает продолжительность времени в течение лечения и после него, пока опухоль не растет. Выживаемость без прогрессирования заболевания включает в себя отрезок времени, за который пациенты испытывали полный или частичный ответ на лечение, а также отрезок времени, за который пациенты испытывали стабилизацию заболевания.

"Период ремиссии" (ПР) относится к отрезку времени в течение лечения и после него, на протяжении которого пациент не испытывает признаков заболевания.

"Общая выживаемость" (ОВ) относится к продлению ожидаемой продолжительности жизни по сравнению с лицами или пациентами, не подвергнутыми какому-либо воздействию или лечению.

При использовании в настоящем описании изобретения и формуле изобретения формы единственного числа включают множественные формы, если из контекста явно не следует другое.

Следует понимать, что описанный в настоящем варианте воплощения термин "включающий", в аналогичных вариантах воплощения описывается в терминах "состоящий из" и/или "по существу состоящий из".

Термин "и/или", при использовании в фразе, такой как "А и/или В" в данном описании, включают в себя "А и В", "А или В", "А" и "В". Аналогично, термин "и/или", используемый в фразе типа "А, В и/или В" предназначен для охвата каждого из следующих вариантов: А, В и В; А, В или В; А или В; А или В; В или В; А и В; А и В, В и В; А (отдельно), В (отдельно) и В (отдельно).

II. Биологические образцы

Биологические образцы часто фиксируют с помощью фиксатора. Для этой цели обычно используются альдегидные фиксаторы, такие как формалин (формальдегид) и глутаральдегид. Образцы тканей фиксируются посредством других способов фиксации, таких как погружение в спирт (Battifora и Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095). Используемые образцы также могут быть залиты парафином. В одном варианте воплощения образцы ткани фиксируются в формалине и заливаются парафином (ФФЗП). В другом варианте воплощения блок ФФЗП окрашивается гематоксилином и эозином до выбора одной или более его частей для проведения анализа с целью выбора конкретной зоны (зон) образца ФФЗП. Способы подготовки блоков тканей из этих частей образцов использовались в предыдущих ИГХ исследованиях различных факторов прогноза и/или хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, Abbondanzo et al., Am J Clin Pathol. 1990 May;93(5):698-702; Allred et al., Arch Surg. 1990 Jan; 125(1): 107-13).

Вкратце, все интактные органы или ткани могут быть разрезаны на достаточно мелкие образцы и выдержаны в различных фиксаторах (например, формалин, спирт и т.д.) в течение различных периодов времени, пока ткань не "зафиксируется". Могут быть получены образцы практически любой интактной ткани, хирургически удаленной из организма. Образцы можно разрезать на относительно небольшие фрагменты, которые помещаются в оборудование, обычно используемое в гистопатологических лабораториях. Размер фрагментов образца обычно составляет от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров.

III. Конъюгаты детекторных антител

Настоящее изобретение также относится к антителам против FOLR1, обычно моноклонального типа, которые связаны с, по меньшей мере, одним агентом с образованием конъюгата детекторного антитела. В целях повышения эффективности использования молекул антител в качестве диагностических их связывают обычной или ковалентной связью или образуют комплекс с, по меньшей мере, одной целевой молекулой или фрагментом. Такая молекула или фрагмент может являться, не ограничиваясь этим, по меньшей мере, одной репортерной группой. Репортерная группа определяется как любой фрагмент, который может быть обнаружен с помощью анализа. Неограничивающие примеры репортерных групп, конъюгированных с антителами включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцирующие молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, люминесцентные молекулы, молекулы, проявляющие фотоаффинность, окрашенные частицы и/или лиганды, такие как биотин.

Любой клеточно-связывающий агент (например, антитело или полипептид) с достаточной селективностью, специфичностью или аффинностью может быть использован в качестве основы для детектирования FOLR1 полипептида. Такие свойства агента могут быть оценены посредством общепринятых иммунологических скрининговых способов, известным специалистам в данной области техники. Сайты для связывания с биологически активными молекулами в молекуле антитела, в дополнение к каноническим антигенсвязывающим сайтам, включают сайты, которые могут связываться с антигеном, находящиеся в области варибельного домена. Кроме того, варибельный домен вовлечен в процесс самосвязывания антитела (Kang et al., 1988) и включает эпитопы (идиотопы), распознаваемые антиантителами (Kohler et al., 1989).

Некоторые примеры конъюгатов, полученных при связывании с белками (например, антитела), включают конъюгаты, в которых агент, связывающий белок (например, антитело) связан с детектируемой меткой. "Детектируемые метки" являются соединениями и/или элементами, которые могут быть обнаружены благодаря их особым функциональным свойствам и/или химическим характеристикам, использование которых позволяет антителу, к которому они присоединены, быть обнаруженным и/или, при необходимости, количественно оцененным.

В данной области техники известно большое количество соответствующих визуализирующих агентов, как известны и способы их крепления к антителам (см., например, патенты США № № 5021236; 4938948 и 4472509, каждый из которых включен в настоящее описание в виде ссылки). Например, в качестве визуализирующих фрагментов, могут быть использованы парамагнитные ионы; радиоактивные изотопы; флюорохромы; обнаруживаемые с помощью ЯМР вещества и/или вещества для визуализации с помощью рентгеновского излучения.

Примеры флуоресцентных меток, предполагаемых для использования их как конъюгатов для связывания с белками (например, антителами), включают 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, флуоресцеинизотиоцианат, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, фикоэритрин, REG, родамин зеленый, родамин красный, тетраметилродамин (TMR), Renographin, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамин, Texas Red и производные этих меток (например, галогенированные аналоги, модифицированные изотиоцианатом или другим конъюгирующим линкером и т.д.). Примером радиоактивной метки является тритий.

Детектируемые конъюгаты, связывающиеся с белками (например, антитела), рассматриваемые в настоящем изобретении, включают предназначенные для использования *in vitro*, где антитело связано с вторично связанным лигандом и/или ферментом (ферментная метка), которые будут окрашивать продукт при контакте с хромогенным субстратом. Примеры подходящих ферментов включают уреазу, щелочную фосфатазу, пероксидазу (хрена) и/или оксидазу глюкозы. Предпочтительными лигандами вторичного связывания являются соединения биотина и/или авидина и стрептавидина. Использование таких меток хорошо известно специалистам в данной области техники и описано, например, в патентах США №№ 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 и 4366241, каждый из которых включен в данный документ в виде ссылки.

Молекулы, включающие азидогруппы, также могут быть использованы с образованием ковалентных связей с белками через реактивные нитреновые интермедиаты, которые генерируются ультрафиолетовым светом низкой интенсивности (Potter & Haley, 1983). В частности, 2- и 8-азидовые аналоги пуриновых нуклеотидов были использованы как сайт-ориентированные фотозонды для идентификации нук-

леотидных связывающих белков в сырых клеточных экстрактах (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- и 8-азидонуклеотиды также использовались для отображения нуклеотидных связывающих доменов очищенных белков (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989 и Dholakia et al., 1989) и могут быть использованы в качестве агентов связывания антител.

В данной области техники известны несколько способов присоединения или конъюгации антитела к его конъюгированному фрагменту. Некоторые из способов присоединения включают использование комплексов хелатов металлов посредством, например, органического хелатирующего агента, такого как ангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА); этилентриаминтетрауксусная кислота, N-хлор-р-толуолсульфонамид и/или тетрахлор-3 α -6 α -дифенилгликолурил-3, прикрепленного к антителу (патент США №№ 4472509 и 4938948, каждый из которых включен в настоящее описание в виде ссылки). Моноклональные антитела также могут быть подвергнуты взаимодействию с ферментом в присутствии связывающего агента, такого как глутаральдегид или периодат. Белок-связывающие конъюгаты (например, связывающие белок с антителом) с маркерами флуоресценции готовят в присутствии этих сшивающих агентов или путем взаимодействия с изоцианатом. В патенте США № 4938948, визуализация опухолей молочной железы, например, достигается путем использования моноклональных антител, когда обнаруживаемые визуализационные фрагменты связаны с антителом посредством линкеров, таких как метил-р-гидроксibenзимидат или N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)-пропионат. В других вариантах воплощения рассматривается дериватизация иммуноглобулинов путем избирательного введения сульфгидрильных групп в Fc регион иммуноглобулина посредством условий реакции, не изменяющих сайт антитела. Конъюгаты антител, полученные по описанной методике, демонстрируют улучшенную долговечность, специфичность и чувствительность (патент США № 5196066, включен в данный документ в виде ссылки). Сайт-специфическое крепление эффекторной или репортерной молекулы, при котором репортерная или эффекторная молекула конъюгирована с углеводным остатком в Fc регионе, также описано в литературе (O'Shannessy et al., 1987). В других вариантах воплощения изобретения иммуноглобулины помечены радиоактивными метками посредством нуклидов, таких как тритий. В дополнительных вариантах воплощения используются наночастицы золота (например, размером от приблизительно 0,5 нм до 40 нм) и/или квантовые точки (Hayward, Calif.).

IV. Ферменты и субстраты (Chromagens)

Для обнаружения FOLR1 предполагается использование субстратов и индикаторов, таких как используемые в качестве примера в приводимых ниже вариантах воплощения. Пероксидаза хрена (HRP) является ферментом, который сначала образует комплекс с перекисью водорода, а затем приводит к его разложению, в результате чего выделяется вода и атомарный кислород. Как и со многими другими ферментами, HRP и HRP-подобная активности могут быть ингибированы избытком субстрата. Комплекс, образованный между HRP и избыточным количеством перекиси водорода каталитически неактивен и в отсутствии донора электронов (например хромогенного вещества) обратимо ингибирует. Это значит, что избыток перекиси водорода и отсутствие донора электронов приводит к гашению эндогенной активности HRP.

В аналитических системах HRP также может быть использована для преобразования определенного субстрата в его активированный хромоген, что приводит к изменению цвета. Фермент HRP может быть конъюгирован с антителом, белком, пептидом, полимером или другой молекулой посредством ряда способов. Такие способы известны специалистам в данной области техники. Добавление глутаральдегида в раствор, включающий смесь HRP и антител приведет к тому, что молекулы антитела будут больше конъюгированы друг с другом, чем с ферментом. В двухэтапной процедуре HRP в первую очередь реагирует с бифункциональными реагентами. На втором этапе с антителом смешивают только активированную HRP, что приводит к гораздо более эффективному мечению без полимеризации. HRP также конъюгирует со (стрепт)авидином посредством двухэтапной глутаральдегидной процедуры. Эта форма используется в процедурах, где субстратом, являясь, например, LAB и LSAB. Конъюгация с биотином также состоит из двух этапов, так как биотин сначала должен быть получен в виде его производных -биотинил-N-гидроксисукцинимидового эстера или биотингидразида, прежде чем он может быть подвергнут взаимодействию с эпсилонаминовыми группами фермента HRP. 3,3'-диаминобензидин (DAB) является субстратом для ферментов, таких как HRP, которые производят конечный продукт коричневого цвета, практически нерастворимый в этаноле и других органических растворителях. Окисление DAB также приводит к полимеризации, что приводит к способности его реагирования с тетраоксидом осмия и, таким образом, увеличению интенсивности окрашивания и электронной плотности. Из нескольких металлов и способов, используемых для повышения оптической плотности полимеризованного DAB наиболее эффективным, по-видимому, является использование хлорида золота в сочетании с сульфидом серебра.

3-Амино-9-этилкарбазол (АЕС) является субстратом для ферментов, таких как HRP. Во время окисления он образует конечный продукт розово-красного цвета, растворимый в этаноле. Таким образом, образцы, обработанные АЕС не должны погружаться в спирт или спиртовые растворы (например, гематоксилин Харриса). Вместо этого должны использоваться водные контрастирующие и заливные среды. АЕС, к сожалению, склонен к дальнейшему окислению, и при воздействии яркого света его интенсивность будет уменьшаться. Поэтому его рекомендуется хранить в темном месте.

4-Хлор-1-нафтол (СН) является субстратом для ферментов, таких как HRP и выпадает в осадок в

виде конечного продукта синего цвета. Поскольку CN растворим в этаноле и других органических растворителях, образец не должен дегидратироваться, подвергаться контрастирующему окрашиванию с помощью этанола или заклеиванию покровными стёклами в заливочных средах, включающих органические растворители. В отличие от DAB, CN имеет тенденцию диффундировать от места осаждения. р-Фенилендиамина дигидрохлорид/пирокатехин (реактив Ханкера-Яте) является субстратом донора электронов для ферментов, таких как HRP и дает продукт реакции сине-черного цвета, нерастворимый в спирте и других органических растворителях. Как и полимеризованный DAB, данный продукт реакции может быть зафиксирован в растворе осмиевой кислоты. Различные результаты были достигнуты при использовании реактива Ханкера-Яте в иммунопероксидазных способах.

Щелочная фосфатаза кишечника телят (AP) (молекулярная масса 100 кДа) представляет собой фермент, который удаляет (путем гидролиза) и переносит фосфатные группы органических сложных эфиров путем разрыва связи P-O; при этом временно формируется промежуточная связь фермент-субстрат. Основными металлическими активирующими добавками для AP являются Mg^{++} , Mn^{++} и Ca^{++} .

AP никогда широко не использовалась в иммуногистохимии до публикации процедуры посредством немеченной щелочной фосфатазы-антищелочной фосфатазы (APAAP). Растворимые иммунные комплексы, используемые в этой процедуре, имеют молекулярную массу приблизительно 560 кДа. Основным преимуществом APAAP процедуры по сравнению с PAP способом является отсутствие помех, связанных с активностью эндогенной пероксидазы. Из-за возможного отвлечения эндогенной активности пероксидазы на PAP окрашивание, техника APAAP рекомендуется для использования на мазках крови и костного мозга. Эндогенная активность щелочной фосфатазы, полученной из тканей костей, почек, печени и некоторых лейкоцитов может быть подавлена добавлением 1 мМ левамизола в раствор субстрата, хотя было установлено, что более эффективным является добавление 5 мМ. Кишечная щелочная фосфатаза должным образом не подавляется левамизолом.

В иммуногистохимическом способе окрашивания посредством щелочной фосфатазы, фермент гидролизует нафтоловые фосфатные эфиры (субстрат) до фенольных соединений и фосфатов. Фенолы контактируют с бесцветными солями диазония (хромоген) с получением нерастворимых цветных азокрасителей. Были успешно использованы несколько различных комбинаций субстратов и хромогенов.

Нафтол AS-MX-фосфат может быть использован в его кислотной форме или в виде натриевой соли. Хромогены Fast Red TR и Fast Blue BB производят ярко-красный или синий конечный продукт, соответственно. Оба растворимы в спиртовых и других органических растворителях, так что для их заливки должны использоваться среды на водной основе. Для окрашивания клеток мазков предпочтительным является Fast Red TR.

Дополнительные примеры субстратов включают нафтол AS-BI фосфат, нафтол AS-TR фосфат и 5-бром-4-хлор-3-индоксил фосфат (BCIP). Другие возможные хромогены включают Fast Red LB, Fast Garnet GBC, Nitro Blue тетразол (NBT) иодонитротетразол Violet (INT) и производные структуры.

V. Иммунологические способы

В других вариантах воплощения настоящее изобретение относится к иммунологическим способам связывания, очистки, количественного удаления и/или иного обнаружения биологических компонентов, таких как лиганды, рассмотренным в настоящем изобретении. Антитела, полученные в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для обнаружения лигандов дикого типа и/или мутантов белков, полипептидов и/или пептидов. Как описано в настоящей публикации, предполагается использование лигандов дикого типа и/или мутантов специфических антител. Некоторые способы иммунодетекции включают проточную цитометрию, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА), иммунорадиометрический анализ, флуороиммуноанализ, хемилюминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ и вестерн-блоттинг, здесь упомянуты некоторые из них. Этапы различных полезных иммунологических способов были описаны в научной литературе, такой как, например, Doolittle M H and Ben-Zeev O, *Methods Mol Biol.* 1999;109:215-37; Gulbis B и Galand P, *Hum Pathol.* 1993 Dec;24(12): 1271-85; и De Jager R et al., *Semin Nucl Med.* 1993 Apr;23(2): 165-79, каждый из которых включен в данный документ в виде ссылки.

В общем, способы иммунного связывания включают в себя получение образца, предположительно включающего лиганд белка, полипептида и/или пептида и контактирование образца с первым лиганд-связывающим пептидом (например, анти-лигандным антителом), в соответствии с настоящим изобретением, в зависимости от обстоятельств, в условиях, способствующих формированию иммунных комплексов.

С точки зрения выявления антигена, анализируемым биологическим образцом может быть любой образец, который может включать лиганд дикого типа или мутантный лиганд белково-специфического антигена, например, срез ткани или образца, гомогенизированный экстракт ткани, аспират биопсии, клетку, выделенную и/или очищенную форму любой из вышеуказанных композиций дикого типа или мутантов, включающих FOLR1, или даже любую биологическую жидкость, которая находится в соприкосновении с тканью, в том числе кровь и/или сыворотку, хотя предпочтительными являются образцы или экстракты тканей.

Контактирование выбранного биологического образца с антителом при соответствующих условиях

и в течение периода времени, достаточного для образования иммунных комплексов (первичных иммунных комплексов), как правило, состоит в простом добавлении композиции антител к образцу и выдерживанию смеси в течение достаточно долгого времени для того, чтобы антитела сформировали с ними иммунные комплексы, т. е. связались с любыми лигандами белка, включающего антигены. По истечении этого времени композиции образец-антитело, такие как срез ткани, ИФА планшет, устройство для дот-блоттинга или вестерн-блоттинга, как правило, промывают, чтобы удалить любые виды неспецифически связанных антител, оставляя для обнаружения только антитела, специфически связанные с первичными иммунными комплексами.

В целом, способы обнаружения образованных иммунокомплексов хорошо известны в данной области техники и могут выполняться с применением многочисленных подходов. Эти способы обычно основаны на обнаружении маркера или метки, такой как любая из радиоактивных, флуоресцентных, биологических и ферментативных меток. Использование таких меток описано, например, в патентах США №№ 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 и 4366241, каждый из которых включен в данный документ в виде ссылки. Конечно, как известно в данной области техники, можно найти дополнительные преимущества за счет использования вторичного связывания лиганда, такие как расположение связывания лигандов с вторичными антителами и/или биотином/авидином.

Антитела к антилиганду, используемые для обнаружения, сами могут быть связаны с детектируемой меткой, которую затем можно было бы просто обнаружить, таким образом позволяя определить количество первичных иммунных комплексов в композиции. В альтернативном варианте первое антитело, которое связывается с первичным иммунным комплексом может быть обнаружено с помощью второго связывающего агента, который обладает связывающей способностью к антителу. В этих случаях второй связывающий агент может быть связан с детектируемой меткой. Второй связывающий агент сам часто является антителом, которое, таким образом, может называться "вторичным" антителом или полимерной системой обнаружения. Первичные иммунные комплексы контактируют с меченым вторичным связующим агентом или системой обнаружения антитело/полимер при соответствующих условиях и в течение периода времени, достаточного для образования вторичных иммунных комплексов. Затем вторичные иммунные комплексы обычно подвергают промывке для удаления неспецифически связанных меченных вторичных антител или лигандов, а затем производят детекцию оставшихся на вторичных иммунных комплексах меток.

Другие способы включают в себя обнаружение первичных иммунных комплексов в два этапа. Второй связывающий агент, такой как антитело, обладающее связывающей способностью к антителам, как описано выше, используется для образования вторичных иммунных комплексов. После промывки, вторичные иммунные комплексы контактируют с третьим связывающим агентом или антителом, обладающим связывающей способностью со вторым антителом, при таких же соответствующих условиях и в течение периода времени, достаточного для образования иммунных комплексов (третичных иммунных комплексов). Третий лиганд или антитело связано с детектируемой меткой, что позволяет производить обнаружение третичных иммунных комплексов таким же образом. При необходимости данная система может обеспечить амплификацию сигнала.

В другом варианте воплощения для обнаружения целевого антигена(ов) используются биотинилированные моноклональные или поликлональные антитела, и затем антитело на втором этапе используется для обнаружения биотина, прикрепленного к биотиновым комплексам. При использовании данного способа тестируемый образец сначала инкубируют в растворе, включающем антитело для первого этапа. Если присутствует антиген-мишень, некоторые из антител связывается с ним, чтобы сформировать биотинилированный комплекс антитело/антиген. Затем комплекс антитело/антиген амплифицируется путем инкубации в последовательных растворах стрептавидина (или авидина), биотинилированных ДНК и/или комплементарных биотинилированных ДНК, с добавлением на каждом этапе дополнительных биотиновых сайтов к комплексу антитело/антиген. Этапы амплификации повторяются, пока не будет достигнут соответствующий уровень амплификации, после чего образец инкубируют в растворе, включающем антитело против биотина для второго этапа. Это антитело второго этапа помечено, например, ферментом, который может быть использован для обнаружения присутствия комплекса антитело/антиген с помощью гистoenзимологии посредством хромогенного субстрата. При соответствующей амплификации конъюгат связывания белков (например, с антителами) может производиться до макроскопической видимости.

Другой известный способ иммунодетекции использует преимущества методологии иммуно-ПЦР (полимеразной цепной реакции). Способ ПЦР использует комплекс ДНК/биотин/стрептавидин/антитело, промываемый буфером с низким pH или высоким содержанием соли, что приводит к высвобождению антител. Затем результирующий промыточный раствор используют для проведения ПЦР-реакции с подходящими праймерами под соответствующим контролем. В конкретных вариантах воплощения огромные возможности амплификации и специфичности ПЦР могут быть использованы для обнаружения одной молекулы антигена. Такое обнаружение может происходить в режиме реального времени. Например, рассматривается использование количественной ПЦР реального времени.

При клинической диагностике и/или мониторинге больных с различными формами заболевания, обнаружение FOLR1 мутанта и/или изменений уровней FOLR1 по сравнению с уровнями в соответст-

вующей биологической пробе нормального субъекта указывает на пациента с болезнью. Однако, как известно специалистам в данной области техники, клинический диагноз не обязательно может быть сделан на основе только данного способа. Специалистам в данной области техники хорошо знакомы существенные различиями в типах и/или количестве биомаркеров, которые используются для положительной идентификации и/или низкий уровень и/или изменения фонового уровня биомаркеров. Действительно, фоновые уровни экспрессии часто используются, чтобы сформировать уровень "отсечения", превышение которого считается как значимое и/или положительное значение.

В одном варианте воплощения обнаружение с помощью иммунологических способов (иммуногистохимии) FOLR1 оценивается по интенсивности и равномерности (процент окрашенных клеток - только мембраны). Сравнительная шкала интенсивности экспрессии FOLR1 устанавливается как 0 - отрицательная интенсивность, 0-1 - очень слабая, 1 - слабая, 1-2 - от слабой до умеренной, 2 - умеренная, 2-3 - от умеренной до сильной, 3 - сильная. Количественно, оценка 0 указывает на то, что окрашивание мембран опухолевых клеток не наблюдается. Оценка 1 указывает на слабое / едва заметное окрашивание мембран опухолевых клеток. Для оценки 2 в опухолевых клетках наблюдается умеренное окрашивание мембран. Наконец, оценка 3 или 3+ указывает на степень окрашивания мембран опухолевых клеток от умеренной до сильной. Образцы с оценкой экспрессии FOLR1 0 или 1 могут быть охарактеризованы, как образцы без гиперэкспрессии FOLR1, тогда как образцы с 2 или 3 баллами могут быть охарактеризованы, как образцы с гиперэкспрессией FOLR1. Образцы с гиперэкспрессией FOLR1 также могут быть классифицированы с помощью иммуногистохимической оценки, соответствующей числу копий молекулы FOLR1, экспрессированных клеткой и биохимически определенных: 0 = 0-10000 копий/клетку, 1 = по меньшей мере, около 200000 копий/клетку, 2 = по меньшей мере, около 500000 копий/клетку и 3 = по меньшей мере, около 2000000 копий/клетку. Сравнительные веса для FOLR1 процентов однородности окрашивания мембраны клетки коррелирует следующим образом: 0-отрицательная, фокальная (очаговая) - <25%, неоднородная (гетеро) - 25-75%, однородная (гомо) - >75%.

VI. Гибридизация нуклеиновых кислот

In situ гибридизацию обычно проводят на клетках или срезах ткани, закрепленных на стеклах. In situ гибридизация может быть выполнена по нескольким стандартным методикам (см., например, Leitch et al. In situ Hybridization: a practical guide, Oxford BIOS Scientific Publishers, Microscopy handbooks v. 27 (1994)). В одной in situ процедуре флуоресцентные красители (такие как флуоресцеин изотиоцианат (FITC), который флуоресцирует зеленым свечением при возбуждении аргоновым ионным лазером) используются для обозначения зонда в виде последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной нуклеотидной последовательности-мишени в клетке. Каждая клетка, включающая нуклеотидную последовательность-мишень связывается меченым зондом, производящим флуоресцентный сигнал при воздействии на клетки источника света с длиной волны, подходящей для возбуждения специфических флуорохромов, используемых в зонде.

Могут быть использованы различные степени гибридизации. С повышением жесткости условий гибридизации повышается требуемая степень комплементарности между зондом и мишенью для формирования и поддержания стабильной дуплексной связи. Жесткость условий увеличивается при повышении температуры, снижении концентрации соли или увеличении концентрации формамида. Добавление сульфата декстрана или повышение его концентрации также может увеличить эффективную концентрацию меченного зонда, что увеличит скорость гибридизации и интенсивность конечного сигнала. После гибридизации стекла промывают в растворе, обычно включающем реагенты, сходные с применяемыми в растворе для гибридизации со временем промывки от нескольких минут до нескольких часов, в зависимости от требуемой жесткости. Более длительные или более строгие промывки обычно снижают неспецифические фоновые влияния, но при этом существует риск снижения общей чувствительности.

Зонды, используемые в анализе гибридизации нуклеиновых кислот могут быть РНК или ДНК олигонуклеотидами или полинуклеотидами и могут включать не только природные нуклеотиды, но и их аналоги, такие как, например, дигоксигенин дЦТФ, биотин дЦТФ 7-азагуанозин, азидотимидин, инозин или уридин. Другие пригодные зонды включают, например, пептидные зонды и их аналоги, разветвленные ДНК-зонды, пептидометики, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) и/или антитела.

Зонды должны обладать достаточной комплементарностью с целевой последовательностью нуклеиновых кислот, представляющей интерес, чтобы обеспечить стабильное и специфическое связывание между целевой последовательностью нуклеиновых кислот и зондом. Степень гомологии, необходимая для стабильной гибридизации, зависит от жесткости среды гибридизации и/или промывочной среды. В настоящем изобретении предпочтительным является использование полностью гомологичных зондов, но специалистам в данной области техники будет понятно, что зонды, показывающие меньшую, но достаточную гомологию также могут быть использованы в настоящем изобретении (см., например, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)).

Зонды также могут быть образованы и выбраны несколькими способами, включая, но не ограничиваясь этим, отображение с помощью гибридизации in situ, панели гибридных соматических клеток или спот-блоттинг отсортированных хромосом; анализ хромосомальных связей; или клонирование и выделение из отсортированных хромосомных библиотек клеточных линий человека или гибридов соматических

клеток с человеческими хромосомами, радиационных гибридов соматических клеток, микродиссекций хромосомных регионов или искусственных хромосом дрожжей (YACs) определяемых с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к уникальным локусам хромосом или другого подходящего средства, такого как соседние YAC-клоны. Зонды могут представлять собой геномную ДНК, кДНК или РНК, клонированную в плазмиды, фаги, космиды, YAC, бактериальные искусственные хромосомы (BAC), вирусные или любые другие подходящие векторы. Зонды могут быть клонированы или синтезированы химическим путем обычными способами. В случае клонирования, выделенные в качестве зонда фрагменты нуклеиновой кислоты обычно встраиваются в вектор, такой как лямбда фаг, pBR322, M13, или векторы, включающие SP6 или T7 промотор и клонированные в виде библиотеки в бактерии-хозяине. [См., например, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, (1989)].

Зонды предпочтительно помечать, например, с помощью флуорофоров. Примеры флуорофоров, включают, но не ограничиваются ими, хелаты редкоземельных металлов (хелаты европия), Texas Red, родамин, флуоресцеин, дансил, лиссамин, умбеллиферон, фикоэритрин, фикоцианин или доступные на рынке флуорофоры, такие, как SPECTRUM ORANGE™ и SPECTRUM GREEN™ и/или производные любого одного или более из вышеперечисленных. Несколько зондов, используемых для анализа могут быть помечены более чем одним различным флуоресцентным или пигментным цветом. Эти различия цвета обеспечивают средства для идентификации позиций гибридизации специфических зондов. Кроме того, зонды, которые не разделены пространственно, можно идентифицировать по различным цветам свечения или пигментам в результате смешения двух других цветов (например, светло-красный+зеленый=желтый) пигмент (например, синий+желтый=зеленый) или с помощью набора фильтров, который пропускает свет только одного цветового оттенка.

Зонды можно помечать прямо или косвенно с помощью флуорофора посредством обычной методологии, известной специалистам в данной области техники.

VII. Наборы и композиции для обнаружения

Кроме того, в изобретении предусмотрены наборы для использования в практике настоящего изобретения, как описано в данном документе. Такие наборы могут включать контейнеры, каждый из которых включает один или более различных реагентов (обычно в концентрированной форме), используемых в способах, в том числе, например, один или несколько связывающих агентов (антитела), которые уже прикреплены к маркеру или, необязательно, реагенты для соединения связывающего агента с антителом или молекулой нуклеиновой кислоты (также, как и сам маркер); буферные растворы соответствующих нуклеотидных трифосфатов (например, дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ, дУТФ, АТФ, СТР, ГТР и УТР), обратную транскриптазу, ДНК-полимеразу, РНК-полимеразу, один или более специфический к последовательностям или вырожденный праймер, используемый при детекции молекул нуклеиновых кислот путем амплификации; и/или реагенты и оборудование для выделения (опционально, путем микродиссекции) для поддержки практического осуществления изобретения. Также в набор обычно бывают включены описание метки или индикатора, набор инструкций для использования компонентов набора в способе обнаружения лиганд по настоящему изобретению, где инструкции могут быть размещены на вкладыше и/или упаковке набора или его компонентов.

В других вариантах воплощения настоящее изобретение относится к наборам для иммунодетекции для использования с иммунологическими способами, описанными выше. В качестве антител для обнаружения белков дикого типа и/или мутантных белков, полипептидов и/или пептидов, как правило, используются антитела, предпочтительно включенные в комплект. Иммунологические наборы, таким образом, содержат в соответствующих контейнерах первое антитело, которое связывается с белком дикого типа и/или мутантным белком, полипептидом и/или пептидом и/или, необязательно, иммунологический реагент, и/или кроме того, необязательно, белок дикого типа и/или мутантный белок, полипептид и/или пептид.

Реагенты, входящие в состав иммунологического набора могут принимать любую форму, в том числе детектируемых меток, которые объединены и/или связаны с данным антителом. Рассматриваются также детектируемые метки, которые объединены и/или присоединены к вторичному связанному лиганду. Примерами вторичных лигандов являются вторичные антитела или полимеры, имеющие сродство к первому антителу.

Другие подходящие иммунологические реагенты для использования в настоящем наборе включают двухкомпонентные реагенты, которые включают вторичное антитело, обладающее связывающей способностью к первому антителу, вместе с третьим антителом или полимером, обладающим связывающей способностью к второму антителу. Третье антитело связано с детектируемой меткой. Как отмечалось выше, в данной области техники известен ряд типичных меток и/или все они могут быть соответствующим образом использованы в настоящем изобретении.

Наборы могут также содержать соответствующие аликвотированные композиции белков дикого типа и/или мутантных белков, полипептиды и/или помеченные и/или непомеченные полипептиды, которые могут быть использованы для получения стандартной кривой для анализа обнаружения. Наборы могут содержать конъюгаты с антитело- или полимерными метками, либо в полностью конъюгированной

форме, в виде промежуточных соединений и/или в виде отдельных фрагментов для конъюгирования пользователем набора. Компоненты наборов могут быть помещены в водную среду и/или находиться в лиофилизированной форме.

Контейнер, содержащий комплект обычно включает, по меньшей мере, один флакон, пробирки, колбы, сосуды, шприцы и/или другие емкости, в которые могут быть помещены антитела, и/или предпочтительно, соответствующим образом разделенные на аликвоты. Наборы по настоящему изобретению также обычно включают в себя емкость, содержащую антитела, антигены и/или любые другие контейнеры с реагентами в плотно закрытой упаковке для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать приспособление для инъекций и/или пластиковые контейнеры выдувного формования, в которых сохраняются требуемые флаконы.

Наборы могут также включать один или более терапевтических агентов для лечения рака, таких как FOLR1 иммуноконъюгат и/или химиотерапевтическое средство.

Набор может дополнительно включать реагент для обнаружения FOLR1, используемый для измерения уровня экспрессии FOLR1 у субъекта, куда входит реагент для обнаружения FOLR1 и инструкция по применению. В одном варианте воплощения реагент для обнаружения FOLR1 включает FOLR1 связывающий пептид, белок или молекулярный зонд (например, нуклеиновую кислоту). В другом варианте воплощения реагент для обнаружения FOLR1 представляет собой анти-FOLR1 антитело. В другом варианте воплощения набор дополнительно включает вторичное антитело, которое связывается с анти-FOLR1 антителом. В одном варианте воплощения используются специфические FOLR1 антитела в концентрации от 0,5 до 7,5 мкг/мл, предпочтительно от 0,9 до 3,8±0,5 мкг/мл. В другом варианте воплощения используются антитела в концентрации 1,0±0,5 мкг/мл, 1,5±0,5 мкг/мл, 1,9±0,5 мкг/мл, 2,5±0,5 мкг/мл, 3,0±0,5 мкг/мл, 3,5±0,5 мкг/мл, 3,8±0,5 мкг/мл или до 4,2 мкг/мл. В другом варианте воплощения антитело используется в концентрированном растворе с инструкциями для разведения для достижения конечной концентрации от 0,9 до 3,8±0,5 мкг/мл. В другом варианте воплощения изобретения набор дополнительно включает реагент для обнаружения, который выбран из группы, состоящей из фермента, флуорофора, радиоактивной метки и люминофора. В другом варианте воплощения реагент для обнаружения выбран из группы, состоящей из биотина, дигоксигенина, флуоресцеина, трития и родамина.

Набор также может включать инструкции для обнаружения и оценки экспрессии FOLR1. Набор также может включать в себя контрольные или референсные образцы. Неограничивающие примеры контрольных или референсных образцов включают в себя конгломераты клеток или клеточных линий тканевой культуры, полученные из образцов нормальной ткани (нормальный контроль) или ткани опухоли (положительный контроль). Примеры клеточных линий включают KB, NCI-H2110, Igrov-1, Ishikawa, Jeg-3, Skov-3, Hela, T47D, Caco2, SW620, OAW28, HCC827, Ovcар-8 и Ovcар-3, Ov-90, другие линии опухолевых клеток с известной экспрессией FOLR1, и клеточные линии, которые постоянно или временно трансфицированы вектором экспрессии, экспрессирующим FOLR1. Дополнительные примеры тканей для положительного контроля приведены в примерах 9-11. Набор может также содержать руководство по окрашиванию, где визуально изображены положительные и нормальные референсные образцы интенсивности и однородности окрашивания. Такие руководства по окрашиванию могут содержать референсные образцы нормального легкого, поджелудочной железы и/или слюнной железы и окрашенные опухолевые ткани с унифицированными оценками (например, ткани опухоли яичников, легких, почек и эндометрия, как описано в примерах и показано на фиг. 23-25).

VIII. FOLR1 связывающие агенты

Любые антитела, связывающие FOLR1 могут быть использованы для способов обнаружения в настоящем изобретении. Примеры терапевтически эффективных анти-FOLR1 антител можно найти в заявке на патент США № 2012/0009181, включенной в данный документ посредством ссылки. Полноразмерная аминокислотная (aa) и нуклеотидная (nt) последовательности для FOLR1 известны в этой области техники и представлены в данном документе в виде SEQ ID №№ 1 и 2 соответственно. Особенно эффективным антителом для обнаружения FOLR1 является мышинное моноклональное антитело анти-huFOLR1, клон BN3.2 (Leica # NCL-L-FRalpha). Примером терапевтически эффективного анти-FOLR1 антитела является huMov19 (M9346A). Полипептидные последовательности SEQ ID №№: 3-5 включают переменный домен тяжелой цепи huMov19 (M9346A), переменный домен легкой цепи версии 1.00 и переменный домен легкой цепи, версия 1.60 для huMov19 соответственно. В некоторых вариантах воплощения huMov19 (M9346A) антитела, кодируемые плазмидами, депонированы в Американской коллекции типовых культур (ATCC), расположенной по адресу: 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 от 7 апреля 2010 г. в соответствии с условиями Будапештского договора, и имеют ATCC депозитные номера PTA-10772 и PTA-10773 или 10774. Примеры FOLR1 иммуноконъюгатов, используемых в терапевтических способах по изобретению приведены ниже.

IX. FOLR1 иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение также относится к способам повышения эффективности конъюгатов (также упоминаемых в данном документе как иммуноконъюгаты), включающих анти-FOLR1 антитела, фрагменты антител, функциональные эквиваленты, улучшенные антитела и их аспекты, как описано в данном

документе, связанные или конъюгированные с цитотоксином (лекарством) или пролекарством. Примеры иммуноконъюгатов FOLR1 можно найти в заявке на патент США № 2012/0009181, включенной в данный документ посредством ссылки. В частности, эффективные терапевтические иммуноконъюгаты, согласно изобретению, включают антитело huMov19, описанное выше.

Подходящие лекарства или пролекарства хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах воплощения лекарства или пролекарства являются цитотоксическими агентами. Цитотоксический агент, используемый в составе цитотоксического конъюгата по настоящему изобретению может быть любым соединением, которое приводит к гибели клетки, или индуцирует гибель клеток, или каким-либо образом уменьшает жизнеспособность клеток и включает, например, майтанзиноиды и их аналоги, бензодиазепины, таксоиды, CC-1065 и аналоги CC-1065, дуокармицины и их аналоги, энедийны, например калихеамицины, доластатин и его аналоги, включая ауристатины, производные томаимицина, производные лептомицина, метотрексат, цисплатин, карбоплатин, даунорубицин, доксорубицин, винкристин, винбластин, мельфалан, митомицин С, хлорамбуцил и морфолинодоксорубицин. В некоторых вариантах воплощения цитостатические агенты представляют собой майтанзиноиды и аналоги майтанзиноидов.

Лекарственное средство или пролекарство может быть связано, например, с анти-FOLR1 антителом, таким как huMov19 или его фрагмент посредством дисульфидной связи. Линкерная молекула или сшивающий агент включает реакционноспособную группу химических веществ, которые могут реагировать с анти-FOLR1 антителом или его фрагментом. В некоторых вариантах воплощения реакционноспособными группами химических веществ, способных реагировать с клеточно-связывающим агентом являются N-сукцинимидиловые эстеры и N-сульфосукцинимидиловые эстеры. Кроме того, линкерная молекула включает реакционноспособную группу химических веществ, в некоторых вариантах воплощения дитиопиридилную группу, которая может реагировать с лекарственным средством с образованием дисульфидной связи. В определенных вариантах воплощения линкерные молекулы включают, например, N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (см., например, Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB) (см., например, патент США № 4563304), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио) 2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB) (см. публикацию США № 20090274713), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио) пентаноат (SPP) (см., например, регистрационный номер CAS 341498-08-6), 2-иминотиолан или ангидрид ацетилянтарной кислоты.

Также могут быть получены конъюгаты антитело-майтанзиноид с нерасщепляющимися связями. Такие сшивающие агенты описаны в данной области техники (см. ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbook и заявку на патент США № 2005/0169933), и включают, но не ограничиваются ими, N-сукцинимидил 4-(малеимидометил) циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), который является "длинноцепочечным" аналогом SMCC (LC-SMCC), κ -малеимидоундекановой кислоты N-сукцинимидиловый эстер (KMUA), β -малеимидопропионовой кислоты N-сукцинимидиловый эстер (BMPS), γ -малеимидомасляной кислоты N-сукцинимидиловый эстер (GMBS), ϵ -малеимидокапроновой кислоты N-гидроксисукцинимидиловый эстер (EMCS), *m*-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эстер (MBS), N-(α -малеимидоацетокси)-сукцинимидиловый эстер (AMAS), сукцинимидил-6- β -малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил 4-(*p*-малеимидофенил)-бутират (SMPB) и N-(*p*-малеимидофенил)изоцианат (PMPI), N-сукцинимидил-4-(иодоацетил)-аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидилиодоацетат (SIA), N-сукцинимидилбромацетат (SBA) и N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP). В некоторых вариантах воплощения антитело модифицируют с помощью сшивающих реагентов, таких как сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сульфо-SMCC, малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидид (MBS), сульфо-MBS или сукцинимидилиодоацетат, как описано в литературе, внедряя от 1 до 10 реакционноспособных групп (Yoshitake et al, *Eur. J. Biochem.*, 101:395-399 (1979); Hashida et al, *J. Applied Biochem.*, 56-63 (1984); and Liu et al, *Biochem.*, 18:690-697 (1979)).

Настоящее изобретение включает аспекты, в которых от приблизительно 2 до приблизительно 8 молекул лекарства ("лекарственная нагрузка"), например, майтанзиноида, связаны с анти-FOLR1 антителом или его фрагментом. Противоопухолевый эффект такого конъюгата является гораздо более эффективным по сравнению с лекарственной нагрузкой большим или меньшим числом препаратов, связанных с тем же клеточносвязывающим агентом. Понятие "лекарственная нагрузка", при использовании в данном документе, относится к числу молекул лекарства (например, майтанзиноида), которые могут быть прикреплены к клеточносвязывающему агенту (например, анти-FOLR1 антителу или его фрагменту). В одном аспекте количество молекул лекарства, которые могут быть прикреплены к клеточносвязывающему агенту может составлять в среднем от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, 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). В некоторых вариантах воплощения лекарством является N²-деацетил-N²-(3-меркапто-1-оксипропил)-майтансин (DM1) или N²-деацетил-N²-(4-меркапто-4-метил-1-оксипентил) майтансин (DM4). Таким образом, в определенном варианте воплощения антитело huMov19

конъюгировано с DM1 или DM4. В другом варианте воплощения антитело FR-1-21 конъюгировано с DM1 или DM4. В другом варианте воплощения антитело FR-1-48 конъюгировано с DM1 или DM4. В другом варианте воплощения антитело FR-1-49 конъюгировано с DM1 или DM4. В другом варианте воплощения антитело FR-1-57 конъюгировано с DM1 или DM4. В другом варианте воплощения антитело FR-1-65 конъюгировано с DM1 или DM4.

Х. Корреляция между экспрессией FOLR1 и терапевтической эффективностью

В некоторых вариантах воплощения изобретение относится к способу идентификации субъектов с повышенной вероятностью ответа на FOLR1-таргетную противораковую терапию. Настоящее изобретение частично основано на открытии, состоящем в том, что повышенные уровни экспрессии FOLR1 коррелирует с эффективностью FOLR-1-таргетной противораковой терапии.

Оценка образцов тканей, полученных от пациентов и корреляция эффективности при использовании *in vivo* моделей ксенотрансплантатов, демонстрирует эффективность анализа экспрессии для выбора субъектов с повышенной вероятностью ответа на лечение. ИГХ обеспечивает оценку экспрессии FOLR1 на опухолевых клетках: от 0 (экспрессия отсутствует) до 3+ (очень высокие уровни экспрессии). Данные исследований *in vivo* посредством моделей ксенотрансплантатов показывают, что образцы тканей с оценкой 1, 2, 3 или 3+ для экспрессии FOLR1, предпочтительно с оценкой 2, 3 или 3+, имеют повышенную вероятность реакции на FOLR-1-таргетную противораковую терапию клинически значимыми дозами FOLR1 иммуноконъюгатов (например, доза иммуноконъюгата FOLR1 5 мг/кг для ксенотрансплантата составит приблизительно 185 мг/м² для пациентов). Таким образом, выявление лиц с повышенной оценкой FOLR1 поможет определить пациентов, могущих реагировать на клинически значимые дозы. Как описано более подробно ниже, восприимчивость FOLR1 терапии коррелирует с оценкой FOLR1, равной 2 или выше, особенно с оценкой 3. Кроме того, более равномерные уровни экспрессии FOLR1 обеспечивают лучшую корреляцию с терапевтическим эффектом. Таким образом, гомогенность (однородность) окрашивания является предпочтительной, но комбинации повышенной интенсивности с неоднородностью окрашивания также свидетельствуют о повышенной экспрессии FOLR1. Например, оценка более 2 с неоднородным окрашиванием является критерием отбора пациента для лечения посредством FOLR1 терапевтического агента.

Анализ экспрессии FOLR1 также идентифицирует пациентов, у которых сниженные дозы FOLR1-таргетной противораковой терапии ("терапия низкой дозой") может быть эффективными для получения противоопухолевого ответа. Как было оценено на практике, соединения обычно вводят в наименьшей дозе, которая достаточна для достижения желаемого терапевтического эффекта. Это особенно важно для терапии, вызывающей клинические и часто нежелательные побочные эффекты. Способность распознавать пациентов с повышенным уровнем экспрессии FOLR1 позволяет минимизировать дозы FOLR-1-таргетной терапии, таким образом уменьшая возможные побочные эффекты при сохранении терапевтической эффективности.

Как показано в данном документе, оценка экспрессии FOLR1 2 или более с неоднородным окрашиванием, коррелирует с повышенной чувствительностью к анти-FOLR1 иммуноконъюгатам. В некоторых вариантах воплощения наблюдается увеличение реактивности кахексии, увеличение продолжительности жизни, удлинение времени до прогрессирования, уменьшение массы опухоли, снижение опухолевой массы и/или продление времени до метастазирования опухоли, времени до возникновения рецидива опухоли, ответ опухоли на лечение, полный ответ, частичный ответ, стабилизация заболевания, прогрессирование заболевания, увеличение выживаемости без прогрессирования (ВБП) или общей выживаемости (ОВ). В некоторых вариантах воплощения экспрессия FOLR1 2 или более с неоднородным окрашиванием, коррелирует с увеличением ВБП, ВПЗ или ОВ.

Наборы для использования в способах обнаружения и корреляции с референсными/контрольными образцами могут включать контрольные (для положительного и/или отрицательного контроля) или референсные образцы. Образцы для положительного контроля или положительные референсные образцы могут быть получены из клеточных линий культуры тканей, образцов нормальных тканей или опухолевых тканей. Положительные и отрицательные референсные образцы могут быть получены из клеточных линий, включая SW620, T47D, IGROV-1, HeLa, KB, JEG-3, других опухолевых клеточных линий и клеточных линий постоянно или временно трансфицированных вектором экспрессии, кодирующим FOLR1. Образцы нормальной или опухолевой ткани и клеточные линии культуры тканей также могут быть использованы в качестве референсных образцов для отрицательного контроля. Для информации о дополнительных образцах, см. примеры 9-11 и фиг. 23-25.

XI. Фармацевтические композиции и терапевтические способы

FOLR1-связывающие агенты (включая антитела, иммуноконъюгаты и полипептиды) пригодны для использования в различных областях применения, включая, но не ограничиваясь этим, терапевтические способы лечения, например, при лечении рака. В некоторых вариантах воплощения агенты используются для ингибирования роста опухоли, индуцирования дифференциации, уменьшения объема опухоли и/или снижения онкогенности опухоли. Способы применения могут быть *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах воплощения FOLR1-связывающий агент, или антитело, или иммуноконъюгат или полипептид представляет собой антагонист человеческого FOLR1, с которым он связывается.

В некоторых вариантах воплощения заболевание, лечение которого производится с помощью FOLR1-связывающего агента или антагониста (например, huMov19 антитела или иммуноконъюгата) представляет собой рак. В некоторых вариантах воплощения рак характеризуется опухолью, экспрессирующей рецептор фолата 1, с которым связывается FOLR1-связывающий агент (например, антитело).

Настоящее изобретение относится к способам лечения рака, включающим введение терапевтически эффективного количества FOLR1-связывающего агента субъекту (например, пациенту, нуждающемуся в лечении). В некоторых вариантах воплощения рак представляет собой рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак яичников, рак печени, рак молочной железы, рак мозга, рак почки, рак предстательной железы, рак желудочно-кишечного тракта, меланому, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, глиобластому и рак головы и шеи. В некоторых вариантах воплощения рак представляет собой рак яичников. В некоторых вариантах воплощения рак представляет собой рак легких. В некоторых вариантах воплощения субъектом является человек.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования роста опухоли посредством антител или других агентов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах воплощения способ ингибирования роста опухоли включает контактирование клетки с FOLR1-связывающим агентом (например, антителом) *in vitro*. Например, иммортализованную линию клеток или линию клеток рака, экспрессирующих FOLR1 культивируют в среде, в которую добавлены антитела или другие агенты для ингибирования роста опухоли. В некоторых вариантах воплощения опухолевые клетки выделяют из образца ткани пациента, такого как, например, биоптат ткани, плевральный выпот или проба крови и культивируют в среде, в которую добавлен FOLR1-связывающий агент для ингибирования роста опухоли.

В некоторых вариантах воплощения способ ингибирования роста опухоли включает контактирование опухоли или опухолевых клеток с FOLR1-связывающим агентом (например, антителом) *in vivo*. В некоторых вариантах воплощения контактирование опухоли или опухолевых клеток с FOLR1-связывающим агентом осуществляется на животной модели. Например, FOLR1-связывающие агенты могут быть введены ксенотрансплантатам, экспрессирующим один или более FOLR1, которые были выращены в организмах иммунологически скомпрометированных мышей (например NOD/SCID мышей) для ингибирования роста опухоли. В некоторых вариантах воплощения FOLR1-связывающий агент вводят одновременно или вскоре после введения онкогенных клеток в организм животного, чтобы предотвратить рост опухоли. В некоторых вариантах воплощения FOLR1-связывающий агент вводят в качестве терапевтического после роста онкогенных клеток до заданного размера.

В некоторых вариантах воплощения способ ингибирования роста опухоли включает введение субъекту терапевтически эффективного количества FOLR1-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения субъектом является человек. В некоторых вариантах воплощения субъект имеет опухоль или опухоль была удалена.

В некоторых вариантах воплощения опухоль представляет собой опухоль мозга, опухоль толстой кишки, опухоль поджелудочной железы, опухоль легкого, опухоль яичников, опухоль печени, опухоль молочной железы, опухоль почки, опухоль предстательной железы, опухоль желудочно-кишечного тракта, меланому, опухоль шейки матки, опухоль мочевого пузыря, глиобластому, опухоль головы и шеи. В некоторых вариантах воплощения опухоль представляет собой опухоль яичников.

В некоторых вариантах воплощения изобретение относится к способам ингибирования роста опухоли посредством низких доз FOLR1-связывающего агента. Термин "низкая доза", используемый в данном документе, относится к терапевтически эффективной дозе FOLR1-связывающего агента, которая меньше, чем обычная или стандартная доза, необходимая для получения терапевтического эффекта.

Таким образом, в некоторых вариантах воплощения изобретение относится к способам лечения рака посредством huMov19 антител и иммуноконъюгатов. В некоторых вариантах воплощения иммуноконъюгатами huMov19 является huMov19-SPDB-DM4; huMov19-sulfo-SPP-DM1; huMov19-SPP-DM1, или huMov19-PEG4-Mal-DM4. В определенном варианте воплощения иммуноконъюгатом huMov19 является huMov19-SPDB-DM4, который также называют IMGN853.

В некоторых вариантах воплощения композиции создаются для хранения и использования путем объединения очищенного антитела или агента по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем (например, носителем, наполнителем) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, нетоксичные буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; соли, такие как хлорид натрия, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил-или пропилпарабен; катехол; резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (например, содержащие менее чем приблизительно 10 аминокислотных остатков), белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; углеводы, такие как моносахариды, дисахариды, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие про-

тивоины, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-протеиновые комплексы) и неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены любым числом способов для местной или системной терапии. Способы введения могут быть местными (например, на слизистые оболочки, включая вагинальное и ректальное введение), используя трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки, легочными (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеальным, интраназальным, трансдермальным и эпидермальным способом), пероральными или парентеральными, включая внутривенные, внутриартериальные, подкожные, внутрибрюшинные или внутримышечные инъекции или инфузии, или внутрочерепными (например, интратекальное или внутримозговое введение).

Антитело или иммуноконъюгат согласно изобретению могут быть объединены в комбинированную фармацевтическую композицию или в режиме дозирования в качестве комбинированной терапии, со вторым соединением, обладающим противораковыми свойствами. Второе соединение комбинированной фармацевтической композиции или режима дозирования предпочтительно имеет дополнительное влияние на нагруженное лекарственным средством антитело (ADC) комбинации так, что они не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Также используются фармацевтические композиции, включающие FOLR1-связывающий агент и вторым противораковое средство.

Для лечения заболевания подходящая доза антитела или агента по настоящему изобретению зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, тяжести и течения заболевания, чувствительности заболевания к лечению, терапевтических или профилактических целей введения антитела или агента, предыдущей терапии, анамнеза пациента и т.д. на усмотрение лечащего врача. Антитело или агент можно вводить однократно или в серии процедур продолжительностью от нескольких дней до нескольких месяцев, или пока не проявится терапевтический эффект или уменьшится болезненное состояние (например, уменьшится размер опухоли). Оптимальная схема введения может быть рассчитана, исходя из измерения накопления лекарственного средства в организме пациента и будет зависеть от относительной эффективности антитела или агента. Лечащий врач может легко определить оптимальные дозировки, методологию дозирования и частоту введения. В некоторых вариантах воплощения доза составляет от 0,01 мкг до 100 мг на кг массы тела, и может вводиться один или несколько раз ежедневно, еженедельно, ежемесячно или ежегодно. В некоторых вариантах воплощения антитело или другой FOLR1-связывающий агент вводится один раз каждые две недели или один раз каждые три недели. В некоторых вариантах воплощения дозировка антитела или другого FOLR1-связывающего агента составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг на кг веса тела. Лечащий врач может оценить частоту введения для дозирования на основании измеренного времени удержания и концентрации препарата в жидкостях или тканях тела.

Комбинированная терапия может обеспечить "синергизм" и показать "синергетический эффект", то есть эффект, состоящий в том, что использование вместе активных ингредиентов дает эффект больший, чем сумма эффектов при использовании соединений по отдельности. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активные ингредиенты являются: (1) совместно составленными и введенными одновременно в комбинированной лекарственной форме одной дозой, (2) введенными поочередно или одновременно в виде отдельных композиций, или (3) в другом режиме. При поочередном введении в чередующейся терапии синергетический эффект может быть достигнут при последовательном введении соединений, например, путем инъекций в различных отдельных шприцах. В общем, при поочередной терапии эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят по очереди, то есть последовательно, тогда как при комбинированной терапии эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят вместе.

Варианты воплощения настоящего изобретения могут быть дополнительно определены с помощью ссылки на следующие не ограничивающие примеры, которые подробно описывают получение некоторых антител по настоящему изобретению и способы использования антител по настоящему изобретению. Специалистам в данной области техники будет очевидно то, что многие модификации как материалов, так и способов могут быть осуществлены без отклонения от области применения настоящего изобретения.

Примеры

Следует помнить, что примеры и варианты воплощения описаны в данном документе только в демонстративных целях и что различные модификации или изменения с их учетом будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и объем настоящего приложения.

Высокие уровни экспрессии рецептора фолата 1 (FOLR1) наблюдаются в опухолях яичников, уровни экспрессии от высоких до умеренных - в опухолях мозга, молочной железы, мочевого пузыря, эндометрия, легкого, поджелудочной железы и карциномы почек. С другой стороны, в нормальных тканях, к которым относятся ткани почек, легких, хориоидного сплетения, поджелудочной железы, молочной железы, щитовидной железы, яичников, предстательной железы и легких, экспрессия FOLR1 ограничена.

В способах количественной оценки FOLR1 используются гомогенаты свежемороженой ткани. В

гомогенатах полного объема ткани невозможно отличить цитоплазматическую экспрессию от мембран-ассоциированной экспрессии, поэтому свежемороженые образцы не поддаются исследованию в клинических условиях. Тем не менее, образцы, фиксированные в формалине и залитые парафином (ФФЗП) по желанию пациента могут быть сохранены в клинике для дальнейших исследований.

Пример 1.

Иммуногистохимическое окрашивание FOLR1 клеточных образцов - ручные способы окрашивания. Фиксированные формалином и залитые парафином конгломераты клеток и тканей использовались в качестве образцов со следующими окрашивающими реагентами и при следующих условиях.

ИГХ Антитела

Исследуемый препарат:
■ моноклональные мышинные антитела huFOLR1 клон BN3.2 (Leica # NCL-L-FRalpha)
ImmunoGen: Прокариотический рекомбинантный белок отвечает 189 аминокислотам внешней области альфа-молекулы рецептора фолата.
Контрольный препарат:
■ muIgG1 (Coulter) клон, Cat# 6602872
Вторичное антитело
■ Биотинилированное лошадиное антимышинное (Vector, Cat# PK-6100)

Условия анализа ФФЗП

Этапы	Состояния
Поиски антигена	Borg (Biocare) pH 9,0
Этапы блокирования	Авидин/Биотин, пероксид
Тестовый или контрольный препарат	2,0 мкг/мл
Растворитель	ФСБ содержащий 2% сыворотку лошади
Вторичное антитело	10 мкг/мл
Система обнаружения*	Комплекс авидин-биотин-пероксидаза; ABC (Vector Labs)
Хромаген	ДАБ (Dako)
Время проявления ДАБ	≥ 5 мин

Зафиксированные в формалине и залитые парафином (ФФЗП) биоптаты опухоли яичников пациента и ксенотрансплантатную опухоль яичников окрашивали мышинными анти-FOLR1 антителами клона BN3.2, (Leica, Cat # NCL-L-FRalpha), в качестве контроля использовали muIgG1 пр-ва Coulter. После демаскирования антигена буфером с pH 9,5, стекла блокировали 2% лошадиной сывороткой в сочетании с авидином. Стекла промывали ФСБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин с анти-FOLR1 или контрольным muIgG1 антителом, а затем 30 мин с биотинилированным анти-мышинным IgG и 40 мин с комплексом авидин-биотин-пероксидаза для обнаружения связанного вторичного антитела. Инкубация в течение 5 мин с ДАБ (3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид) привела к появлению цветового сигнала. Стекла подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином.

Интенсивность и картина распределения окрашивания FOLR1 были оценены по сравнению с контрольными окрашиваниями IgG (неспецифическим). Интенсивность оценивали по шкале от 0 до 3 (0 = нет окрашивания, 1 = слабое, 2 = умеренное и 3 = сильное), а распределение было оценено как фокальное (<25% окрашенных клеток), неоднородное (25-75% окрашенных клеток) и однородное (>75% окрашенных клеток).

ФФЗП образцы были получены из микромассивов опухоли, а блоки человеческих тканей - из семи различных опухолей, как описано ниже.

ФФЗП тестовые образцы

Микромассивы опухоли человека (ТМА)	Описание	Коммерческий источник
■ Смешанной опухоли	96 образцов 33 типов рака	Biomax Cat# MC961
■ Опухоли яичников	64 образцов	Biochain Cat# T8235725
■ НМРЛ	80 образцов	Biomax Cat# LC806
■ Колоректального рака	85 дубликатов образцов	Biomax Cat# BC000110
Блоки человеческих тканей	Количество	Коммерческий источник
■ Опухоли молочной железы	4	CHTN
■ Колоректального рака	4	
■ Опухоли яичников	4	
■ НМРЛ	8	
■ Опухоли поджелудочной железы	1	
■ Опухоли почки	8	
■ ПРГШ	14	

FOLR1 исследуемый препарат и мышинный анти-FOLR1 клон BN3.2 были испытаны для определения специфичности связывания с антигеном huFOLR1. Используя описанные способы ИГХ окрашивания, ФФЗП срезы 300-19 и 300-19 трансфицированные huFOLR1 (300-10/FOLR1) и конгломераты клеток окрашивали и оценивали на FOLR1. Для определения FOLR1 клетки исследуемого препарата специально окрашивались 300.19/FOLR1+ и не показали окрашивания в клетках 300-19 (3-однородное и отрицательное окрашивание, соответственно). Эти результаты показывают, что клон BN3.2 ориентирован исключительно на huFOLR1 антиген. (фиг. 1).

BN3.2 антитела также использовались для обнаружения экспрессии FOLR1 в образцах тканей. Иммунореактивность каждого тестового и контрольного образца тканей и клеточных конгломератов определял патологоанатом-консультант, д-р David Dorfman. Клеточные конгломераты для контроля были оценены сначала, затем оценивались образцы тканей. Для каждой ткани сообщались оценка и описание интенсивности и однородности окрашивания. Оценка интенсивности окрашивания и величина однородности описаны ниже. Конечный балл для каждого образца ткани вычислялся, как оценка тестового образца минус оценка соответствующего контрольного образца.

Уровень САК для каждого образца оценивали путем сравнения оценки окрашивания с калиброванным образцом конгломерата клеток.

Интенсивность (количество окрашивающего средства)		Однородность (количество окрашенных клеток)	
0	Негативная		
1	Слабая	0	Негативная
2	Умеренная	Фокальная	<25%
3	Сильная	Неоднородная (гетерогенная)	25-75%
3 +	Очень сильная	Однородная (гомогенная)	> 75%

Значения показателя связанных антител на клетку (САК) были определены для FOLR1-позитивных опухолевых клеточных линий (KB, IGROV1, JEG3 и OVCAR3) посредством анти-FOLR1-фикоэритрина, BD Quantibrite Beads и проточной цитометрии и показали разные значения САК (фиг. 2). Условия окрашивания были оптимизированы для FOLR1 так, чтобы конгломераты клеток, полученные из FOLR1-позитивных опухолевых клеточных линий показали различные уровни интенсивности ИГХ окрашивания. Конгломерат клеток KB показал очень высокую степень однородности окрашивания с высокой ин-

тенсивностью (3+), конгломерат клеток IGROV1 показал высокую степень окрашивания (3), конгломерат клеток JEG3 показал умеренную степень (2-3) неоднородного окрашивания, а конгломерат клеток OVCAR3 показал низкую степень интенсивности (1-2) неоднородного окрашивания. Тенденции интенсивности окрашивания FOLR1, наблюдаемые на конгломератах клеток соответствуют приведенным значениям САК, где KB клетки показали высокое значение САК 1700000, IGROV-1 клетки показали следующее по величине значение САК 260000, JEG-3 имели более низкое значение САК 41000, а OVCAR3 клетки показали самое низкое значение САК 4000. Результаты окрашивания и соответствующие значения САК перечислены в таблице ниже.

Значения САК и соответствующие результаты окрашивания huFOLR1 клеточных линий и соответствующих клеточных конгломератов

Клеточная линия	FOLR1	
	САК	Оценка
KB	1700000	3+ однородная
IGROV1	260000	3 однородная
JEG3	41000	2-3 неоднородная
OVCAR3	4000	1-2 неоднородная

Дополнительные клеточные линии, в том числе Capan-1, Jar, Hec-1-A, Hec-1-B, Ishikawa, NCIH292, BT474EEI, PA-1, OV-90, CaOv-4, CaOv-3, A2780, Ovcар-5, Ovcар-4, HCT-15, 786-O, NCI H838, NCI H 522, NCI H2110, NCI H1734, NCI H228 и FU.OV-3 были испытаны и признаны FOLR1 позитивными, но их уровни экспрессии FOLR1 и чувствительности к анти-FOLR1 иммуноконъюгату сильно отличаются. Для справочных целей предпочтительными являются клеточные линии, обладающие стабильной экспрессией FOLR1 и чувствительностью к анти-FOLR1 иммуноконъюгатам.

Особенно важным является то, что способом ИГХ удалось обнаружить стабильную экспрессию FOLR1 образцов ткани рака яичников и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Как показано на фиг. 3, экспрессия FOLR1 может быть достоверно обнаружена в образцах карциномы яичников и НМРЛ с оценкой от 2 неоднородной до 3 однородной. Значения САК для этих образцов находятся в диапазоне от приблизительно 41 000 для образцов с оценкой 2 неоднородной, до более чем 260 000 для образцов с оценкой 3 однородной. Как показано на фиг. 4, высокая интенсивность и однородность окрашивания наблюдалась также для рака яичников, аденокарциномы легких и бронхиолоальвеолярной карциномы. Кроме того, было дополнительно установлено, что экспрессия FOLR1 в образцах тканей НМРЛ (фиг. 5) и рака яичников (фиг. 6) преимущественно локализована на мембранах. Экспрессия была обнаружена на нескольких образцах одной, а также различных образцах опухоли. Интересно, что ни один из образцов опухоли толстой кишки, молочной железы или мелкоклеточного рака легких не показал оценки выше 2 неоднородной.

Пример 2.

In vivo эффективность huMov19-PEG4Mal-DM4 и huMov19-SPDB-DM4 конъюгатов по сравнению с аналогичными нетаргетными конъюгатами в модели ксенотрансплантата KB.

FOLR1-таргетный расщепляемый конъюгат huMov19-SPDB-DM4 в сравнении с не таргетным huC242-SPDB-DM4, нерасщепляемый конъюгат huMov19-PEG4-Mal-DM4 в сравнении с не таргетным huC242-PEG4Mal-DM4 были протестированы посредством установленной модели ксенотрансплантата KB клеток (очень высокая экспрессия FOLR1, 3+ однородная при ИГХ с ручным окрашиванием), имплантированного подкожно ТКИН-мышам. Мыши были случайным образом распределены по весу тела в группы терапии и подвергались воздействию либо один раз (SPDB конъюгатами) на 3 день после инокуляции клеток, либо три раза в неделю в дни 3, 10 и 17 после инокуляции клеток 5 и 10 мг конъюгата / кг массы тела, соответственно. Средний объем опухоли в различных группах терапии приведен на фиг. 7. Терапия посредством huMov19-SPDB-DM4 или huMov19-PEG4Mal-DM4 привела к снижению среднего объема опухоли по сравнению с контрольной группой, в которой использовался ФСБ, в то время как лечение посредством любого из соответствующих не таргетных конъюгатов не показало заметного эффекта.

Пример 3.

Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 при воздействии на OVCAR-3 ксенотрансплантат карциномы яичников человека.

Противоопухолевый эффект IMGN853 оценивали на стандартной модели подкожного ксенотрансплантата карциномы яичника. ТКИН-мышам инокулировали клетки карциномы яичника OVCAR-3 (1×10^7 клеток/животное), которые вводились подкожно в правый бок животного. Когда объем опухоли достиг приблизительно 100 мм³ (21 день после инокуляции опухолевых клеток), мышей случайным образом делили на четыре группы (по 6 животных в группе). Мышей обрабатывали с помощью однократ-

ной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ. Рост опухоли контролировали путем измерения ее размера два раза в неделю. Размер опухоли рассчитывали по формуле: длина $\times$ ширина $\times$ высота $\times \frac{1}{2}$.

Препарат IMGN853 проявил высокую активность в отношении OVCAR-3 опухолей (ИГХ оценка 3, однородная, при использовании ручных ИГХ способов) с точки зрения ингибирования роста опухоли (Т/С=0%), при уровнях дозы 2,5 и 5,0 мг/кг (фиг. 8). У 6/6 мышей, получавших IMGN853 в дозе 5,0 мг/кг была достигнута полная регрессия (ПР) опухоли. У мышей, получавших IMGN853 в дозе 2,5 мг/кг была достигнута частичная регрессия (ЧР) опухоли в 6/6, и ПР - в 4/6. Препарат IMGN853 показал активность в дозе 1,2 мг/кг, с Т/С равном 18% при ЧР 2/6 и ПР 1/6. В соответствии со стандартами Национального института рака (NCI) значение Т/С в диапазоне от 10% до 42% считается активным, значение Т/С менее 10% считается чрезвычайно активными.

Пример 4.

Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 при воздействии на IGROV-1 ксенотрансплантат карциномы яичников человека.

Противоопухолевый эффект IMGN853 оценивали на стандартной модели подкожного ксенотрансплантата карциномы яичника. ТКИН-мышам инокулировали клетки карциномы яичника IGROV-1 (1×10^7 клеток/животное), которые вводились подкожно в правый бок животного. Когда объем опухолей достиг приблизительно 100 мм³ (7 день после инокуляции опухолевых клеток), мышей случайным образом делили на четыре группы (по 6 животных в группе). Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ. Рост опухоли контролировали путем измерения ее размера два раза в неделю. Размер опухоли рассчитывали по формуле: длина $\times$ ширина $\times$ высота $\times \frac{1}{2}$.

Препарат IMGN853 проявил высокую активность в отношении IGROV-1 опухолей (ИГХ оценка 3, однородная, при использовании ручных ИГХ способов) при дозах 2,5 и 5,0 мг/кг, результирующее соотношение Т/С равно 5% для обеих доз (фиг. 9). У 5/6 и 6/6 мышей наблюдалась частичная регрессия опухоли при дозах 2,5 и 5,0 мг/кг, соответственно. В дозе 1,2 мг/кг (Т/С=47%) препарат IMGN853 активности не проявил.

Пример 5.

Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 при воздействии на OV-90 ксенотрансплантат карциномы яичников человека.

Противоопухолевый эффект IMGN853 оценивали на стандартной модели подкожного ксенотрансплантата карциномы яичника. ТКИН-мышам инокулировали OV-90 клетки карциномы яичника (1×10^7 клеток/животное), которые вводились подкожно в правый бок животного. Когда объем опухолей достиг приблизительно 100 мм³ (13 день после инокуляции опухолевых клеток), мышей случайным образом делили на четыре группы (по 6 животных в группе). Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ. В контрольной группе, получавшей ФСБ, внутривенные инъекции проводились по такому же графику. Рост опухоли контролировали путем измерения ее размера в два раза в неделю. Размер опухоли рассчитывали по формуле: длина $\times$ ширина $\times$ высота $\times \frac{1}{2}$.

Препарат IMGN853 проявил активность в отношении OV-90 опухолей (ИГХ оценка 3, однородная-неоднородная при использовании ручных ИГХ способов) при дозах 2,5 и 5,0 мг/кг, результирующее соотношение Т/С равно 36 и 18%, соответственно (фиг. 10). У двух животных наблюдалась частичный регресс опухоли в группе 5,0 мг/кг, никакого другого регресса опухоли в любой из групп не наблюдалось. В дозе 1,2 мг/кг (Т/С=77%) препарат IMGN853 активности не проявил.

Пример 6.

Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 при воздействии на SKOV-3 ксенотрансплантат карциномы яичников человека.

Противоопухолевый эффект IMGN853 оценивали на стандартной модели подкожного ксенотрансплантата карциномы яичника. ТКИН-мышам инокулировали клетки карциномы яичника SKOV-3 (1×10^7 клеток/животное), которые вводились подкожно в правый бок животного. Когда объем опухолей достиг приблизительно 100 мм³ (26 день после инокуляции опухолевых клеток), мышей случайным образом делили на четыре группы (по 6 животных в группе). Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMGN853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ. Рост опухоли контролировали путем измерения ее размера два раза в неделю. Размер опухоли рассчитывали по формуле: длина $\times$ ширина $\times$ высота $\times \frac{1}{2}$.

Препарат IMGN853 не проявил активность в отношении SKOV-3 опухоли (ИГХ оценка 3, фокальная при использовании ручных ИГХ способов) во всех дозах, с ростом IMGN853 обработанных опухолей параллельно контрольной группе, обработанной ФСБ (фиг. 11). Анализ данных не проводился, а само исследование было досрочно прекращено в связи с отсутствием активности IMGN853 в этой модели.

Пример 7.

Дозозависимая противоопухолевая активность IMGN853 при воздействии на KB ксенотрансплантат

человеческой аденокарциномы шейки матки.

Противоопухолевый эффект IMG853 оценивали на стандартной модели подкожного ксенотрансплантата аденокарциномы шейки матки. ТКИН-мышам инокулировали клетки аденокарциномы шейки матки KB (1×10^7 клеток/животное), которые вводились подкожно в правый бок животного. Когда объем опухолей достиг приблизительно 100 мм³ (7 день после инокуляции опухолевых клеток), мышей случайным образом делили на четыре группы (по 6 животных в группе). Мышей обрабатывали с помощью однократной внутривенной инъекции IMG853 дозой 1,2, 2,5 или 5,0 мг/кг. Животные контрольной группы получали однократную внутривенную инъекцию ФСБ. Рост опухоли контролировали путем измерения ее размера в два раза в неделю. Размер опухоли рассчитывали по формуле: длина $\times$ ширина $\times$ высота $\times \frac{1}{2}$.

Препарат IMG853 проявил высокую активность в отношении опухоли KB с точки зрения торможения роста опухоли (Т/С = 0%) в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг (фиг. 12). У шести из шести мышей в группе 5,0 мг/кг и пяти из шести мышей в группе 2,5 мг/кг наблюдалась ПР с полным исчезновением опухоли к концу исследования (день 120). Доза 1,0 мг/кг показала активность, результирующее соотношение Т/С составило 37%, однако ни частичной, ни полной регрессии при ней не наблюдалось.

Пример 8.

Иммуногистохимическое окрашивание FOLR1 клеточных образцов, фиксированных в формалине и залитых парафином (ФФЗП) - автоматизированные способы окрашивания.

При анализе ИГХ окрашивания используются IVD реагенты класса I, в том числе антитела Novocastra FOLR1 (Novocastra/Leica Cat # NCI-L-FRalpha, клон BN3.2) в качестве исследуемого препарата и автоматизированное устройство для окрашивания Leica Bond RX. Связанный испытываемый или контрольный образец выявлялся путем инкубации с системой детектирования Leica Bond Refine, которая включает использование первичного реагента (кроличий антимышиный IgG), а затем реагента полимера (козий анти-кроличий полимер) и 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорида (ДАБ) хромогена. ФФЗП образцы окрашивали с указанной концентрацией первичного антитела (полученный разбавлением в Leica разбавителе FOLR1), как показано ниже.

Антитела для ИГХ

Исследуемый препарат i)	Альфа-рецепторы фолиевой кислоты (Novocastra/Leica Cat # NCI-L-FRalpha, Lot 159506), мышинные, клон BN3.2, жидкий концентрат: 75 мкг/мл
	IgG1 (Beckman Coulter Cat # 6602872, Lots 2S7SPS04-23 и 2S7SPS04-26.) концентрация исходного раствора: 1 мг/мл, мышинные, клон 2T8-2F5

Способ анализа ФФЗП посредством Leica Bond RX

Этап ⁱ⁾	Действие	Время
Термическая обработка	Температура: 60°C	30 минут
Депарафинизирование	С помощью раствора Bond Dewax	Fixed
	100% этанол	Fixed
Демаскирование антигена	Bond ER2	20 минут
Блок эндогенной пероксидазы	Пероксид (Компонент набора для очистки)	5 минут
Исследуемый препарат:	FOLR1 при 1,9 мкг/мл в разбавителе Leica	15 минут
Обнаружение	Пост-первичный реагент (Набор для очистки)	8 минут
	Полимер (Набор для очистки)	8 минут
	Смесь ДАБ (Набор для очистки)	10 минут
Контрастирующее окрашивание	Гематоксилин (Набор для очистки)	5 минут

Все окрашенные образцы исследовались и оценивались. Сначала исследовались контрольные образцы, затем тестовые образцы (срезы целиком и отдельные центральные фрагменты тканевых блоков). Для каждой исследуемой опухолевой ткани или конгломерата клеток производилось описание интенсивности окрашивания и соответствующих пропорций окрашенных клеток опухоли. Окрашивание, ассоциированное с мембранами, записывалось для каждого образца. В случае, если от одного пациента были получены дублирующие оценки, в анализ был включен только наивысший балл. Если при оценке регистрировалось окрашивание только цитоплазмы, окончательная оценка равнялась нулю (0). Интенсивность и однородность каждого образца подавались, как описано в таблице ниже. Интенсивность и картина распределения окрашивания были оценены по сравнению с контрольным окрашиванием IgG (неспецифическим). Интенсивность оценивали по шкале от 0 до 3 (0 = нет окрашивания, 1 = слабое, 2 = умеренное и 3 = сильное) а распределение было оценено как фокальное (<25% окрашенных клеток), неоднородное (25-75% окрашенных клеток) и однородное (>75% окрашенных клеток). В нормальной ткани при расчете интенсивности и пропорции рассматривались только определенные подструктуры.

ИГХ система оценки, состоящая из весов интенсивности и равномерности

Интенсивность (количество окрашивающего средства)		
Наблюдаемая интенсивность	Категория интенсивности	Оценка интенсивности
0	Негативная	0
0-1	Очень слабая	1
1	Слабая	
1-2	Слабая до умеренной	2
2	Умеренная	
2-3	Умеренная до сильной	3
3	Сильная	
Однородность (процент только окрашенных мембран клеток)		
0	Негативная	
Фокальная	<25%	
Неоднородная (гетерогенная)	25-75%	
Однородная (гомогенная)	> 75%	

ФФЗП образцы были получены из микромассивов опухоли, а также блоки человеческих тканей из семи различных опухолей, как описано ниже.

ФФЗП тестовые образцы: фрагменты тканевых блоков

Анатомическая область	Поставщик	№ в каталоге	Код	Количество образцов на одного пациента	Общее количество пациентов
Почка	Pantomics	KIC1501	PT-ARR-KID-122711-1	2	69
Легкое	Pantomics	LUC1501	PT-ARR-LNG-122711-1	2	70
Легкое	Tristar	69571059/TA1249	PT-ARR-OVA-122711-1	1	110
Яичник	Biochain	T8235725-5	PT-ARR-OVA-122111-1	1	62
Яичник	Pantomics	OVC1501	PT-ARR-OVA-122711-1	2	70
Яичник	Tristar	69571091/TA1322	PT-ARR-OVA-010912-	2	96
			1		
Матка (Эндо метрий)	Pantomics	EMC1501	PT-ARR-EME-122711-1	2	70
Различные органы	Pantomics	MTU481	PT-ARR-122711-1	1	48

ФФЗП тестовые образцы: срезы целиком

Орган	Код	Источник	Диагноз (из документации источника)
Яичник	1	Неизвестный	аденокарцинома эндометрия
	2	Proteogenex	аденокарцинома эндометрия
	3	CHTN	аденокарцинома смешанного типа со свойствами аденокарциномы эндометрия, серозной и светлоклеточной
	4	CHTN	аденокарцинома высокой степени дифференцировки смешанного типа с областями папиллярных, серозных, эндометрионидных и светлых клеток
	5	CHTN	серозная аденокарцинома папиллярного типа
	6	Proteogenex	серозная аденокарцинома
	7	Proteogenex	серозная аденокарцинома папиллярного типа
	8	Proteogenex	серозная аденокарцинома папиллярного типа
	9	CHTN	серозная аденокарцинома папиллярного типа
	10	Proteogenex	серозная аденокарцинома папиллярного типа
Легкое	1	CHTN	слабо дифференцированная аденокарцинома
	2	CHTN	ацинарная аденокарцинома, хорошо дифференцированная, со свойствами бронхиолоальвеолярной
	3	CHTN	аденокарцинома с муцинозными свойствами
	4	CHTN	аденокарцинома
	5	CHTN	аденокарцинома
	6	CHTN	аденокарциномы (бронхиолоальвеолярная) карцинома
	7	CHTN	аденокарцинома
	8	CHTN	аденокарцинома, умеренно дифференцированная, со свойствами светлоклеточной
	9	CHTN	аденокарцинома
	10	CHTN	плоскоклеточный рак

Клетки (опухолевые клетки или трансфицированные клетки) были зафиксированы формалином и залиты парафином (ФФЗП). При определении с помощью проточной цитометрии, ФФЗП клеточные конгломераты образцов показали различные диапазоны экспрессии FOLR1. В этом исследовании также были использованы нормальные человеческие ткани для положительного и отрицательного контроля и для

анализа специфичности. Конгломераты клеток показали различные уровни FOLR1, соответствующие оценки приведены ниже. В конгломератах клеток наблюдалась слабая корреляция между оценками окрашивания и соответствующими уровнями экспрессии FOLR1 (связанных антител на клетку, САК, определяется с помощью калиброванной проточной цитометрии). Например оценка 1-3 неоднородная была дана для SW620 и IGROV-1, показавших значения САК 40098 и 565481, соответственно. Кроме того, клетки Hela показали значение САК 1,5 млн при оценке 2-3 неоднородная, в то время как 300.19/FR1 показали значение САК 830003 при высокой оценке - 3 однородная.

Окончательные оценки для клеточных конгломератов при концентрации исследуемого препарата 1,9 мкг/мл

Клеточная линия	^a Значение САК	Оценка окрашивания
SW620	40098	1-3 неоднородная
T47D	97576	1-2 неоднородная
IGROV-1	565481	1-3 неоднородная
300,19 / FR1	830003	3 однородная
HELA	1500587	2-3 неоднородная
KB	4000000	3 однородная

^aПолученное значение САК представляет собой среднее значение связанных антител на клетку в популяции клеток и определяется следующим образом: используется концентрация $1,0 \times 10^{-8}$ М анти-FOLR1-PE (1:1) для определения значений САК соответствующей линии клеток посредством способов проточной цитометрии и Quantibrite™ Beads (BD Biosciences).

Гистограммы проточной цитометрии показывают распределение клеток по сравнению с числом анти-FOLR1 связей на клетку (уровень экспрессии FOLR1). И гистограммы, и соответствующие результаты ИГХ окрашивания показывают, что каждая из этих клеточных линий включает гетерогенную популяцию клеток, обладающих широким диапазоном экспрессии FOLR1. Исключением является клеточная линия 300.19/FR1, показавшая и равномерную гистограмму проточной цитометрии, и оценки ИГХ окрашивания. Эти данные свидетельствуют о том, что клеточные линии, экспрессирующие FOLR1 более равномерно, показывают более точную корреляцию между значениями САК и соответствующими оценками окрашивания. Хотя анализ показал положительное окрашивание всех FOLR1-позитивных контрольных конгломератов клеток, существует лишь слабая корреляция между оценкой окрашивания и соответствующими уровнями экспрессии FOLR1 большинства этих конгломератов клеток. Таким образом, клеточные конгломераты этой группы не могут быть идентифицированы как контрольные образцы с высокой, средней и низкой экспрессией. Типичные фотоизображения и гистограммы, показывающие экспрессию FOLR1 в клеточных линиях, определенную с помощью ИГХ и проточной цитометрии приведены на фиг. 13.

Для определения условий анализа был испытан диапазон разбавлений тестируемого и контрольного препарата с тем, чтобы выбрать разбавления, соответствующие требуемому уровню чувствительности. Эксперименты проводили на панели ФФЗП образцов, включая FOLR1-позитивные конгломераты клеток и фрагменты тканевых блоков, и ТМА, состоящие из FOLR1 положительных и отрицательных нормальных тканей (надпочечников (коры/мозгового вещества), молочной железы (протоков и долек/соединительной ткани), фаллопиевых труб (поверхностного эпителия/мышечной стенки), почек (канальцев/клубочков), легких (пневмоцитов I/II типа/межальвеолярной соединительной ткани), поджелудочной железы (каналов/островков Лангерганса), слюнных желез (каналов/стромы), кожи (потовых желез/эпидермиса), желудка (поверхностного эпителия/подслизистой)), и целых срезов опухолевых тканей (10 образцов опухолей яичников и 10 образцов опухолей легких). Каждый образец окрашивали с помощью серийных разбавлений концентрации тестируемого препарата (0,25, 0,5, 0,9, 1,9, 3,8 и 7,5 мкг/мл) или концентрации контрольного препарата 1,9 мкг/мл и 3,8 мкг/мл. Относительные интенсивности окрашивания для каждого разбавления сравнивались для каждого образца для определения оптимальной степени разбавления. Критерием для оптимальной степени разбавления было разбавление, которое 1) не вызывало окрашивания фона в окрашенных образцах с изотипическим контролем 2) не вызывало окрашивания ткани образца для отрицательного контроля, окрашенного тестовым препаратом и 3) показывало различие между разными уровнями ассоциированной с мембранами экспрессии FOLR1 среди образцов, представляющих интерес (ФФЗП ткани опухоли яичников, опухоли эндометрия, HMPJ и опухоли почки). Из пяти разбавлений тестируемого препарата концентрация 1,9 мкг/мл показала лучший динамический диапазон результатов окрашивания посредством автоматизированных протоколов Leica Bond RX (Протоколы термической обработки и депарафинизирования, протокол HIER посредством ER2 в течение 20 минут и протокол ИГХ окрашивания F с дополнительной промывкой).

Пример 9.

Идентификация и характеристика контрольных образцов, характеризующих динамический диапа-

зон анализа автоматизированных способов окрашивания Контроль качества: нормальные человеческие ткани слюнной железы, легких и поджелудочной железы были определены, как ткани для положительно-го контроля, используемые в каждом анализе, чтобы убедиться, что процедура окрашивания выполняется, как ожидалось. Нормальные ткани пищевода человека были идентифицированы в качестве отрицательного контроля. Эти контрольные образцы были охарактеризованы следующим образом: для того, чтобы обеспечить контроль, который охватывает динамический диапазон анализа, матричный мультитканевый блок (ММБ), состоящий из нескольких FOLR1 положительных и отрицательных образцов нормальной ткани должен обладать динамическим диапазоном анализа, использованного в качестве анализа проверки контроля во время фаз оптимизации и валидации. Четыре типа нормальных тканей с определенными структурами в этом ММБ были определены как соответствующие виды контроля для анализа следующим образом: дыхательный эпителий нормального человеческого легкого (оценка 2, однородная); протоки нормальной поджелудочной железы человека (оценка 3, однородная, апикальное окрашивание); промежуточные протоки нормальной человеческой слюнной железы (оценка 1-2 неоднородная) и нормальная ткань человеческого пищевода (оценка 0). Всего было проведено более 4 анализов, соответствующие контрольные анализы этого ММБ дали идентичные результаты. Эти результаты показывают, что выбранный контрольный образец дает устойчивые результаты и охватывает динамический диапазон анализа.

Структуры в нормальных тканях, определенные в качестве контроля,
охватывающего динамический диапазон анализа

Нормальный орган	Суб-структура	Оценка окрашивания (контрольный препарат)	Оценка окрашивания (тестируемый препарат)
Пищевод	Все структуры	0 (отрицательная)	0 (отрицательная)
Слюнная железа	Промежуточные протоки	0 (отрицательная)	1-2 неоднородная
Легкое	Дыхательный эпителий	0 (отрицательная)	2 однородная
Поджелудочная железа	Протоки	0 (отрицательная)	3 однородная, апикальное окраш.

Апикальное окрашивание определяется как поляризованное неоднородное окрашивание мембраны.

Пример 10.

Анализ эффективности автоматизированного способа окрашивания.

Использование данного анализа позволяет специфически обнаружить воспроизводимость FOLR1 и с соответствующей чувствительностью дифференцировать различные уровни и единообразие ассоциированной с мембранами экспрессии FOLR1 (оптимальный динамический диапазон) ФФЗП тканей опухоли яичников, эндометрия, НМРЛ и почек. Таким образом, критериями эффективности считаются специфичность, воспроизводимость и чувствительность.

Специфичность и чувствительность анализа оценивали путем сравнения окрашивания нормальных тканей с изучением результатов анализа, сообщавшихся ранее. Результаты окрашивания в этом исследовании были сопоставлены с соответствующими результатами окрашивания Scorer et al 2010 (A Full Immunohistochemical Evaluation of a Novel Monoclonal Antibody to Folate Receptor - alpha. The Novocastra Journal of Histopathology, REAGENTS: 2010(3):8-12, describing the same antibody clone BN3.2) с ФФЗП нормальной ткани и из исследования кросс-реактивности тканей (КРТ) посредством IMG853 (huMov19 (M9346A) антител) на свежемороженой нормальной ткани (ImmunoGen Report IMH28-003). Сравнение результатов окрашивания для каждого способа свидетельствует, что три анализа показали в целом аналогичные нормальные профили окрашивания тканей с различной относительной чувствительностью. Анализ Scorer оказался наименее чувствительным, анализ из исследования (IMH28-011) обладал промежуточной чувствительностью, способ исследования КРТ являлся наиболее чувствительным. Некоторые структуры показали положительное окрашивание только при использовании двух более чувствительных способов (анализа из исследования и КРТ анализа). Не было ни одного примера положительного окрашивания в наименее чувствительном анализе Scorer, который также не был положительным в анализе из исследования и при использовании способа КРТ. Данные результаты показывают, что специфичность и чувствительность анализа из исследования является подходящей для оценки FOLR1 экспрессии в нормальных тканях.

Специфичность и чувствительность анализа из исследования дополнительно характеризуется ок-

рашиванием и оценкой панели опухолевых ММБ, состоящей из клеток рака яичников, эндометрия, НМРЛ и рака почки (набор образцов предназначен для клинического использования анализа). Положительное окрашивание последовательно локализовалось в опухолевой ткани с прилегающими компонентами нормальной ткани, включая строму, сосуды, лимфоциты и нормальные ткани органа. Окрашивание было отрицательным или положительным, как и ожидалось. Для каждого подтипа карциномы яичника или НМРЛ распределение оценок окрашивания между ММБ различных производителей показало аналогичное распределение оценок, наводящее на мысль, что данный способ не чувствителен к различным условиям фиксации и обработки. Поскольку модели распределения среди ММБ были подобны, данные из различных блоков были объединены и оценки были классифицированы. Итоговые оценки для подтипов опухоли, включающие 20 или более образцов на подтип перечислены в следующих таблицах. Как показано в этих таблицах, динамический диапазон оценок отмечается для каждого типа опухоли и указывает, что этот анализ демонстрирует соответствующую чувствительность к различению разных уровней и различных видов однородности окрашивания экспрессии FOLR1, ассоциированной с мембранами в тканях опухоли яичников, эндометрия, НМРЛ и почек. Типичные фотоизображения серозной карциномы яичников, эндометриальной карциномы яичников, НМРЛ, рака эндометрия и почечноклеточной карциномы показаны на фиг. 14-18. Дополнительные фотографии, пригодные, например, для руководства по окрашиванию или диагностического набора, показаны на фиг. 23-25. Данные исследования показывают, что анализ является специфичным и обладает соответствующей чувствительностью для использования в качестве диагностического реагента или его дополнения.

Итоговые оценки окрашивания преобладающих подтипов опухолей яичников

<u>Подтип</u>	<u>Номер образца</u> (%)						
	Всего	≥ 3 неодн. 1)	≥ 2 неодн. 1)	≥ 1 неодн. 1)	1-3 фокальн.	Любой положит.	Отриц.
Эндометриальный	35	15	18	20	6	26	9
	(100)	(43)	(51)	(57)	(17)	(74)	(26)
Муцинозный	29	2	4	5	0	5	24
	(100)	(7)	(14)	(17)	(0)	(17)	(83)
Серозный	129	44	92	92	8	100	29
	(100)	(34)	(71)	(71)	(6)	(78)	(22)

¹⁾ Фокальный характер окрашивания был исключен

Итоговые оценки окрашивания опухоли НМРЛ

<u>Тип</u>	<u>Подтип</u>	<u>Номер образца</u> (%)						
		Всего	≥ 3 неодн. 1)	≥ 2 неодн. 1)	≥ 1 неодн. 1)	1-3 фокальн.	Любой положит.	Отриц.
Адено-карцинома	Все^B	67	17	39	42	5	47	20
		(100)	(25)	(58)	(63)	(7)	70	30
	Бронхиолоальвеолярная	7	2	5	5	0	5	2
		(100)	(29)	(71)	(71)	(0)	(71)	(29)
Плоскоклеточный рак	Все	74	1	4	6	6	12	62
		(100)	(1)	(5)	(8)	(8)	(16)	(84)

¹⁾ Фокальный характер окрашивания был исключен

Включены все образцы аденокарциномы, за исключением указанного типа образцов бронхиолоальвеолярной карциномы.

Итоговые оценки окрашивания для аденокарциномы
эндометрия и светлоклеточного рака почки

Тип / подтип опухоли	Количество образцов (%)						
	Всего	≥ 3	≥ 2	≥ 1	1-3	Любой	Отриц.
		неодн. 1)	неодн. 1)	неодн. 1)	фокальн.	положит.	
Эндометрий / аденокарциномы	58	5	23	30	10	40	18
	(100)	(9)	(40)	(52)	(17)	(69)	(31)
Почки / Светлоклеточный рак	34	0	9	23	6	29	5
	(100)	(0)	(26)	(68)	(18)	(85)	(15)

Фокальный характер окрашивания был исключен.

Точность анализа исследования изучали путем выполнения теста внутренней и внешней воспроизводимости анализа посредством трех ФФЗП образцов опухоли ткани яичников, НМРЛ или рака почки, где каждый образец показывал высокую, среднюю или низкую оценки. Для оценки внутренней воспроизводимости девять стекол, каждое из которых содержало срез опухоли легкого, яичника и почки были помещены в девять случайных мест на Leica Bond RX. Для оценки внешней воспроизводимости три стекла, содержащих срезы одного и того же образца окрашивали в три различных дня. Все стекла после проведения экспериментов внутренней и внешней воспроизводимости были оценены и показали эквивалентные оценки окрашивания для каждого соответствующего образца: опухоль легких (высокая: 3 однородная), опухоль яичников (средняя: 2 неоднородная) и опухоль почки (низкая: 1-2 неоднородная). Полученные данные демонстрируют воспроизводимость для разных типов тканей с низким, средним и высоким уровнем экспрессии.

Пример 11.

Экспрессия FOLR1 с ИГХ оценкой ≥ 2 гетерогенная является критерием отбора пациентов для лечения с применением IMGN853.

Уровни экспрессии FOLR1 опухолевых клеточных линий были определены посредством конъюгата антитело-PE (FR1-24-PE) и системы QuantiBRITE. Три клеточных линии карциномы яичников (IGROV-1, Skov-3 и Ovcар-3), линия клеток хориокарциномы Jeg-3 и клеточная линия карциномы шейки матки KB были включены в исследование. Для того чтобы получить заслуживающие доверия значения САК, эксперименты по связыванию с конъюгатом антитело-PE следует проводить при насыщающей концентрации (концентрации, при которой все доступные сайты связывания заняты конъюгатом). Для определения такой концентрации для конъюгатов FR1-24-PE мы провели эксперименты по связыванию на панели FOLR1-позитивных клеточных линий с различными уровнями экспрессии FOLR1. Клетки инкубировали с FR1-24-PE конъюгатом в широком диапазоне концентраций в течение двух часов на льду, промывали ФАС-буфером (ФСБ с 1% БСА), фиксировали 1% формальдегидом в ФСБ и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur. При концентрации 1×10^{-8} М конъюгат насыщает сайты связывания на клеточной поверхности всех протестированных линий клеток Igrov-1, Jeg-3, Skov-3, Ovcар-3 и KB. В последующих экспериментах на связывание FR1-24-PE и определение САК, конъюгаты использовались в концентрации 1×10^{-8} М. Каждый образец поддавался троекратному анализу, на каждой клеточной линии выполнялось несколько независимых экспериментов. Самые высокие значения экспрессии были обнаружены на клетках KB со значением САК приблизительно 4000000 ± 3000000 , затем шли клеточные линии IGROV-1 и Jeg-3 со значениями САК 4000000 ± 85000 и 150000 ± 75000 , соответственно. Две клеточных линии, Skov-3 и Ovcар-3 показали низкий уровень экспрессии FOLR1, 20000 ± 10000 и 7000 ± 4000 САК соответственно. Значительные изменения значений САК от эксперимента к эксперименту наблюдали для клеточной линии Jeg-3, где значения САК варьировали от 40000 до 300000. Эта вариабельность скорее всего отражает некоторые биологические свойства клеточной линии, а не вариабельность анализа, так как значения САК, полученные для других проанализированных клеточных линий были гораздо менее вариабельны (см. табл. ниже).

Клеточная линия	САК (Среднее $\pm$ SD, n) ¹⁾	Изменения от эксперимента к эксперименту	
		Самый высокий зарегистрированный уровень САК	Самый низкий зарегистрированный уровень САК
KB	4000000 $\pm$ 300000, 4	4500000	3800000
IGROV-1	400 000 $\pm$ 85 000, 5	480000	280000
Jeg-3	150 000 $\pm$ 75 000, 14	260000	40000
Skov-3	20 000 $\pm$ 10 000	28000	10000
Ovcar-3	7000 $\pm$ 4000	10000	4000

¹⁾SD - стандартное отклонение, n - количество независимых экспериментов

Значения САК были определены с помощью анализа на основе ФАС с FR1-24 PE-меченными антителами и системы QuantiBRITE. Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD) было рассчитано для независимых экспериментов.

Активность и специфичность IMGN853 были проанализированы с FOLR1-позитивными клеточными линиями с широким спектром экспрессии FOLR1 (значения САК клеточных линий указаны выше). Кроме того, в эксперименты были включены FOLR1-негативные клеточные линии Namalwa и SW2. IMGN853 показал высокую цитотоксичность против клеток KB с повышенной экспрессией FOLR1 (4000000 $\pm$ 300000 САК), Igrov-1 (400000 $\pm$ 85000 САК) и Jeg-3 (150000 $\pm$ 75000 САК), при этом значения ИК₅₀ составляли 0,10 $\pm$ 0,01 нМ, 0,50 $\pm$ 0,07 нМ и 1,00 $\pm$ 0,05 нМ, соответственно. Активность лизиса клеток в отношении всех трех клеточных линий зависела от FOLR1, так как избыток немодифицированного huMov19 (M9346A) антитела (0,5 мкМ) заметно уменьшал активность конъюгата для типичных неспецифических уровней (от 10 до 20 раз). IMGN853 показал только незначительную активность в отношении слабоэкспрессирующих FOLR1 клеток Skov-3 и Ovcar-3 (20000 $\pm$ 10000 и 7000 $\pm$ 4000 САК соответственно), а также против FOLR1-негативных клеток Namalwa и SW2, при значениях ИК₅₀, превышающих 2 нМ. Цитотоксическая активность IMGN853 против этих клеточных линий была низкой и не FOLR1-зависимой, блокирование huMov19 (M9346A) не затрагивало ее. См. фиг. 19 и 20.

ФФЗП образцы, полученные из мышинных моделей ксенотрансплантата опухоли оценивались на FOLR1 положительность, используя оптимизированные и утвержденные способы анализа, описанного выше. Окрашивание не было замечено в опухолевых клетках любого образца ксенотрансплантата, окрашиваемого контрольным препаратом. ФФЗП ткани ксенотрансплантата мыши, полученные из следующих клеточных линий показали такие модели окрашивания: Igrov-1, KB и NCI-H2110 показали однородную модель окрашивания 3-го уровня интенсивности; Ishikawa и Ovcar 3 показали неоднородную модель окрашивания 3-го уровня интенсивности; LXFA737 показал однородную модель окрашивания с уровнем интенсивности 2; OV-90 показал неоднородную модель с уровнем интенсивности 2, SKOV3 показал отрицательное значение. Типичные фотоизображения ксенотрансплантатов опухоли приведены на фиг. 21 и 22.

Родительская клеточная линия или фрагмент опухоли	Тип заболевания	Окончательная оценка	Категория окрашивания
IGROV-1	Рак яичников	1-3 однородная	3 однородная
		1-3 однородная	
		1-3 однородная	
Ishikawa	Рак эндометрия	2-3 неоднородная	3 неоднородная
		1-2 неоднородная / 3 Фокальная	
		2 неоднородная / 3 Фокальная	
		2 неоднородная / 3 Фокальная	
KB	Рак шейки матки	3 однородная	3 однородная
		3 однородная	
LXFA737	HMPJI	2 однородная	2 однородная
		2 однородная	
NCI-H2110	HMPJI	2-3 однородная	3 однородная
		2 однородная	
OV-90	Рак яичников	1-2 неоднородная	2 неоднородная
		отрицательная ^a	
OVCAR3	Рак яичников	1-3 неоднородная	3 неоднородная
		1-3 неоднородная	
SKOV-3	Рак яичников	Отриц.	Отриц.
		Отриц.	

Порог окрашивания (≥ 2 неоднородная) требует минимального уровня экспрессии (интенсивность окрашивания) и минимального распределения окрашивания (процент опухолевых клеток, экспрессирующих FOLR1). Доклинические данные предоставляют обоснование для этого порога у карциномы яичников. Образцы опухоли мышинного ксенотрансплантата с баллами ИГХ ≥ 2 неоднородная показали чувствительность к IMGN 853 в условиях *in vivo*. ФФЗП образцы, полученные из мышинных моделей ксенотрансплантата опухоли оценивались на FOLR1 положительность, используя оптимизированные и утвержденные способы анализа, описанного выше. Две модели ксенотрансплантата карциномы яичников OVCAR-3 и IGROV-1 показали неоднородное или однородное окрашивания 3-го уровня интенсивности. Модель ксенотрансплантата, полученная из клеток карциномы яичников OV-90 показала неоднородное окрашивание с оценкой уровня интенсивности 2; модель карциномы яичников Skov-3 оказалась FOLR1-отрицательной. Высокая активность EVIGN853 была проявлена на двух моделях яичников с уровнем 3 FOLR1 интенсивности, активность OV-90 модели составила 2 уровень FOLR1 интенсивности. Skov-3 модель не показывала никакой активности. Модели ксенотрансплантата оценивали также для других заболеваний, включая легкие, эндометрию и опухоли шейки матки, и, хотя была обнаружена корреляция

между активностью и FOLR1 оценкой окрашивания, должны быть проверены дополнительные образцы.

Чувствительность модели ксенотрансплантата опухолей яичников к EVIGN853 против уровня экспрессии FOLR1.

Ксенотрансплантат	Активность in vivo (5 мг/кг IMGN853, разовая доза)	Оценка интенсивности, тип распределения
OVCAR3	Высокая активность	3 неоднородная
IGROV-1	Высокая активность	3 однородная
OV-90	Активность	2 неоднородная
SKOV-3	Неактивный	Негативный результат

Чувствительность модели ксенотрансплантата опухолей к IMGN853 против уровня экспрессии FOLR1

Ксенотрансплантат	Тип опухоли	Активность in vivo (5 мг/кг IMGN853, разовая доза)	Оценка интенсивности, тип распределения
NCI-H2110	НМРЛ	Высокая активность	3 однородная
Ishikawa	Эндометрия	Препарат неактивный	2 однородная
KB	Шейки матки	Высокая активность	3 однородная

Все публикации, патенты, патентные заявки, интернет-сайты и инвентарные номера/базы данных последовательностей (включая полинуклеотидные и полипептидные последовательности), приведенные в данном документе, включены путем ссылки во всей их полноте для всех целей и в такой же степени, как если бы о каждой отдельной публикации, патенте, патентной заявке, интернет-сайте или инвентарном номере/последовательности базы данных было специально и отдельно указано, что они применяются в качестве ссылки.

Последовательности.

SEQ ID NO: 1 - человеческий рецептор фолиевой кислоты 1

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQ
CRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLEYECSPNL
GPWIIQQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNK
CAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVA
RFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

SEQ ID NO: 2 - человеческий рецептор фолиевой кислоты 1, последовательность нуклеиновой кислоты

atggctcagcgatgacaacacagctgctgctccttctagtgtgggtggctgtagtagggaggctcagacaaggattgcatgggccagg
actgagcttctcaatgtctgcatgaacgccaagcaccacaaggaaaagccaggccccgaggacaagttgcatgagcagtgctgacccctgg
aggaagaatgcctgctgttctaccaacaccagccaggaagcccataaggatgttctacctatatagattcaactggaaccactgtggaga
gatggcacctgcctgcaaacggcattcatccaggacacctgcctctacgagtgtccccaaactggggccctggatccagcaggtggat
cagagctggcgcaaagagcgggtactgaacgtgcccctgtgcaaagaggactgtgagcaatggtgggaagattgtcgcacctcctacac
ctgcaagagcaactggcacaagggctggaactggacttcagggttaacaagtgcgcagtgggagctgcctgccaacctttcatttctact
tccccacaccactgttctgtgcaatgaaatctggactcactcctacaaggtcagcaactacagccgaggagtgggcctgcatccagat
gtggttcgacccagcccaggggcaacccaatgaggaggtggcgaggttctatgctgcagccatgagtggggctgggcccctgggcagcct
ggccttctctgcttagcctggccctaattgctgtgtggctgctcagc

SEQ ID NO:3 - huMov19 vHC

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGD
T FYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVT
VSS

SEQ ID NO: 4 - huMov19 vLCv1.00

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEA
GVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO: 5 - huMov19 vLCv1.60

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEA
GVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации рака как с вероятностью реагирующего на анти-FOLR1 иммуноконъюгат, включающий:

(а) приведение биологического образца, содержащего клетки указанного рака, в контакт с антителом для обнаружения или его антигенсвязывающим фрагментом, которое специфически связывается с FOLR1;

(б) определение связывания антитела для обнаружения или его антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом стадии (а) с использованием способа обнаружения, различающего интенсивность и однородность окрашивания; и

(в) оценку связывания, указанного на стадии (б),
причем оценка интенсивности окрашивания FOLR1, составляющая 2 или более в по меньшей мере 25% клеток в образце опухоли от субъекта с использованием способа обнаружения, идентифицирует

указанный рак как с вероятностью реагирующий на анти-FOLR1 иммуноконъюгат.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный анти-FOLR1 иммуноконъюгат определяется формулой (A)-(L)-(C), где:

(A) включает терапевтическое анти-FOLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий GYFMN (SEQ ID NO: 6); CDR2 тяжелой цепи, содержащий RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7); и CDR3 тяжелой цепи, содержащий YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 8) и CDR1 легкой цепи, содержащий KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 9); CDR2 легкой цепи, содержащий RASNLEA (SEQ ID NO: 10); и CDR3 легкой цепи, содержащий QQSREYPYT (SEQ ID NO: 11),

(L) включает линкер,

(C) включает цитотоксический агент, и
при этом (L) связывает (A) с (C).

3. Способ идентификации опухоли как чувствительной к терапии анти-FOLR1 иммуноконъюгатом, включающий:

(а) измерение уровня экспрессии FOLR1 в образце опухолевой ткани, полученном из указанной опухоли, с использованием антитела для обнаружения или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с FOLR1, где указанное измерение включает использование способа обнаружения, различающего интенсивность окрашивания в образце рака, экспрессирующего FOLR1, по сравнению с интенсивностью окрашивания одного или более референсных образцов;

(б) определение оценки интенсивности окрашивания FOLR1 для указанного образца опухолевой ткани; и

(в) сравнение оценки интенсивности окрашивания FOLR1, определенной на этапе (б) с референсным значением, которое определяется путем измерения экспрессии белка FOLR1 в по меньшей мере одном референсном образце, где указанный по меньшей мере один референсный образец представляет собой образец ткани, клетки или клеточного конгломерата, не чувствительный к терапии анти-FOLR1 иммуноконъюгатом,

причем оценка интенсивности окрашивания FOLR1 указанного образца опухолевой ткани, определенная на этапе (б) и являющаяся более высокой, чем указанное референсное значение, идентифицирует данную опухоль как чувствительную к терапии анти-FOLR1 иммуноконъюгатом,

причем указанный анти-FOLR1 иммуноконъюгат определяется формулой (A)-(L)-(C), где:

(A) включает терапевтическое анти-FOLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий GYFMN (SEQ ID NO: 6); CDR2 тяжелой цепи, содержащий RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7); и CDR3 тяжелой цепи, содержащий YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 8) и CDR1 легкой цепи, содержащий KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 9); CDR2 легкой цепи, содержащий RASNLEA (SEQ ID NO: 10); и CDR3 легкой цепи, содержащий QQSREYPYT (SEQ ID NO: 11),

(L) включает линкер,

(C) включает цитотоксический агент, и
при этом (L) связывает (A) с (C).

4. Способ идентификации рака яичников как с вероятностью реагирующего на анти-FOLR1 иммуноконъюгат, включающий:

(а) приведение биологического образца, содержащего клетки указанного рака, в контакт с антителом для обнаружения или его антигенсвязывающим фрагментом, которое специфически связывается с FOLR1; и

(б) определение связывания антитела для обнаружения или его антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом стадии (а) с использованием иммуногистохимического (ИГХ) способа обнаружения, различающего интенсивность и однородность окрашивания FOLR1;

причем оценка интенсивности окрашивания FOLR1, составляющая 2 или более в более чем 75% клеток биологического образца, идентифицирует указанный рак яичников как вероятно чувствительный к анти-FOLR1 иммуноконъюгату;

причем указанный анти-FOLR1 иммуноконъюгат определяется формулой (A)-(L)-(C), где:

(A) включает терапевтическое анти-FOLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий GYFMN (SEQ ID NO: 6); CDR2 тяжелой цепи, содержащий RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7); и CDR3 тяжелой цепи, содержащий YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 8) и CDR1 легкой цепи, содержащий KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 9); CDR2 легкой цепи, содержащий RASNLEA (SEQ ID NO: 10); и CDR3 легкой цепи, содержащий QQSREYPYT (SEQ ID NO: 11),

(L) включает линкер,

(C) включает цитотоксический агент, и
при этом (L) связывает (A) с (C).

5. Способ по любому из пп.2-4, отличающийся тем, что линкер выбран из группы, состоящей из: нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера и линкера на основе дикарбоновых кислот.

6. Способ по любому из пп.2-4, отличающийся тем, что линкер представляет собой расщепляемый линкер.

7. Способ по любому из пп.2-4, отличающийся тем, что линкер выбран из группы, состоящей из: N-

сукцинимидил 4-(малеимидометил) циклогексанкарбоксилата (SMCC), N-сульфосукцинимидил 4-(малеимидометил) циклогексанкарбоксилата (сульфо-SMCC), N-сукцинимидил-4-(иодоацетил)-аминобензоата (SIAB); N-сукцинимидил-[(N-малеимидопропионамидо)-тетраэтиленгликоль] эфира (NHS-PEG4-малеимид); N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)пентаноата (SPP); N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)-2-сульфопентаноата (сульфо-SPP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)бутаноата (SPDB); и N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноата (сульфо-SPDB).

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что расщепляемый линкер представляет собой N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB).

9. Способ по любому из пп.2-7, отличающийся тем, что цитотоксический агент выбран из группы, состоящей из: майтансиноида, аналога майтансиноида, бензодиазепина, таксоида, CC-1065, аналога CC-1065, дуокармицина, аналога дуокармицина, калихеамицина, доластатина, аналога доластатина, ауристатина, производного томаимицина и производного лептомицина, или пролекарства указанного цитотоксического агента.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанный цитотоксический агент представляет собой майтансиноид.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что указанный цитотоксический агент представляет собой N(2')-деацетил-N-(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтансин (DM1) или N(2')-деацетил-N(2')-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин (DM4).

12. Способ по любому из пп.2-11, отличающийся тем, что терапевтическое анти-FOLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 3 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 4 или 5.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что терапевтическое анти-FOLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (i) тяжелую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, как и аминокислотная последовательность тяжелой цепи, кодируемой плазмидой, депонированной в ATCC как PTA-10772, и (ii) легкую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, как и аминокислотная последовательность легкой цепи, кодируемой плазмидой, депонированной в ATCC как PTA-10773 или PTA-10774.

14. Способ по любому из пп.2-4, отличающийся тем, что терапевтическое анти-FOLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 3 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 4 или 5, причем линкер представляет собой N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноата (сульфо-SPDB), и при этом цитотоксический агент представляет собой N(2')-деацетил-N(2')-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин (DM4).

15. Способ по любому из пп.2-4, отличающийся тем, что терапевтическое анти-FOLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (i) тяжелую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, как и аминокислотная последовательность тяжелой цепи, кодируемой плазмидой, депонированной в ATCC как PTA-10772, и (ii) легкую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, как и аминокислотная последовательность легкой цепи, кодируемой плазмидой, депонированной в ATCC как PTA-10774, причем линкер представляет собой N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноата (сульфо-SPDB), и при этом цитотоксический агент представляет собой N(2')-деацетил-N(2')-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин (DM4).

16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что антитело для обнаружения или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GYFMN (SEQ ID NO: 6); CDR2 тяжелой цепи, содержащий RIHPYDGDFTFYNQKFQ (SEQ ID NO: 7); и CDR3 тяжелой цепи, содержащий YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 8) и CDR1 легкой цепи, содержащий KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 9); CDR2 легкой цепи, содержащий RASNLEA (SEQ ID NO: 10); и CDR3 легкой цепи, содержащий QQSREYPYT (SEQ ID NO: 11).

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что антитело для обнаружения или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 3 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 4 или 5.

18. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что антитело для обнаружения или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой BN3.2.

19. Способ по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что антитело для обнаружения или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит реагент для обнаружения, выбранный из группы, состоящей из: фермента, флуорофора, радиоактивной метки и люминофора.

20. Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что указанный способ обнаружения выполняется с помощью автоматизированной системы.

21. Способ по любому из пп.1-3 и 5-20, отличающийся тем, что указанный способ обнаружения является иммуногистохимическим (ИГХ).

22. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что оценка интенсивности окрашивания FOLR1, составляющая 2 или более в более чем 75% клеток биологического образца, идентифицирует указанный рак как с вероятностью реагирующий на анти-FOLR1 иммуноконъюгат, идентифицирует опу-

холь как чувствительную к терапии анти-FOLR1 иммуноконъюгатом или идентифицирует рак яичников как с вероятностью реагирующий на анти-FOLR1 иммуноконъюгат.

23. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что оценка интенсивности окрашивания FOLR1, составляющая 3 в по меньшей мере 25% клеток, идентифицирует указанный рак как с вероятностью реагирующий на анти-FOLR1 иммуноконъюгат, идентифицирует опухоль как чувствительную к терапии анти-FOLR1 иммуноконъюгатом или идентифицирует рак яичников как с вероятностью реагирующий на анти-FOLR1 иммуноконъюгат.

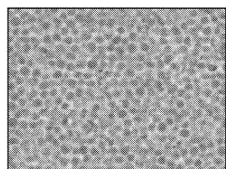
24. Способ по любому из пп.1-3 и 5-23, отличающийся тем, что указанная опухоль или рак представляет собой опухоль эндометрия или рак эндометрия.

25. Способ по любому из пп.1-3 и 5-23, отличающийся тем, что указанная опухоль или рак представляет собой опухоль яичников или рак яичников.

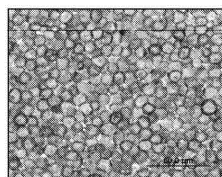
26. Способ по любому из пп.1-3 и 5-23, отличающийся тем, что указанная опухоль или рак представляет собой опухоль брюшной полости или рак брюшной полости.

27. Способ по любому из пп.1-3 и 5-23, отличающийся тем, что указанная опухоль или рак представляет собой немелкоклеточную раковую опухоль легких (НМРЛ) или НМРЛ.

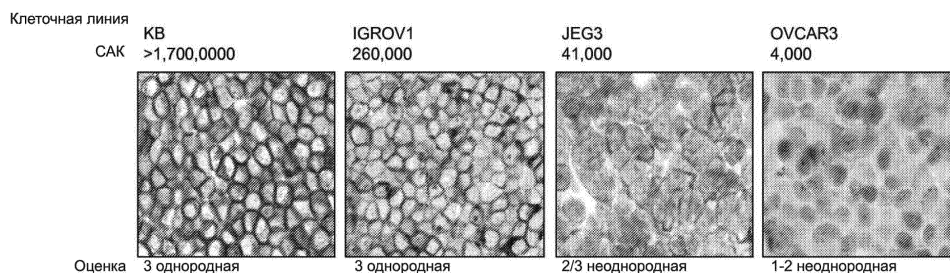
A. 300-19 клетки



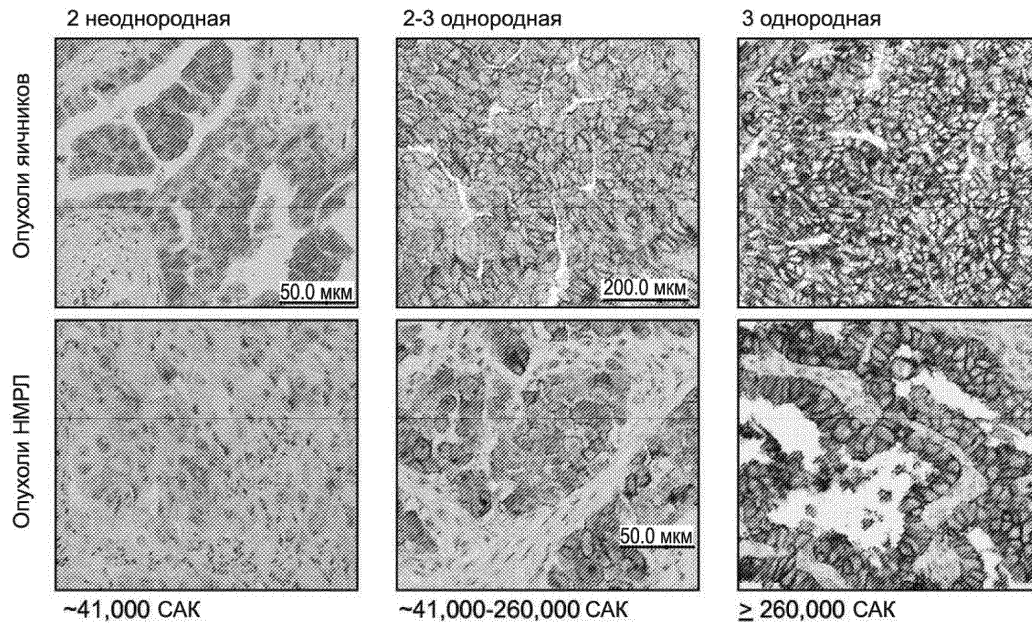
B. 300-19 клетки, трансфицированные FOLR1



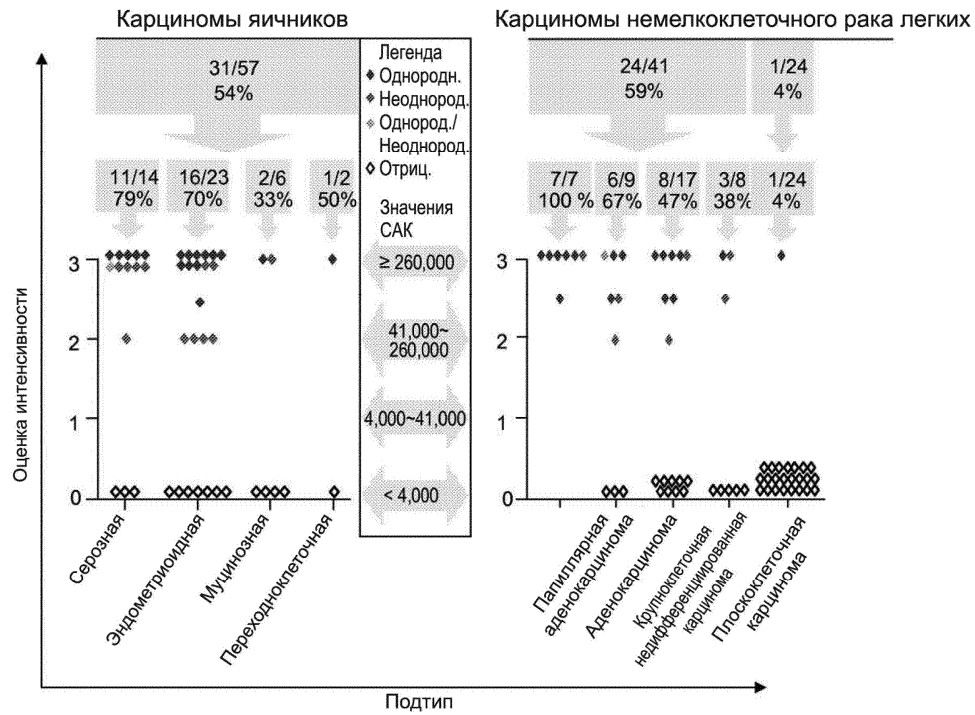
Фиг. 1



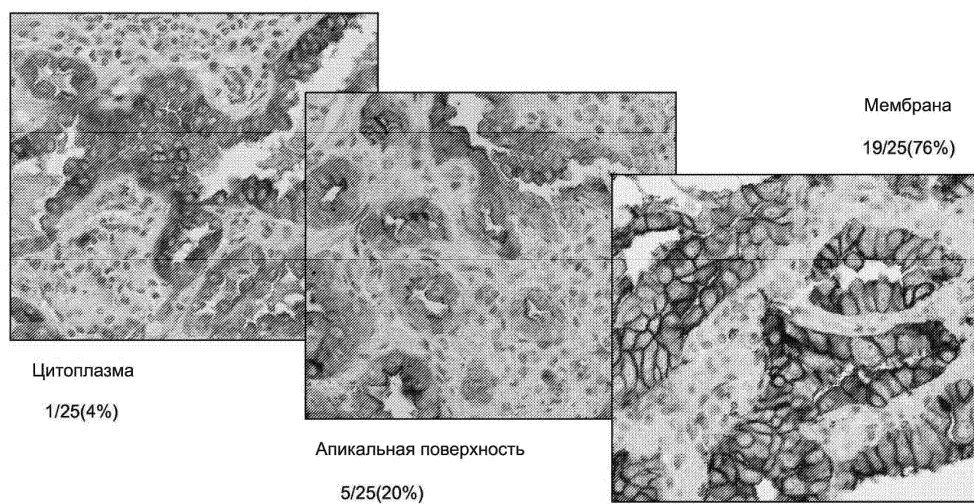
Фиг. 2



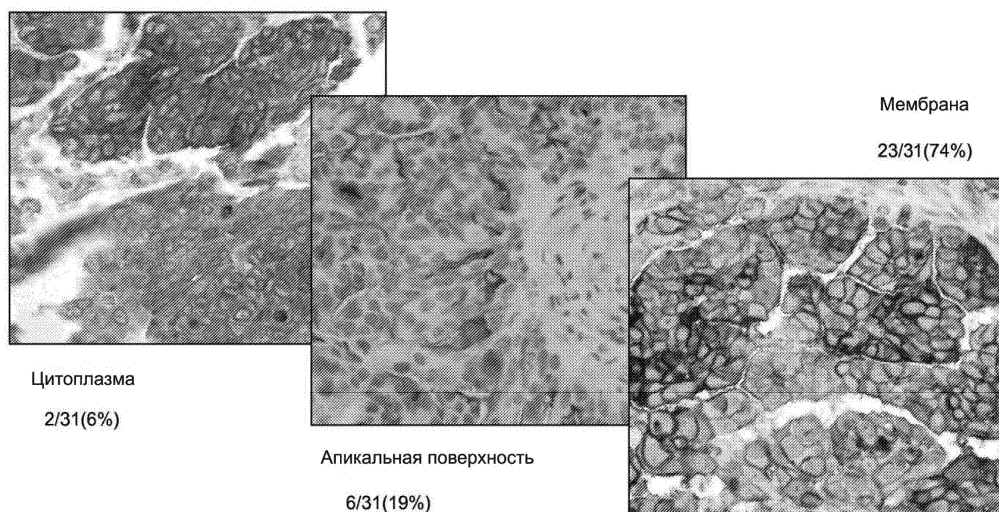
Фиг. 3



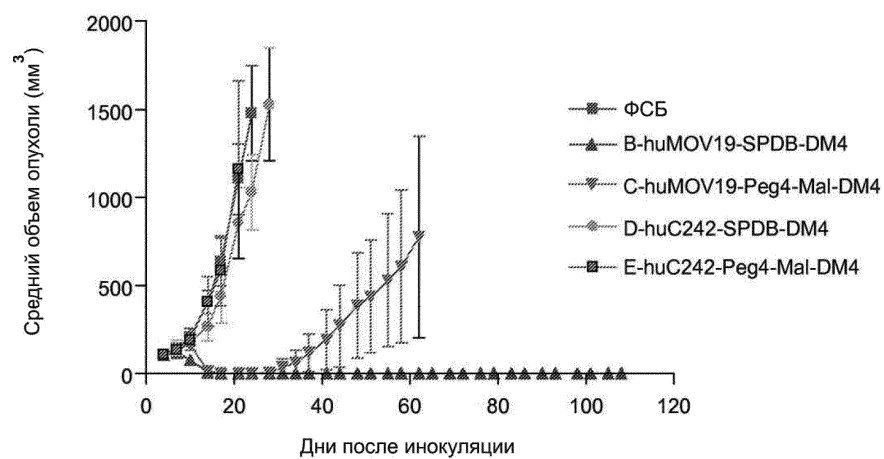
Фиг. 4

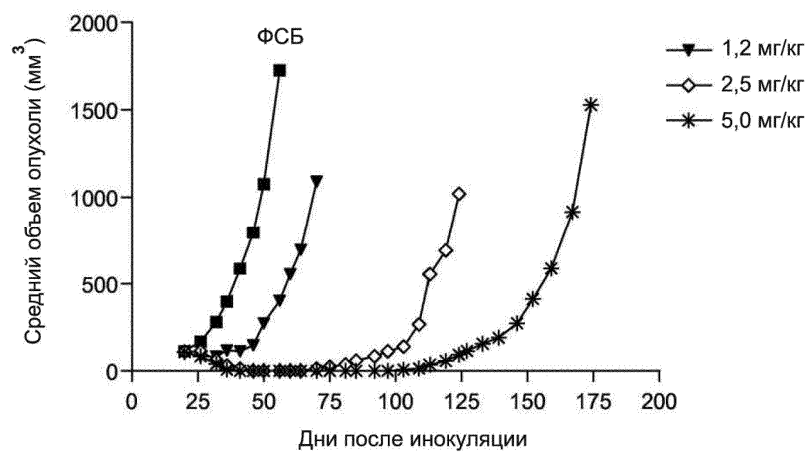


Фиг. 5

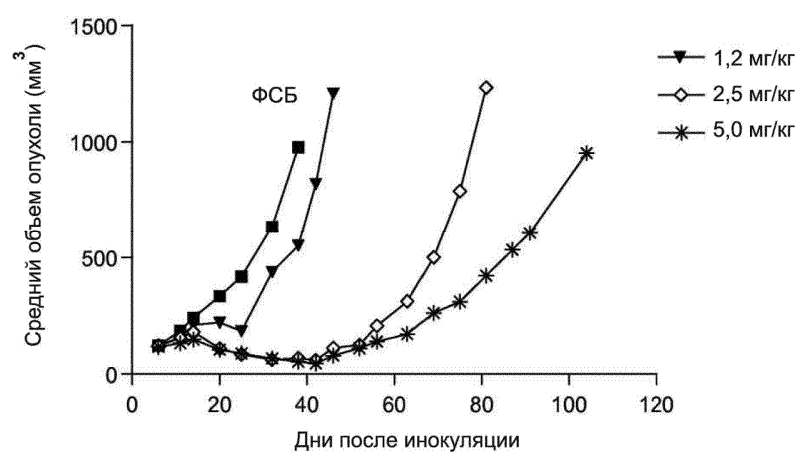


Фиг. 6

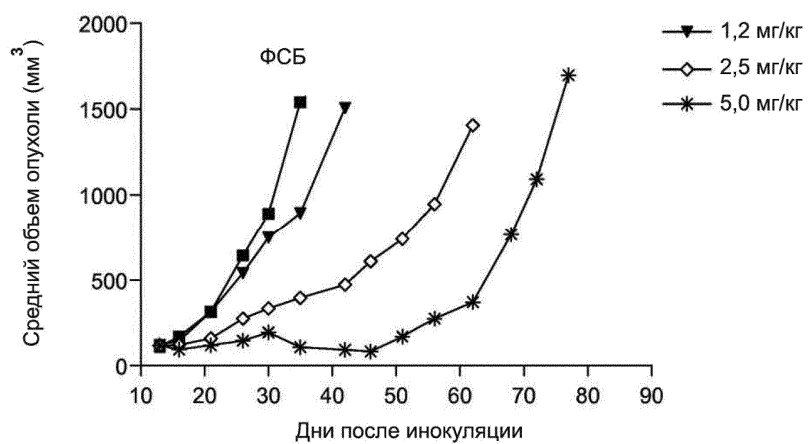




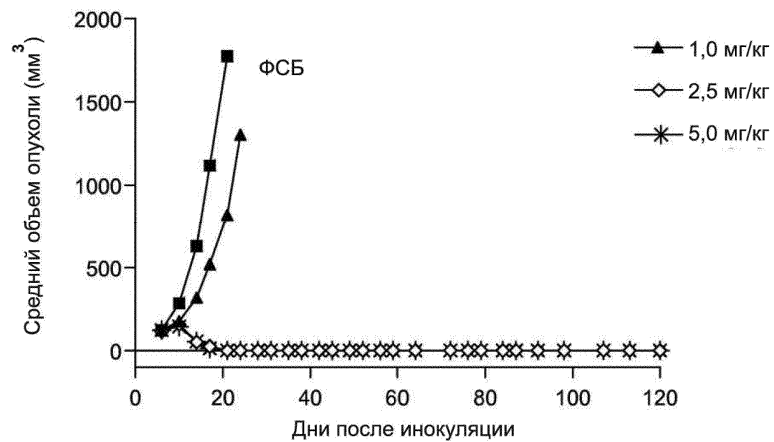
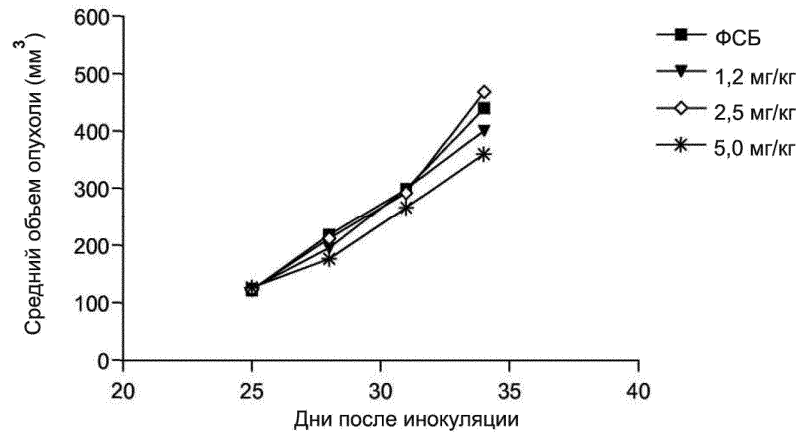
Фиг. 8



Фиг. 9



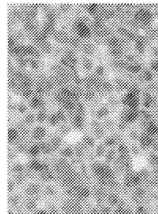
Фиг. 10



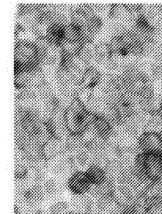
SW620 (40 098 САК)
1-3 неодн. (1,9 мкг/мл)



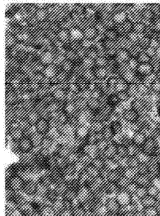
T47D (97 576 САК)
1-2 неодн. (1,9 мкг/мл)



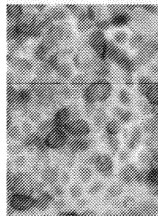
IGROV-1 (565 481 САК)
1-3 неодн. (1,9 мкг/мл)



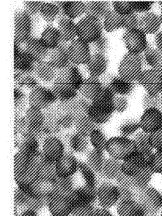
300.19/FR1 (830 003 САК)
3 однор. (1,9 мкг/мл)



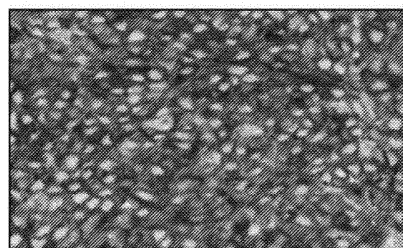
Hela (1 500 587 САК)
2-3 неодн. (1,9 мкг/мл)



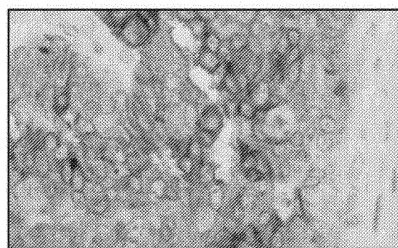
KB (~4 000 000 САК)
3 однор. (1,9 мкг/мл)



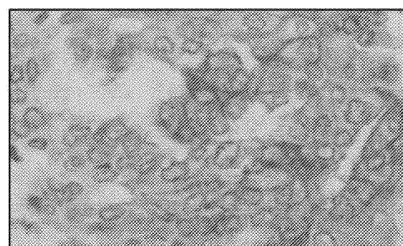
Фиг. 13



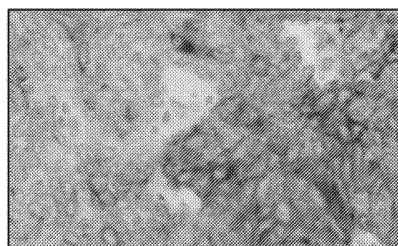
3 однор. (core H13, Pantomics)



2-3 однор. (core G03, Pantomics)

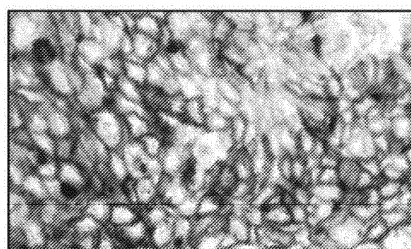


2 однор. (core A07, Pantomics)

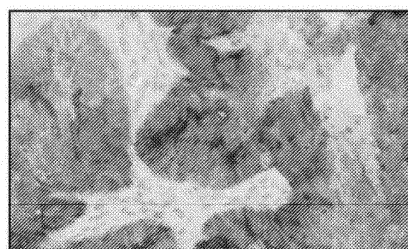


2 неоднор. (core D08, Pantomics)

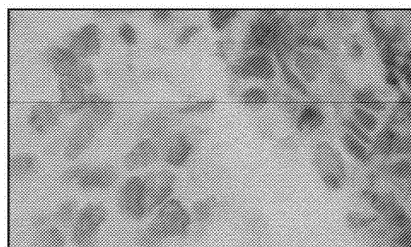
Фиг. 14



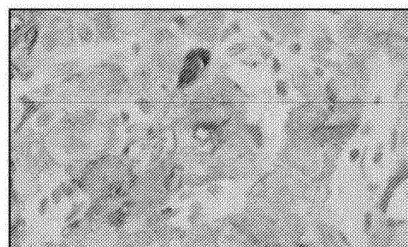
3 однор. (core A12, Pantomics)



2-3 однор. (P-T-OVA-032610-1)

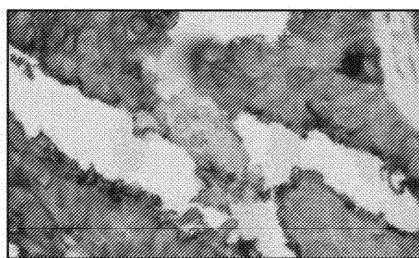


3 фокальн. (core E11, Pantomics)

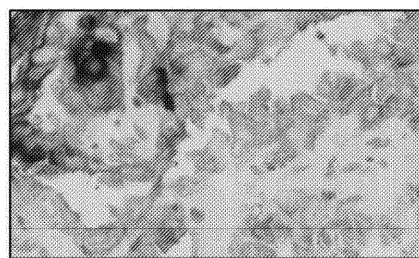


1-2 неоднор. (core G14, Pantomics)

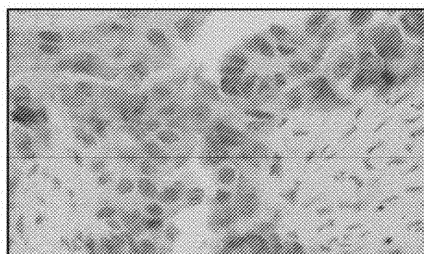
Фиг. 15



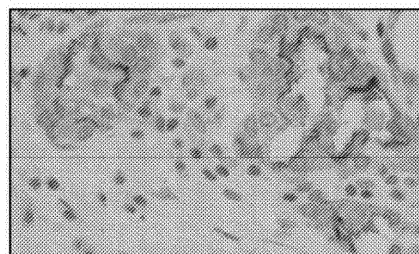
3 однор. (core F03, Pantomics)



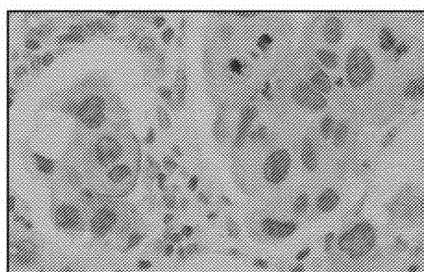
2-3 однор. (core J05, Pantomics)



2 неодн. (core 29, Tristar)

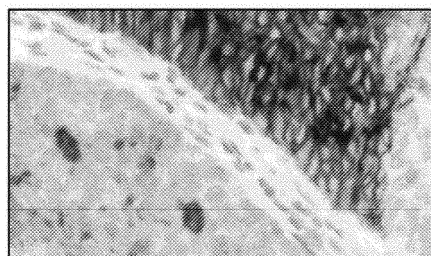


2 однор. апикальн. (core G10, Pantomics)

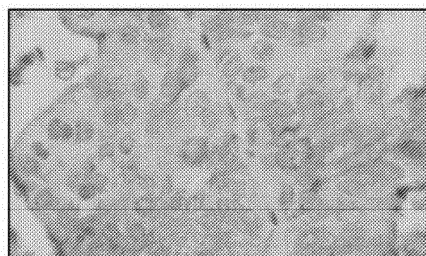


1-2 неодн. (core H15, Pantomics)

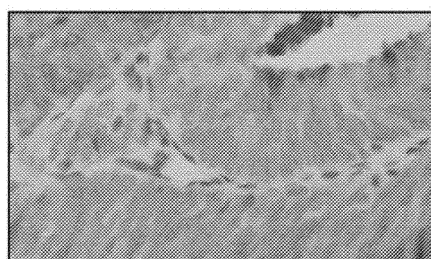
Фиг. 16



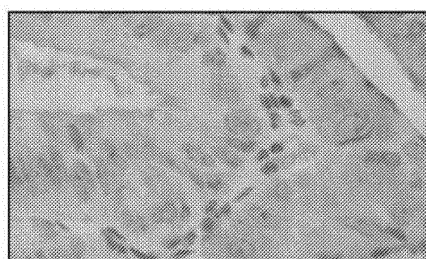
3 неоднор. (core I04, Pantomics)



2 неоднор. (core G08, Pantomics)

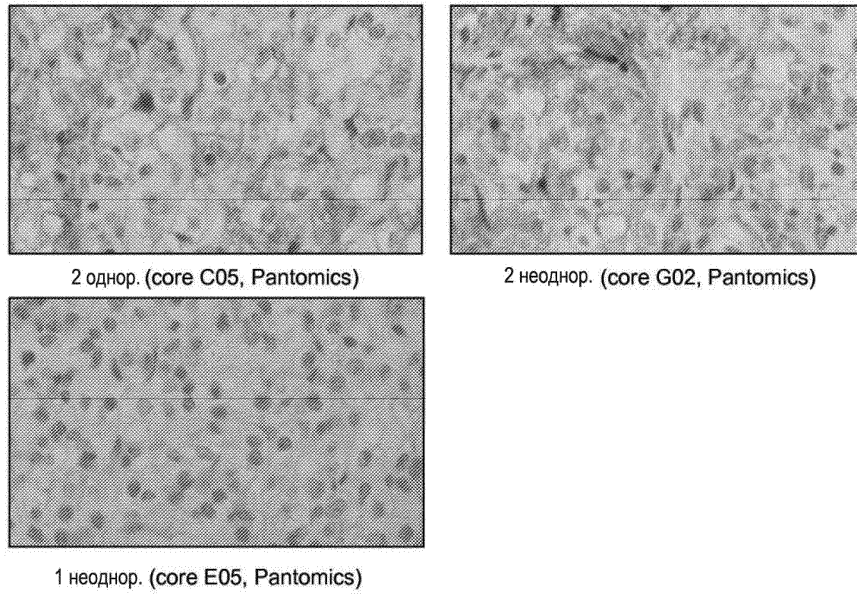


2 неоднор. (core G10, Pantomics)

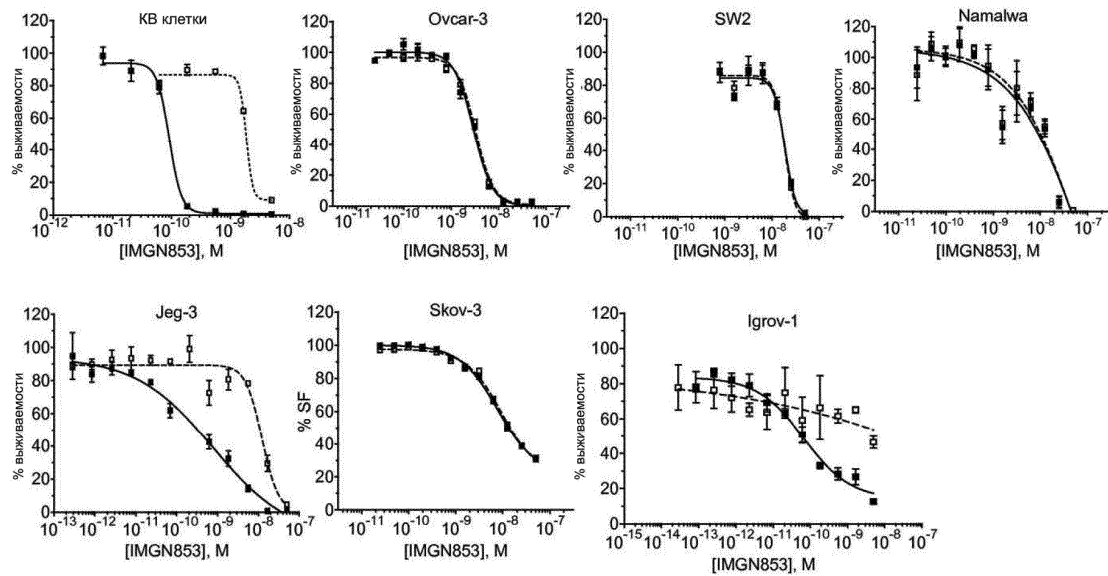


1 неоднор. (core I11, Pantomics)

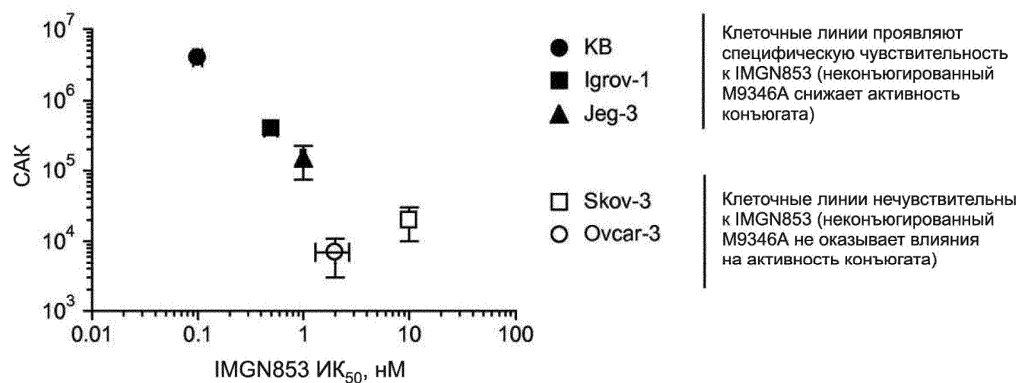
Фиг. 17



Фиг. 18

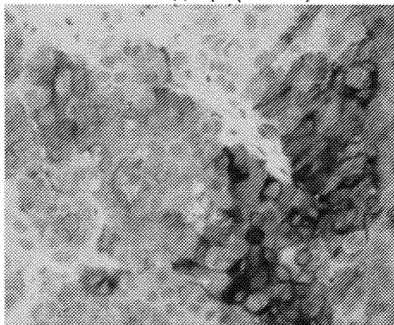


Фиг. 19

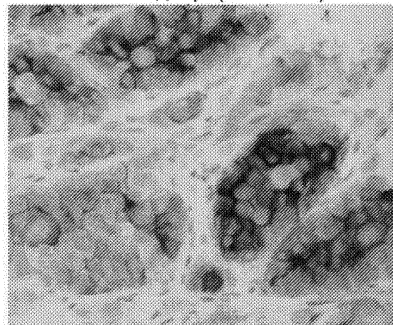


Фиг. 20

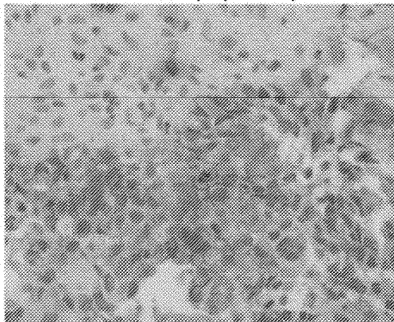
Ovcar 3: 1-3 неоднор. (XT012)



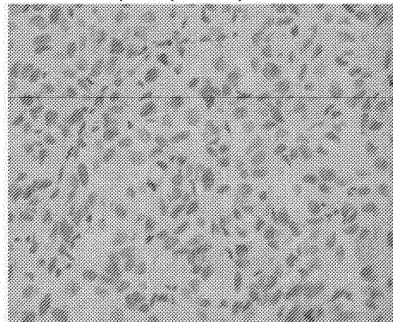
IGROV-1: 1-3 однор. (XT056-1b)



OV-90: 1-2 неоднор. (XT015)



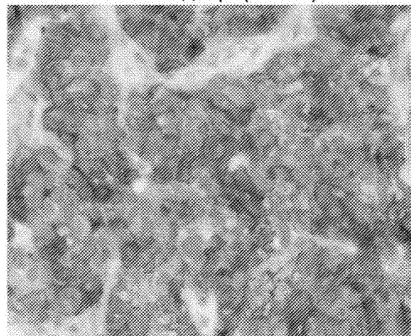
SKOV-3: отриц. (XT010)



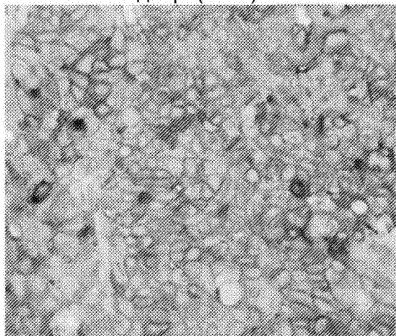
Фиг. 21

A. НМРЛ

NCI-H2110: 2-3 однор. (XT097)

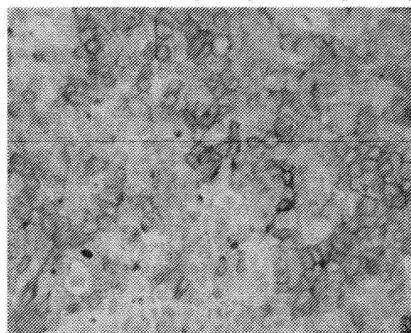


LXFA737: 2 однор. (5374)



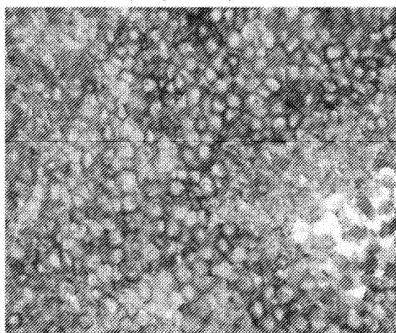
B. Карцинома эндометрия

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

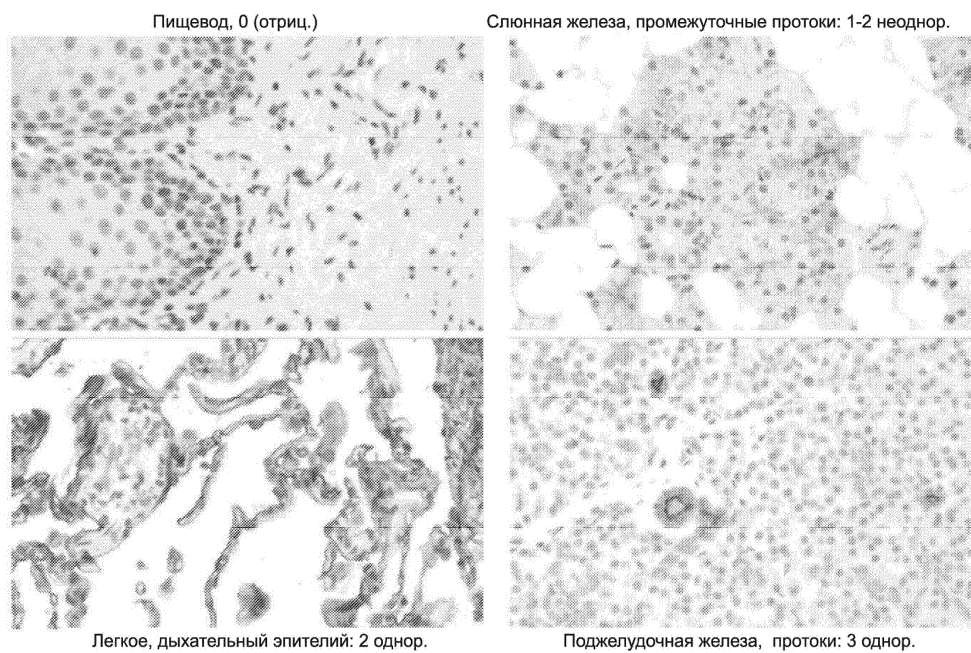


C. Карцинома шейки матки

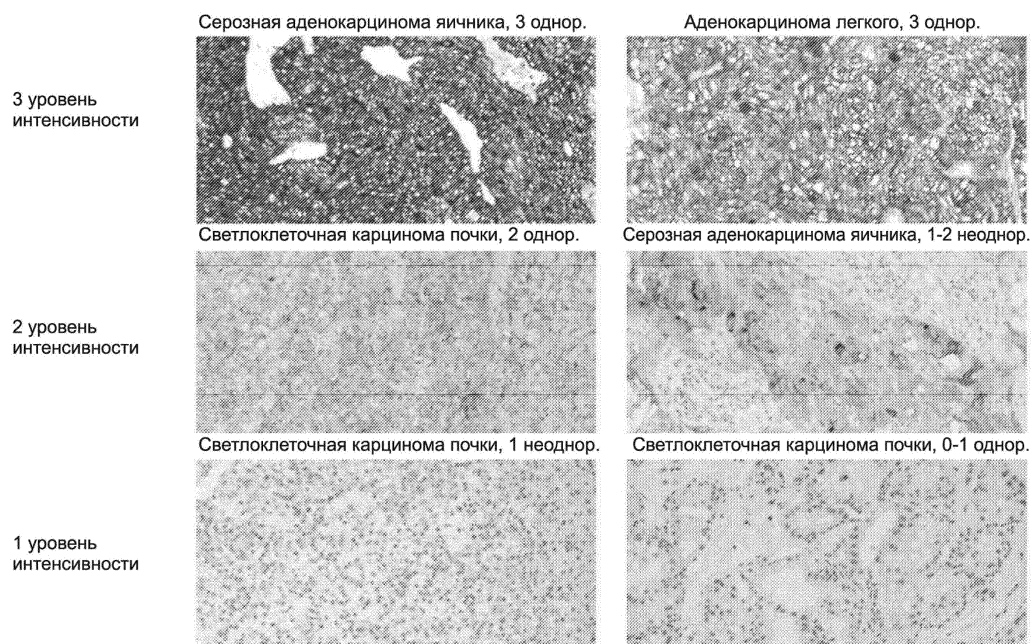
KB: 3 однор. (XT005)



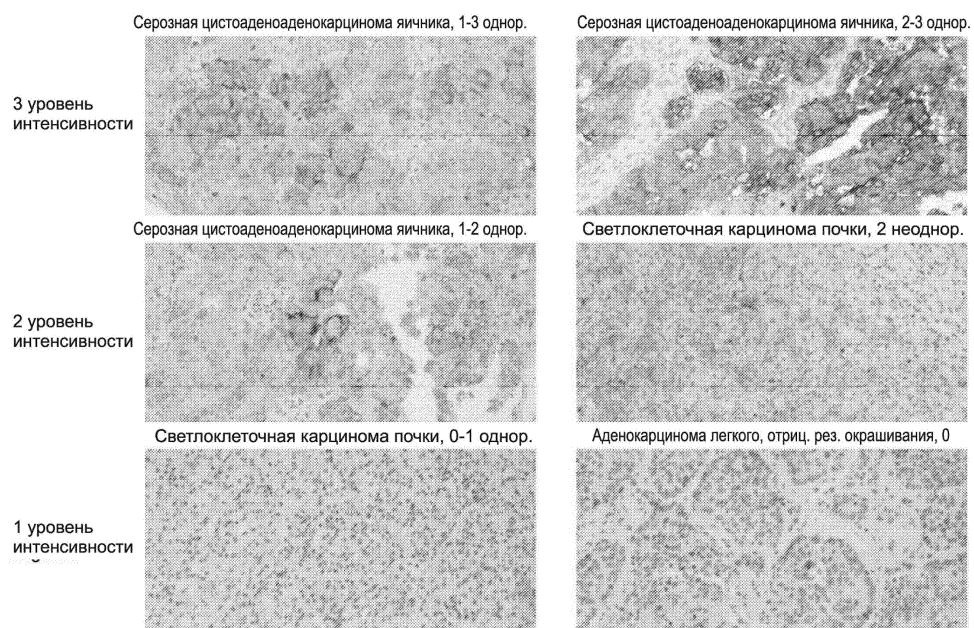
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2