

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6018621号
(P6018621)

(45) 発行日 平成28年11月2日(2016. 11. 2)

(24) 登録日 平成28年10月7日(2016. 10. 7)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)
 A 6 1 K 49/00 (2006. 01)
 A 6 1 K 51/00 (2006. 01)
 G O 1 N 33/53 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 Z N A L
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 49/00 A
 A 6 1 K 49/02 A
 G O 1 N 33/53 U

請求項の数 56 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-502848 (P2014-502848)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月30日(2012. 3. 30)
 (65) 公表番号 特表2014-513068 (P2014-513068A)
 (43) 公表日 平成26年5月29日(2014. 5. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/031544
 (87) 国際公開番号 W02012/135675
 (87) 国際公開日 平成24年10月4日(2012. 10. 4)
 審査請求日 平成27年3月27日(2015. 3. 27)
 (31) 優先権主張番号 61/471, 007
 (32) 優先日 平成23年4月1日(2011. 4. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-10772
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10773
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10774
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10775

(73) 特許権者 512186793
 イミュノジェン, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 451, ウォルサム, ウィンター ス
 トリート 830
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74) 代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F O L R 1 がん治療の有効性を増加させるための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象におけるがん治療のための組成物であって、前記組成物は、抗葉酸受容体 1 (F O L R 1) 免疫複合体を含み、前記対象からの腫瘍試料は、一つまたは複数の参照試料における染色強度および染色均一性と比較して、F O L R 1 を発現するがん試料における染色強度および染色均一性を識別する、検出抗体またはその抗原結合断片による検出法を用いて F O L R 1 の発現増加を示し、前記検出抗体またはその抗原結合断片は F O L R 1 に特異的に結合し、前記抗 F O L R 1 免疫複合体が、式 (A) - (L) - (C) を有し、式中

(A) が、配列番号 3 の重鎖可変ドメインおよび配列番号 4 または 5 の軽鎖可変ドメインを含む抗 F O L R 1 抗体またはその抗原結合断片を含み、

(L) が、切断可能なリンカーを含み、そして

(C) が、メイタンシノイドまたはその類似体を含み、

ここで、(L) が (A) を (C) へと連結している、上記組成物。

【請求項 2】

前記検出法が、弱い F O L R 1 発現、中程度の F O L R 1 発現、または強い F O L R 1 発現を有する試料に対して、ある範囲の染色強度をもたらし、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記検出法が免疫組織化学 (I H C) である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

10

20

前記 I H C が、レベルの異なる F O L R 1 発現を識別することができる較正 I H C である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記腫瘍試料が、I H C による F O L R 1 発現について、1 またはそれより大きい染色強度スコアを有する、請求項 3 または 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記腫瘍試料の 2 5 ～ 7 5 % の細胞が、F O L R 1 発現について染色される、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記腫瘍試料の 7 5 % 超の細胞が、F O L R 1 発現について染色される、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記腫瘍試料が、I H C による F O L R 1 発現について、2 またはそれより大きい染色強度スコアを有する、請求項 3 または 4 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記腫瘍試料の 2 5 ～ 7 5 % の細胞が、F O L R 1 発現について染色される、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記腫瘍試料の 7 5 % 超の細胞が、F O L R 1 発現について染色される、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記腫瘍試料が、I H C による F O L R 1 発現について、2、3、または 3 + の染色強度スコアを有する、請求項 3 または 4 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記腫瘍試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋試料である、請求項 3 ～ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 I H C が自動化された系を用いて行われる、請求項 3 ～ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記腫瘍試料が、不均一または均一である染色均一性を有する、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記腫瘍試料が、均一である染色均一性を有する、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記参照試料が陽性参照試料である、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記参照試料が細胞、細胞ペレット、または組織を含む、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記検出抗体またはその抗原結合断片が、h u M o v 1 9 抗体、B n 3 . 2 抗体、ならびに配列番号 3 の重鎖可変ドメインおよび配列番号 4 または 5 の軽鎖可変ドメインを含む抗体からなる群より選択される、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記検出抗体が、酵素、蛍光物質、放射性標識、発光団、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミンからなる群から選択される検出試薬をさらに含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記対象が、非小細胞肺がんを有する、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

前記対象が、子宮内膜がんを有する、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記対象が、卵巣がんを有する、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記対象が、腹膜のがんを有する、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記対象が、子宮がんを有する、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記切断可能なリンカーが、N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) ペンタノアート (SPP) ; N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホペンタノアート (スルホ-SPP) ; N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) ブタノアート (SPDB) ; および N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホブタノアート (スルホ-SPDB) からなる群から選択される、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 2 6】

前記切断可能なリンカーが、N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホブタノアート (スルホ-SPDB) である、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記メイタンシノイドが、N (2') -デアセチル-N (2') - (3-メルカプト-1-オキソプロピル) -メイタンシン (DM1) または N (2') -デアセチル-N (2') - (4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル) -メイタンシン (DM4) である、請求項 1 ～ 2 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 2 8】

(L) が、N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホブタノアート (スルホ-SPDB) を含み、そして

(C) が、N (2') -デアセチル-N (2') - (4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル) -メイタンシン (DM4) を含む、請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

診断用で使用するための FOLR1 に特異的に結合する検出抗体またはその抗原結合断片、およびがんを有する対象における治療で使用するための抗 FOLR1 免疫複合体を含む、診断用および医薬品を組み合わせたキットであって、前記対象からの腫瘍試料は、一つまたは複数の参照試料における染色強度および染色均一性と比較して、FOLR1 を発現するがん試料における染色強度および染色均一性を識別する、検出抗体またはその抗原結合断片による検出法を用いて FOLR1 の発現増加を示し、前記抗 FOLR1 免疫複合体が、式 (A) - (L) - (C) を有し、式中、

30

(A) が、配列番号 3 の重鎖可変ドメインおよび配列番号 4 または 5 の軽鎖可変ドメインを含む抗 FOLR1 抗体またはその抗原結合断片を含み、

(L) が、切断可能なリンカーを含み、そして

(C) が、メイタンシノイドまたはその類似体を含み、

40

ここで、(L) が (A) を (C) へと連結している、診断用および医薬品を組み合わせたキット。

【請求項 3 0】

(L) が N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホブタノアート (スルホ-SPDB) を含み、そして

(C) が、N (2') -デアセチル-N (2') - (4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル) -メイタンシン (DM4) を含む、請求項 2 9 に記載の診断用および医薬品を組み合わせたキット。

【請求項 3 1】

生物試料のスコアと参照試料のスコアとの間の比較を、あるがんが抗 FOLR1 免疫複

50

合体に応答する可能性が高いことの指標とする方法であって、前記方法は、

(a) 前記がんからとられた前記生物試料を、F O L R 1 と特異的に結合する検出抗体またはその抗原結合断片と接触させることと、

(b) 一つまたは複数の参照試料における染色強度および染色均一性と比較して、前記生物試料における染色強度および染色均一性を識別する、前記検出抗体またはその抗原結合断片による検出法を用いて、ステップ (a) の前記生物試料への前記検出抗体またはその抗原結合断片の結合を検出することと、

(c) ステップ (b) の前記結合に前記スコアを割り当てることであって、前記スコアは前記一つまたは複数の参照試料との比較に基づいて割り当てられる、前記スコアを割り当てることと

10

(d) ステップ (c) における前記スコアを、参照の組織または細胞のスコアと比較すること、とを含み、

F O L R 1 を低発現する参照試料に対するスコアよりも大きな、前記がんの F O L R 1 レベルに対するスコア、または F O L R 1 を高発現する参照試料に対するスコアと等しいもしくはそれより大きな、前記がんの F O L R 1 レベルに対するスコアによって、前記がんが、前記抗 F O L R 1 免疫複合体に応答する可能性が高いと特定され、ここで、前記抗 F O L R 1 免疫複合体が、式 (A) - (L) - (C) を有し、式中、

(A) が、配列番号 3 の重鎖可変ドメインおよび配列番号 4 または 5 の軽鎖可変ドメインを含む抗 F O L R 1 抗体またはその抗原結合断片を含み、

(L) が、切断可能なリンカーを含み、そして

20

(C) が、メイタンシノイドまたはその類似体を含み、

ここで、(L) が (A) を (C) へと連結している、上記方法。

【請求項 3 2】

腫瘍試料の F O L R 1 染色強度スコアと参照値との間の比較を、ある腫瘍が抗 F O L R 1 免疫複合体を用いる治療に対して感受性であることの指標とする方法であって、前記方法は、

(a) 前記腫瘍からとられた腫瘍試料における F O L R 1 発現レベルを測定することであって、前記測定が、一つまたは複数の参照試料における染色強度および染色均一性と比較して、F O L R 1 を発現するがん試料における染色強度または染色均一性を識別する、検出抗体またはその抗原結合断片による検出法の使用を含み、前記検出抗体またはその抗原結合断片が F O L R 1 に特異的に結合する、測定することと、

30

(b) 前記腫瘍試料の前記 F O L R 1 染色強度スコアを決定することと、

(c) ステップ (b) で決定された前記 F O L R 1 染色強度スコアを、少なくとも 1 つの参照試料における F O L R 1 タンパク質発現を測定することによって決定された前記参照値と比較すること、とを含み、前記少なくとも 1 つの参照試料は、前記抗 F O L R 1 免疫複合体を用いる治療に対し感受性ではない組織、細胞、または細胞ペレット試料であり、前記参照値よりも高い、ステップ (b) で決定された前記試料の前記 F O L R 1 染色強度スコアによって、前記腫瘍が、前記抗 F O L R 1 免疫複合体を用いる治療に対し感受性であることが確認され、ここで、前記抗 F O L R 1 免疫複合体が、式 (A) - (L) - (C) を有し、式中、

40

(A) が、配列番号 3 の重鎖可変ドメインおよび配列番号 4 または 5 の軽鎖可変ドメインを含む抗 F O L R 1 抗体またはその抗原結合断片を含み、

(L) が、切断可能なリンカーを含み、そして

(C) が、メイタンシノイドまたはその類似体を含み、

ここで、(L) が (A) を (C) へと連結している、上記方法。

【請求項 3 3】

腫瘍試料の染色スコアを、抗 F O L R 1 免疫複合体へと応答する可能性が高いがんの指標とする方法であって、前記方法は、

(a) 前記対象からとられた前記腫瘍試料を、F O L R 1 と特異的に結合する検出抗体またはその抗原結合断片と接触させることと、

50

(b) 一つまたは複数の参照試料における染色強度および染色均一性と比較して、F O L R 1を発現するがん試料における染色強度および染色均一性を識別することができる検出法を用いて、(a)における前記検出抗体またはその抗原結合断片の、前記試料におけるF O L R 1に対する結合を測定すること、および前記試料に対して前記染色スコアを割り当てることとを含み、

F O L R 1を低発現する参照試料のスコアと等しいもしくはそれより大きな、ステップ(b)におけるスコアによって、前記がんが、前記抗F O L R 1抗体または抗F O L R 1免疫複合体に応答する可能性が高いと特定され、ここで、前記抗F O L R 1免疫複合体が、式(A) - (L) - (C)を有し、式中、

(A)が、配列番号3の重鎖可変ドメインおよび配列番号4または5の軽鎖可変ドメインを含む抗F O L R 1抗体またはその抗原結合断片を含み、

(L)が、切断可能なリンカーを含み、そして

(C)が、メイタンシノイドまたはその類似体を含み、

ここで、(L)が(A)を(C)へと連結している、上記方法。

【請求項34】

生物試料のスコアと参照組織または細胞のスコアとの比較を、がんを有する対象が、抗F O L R 1免疫複合体による治療計画に応答する可能性が高いことの指標とする方法であって、前記方法は、

(a) 前記がんからの細胞を含む、対象からとられた前記生物試料を、F O L R 1と特異的に結合する検出抗体またはその抗原結合断片と接触させることと、

(b) 一つまたは複数の参照試料における染色強度および染色均一性と比較して、F O L R 1を発現するがん試料における染色強度および染色均一性を識別することができる、前記検出抗体またはその抗原結合断片による検出法を用いて、(a)の前記生物試料に対する、前記検出抗体またはその抗原結合断片の結合を検出することと、

(c) ステップ(b)の前記結合に対して前記スコアを割り当てることであって、前記スコアは前記一つまたは複数の参照試料に対する比較に基づいて割り当てられる、前記スコアを割り当てることと、

(d) ステップ(c)における前記スコアを、参照の組織または細胞のスコアと比較すること、とを含み、

F O L R 1を低発現する参照試料に対するスコアよりも大きな、前記がんのF O L R 1レベルに対するスコア、または、F O L R 1を高発現する参照試料に対するスコアと等しいもしくはそれよりも大きな、前記がんのF O L R 1レベルに対するスコアによって、前記がんが、前記抗F O L R 1免疫複合体に応答する可能性が高いと確認され、ここで、前記抗F O L R 1免疫複合体が、式(A) - (L) - (C)を有し、式中、

(A)が、配列番号3の重鎖可変ドメインおよび配列番号4または5の軽鎖可変ドメインを含む抗F O L R 1抗体またはその抗原結合断片を含み、

(L)が、切断可能なリンカーを含み、そして

(C)が、メイタンシノイドまたはその類似体を含み、

ここで、(L)が(A)を(C)へと連結している、上記方法。

【請求項35】

前記がんまたは腫瘍が卵巣がんもしくは卵巣腫瘍、子宮内膜がんもしくは子宮内膜腫瘍、腹膜のがんもしくは腹膜の腫瘍、子宮がんもしくは子宮腫瘍、または小細胞肺がんもしくは小細胞肺腫瘍である、請求項31～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

前記検出法が自動化された系を使用して行われる、請求項31～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

前記検出法がIHCである、請求項31～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

前記IHCが、レベルの異なるF O L R 1発現を識別することができる較正IHCであ

10

20

30

40

50

る、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記検出法が、弱い F O L R 1 発現、中程度の F O L R 1 発現、または強い F O L R 1 発現を有する試料に対して、ある範囲の染色強度をもたらず、請求項 31 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記生物試料または腫瘍試料が、IHC による F O L R 1 発現について、1 またはそれより大きい染色強度スコアを有する、請求項 31 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記生物試料または腫瘍試料の 25 ~ 75 % の細胞が、F O L R 1 発現について染色される、請求項 40 に記載の方法。

10

【請求項 42】

前記生物試料または腫瘍試料の 75 % 超の細胞が、F O L R 1 発現について染色される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

前記腫瘍試料が、IHC による F O L R 1 発現について、2 またはそれより大きい染色強度スコアを有する、請求項 31 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 44】

前記生物試料または腫瘍試料の 25 ~ 75 % の細胞が、F O L R 1 発現について染色される、請求項 43 に記載の方法。

20

【請求項 45】

前記生物試料または腫瘍試料の 75 % 超の細胞が、F O L R 1 発現について染色される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 46】

前記生物試料または腫瘍試料が、IHC による F O L R 1 発現について、2、3、または 3+ の染色強度スコアを有する、請求項 31 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

前記生物試料または腫瘍試料が、不均一または均一である染色均一性を有する、請求項 31 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 48】

前記生物試料または腫瘍試料が、均一である染色均一性を有する、請求項 31 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 49】

前記検出抗体が、h u M o v 19 抗体、B n 3 . 2 抗体、ならびに配列番号 3 の重鎖可変ドメインおよび配列番号 4 または 5 の軽鎖可変ドメインを含む抗体からなる群より選択される、請求項 31 ~ 48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記検出抗体が、酵素、蛍光物質、放射性標識、発光団、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミンからなる群から選択される検出試薬をさらに含む、請求項 49 に記載の方法。

40

【請求項 51】

前記参照試料が、陽性参照試料である、請求項 31 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記参照試料が、陰性参照試料である、請求項 31 ~ 50 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 53】

前記参照試料が細胞、細胞ペレット、または組織を含む、請求項 31 ~ 52 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

50

前記切断可能なリンカーが、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノアート(SPP)；N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホペンタノアート(スルホ-SPP)；N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブタノアート(SPDB)；およびN-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノアート(スルホ-SPDB)からなる群から選択される、請求項31～53のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】

前記メイタンシノイドが、N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン(DM1)またはN(2')-デアセチル-N(2')-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4)である、請求項31～54に記載の方法。

10

【請求項56】

(L)がN-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノアート(スルホ-SPDB)を含み、そして
(C)が、N(2')-デアセチル-N(2')-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4)を含む、請求項55に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

20

本出願は、2011年4月1日に出願された米国仮特許出願第61/471,007号の利益を主張するものであり、これは参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【0002】

発明の分野は、概して、ヒト葉酸受容体1(FOLR1)の過剰発現によって特徴付けられるがんの、治療の有効性を増加させることに関する。より具体的には、本発明は、がん罹患し易い、またはがんと診断された患者の、より有効な治療に関し、そのがんにおいて、腫瘍細胞は、FOLR1拮抗薬(例えば、FOLR1免疫複合体)を用いる遺伝子発現アッセイによって決定されるように、FOLR1を過剰発現している。

【背景技術】

【0003】

30

がんは、先進国世界における主な死因の一つであり、米国だけで、年間1,000,000人以上ががんと診断され、500,000人が死亡している。全体的に見て、3人のうち1人を超える人数が、生涯を通じて、ある種のがんを発症すると推定されている。200種超の、異なる種類のがんが存在し、それらのうち4種、乳房、肺、結腸直腸、および前立腺は、全新患のうちの半分超を占める(非特許文献1)。

【0004】

葉酸受容体1(FOLR1)は、葉酸受容体αまたは葉酸結合タンパク質としても知られており、細胞の原形質膜上に発現される、N-グリコシル化タンパク質である。FOLR1は、葉酸に対して、およびいくつかの還元型葉酸誘導体に対して、高い親和性を有する。FOLR1は、生理的な葉酸塩である5-メチルテトラヒドロ葉酸の、細胞内部への輸送を仲介する。

40

【0005】

FOLR1は、卵巣がんの大部分において、並びに、多くの、子宮がん、子宮内膜がん、膵がん、腎がん、肺がん、および乳がんにおいて過剰発現されており、一方、正常組織でのFOLR1の発現は、腎近位尿細管における上皮細胞の頂端膜、肺の肺胞細胞(alveolar pneumocyte)、膀胱、精巣、脈絡叢、および甲状腺に限定されている(非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4)。このFOLR1発現パターンは、FOLR1を標的としたがん治療のための、望ましい標的となる。

卵巣がんは、典型的には進行期まで無症状であるため、しばしば後期において診断され、現在利用可能な処置、典型的には外科的減量後の化学療法剤、で治療された場合に、予

50

後が不良である（非特許文献 5、非特許文献 6、非特許文献 7）。従って、卵巣がんに対するより有効な治療への、明らかな、未だ対処されていない、医学的ニーズが存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26

【非特許文献 2】Weitman SD, et al., Cancer Res 52: 3396-3401 (1992)

【非特許文献 3】Antony AC, Annu Rev Nutr 16: 501-521 (1996)

【非特許文献 4】Kalli KR, et al. Gynecol Oncol 108: 619-626 (2008)

【非特許文献 5】von Gruenigen V et al., Cancer 112: 2221-2227 (2008)

【非特許文献 6】Ayhan A et al., Am J Obstet Gynecol 196: 81 e81-86 (2007)

【非特許文献 7】Harry VN et al., Obstet Gynecol Surv 64: 548-560 (2009)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、腫瘍組織における FOLR1 の発現の動的な範囲 (dynamic range) の発見、および、上昇した FOLR1 発現レベルを有する腫瘍は抗 FOLR1 抗体または抗 FOLR1 免疫複合体を用いる治療に対して感受性がより高いという発見に基づいている。本発明は、治療薬、すなわち、抗 FOLR1 抗体または抗 FOLR1 免疫複合体を、上昇した FOLR1 発現レベルを有することが判明している患者に投与することによって、治療に対する応答の見込みがより大きな患者の治療を有利に可能にする。

【0008】

本発明は、葉酸受容体 1 (FOLR1) 標的抗がん剤に対し、好都合に応答する傾向がある対象を特定するための方法を提供し、その方法は、対象から得た組織試料において、FOLR1 発現を検出することを含む。

【0009】

本発明は、がん治療が有効である可能性を増加させるための方法をも提供し、その方法は、治療有効量の FOLR1 標的抗がん剤を、対象に投与することを含み、該対象から得た組織試料における FOLR1 発現は増加していることが判明しているものとする。

【0010】

本発明は、低用量がん治療の有効性を予測するための方法をも提供し、その方法は、治療有効量の FOLR1 標的抗がん剤を、対象に投与することを含み、上記対象は試料における FOLR1 発現が増加していることが判明しているものとする。

【0011】

一実施形態では、本方法は、卵巣癌、非小細胞肺癌（細気管支肺胞上皮癌を含む）、腎癌、および子宮内膜癌を対象としている。

【0012】

一実施形態では、FOLR1 発現の程度および均一性は、免疫組織化学 (IHC)、フローサイトメトリー、または核酸ハイブリダイゼーションによって検出される。別の実施形態では、FOLR1 発現のレベルは、免疫組織化学によって検出される。IHC の非制限的な例としては、本明細書に記載されるもの等の、様々なレベルの FOLR1 を識別する IHC 法、および較正 (calibrated) IHC 法が挙げられる。FOLR1 発現は、適切な採点法を用いてスコア化することができ、適切な採点法としては、例えば、これに限定はされないが、本明細書に記載のスコア化法が挙げられる。例えば、FOLR1 発現は、0、1、2、3、および 3+ の染色強度範囲を含み、0 が最も低い染色強度レベルであり、3+ が最も高い染色強度レベルである、較正 IHC 法を用いてスコア化することができる。あるいは、または、加えて、FOLR1 発現は、局所的 (25% 未満の染色細胞) から、不均一 (25~75% の染色細胞)、均一 (75% 超の染色細胞) にまでわたる染色均一性を含む、較正 IHC 法を用いてスコア化することができ、局所的な染色とは均一性

が最も小さな染色であり、均一な染色とは均一性が最も大きな染色である。

【0013】

更なる実施形態では、試料（例えば、腫瘍組織試料）におけるFOLR1発現は、測定されて、一つまたは複数の参照試料に対して比較され、対象の腫瘍、異種移植片腫瘍、または細胞株から得た組織試料におけるFOLR1発現は、一つまたは複数の参照試料と比較した場合の発現の程度および均一性に相関する、FOLR1特有のスコアを有する。様々な例において、均一な染色パターンでレベル1、2、3または3+のFOLR1染色強度を有する組織試料または細胞は、FOLR1発現が増加していると思われ、不均一または局所的な染色パターンでレベル3のFOLR1染色強度を有する組織試料または細胞は、FOLR1発現が増加していると思われる。別の実施形態では、試料におけるFOLR1発現は、測定され、一つまたは複数の参照試料と比較されて、同程度の染色レベルが特定される。一実施形態では、参照試料は、予め割り当てられたIHCスコアおよび／または予め決定された細胞あたりの抗原（またはABC）数を有し、試料組織の抗原またはABC数は、比較に基づいて決定することができる。

10

【0014】

一実施形態では、試料（例えば、腫瘍組織試料）中のFOLR1発現は、測定され、一つまたは複数の対照試料と比較され、対象の腫瘍、異種移植片腫瘍、または細胞株から得た組織試料におけるFOLR1発現は、一つまたは複数の対照試料と比較した場合に発現の程度および均一性に相関性がある、FOLR1特有のスコアを有する。一実施形態では、試料中のFOLR1発現は、検出可能なFOLR1発現をほとんどまたは全く示さない、陰性対照試料と比較される。別の実施形態では、試料中のFOLR1発現は、増加したFOLR1発現（レベル1、2、3または3+）を有する、陽性対照試料と比較される。一部の実施形態では、対照試料としては、限定はされないが、Namalwa、SW2、SW620、T47D、IGROV-1、300.19FR1、Hela、またはKB細胞が挙げられる。特定の実施形態では、対照試料には、葉酸受容体を形質移入された細胞（例えば、300.19FR1）から得られる細胞または細胞ペレットが含まれる。

20

【0015】

一実施形態では、FOLR1標的抗がん剤は、FOLR1免疫複合体である。一実施形態では、免疫複合体は、抗FOLR1抗体、リンカー、および細胞毒を含む。

【0016】

更なる実施形態では、抗FOLR1抗体は、huMOV19である。別の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、親水性のリンカー、およびジカルボン酸ベースのリンカーからなる群から選択される。別の実施形態では、リンカーは、以下からなる群から選択される：N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルジチオ）ペンタノアート（SPP）またはN-スクシンイミジル4-（2-ピリジルジチオ）-2-スルホペンタノアート（スルホ-SPP）；N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルジチオ）ブタノアート（SPDB）またはN-スクシンイミジル4-（2-ピリジルジチオ）-2-スルホブタノアート（スルホ-SPDB）；N-スクシンイミジル4-（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボキシラート（SMCC）；N-スルホスクシンイミジル4-（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボキシラート（スルホSMCC）；N-スクシンイミジル-4-（ヨードアセチル）-アミノベンゾアート（SIAB）；およびN-スクシンイミジル-〔（N-マレイミドプロピオンアミド）-テトラエチレングリコール〕エステル（NHS-PEG4-マレイミド）。別の実施形態では、リンカーは、N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルジチオ）-2-スルホブタノアート（スルホ-SPDB）である。別の実施形態では、細胞毒は、メイタンシノイド、メイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC-1065、CC-1065類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アウリスタチン、トマイマイシン誘導体、およびレプトマイシン誘導体またはその薬剤のプロドラッグからなる群から選択される。別の実施形態では、細胞毒はメイタンシノイドである。別の実施形態では、細胞毒は、N（2'）-デアセチル-N（2

30

40

50

’) - (3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン、またはN(2’)-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシンである。別の実施形態では、細胞毒は、N(2’)-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4)である。更なる実施形態では、免疫複合体は、HUMOV19抗体、スルホ-S P D B、およびDM4(IMG N853)を含む。

【0017】

本発明は、FOLR1検出試薬、および使用のための説明書を含む、対象におけるFOLR1発現を測定するためのキットをも対象としている。一実施形態では、FOLR1検出試薬は、FOLR1結合性のペプチド、タンパク質または分子プローブ(すなわち核酸)を含む。別の実施形態では、FOLR1検出試薬は、抗FOLR1抗体である。別の実施形態では、キットはさらに、抗FOLR1抗体と結合する二次抗体を含む。一実施形態では、抗体は、0.5~7.5 µg/ml、望ましくは0.9~3.8+/-0.5 µg/mlの濃度で含まれる。様々な実施形態では、抗体は、1.0+/-0.5 µg/ml、1.5+/-0.5 µg/ml、1.9+/-0.5 µg/ml、2.5+/-0.5 µg/ml、3.0+/-0.5 µg/ml、3.5+/-0.5 µg/ml、3.8+/-0.5 µg/ml、または最大4.2 µg/mlの濃度で含まれる。別の実施形態では、抗体は、濃縮液の状態、0.9~3.8+/-0.5 µg/mlの最終濃度を達成するための希釈のための説明書と一緒に、含まれる。別の実施形態では、キットはさらに、以下からなる群から選択される検出試薬を含む：酵素、蛍光物質、放射性標識、および発光団。別の実施形態では、検出試薬は、以下からなる群から選択される：ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミン。

【0018】

キットは、FOLR1発現の検出およびスコア化に関する説明書も含み得る。キットは、対照または参照試料も含み得る。対照または参照試料の非制限的な例としては、組織試料、細胞ペレットまたは細胞が挙げられる。対照または参照試料は、組織培養細胞株(正常または腫瘍)、正常組織(正常対照)または腫瘍組織(陽性対照)試料に由来するものであってもよい。細胞株の例としては、SW620、T47D、IGROV-1、HELA、KB、JEG-3およびFOLR1を発現する発現ベクターを安定に、または一過性に形質移入された細胞株(例えば、300.19FR1)が挙げられる。FOLR1発現検出法において正常参照組織として使用することができる組織の例は、本明細書に記載されており、例えば、正常な肺、唾液腺、および脾臓が挙げられる。

【0019】

本発明は、抗FOLR1抗体、または抗FOLR1免疫複合体に応答する可能性が高いがんを特定するための方法をも対象としており、その方法は、(a) 上記がんから得た細胞を含む生物試料を、細胞表面上のFOLR1タンパク質と結合する薬剤と接触させることと、(b) (a)の前記生物試料の細胞表面上のFOLR1タンパク質と結合する上記薬剤の結合を検出することと、(c) ステップ(b)の上記結合に対しスコアを割り当てることであって、上記スコアは一つまたは複数の参照試料との比較に基づいて割り当てられる、スコアを割り当てることと(d) ステップ(c)における上記スコアを、参照組織または参照細胞のスコアと比較すること、とを含み、FOLR1を正常発現もしくは低発現する参照試料のスコアよりも大きな、上記がんのFOLR1レベルのスコア、またはFOLR1を高発現する参照試料のスコアと等しい、もしくはそれよりも大きな上記がんのFOLR1レベルのスコアによって、上記がんは、抗FOLR1抗体または抗FOLR1免疫複合体に応答する可能性が高いとみなされる。ある実施形態では、がんは卵巣がんまたは肺がんである。

【0020】

本発明は、腫瘍を、抗FOLR1抗体、または抗FOLR1免疫複合体を用いる治療に感受性であるものと特定する方法をも対象とし、上記方法は、(a) 上記腫瘍から得られた腫瘍組織試料におけるFOLR1発現のレベルを測定することであって、上記測定は

、一つまたは複数の参照試料における染色強度または染色均一性と比較して、F O L R 1 発現がん試料における染色強度または染色均一性を識別する検出法の使用を含む、測定することと、(b) 上記腫瘍組織試料のF O L R 1 染色強度スコアを決定することと、(c) ステップ(b)において決定されたF O L R 1 染色強度スコアを、少なくとも1つの参照試料におけるF O L R 1 タンパク質発現を測定することにより決定される相対値と比較すること、とを含み、上記少なくとも1つの参照試料は、抗F O L R 1 抗体、または抗F O L R 1 免疫複合体を用いた治療に対し感受性でない組織、細胞、または細胞ペレット試料であり、上記相対値よりも高い、ステップ(b)において決定された上記試料のF O L R 1 染色強度スコアによって、上記腫瘍は、抗F O L R 1 抗体または抗F O L R 1 免疫複合体を用いる治療に対し感受性であるものと見なされる。ある実施形態では、検出法は、手動で、または自動化された系を用いて、実行される。一実施形態では、検出法はI H Cである。別の実施形態では、I H Cは、レベルが異なるF O L R 1 発現を識別することができる、校正I H Cである。

10

【0021】

本発明は、肺がんまたは卵巣がんを有する対象に対する、抗F O L R 1 抗体または抗F O L R 1 免疫複合体を用いる最適治療計画を最適化する方法をも対象とし、上記方法は、

(a) 上記対象から得た上記試料を、細胞表面のF O L R 1 と特異的に結合する抗体と接触させることと、(b) 一つまたは複数の参照試料における染色強度または染色均一性と比較して、F O L R 1 発現がん試料における染色強度または染色均一性を識別することができる検出法を用いて、(a)における上記抗体の、上記試料中の前記細胞表面F O L R 1 に対する結合を測定すること、および上記試料に染色スコアを割り当てることと、

20

(c) ステップ(b)におけるスコアが、F O L R 1 を正常発現または低発現する参照試料のスコア未満またはそれに等しい場合は、高用量の抗F O L R 1 免疫複合体を投与すること、あるいは、スコアがF O L R 1 を正常発現または低発現する参照試料のスコアよりもより大きい場合は、低用量の抗F O L R 1 免疫複合体を投与すること、とを含む。

【0022】

本発明は、対象から得た腫瘍組織試料におけるがん細胞上の細胞表面F O L R 1 の発現を検出する方法をも対象とし、上記方法は、(a) 腫瘍組織試料を入手することであって、上記がん試料はホルマリン固定され、パラフィン包埋される、入手することと(b)

上記試料を、細胞表面F O L R 1 と特異的に結合する抗体と接触させることと、(c) 一つまたは複数の参照試料における染色強度または染色均一性と比較して、F O L R 1 発現がん試料における染色強度または染色均一性を識別することができる検出法を用いて、

30

(b)における上記抗体の、上記腫瘍組織試料における上記細胞表面F O L R 1 への結合を測定することと、(d) 上記腫瘍組織試料における細胞表面F O L R 1 の染色強度または染色均一性のレベルを、一つまたは複数の参照試料と比較した後に、F O L R 1 発現スコアを上記F O L R 1 に割り当てること、とを含む。

【0023】

本発明は、低用量の抗F O L R 1 抗体または抗F O L R 1 免疫複合体を用いる治療計画に応答する可能性が高い、肺がんまたは卵巣がんを有する対象を特定する方法をも対象とし、上記方法は、(a) 上記卵巣がんまたは肺がんから得た細胞を含む生物試料を、細胞表面のF O L R 1 タンパク質と結合する薬剤と接触させることと、(b) (a)の上記生物試料に対する上記薬剤の結合を検出することと、(c)ステップ(b)の上記結合に対してスコアを割り当てることであって、上記スコアは一つまたは複数の参照試料との比較に基づいて割り当てられる、スコアを割り当てることと(d)ステップ(c)における上記スコアを、参照の組織または細胞のスコアと比較すること、とを含み、F O L R 1 を正常発現もしくは低発現する参照試料のスコアよりもより大きな、上記卵巣がんもしくは肺がんのF O L R 1 レベルのスコア、またはF O L R 1 を高発現する参照試料のスコアと等しいもしくはそれより大きな、上記卵巣がんもしくは肺がんのF O L R 1 レベルのスコアによって、上記卵巣がんまたは肺がんは、低用量の抗F O L R 1 抗体または抗F O L R 1 免疫複合体に

40

50

、治療有効量の、ヒト化した、抗 F O L R 1 抗体または抗 F O L R 1 免疫複合体を、上記対象に投与することを含む。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

抗葉酸受容体 1 (F O L R 1) 抗体または抗 F O L R 1 免疫複合体を用いるがん治療の有効性を増加させるための方法であって、前記方法は、がんを有する対象に、抗 F O L R 1 抗体または抗 F O L R 1 免疫複合体を投与することを含み、前記対象から得られたがん試料における F O L R 1 遺伝子またはタンパク質の発現増加が、一つまたは複数の参照試料における染色強度または染色均一性と比較して、 F O L R 1 を発現するがん試料における染色強度または染色均一性を識別する検出法を用いて検出されている、上記方法。

10

(項目 2)

前記検出法が免疫組織化学 (I H C) である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記 I H C が、レベルの異なる F O L R 1 発現を識別することができる較正 I H C である、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記検出法が、低い F O L R 1 細胞表面発現、中間の F O L R 1 細胞表面発現、または高い F O L R 1 細胞表面発現を有する試料に対して、ある範囲の染色強度をもたらす、項目 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 5)

前記検出法が、参照試料と比較して、 F O L R 1 を発現するがん試料における染色強度および染色均一性を識別する、項目 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 6)

前記がん試料が、免疫組織化学による F O L R 1 発現について、1 より大きい染色強度スコアを有する、項目 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 7)

前記がん試料が、免疫組織化学による F O L R 1 発現について、2、3、または 3 + の染色強度スコアを有する、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

前記がん試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋試料に対する免疫組織化学による F O L R 1 発現について、2、3、または 3 + の染色強度スコアを有する、項目 7 に記載の方法。

30

(項目 9)

前記がん試料が、均一である F O L R 1 発現について、ある染色均一性を有する、項目 6 ～ 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 10)

前記がん試料が、 F O L R 1 について、2、3、または 3 + の染色強度スコアを有し、不均一または均一である染色均一性を有する、項目 6 ～ 8 に記載の方法。

(項目 11)

前記免疫組織化学が手動で行われる、項目 2 ～ 10 のいずれかに記載の方法。

40

(項目 12)

前記免疫組織化学が自動化された系を用いて行われる、項目 2 ～ 10 のいずれかに記載の方法。

(項目 13)

前記参照試料が陽性参照試料または陰性参照試料である、項目 1 ～ 12 のいずれかに記載の方法。

(項目 14)

参照試料が細胞、細胞ペレット、または組織を含む、項目 1 ～ 13 のいずれかに記載の方法。

(項目 15)

50

前記検出法が、細胞表面 F O L R 1 と特異的に結合する抗体を用いて F O L R 1 発現を検出することを含む、項目 1 ～ 1 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 6)

前記抗体が h u M o v 1 9 抗体 (M 9 3 4 6 A) である、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記抗体が、酵素、蛍光物質、放射性標識、および発光団からなる群から選択される検出試薬をさらに含む、項目 1 5 または 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記検出試薬が、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミンからなる群から選択される、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記抗体の濃度が約 0. 9 ～ 約 3. 8 μ g / m l である、項目 1 5 ～ 1 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 0)

抗 F O L R 1 抗体または抗 F O L R 1 免疫複合体、容器、および I H C により測定された 2、3、または 3 + のレベルでの F O L R 1 の発現によって特徴付けられるがんを治療するのに前記抗体または前記免疫複合体を使用することができることを示す添付文書またはラベル、を含む製品。

(項目 2 1)

前記 I H C が、レベルが異なる F O L R 1 発現を識別することができる較正 I H C である、項目 2 0 に記載の製品。

(項目 2 2)

前記がんから得られるがん試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋試料に対する免疫組織化学による F O L R 1 発現について、2、3、または 3 + の染色強度スコアを有する、項目 2 0 または 2 1 に記載の製品。

(項目 2 3)

前記がんから得られるがん試料が、F O L R 1 について 2、3、または 3 + の染色強度スコアを有し、不均一または均一である染色均一性を有する、項目 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の製品。

(項目 2 4)

免疫組織化学が手動で行われる、項目 2 0 ～ 2 3 のいずれかに記載の製品。

(項目 2 5)

前記免疫組織化学が自動化された系を使用して行われる、項目 2 0 ～ 2 3 のいずれかに記載の製品。

(項目 2 6)

前記 F O L R 1 免疫複合体が抗 F O L R 1 抗体、リンカー、および細胞毒を含む、項目 2 0 ～ 2 5 のいずれかに記載の製品。

(項目 2 7)

前記抗 F O L R 1 抗体が h u M o v 1 9 (M 9 3 4 6 A) である、項目 2 6 に記載の製品。

(項目 2 8)

前記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、親水性のリンカー、およびジカルボン酸ベースのリンカーからなる群から選択される、項目 2 6 または 2 7 に記載の製品。

(項目 2 9)

前記リンカーが、N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) ペンタノアート (S P P) または N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホペンタノアート (スルホ-S P P) ; N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) ブタノアート (S P D B) または N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホブタノアート (スルホ-S P D B) ; N-スクシンイミジル 4- (マレイミドメチル) シ

10

20

30

40

50

クロヘキサシカルボキシラート（SMCC）；N-スルホスクシンイミジル4-（マレイミドメチル）シクロヘキサシカルボキシラート（スルホSMCC）；N-スクシンイミジル4-（ヨードアセチル）-アミノベンゾアート（SIAB）；およびN-スクシンイミジル-〔（N-マレイミドプロピオンアミド）-テトラエチレングリコール〕エステル（NHSPEG4-マレイミド）からなる群から選択される、項目28に記載の製品。

（項目30）

前記リンカーが、N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルジチオ）-2-スルホブタノアート（スルホ-SPDB）である、項目29に記載の製品。

（項目31）

前記細胞毒が、メイタンシノイド、メイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC-1065、CC-1065類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アウリスタチン、トマイマイシン誘導体、およびレプトマイシン誘導体またはその薬剤のプロドラッグからなる群から選択される、項目26～30のいずれか一項に記載の製品。

（項目32）

前記細胞毒がメイタンシノイドである、項目31に記載の製品。

（項目33）

前記細胞毒が、N（2'）-デアセチル-N（2'）-（3-メルカプト-1-オキソプロピル）-メイタンシンまたはN（2'）-デアセチル-N2-（4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル）-メイタンシンである、項目32に記載の製品。

（項目34）

前記細胞毒が、N（2'）-デアセチル-N2-（4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル）-メイタンシン（DM4）である、項目33に記載の製品。

（項目35）

前記免疫複合体が、huMov19抗体（M9346A）、スルホ-SPDB抗体、およびDM4抗体（IMGN853）を含む、項目26～34のいずれかに記載の製品。

（項目36）

診断用のマウス抗FOLR1抗体、および治療用のヒト化抗FOLR1抗体またはヒト化抗FOLR1抗体を含んでなる抗FOLR1免疫複合体を含む、診断および医薬品を組み合わせたキット。

（項目37）

診断用抗体が、IHCによりFOLR1発現を検出することができる、項目36に記載のキット。

（項目38）

前記IHCが、レベルが異なるFOLR1発現を識別することができる較正IHCである、項目37に記載のキット。

（項目39）

前記較正IHCが、低いFOLR1細胞表面発現、中間のFOLR1細胞表面発現、または高いFOLR1細胞表面発現を有する試料に対して、ある範囲の染色強度をもたらす、項目38に記載のキット。

（項目40）

前記較正IHCが、参照試料と比較して、FOLR1を発現するがん試料における染色強度および染色均一性を識別する、項目36～39のいずれかに記載のキット。

（項目41）

一つまたは複数の参照試料をさらに含む、項目36～40のいずれかに記載のキット。

（項目42）

前記参照試料が陽性参照試料または陰性参照試料である、項目41に記載のキット。

（項目43）

前記参照試料が細胞、細胞ペレット、または組織を含む、項目41または42に記載のキット。

10

20

30

40

50

(項目 4 4)

前記検出抗体が、酵素、蛍光物質、放射性標識、および発光団からなる群から選択される検出試薬をさらに含む、項目 3 6 ～ 4 3 のいずれかに記載のキット。

(項目 4 5)

前記検出試薬が、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミンからなる群から選択される、項目 4 4 に記載のキット。

(項目 4 6)

前記検出抗体の濃度が約 0. 9 ～ 約 3. 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である、項目 3 6 ～ 4 5 のいずれかに記載のキット。

(項目 4 7)

前記ヒト化抗 F O L R 1 抗体が h u M o v 1 9 (M 9 3 4 6 A) である、項目 3 6 ～ 4 6 のいずれかに記載のキット。

(項目 4 8)

前記抗 F O L R 1 免疫複合体が、抗 F O L R 1 抗体、リンカー、および細胞毒を含む、項目 3 6 ～ 4 7 のいずれかに記載のキット。

(項目 4 9)

前記抗 F O L R 1 抗体が h u M o v 1 9 (M 9 3 4 6 A) である、項目 4 8 に記載のキット。

(項目 5 0)

前記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、親水性のリンカー、およびジカルボン酸ベースのリンカーからなる群から選択される、項目 4 8 または 4 9 に記載のキット。

(項目 5 1)

前記リンカーが、N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) ペンタノアート (S P P) または N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホペンタノアート (スルホ- S P P) ; N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) ブタノアート (S P D B) または N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホブタノアート (スルホ- S P D B) ; N-スクシンイミジル 4- (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシラート (S M C C) ; N-スルホスクシンイミジル 4- (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシラート (スルホ S M C C) ; N-スクシンイミジル 4- (ヨードアセチル) -アミノベンゾアート (S I A B) ; および N-スクシンイミジル 4- [(N-マレイミドプロピオンアミド) -テトラエチレングリコール] エステル (N H S - P E G 4 - マレイミド) からなる群から選択される、項目 5 0 に記載のキット。

(項目 5 2)

前記リンカーが、N-スクシンイミジル 4- (2-ピリジルジチオ) -2-スルホブタノアート (スルホ- S P D B) である、項目 5 1 に記載のキット。

(項目 5 3)

前記細胞毒が、メイタンシノイド、メイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、C C - 1 0 6 5、C C - 1 0 6 5 類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリチアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アウリスタチン、トマイマイシン誘導体、およびレプトマイシン誘導体またはその薬剤のプロドラッグからなる群から選択される、項目 4 8 ～ 5 2 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 4)

前記細胞毒がメイタンシノイドである、項目 5 3 に記載のキット。

(項目 5 5)

前記細胞毒が、N (2 ') -デアセチル-N (2 ') - (3-メルカプト-1-オキソプロピル) -メイタンシンまたは N (2 ') -デアセチル-N 2 - (4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル) -メイタンシンである、項目 5 4 に記載のキット。

(項目 5 6)

10

20

30

40

50

前記細胞毒が、N（2'）-デアセチル-N2-（4-メルカプト-4-メチル-1-オキソベンチル）-メイタンシン（DM4）である、項目55に記載のキット。

（項目57）

前記免疫複合体が、h u M o v 1 9抗体（M9346A）、スルホ-S P D B抗体、およびDM4抗体（I M G N 8 5 3）を含む、項目48～56のいずれかに記載のキット。

（項目58）

診断用キットであって、細胞表面F O L R 1に特異的に結合する抗F O L R 1抗体、免疫組織化学のための試薬、および参照のための一つまたは複数の標準対照を含み、前記標準対照が、細胞、細胞ペレット、またはホルマリン固定パラフィン包埋組織試料を含み、前記一つまたは複数の標準対照が、F O L R 1非発現、F O L R 1低発現、またはF O L R 1高発現細胞、細胞ペレット、または組織から得られる、上記診断用キット。

10

（項目59）

前記F O L R 1を低発現する対照が、唾液腺組織、肺組織、O V C A R 3細胞、およびT 4 7 D細胞からなる群から選択される、項目58に記載のキット。

（項目60）

前記F O L R 1を高発現する対照が、膵臓組織、K B細胞、I G R O V 1細胞、および葉酸受容体1を安定にまたは一過性に形質移入された細胞株からなる群から選択される、項目58に記載のキット。

（項目61）

葉酸受容体1を安定にまたは一過性に形質移入された前記細胞株が3 O O . 1 9 / F R 1である、項目60に記載のキット。

20

（項目62）

抗F O L R 1抗体または抗F O L R 1免疫複合体に応答する可能性が高いがんを特定するための方法であって、前記方法は、

（a） 前記がんから得られた細胞を含む生物試料を、細胞表面上のF O L R 1タンパク質と結合する薬剤と接触させることと、

（b） （a）の前記生物試料の細胞表面上のF O L R 1タンパク質と結合する前記薬剤の結合を検出することと、

（c） ステップ（b）の前記結合にスコアを割り当てることであって、前記スコアは一つまたは複数の参照試料との比較に基づいて割り当てられる、スコアを割り当てることと

30

（d） ステップ（c）における前記スコアを、参照の組織または細胞のスコアと比較すること、とを含み、

F O L R 1を正常発現もしくは低発現する参照試料に対するスコアよりも大きな、前記がんのF O L R 1レベルに対するスコア、またはF O L R 1を高発現する参照試料に対するスコアと等しいもしくはそれより大きな、前記がんのF O L R 1レベルに対するスコアによって、前記がんが、抗F O L R 1抗体または抗F O L R 1免疫複合体に応答する可能性が高いと特定される、上記方法。

（項目63）

前記がんが卵巣がんまたは肺がんである、項目62に記載の方法。

（項目64）

40

ある腫瘍が、抗F O L R 1抗体または抗F O L R 1免疫複合体を用いる治療に対して感受性であることを確認する方法であって、前記方法は、

（a） 前記腫瘍から得られた腫瘍組織試料におけるF O L R 1発現レベルを測定することであって、前記測定が、一つまたは複数の参照試料における染色強度または染色均一性と比較して、F O L R 1を発現するがん試料における染色強度または染色均一性を識別する検出法の使用を含む、測定することと、

（b） 前記腫瘍組織試料のF O L R 1染色強度スコアを決定することと、

（c） ステップ（b）で決定されたF O L R 1染色強度スコアを、少なくとも1つの参照試料におけるF O L R 1タンパク質発現を測定することによって決定された相対値と比較すること、とを含み、前記少なくとも1つの参照試料は、抗F O L R 1抗体または抗F

50

OLR1免疫複合体を用いる治療に対し感受性ではない組織、細胞、または細胞ペレット試料であり、前記相対値よりも高い、ステップ（b）で決定された前記試料のFOLR1染色強度スコアによって、前記腫瘍が、抗FOLR1抗体または抗FOLR1免疫複合体を用いる治療に対し感受性であることが確認される、上記方法。

（項目65）

前記検出法が手動で、または自動化された系を使用して行われる、項目62～64のいずれかに記載の方法。

（項目66）

前記検出法が自動化されている、項目65に記載の方法。

（項目67）

前記検出法がIHCである、項目62～66のいずれかに記載の方法。

（項目68）

前記IHCが、レベルが異なるFOLR1発現を識別することができる較正IHCである、項目67に記載の方法。

（項目69）

前記検出法が、低いFOLR1細胞表面発現、中間のFOLR1細胞表面発現、または高いFOLR1細胞表面発現を有する試料に対して、ある範囲の染色強度をもたらす、項目62～68のいずれかに記載の方法。

（項目70）

前記検出法が、参照試料と比較して、FOLR1を発現するがん試料における染色強度および染色均一性を識別する、項目62～69のいずれかに記載の方法。

（項目71）

前記試料が、免疫組織化学によるFOLR1発現について、1よりも大きな染色強度スコアを有する、項目62～70のいずれかに記載の方法。

（項目72）

前記試料が、免疫組織化学によるFOLR1発現について、2、3、または3+の染色強度スコアを有する、項目71に記載の方法。

（項目73）

前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋試料に対する免疫組織化学によるFOLR1発現について、2、3、または3+の染色強度スコアを有する、項目72に記載の方法。

（項目74）

前記試料が、均一であるFOLR1発現の染色均一性を有する、項目62～73のいずれかに記載の方法。

（項目75）

前記試料が、FOLR1について2、3、または3+の染色強度スコアを有し、不均一または均一である染色均一性を有する、項目62～74のいずれかに記載の方法。

（項目76）

FOLR1発現レベルが、細胞表面FOLR1と特異的に結合する抗体を用いて測定される、項目62～75のいずれかに記載の方法。

（項目77）

前記抗体がhuMo v 19抗体（M9346A）である、項目76に記載の方法。

（項目78）

前記抗体が、酵素、蛍光物質、放射性標識、および発光団からなる群から選択される検出試薬をさらに含む、項目62～77のいずれかに記載の方法。

（項目79）

前記検出試薬が、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミンからなる群から選択される、項目78に記載の方法。

（項目80）

前記抗体の濃度が約0.9～約3.8 μg/mlである、項目62～79のいずれかに

10

20

30

40

50

記載の方法。

(項目 8 1)

肺がんまたは卵巣がんを有する対象に対する、抗 F O L R 1 抗体または抗 F O L R 1 免疫複合体を用いる最適治療計画を最適化する方法であって、前記方法は、

(a) 前記対象から得られた前記試料を、細胞表面 F O L R 1 と特異的に結合する抗体と接触させることと、

(b) 一つまたは複数の参照試料における染色強度または染色均一性と比較して、F O L R 1 を発現するがん試料における染色強度または染色均一性を識別することができる検出法を用いて、(a)における前記抗体の、前記試料における前記細胞表面 F O L R 1 に対する結合を測定すること、および前記試料に対して染色スコアを割り当てることと、

(c) ステップ (b) におけるスコアが、F O L R 1 を正常発現もしくは低発現する参照試料のスコア未満もしくはそれに等しい場合は、高用量の抗 F O L R 1 免疫複合体を投与すること、または前記スコアが F O L R 1 を正常発現または低発現する参照試料のスコアよりも大きな場合、低用量の抗 F O L R 1 免疫複合体を投与すること、とを含む、上記方法。

(項目 8 2)

対象から得られた腫瘍組織試料におけるがん細胞上における細胞表面 F O L R 1 の発現を検出する方法であって、前記方法は、

(a) 腫瘍組織試料を得ることであって、前記がん試料をホルマリン固定してパラフィン包埋する、得ることと、

(b) 前記試料を、細胞表面 F O L R 1 と特異的に結合する抗体と接触させることと、

(c) F O L R 1 を発現するがん試料における染色強度または染色均一性を識別することができる検出法を使用し、一つまたは複数の参照試料における染色強度または染色均一性と比較して、前記腫瘍組織試料における前記細胞表面 F O L R 1 に対する、(b)における前記抗体の結合を測定することと、

(d) 前記腫瘍組織試料における細胞表面 F O L R 1 の染色強度または染色均一性のレベルを、一つまたは複数の参照試料に対して比較した後に、前記 F O L R 1 に対して F O L R 1 発現スコアを割り当てること、とを含む、上記方法。

(項目 8 3)

肺がんまたは卵巣がんを有する対象が、低用量の抗 F O L R 1 抗体または抗 F O L R 1 免疫複合体による治療計画に応答する可能性が高いことを確認する方法であって、前記方法は、

(a) 前記卵巣がんまたは肺がんから得られた細胞を含む生物試料を、細胞表面 F O L R 1 タンパク質と結合する薬剤と接触させることと、

(b) (a) の前記生物試料に対する、前記薬剤の結合を検出することと、

(c) ステップ (b) の前記結合に対してスコアを割り当てることであって、前記スコアは一つまたは複数の参照試料に対する比較に基づいて割り当てられる、スコアを割り当てることと、

(d) ステップ (c) における前記スコアを、参照の組織または細胞のスコアと比較すること、とを含み、

F O L R 1 を正常発現もしくは低発現する参照試料に対するスコアよりも大きな、前記卵巣がんもしくは肺がんの F O L R 1 レベルに対するスコア、または、F O L R 1 を高発現する参照試料に対するスコアと等しいもしくはそれよりも大きな、前記卵巣がんもしくは肺がんの F O L R 1 レベルに対するスコアによって、前記卵巣がんまたは肺がんが、低用量の抗 F O L R 1 抗体または抗 F O L R 1 免疫複合体に応答する可能性が高いと確認される、上記方法。

(項目 8 4)

前記がんが卵巣がんまたは肺がんである、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記検出法が、低い F O L R 1 発現、中間の F O L R 1 発現、または高い F O L R 1 発

10

20

30

40

50

現を有する試料に対して、ある範囲の染色強度をもたらす、項目 8 1 ～ 8 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 6)

前記試料が、F O L R 1 発現について、2、3、または 3 + の染色強度スコアを有する、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記試料が、F O L R 1 発現について、均一な染色均一性を有する、項目 8 1 ～ 8 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 8)

前記試料が、F O L R 1 について 2、3、または 3 + の染色強度スコアを有し、不均一または均一である染色均一性を有する、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記方法が手動で行われる、項目 8 1 ～ 8 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 0)

前記方法が自動化された系を使用して行われる、項目 8 1 ～ 8 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 1)

前記参照試料が、陽性参照試料または陰性参照試料である、項目 8 1 ～ 9 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 2)

前記参照試料が細胞、細胞ペレット、または組織を含む、項目 8 1 ～ 9 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 3)

前記薬剤または抗体が、酵素、蛍光物質、放射性標識、および発光団からなる群から選択される検出試薬をさらに含む、項目 8 1 ～ 9 2 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 4)

前記検出試薬が、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミンからなる群から選択される、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記薬剤または抗体の濃度が、約 0. 9 ～ 約 3. 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度である、項目 8 1 ～ 9 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 6)

治療有効量のヒト化抗 F O L R 1 抗体または抗 F O L R 1 免疫複合体を、前記対象に投与することをさらに含む、項目 8 1 ～ 9 5 のいずれかに記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図 1】手動による染色法：抗 F O L R 1 抗体は、形質移入細胞における F O L R 1 発現を検出する。300. 19 細胞に、ヒト F O L R 1 をコードするポリヌクレオチドを形質移入した。F O L R 1 タンパク質発現を、マウス抗体 BN 3. 2 を用いて検出した。(Smith AE et al, Hybridoma (Larchmt). 2007 Oct;26(5):281-8)

【図 2】手動による染色法：抗 F O L R 1 抗体は、レベルが異なる F O L R 1 発現を識別することができる。抗体 BN 3. 2 を用いて、種々の異種移植片細胞における F O L R 1 発現を検出した。BN 3. 2 抗体に対する検出限界は、およそ 4000 の、細胞あたりの結合抗体 (antibodies bound per cell) (ABC) である。

【図 3】手動による染色法：抗 F O L R 1 抗体は、組織試料におけるレベルが異なる F O L R 1 発現を識別することができる。BN 3. 2 を用いて、卵巣腫瘍 (A)、並びに非小細胞肺癌腫瘍 (B) の両方における F O L R 1 発現を検出した。

【図 4】手動による染色法：卵巣腫瘍および NSCLC 腫瘍における均一な F O L R 1 発現。F O L R 1 発現は、試験された卵巣癌並びに肺腺癌および細気管支肺胞上皮癌の多くで高かった。卵巣癌試料の大部分は、漿液細胞または類内膜細胞において、最も高い強度

10

20

30

40

50

の染色を有した。NSCLC腫瘍では、最も高いABC値は、細気管支肺胞上皮癌および乳頭状腺癌で見出された。

【図5】手動による染色法：FOLR1発現は通常、NSCLC細胞の膜に限定されている。高分解能顕微鏡観察によって、FOLR1染色の大部分が、NSCLC腫瘍における膜に限定されていたことを明らかにした。

【図6】手動による染色法：FOLR1発現は通常、卵巣がん細胞の膜に限定されている。高分解能顕微鏡観察によって、FOLR1染色の大部分が、卵巣腫瘍における膜に限定されていたことを明らかにした。

【図7】KB異種移植モデルにおける、huMov19標的化複合体の、*in vivo*での有効性。FOLR1非標的huC242-SPDB-DM4(D)との比較における、FOLR1標的切断可能複合体huMov19-SPDB-DM4(B)、および非標的huC242-PEG4Mal-DM4(E)との比較における、切断不可複合体huMov19-PEG4-Mal-DM4(C)を、SCIDマウスにKB細胞が皮下移植された確立された異種移植モデルを用いて試験した。huMov19によるFOLR1の標的化により、平均腫瘍容積に有意な減少がもたらされた。

10

【図8】OVCA-R-3ヒト卵巣癌異種移植片におけるIMGN853処置の用量反応抗腫瘍活性。マウスを、1.2、2.5または5.0mg/kgの、IMGN853の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBSの単回静脈内注射を与えた。

【図9】IGROV-1ヒト卵巣癌異種移植片におけるIMGN853処置の用量反応抗腫瘍活性。マウスを、1.2、2.5または5.0mg/kgの、IMGN853の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBSの単回静脈内注射を与えた。

20

【図10】OV-90ヒト卵巣癌異種移植片におけるIMGN853処置の用量反応抗腫瘍活性。マウスを、1.2、2.5または5.0mg/kgの、IMGN853の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBSの単回静脈内注射を与えた。

【図11】SKOV-3ヒト卵巣癌異種移植片におけるIMGN853処置の用量反応抗腫瘍活性。マウスを、1.2、2.5または5.0mg/kgの、IMGN853の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBSの単回静脈内注射を与えた。

【図12】KBヒト子宮頸部腺癌異種移植片におけるIMGN853処置の用量反応抗腫瘍活性。マウスを、1.0、2.5または5.0mg/kgの、IMGN853の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBSの単回静脈内注射を与えた。

30

【図13】自動染色法：IHCおよびフローサイトメトリーによる、株化細胞におけるFOLR1発現を示す代表的な写真およびヒストグラム。SW620細胞、T47D細胞、Igrov-1細胞、300.19/FR1細胞、HeLa細胞、およびKB細胞を、FOLR1の染色強度および均一性に関して、全てスコア化した。SW630およびIGROV-1は1～3不均一とスコア化され、T47Dは1～2不均一とスコア化され、HeLaは2～3不均一とスコア化され、一方、300.19/FR1およびKBは3均一とスコア化された。

【図14】自動染色法：漿液性卵巣がんにおける代表的なFOLR1染色。IHCによって、漿液性卵巣がんから得られた組織切片について、3均一、2～3均一、2均一、および2不均一染色を示す染色パターンが示された。

40

【図15】自動染色法：卵巣類内膜がん(endometrioid ovarian cancer)における代表的なFOLR1染色。IHCによって、類内膜がんから得られた組織切片について、3均一、2～3均一、3局所的、および1～2不均一染色を示す染色パターンが示された。

【図16】自動染色法：腺癌亜型(細気管支肺胞上皮癌を除く)のNSCLCにおける代表的なFOLR1染色。IHCによって、非小細胞肺癌、腺癌亜型から得られた組織切片について、3均一、2～3均一、2不均一、2均一、および1～2不均一染色を示す染色パターンが示された。

【図17】自動染色法：子宮内膜腺癌における代表的なFOLR1染色。IHCによって、子宮内膜腺癌から得られた組織切片について、3不均一、2不均一、および1不均一染色を示す染色パターンが示された。

50

【図18】自動染色法：腎明細胞癌における代表的なFOLR1染色。IHCによって、腎細胞がんから得られた組織切片について、2均一、2不均一、および1不均一染色を示す染色パターンが示された。

【図19】in vitroにおけるIMGN853の細胞障害活性。5種のFOLR1陽性細胞株（KB、IGROV-1、JEG-3、SKOV-3およびOVCAR-3）および2種のFOLR1陰性細胞株（NamalwaおよびSW2）を、IMGN853の細胞毒性効果に対するそれらの感受性について分析した。細胞を、IMGN853（実線）またはIMGN853+0.5μMの非複合体化humov19（M9346A）（点線）に5日間暴露し、WST-8をベースとしたアッセイによって細胞生存を決定した。代表的なデータを示す。生存細胞の割合を、10を底とするIMGN853の濃度の対数に対してプロットした。

10

【図20】FOLR1陽性細胞株のIMGN853に対する感受性対FOLR1発現のレベル。IMGN853の作用強度および特異性を、広範囲のFOLR1発現を有するFOLR1陽性細胞株に対して、分析した。株化細胞をIMGN853と共にインキュベートしたところ、KB、Igrov-1、およびJeg-3が、IMGN853に対して特に感受性が高く、一方、非複合体化humov19（M9346A）は、複合体活性の減少を示した。Skov-3およびOvcar-3は、IMGN853に対して感受性ではなく、非複合体化humov19（M9346A）は、複合体活性を変化させなかった。

【図21】自動染色法：FOLR1について染色された、卵巣癌異種移植片有効性モデル。IHCによって、卵巣がん異種移植片から得られた組織切片について、1～3不均一（Ovcar3）、1～3均一（Igrov1）、1～2不均一（Ov90）および陰性（SKOV3）を示す染色パターンが示された。

20

【図22】自動染色法：マウス異種移植片モデル。NSCLC（A）、子宮内膜癌（B）、および子宮頸癌（C）の株化細胞について、異種移植片におけるFOLR1の染色パターンを示した。NSCLC試料は2～3均一または2均一染色を示し、子宮内膜癌は2不均一／3局所的染色を示し、子宮頸癌は3均一染色を示した。

【図23】アッセイ対照組織の自動染色ガイド。自動IHCによって決定された、陰性（食道0）および陽性対照試料（唾液腺1～2不均一、肺2均一、脾臓3均一）の染色パターンを示す。

【図24】腫瘍組織の自動染色ガイド。自動IHCによって決定された、対照組織に対する、レベル3、レベル2、およびレベル1染色の代表的な染色パターンを示す。

30

【図25】腫瘍組織の自動染色ガイド。自動IHCによって決定された、対照組織に対する、レベル3、レベル2、およびレベル1／陰性染色の代表的な染色パターンを示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明は、FOLR1の過剰発現によって特徴付けられるがんの治療の有効性、またはそれに応答する可能性を増加させるための方法を提供する。本発明は、正常組織と比較された場合の、腫瘍組織におけるFOLR1の発現の動的な範囲（dynamic range）の発見、および、上昇したFOLR1発現レベルを有する腫瘍は抗FOLR1抗体または抗FOLR1免疫複合体を用いる治療に対して感受性がより高いという発見に基づいている。自動化された方法と手動の方法の間にある、感受性（sensitivity）および動的な範囲（dynamic range）の検出における差異も発見された。さらに、本発明の方法を実施するのに有用な一つまたは複数の試薬を含むキットが提供される。

40

【0026】

I. 定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および言い回しを下記に定義する。

【0027】

「ヒト葉酸受容体1」または「FOLR1」という用語は、本明細書で使用される場合、特に明記しない限りは、あらゆる未変性ヒトFOLR1をも意味する。「FOLR1」という用語は、「完全長の」、プロセッシングされていないFOLR1、および細胞内のプ

50

ロセシングによりもたらされるあらゆる形態の F O L R 1 を包含する。前記用語は、F O L R 1 の自然発生的な変異体（例えば、スプライスバリエント、対立遺伝子多型およびアイソフォーム）も包含する。本明細書に記載の F O L R 1 ポリペプチドは、種々の源から（ヒト組織型から等）、もしくは別の源から単離することができ、または組換え法もしくは合成法によって調製することができる。F O L R 1 配列の例としては、限定はされないが、N C B I 参照番号 P 1 5 3 2 8、N P _ 0 0 1 0 9 2 2 4 2 . 1、A A X 2 9 2 6 8 . 1、A A X 3 7 1 1 9 . 1、N P _ 0 5 7 9 3 7 . 1、および N P _ 0 5 7 9 3 6 . 1、並びに配列番号 1 および配列番号 2 に示されるものが挙げられる。

【0028】

F O L R 1 の「発現増加」という用語は、F O L R 1 発現レベルの上昇を含む試料を意味する。一例では、F O L R 1 発現は、I H C によって測定され、定義されたスコアを示す対照（例えば、較正対照）との比較によって、染色強度スコアまたは染色均一性スコアを与えられる（例えば、強度がレベル 3 の較正対照に匹敵する場合は、3 の強度スコアが試験試料に与えられ、または、強度がレベル 2 の較正対照に匹敵する場合は、2 の強度が試験試料に与えられる）。例えば、免疫組織化学による 1、2、3、もしくは 3 + またはそれより大きいスコアは、F O L R 1 の発現増加を示す。不均一または均一な染色均一性も、F O L R 1 の発現増加を示すものである。染色強度および染色均一性のスコアは、単独で、または組み合わせて（例えば、2 均一、2 不均一、3 均一、3 不均一等）、使用することができる。別の例では、F O L R 1 の発現増加は、対照値（例えば、がん罹患していない対象、または上昇した F O L R 1 値を有さないがん罹患している対象から得られた組織または細胞における発現レベル）と比較して、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍）の増加を検出することによって、決定することができる。

【0029】

「参照試料」は、試験試料から本発明の方法で得られた結果を相互に関連付け、比較するために使用することができる。参照試料は、細胞（例えば、細胞株、細胞ペレット）または組織であり得る。「参照試料」における F O L R 1 レベルは、絶対量もしくは相対量、ある範囲の量、最小量および／もしくは最大量、平均量、並びに／または F O L R 1 の中央値量であってよい。本発明の診断法は、試験試料における F O L R 1 の発現レベルと、「参照値」を比較することを含む。一部の実施形態では、参照値は、参照試料における F O L R 1 の発現レベルである。参照値は、前もって決定された値であってよく、試験試料と並行して試験された参照試料（例えば、対照生物試料）から決定されてもよい。参照値は、単一のカットオフ値（例えば中央値または平均値）またはある範囲の値（例えば信頼区間）であり得る。参照値は、がん罹患し易い個体、早期がんもしくは後期がんを有する個体、雄および／もしくは雌の個体、またはがん治療を受けている個体等の、種々の個体亜群に対して確立することができる。正常参照試料または正常参照値、および陽性参照試料または陽性参照値の例は、本明細書に記載されている。

【0030】

一部の実施形態では、参照試料は、健全な組織、具体的にはがん罹患していない対応する組織から得られた試料である。これらのタイプの参照試料は、陰性対照試料と称される。他の実施形態では、参照試料は、F O L R 1 を発現する腫瘍組織から得られた試料である。これらのタイプの参照試料は、陽性対照試料と称される。陽性対照試料は、均一性（不均一对均一）および／または染色強度の程度（1、2、3、3 +）についての比較指標としても使用することができ、これは、F O L R 1 発現レベルと相関関係を持つ。陽性対照比較試料は、染色強度または均一性の動的な範囲（dynamic range）を示す、較正参照試料（calibrated reference sample）とも称される。実施例 1 ~ 9 に示されるように、F O L R 1 を発現しない参照試料としては、ヒト食道組織が挙げられ、低 F O L R 1 参照としては、唾液腺（具体的には介在導管）組織および肺（具体的には呼吸上皮）組織が挙げられ、高 F O L R 1 発現組織としては、膵臓（具体的には、導管細胞）が挙げられる。細胞株について、低発現体（expressor）としては、限定はされないが、O V C A R 3 および T 4 7 D が挙げられ、中程度の発現体（expresser）としては、限定はされない

が、SW620、IGROV-1、JEG3が挙げられ、高発現体としては、限定はされないが、KBおよびIGROV1が挙げられる。特に望ましい、高FOLR1陽性参照は、葉酸受容体1を安定にまたは一過性に形質移入された細胞株（例えば、300.19/FR1）である。特定のがんについての、FOLR1の適切な陽性基準レベルおよび陰性基準レベルは、一つまたは複数の適切な対象におけるFOLR1のレベルを測定することによって決定してもよく、そのような基準レベルは、対象の特定の集団に合わせてもよい（例えば、基準レベルは、ある年齢の対象から得られた試料におけるFOLR1レベル間、およびある年齢群における特定の病状、表現型、またはそれらの欠如についての基準レベル間の比較ができるように、年齢を適合させてもよい）。そのような基準レベルは、生物試料におけるFOLR1のレベルを測定するのに使用される特定の技術（例えば、イムノアッセイ等）に合わせてもよく、FOLR1のレベルは使用される特定の技術によって異なり得る。

10

【0031】

「一次抗体」という用語は、本明細書では、組織試料における標的タンパク質抗原に特異的に結合する抗体を意味する。一次抗体は、通常、免疫組織化学（IHC）の手順で使用される、最初の抗体である。一実施形態では、一次抗体は、IHC手順で使用される唯一の抗体である。「二次抗体」という用語は、本明細書では、一次抗体に特異的に結合することによって、一次抗体と、仮にあれば後の試薬との間に、橋を形成する、抗体を意味する。二次抗体は、通常、免疫組織化学の手順で使用される、2番目の抗体である。

【0032】

20

本発明の「試料」または「生物試料」は、生体起源のものであり、特定の実施形態では、真核生物由来のもの等である。好ましい実施形態では、試料はヒト試料であるが、動物試料も本発明の実施に使用することができる。本発明で使用するための試料の源としては、限定はされないが、例えば、固形組織、生検吸引液（biopsy aspirate）、腹水、流体抽出物（fluidic extract）、血液、血漿、血清、髄液、リンパ液、皮膚の外側部分（external section）、気道、腸管、および尿生殖路、涙、唾液、乳汁、腫瘍、器官、細胞培養物および／または細胞培養成分が挙げられる。本発明は、固形組織試料を通常含むがん試料、または利用可能な物質の量が少ない、腹水等の他の体液にとって、特に有用である。本方法は、FOLR1の発現の様相（aspect）または試料の状態を試験するのに使用することができ、限定はされないが、種類の異なる細胞または組織を比較すること、異なる発生段階を比較すること、並びに疾患または異常の存在および／または種類を検出または決定することを含む。

30

【0033】

本明細書における目的のために、組織試料の「切片」とは、組織試料の単一の部分または断片（例えば組織の薄切片、または組織試料から切り取られた細胞）を意味する。組織試料の複数枚の切片（section）をとって、本発明に従って分析にかけてもよいことは理解されよう。いくつかの場合では、組織の選択された部分（portion）または切片（section）は、均一な細胞集団を含む。他の場合では、選択された部分は、組織の一領域（例えば、非限定例として管腔）を含む。選択された部分は、例えば、1個の細胞または2個の細胞程の大きさであってもよく、または何千個もの細胞を表し得る。ほとんどの場合、細胞の収集が重要となるが、本発明は、細胞成分の検出での使用のために記述されている一方で、本方法は生物体の非細胞成分（例えば非限定例として血液中の可溶性成分）を検出することにも使用することができる。

40

【0034】

「関連させる」または「関連させること」とは、方法は何であれ、第一の分析の成績および／または結果を、第二の分析の成績および／または結果と比較することを意味する。例えば、第二の分析を実行する際に第一の分析の結果を使用してもよく、および／または、第二の分析が実行されるべきかどうかを決定するために第一の分析の結果を使用してもよく、および／または、第一の分析の結果を、第二の分析の結果と比較してもよい。一実施形態では、FOLR1の発現増加は、FOLR1を標的とする抗がん治療の有効性の可

50

能性の増大と相関する。

【0035】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を通じて、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリスクレオチド、脂質、または上記の組み合わせ等の標的を認識し特異的に結合する、免疫グロブリン分子を意味する。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片（F a b、F a b'、F（a b'）₂、およびF vフラグメント等）、一本鎖F v（s c F v）変異体、少なくとも2つのインタクトな抗体から作製された、二重特異性抗体等の多特異的抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部位を含む融合タンパク質、並びに抗体が所望の生物活性を示せばよい、抗原認識部位を含む、その他全ての改変された免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、免疫グロブリンの5つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、およびI g M、またはそのサブクラス（アイソタイプ）（例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2）のいずれかであり得、それぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと称される、それらの重鎖の定常領域のアイデンティティに基づいている。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なる、よく知られたサブユニット構造および三次元配置を有する。抗体は、裸の状態でもよいし、トキシン、放射性同位元素等の他の分子に結合していてもよい。

10

【0036】

「阻止」抗体または「拮抗」抗体は、それが結合する、F O L R 1等の抗原の生物活性を阻害または低減する抗体である。ある実施形態では、阻止抗体または拮抗抗体は、実質的にまたは完全に、抗原の生物活性を阻害する。生物活性が、10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%、または100%低減されることが望ましい。

20

【0037】

「抗F O L R 1抗体」または「F O L R 1に結合する抗体」という用語は、F O L R 1を標的とする際、抗体が診断薬および／または治療薬として有用であるように、十分な親和性でF O L R 1と結合することが可能な抗体を意味する。無関係な、非F O L R 1タンパク質に対する抗F O L R 1抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）によって測定された場合、F O L R 1に対するその抗体の結合の約10%未満である。ある実施形態では、F O L R 1に結合する抗体は、1 μM以下、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下、または0.1 nM以下の解離定数（K d）を有する。抗F O L R 1抗体の例は、当該技術分野において周知であり、米国特許出願公開第2012/0009181号に記載されており、これは、参照によって本明細書に組み込まれる。

30

【0038】

「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体の一部分を意味し、インタクトな抗体の抗原決定可変領域を意味する。抗体断片の例としては、限定はされないが、F a b、F a b'、F（a b'）₂、およびF vフラグメント、直鎖抗体、一本鎖抗体、および抗体断片から形成された多特異的抗体が挙げられる。

【0039】

「モノクローナル抗体」とは、単一の抗原決定基、またはエピトープの高度に特異的な認識および結合に関わる、均質な抗体集団を意味する。これは、異なる抗原決定基を対象とする異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体とは対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、インタクトな、完全長のモノクローナル抗体、並びに抗体断片（F a b、F a b'、F（a b'）₂、F v等）、一本鎖（s c F v）変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含むその他全ての改変された免疫グロブリン分子を両方とも包含する。さらに、「モノクローナル抗体」とは、多くの方法、例えば、限定はされないが、ハイブリドーマ、ファージ選択、組み換え発現、および遺伝子導入動物によって作成された抗体を意味する。

40

【0040】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、本明細書では同義的に使用され、

50

特定の抗体により認識され、特異的に結合されることが可能な抗原の部分の意味する。抗原がポリペプチドであるとき、エピトープは、タンパク質の三次元的折り畳み (tertiary folding) によって並置された、近接アミノ酸および非近接アミノ酸の両方から形成され得る。近接アミノ酸から形成されたエピトープは通常、タンパク質変性時に保持されるが、一方で、三次元的折り畳みによって形成されたエピトープは通常、タンパク質変性時に失われる。エピトープは典型的に、独特な空間的高次構造で、少なくとも3個、より一般的には少なくとも5個または8～10個のアミノ酸を含んでいる。

【0041】

「結合親和性」とは、通常、分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位と、その結合パートナー (例えば、抗原) の間の、非共有相互作用の合計の強度を意味する。特に指示のない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー (例えば、抗体と抗原) の間の1:1の相互作用を反映する、固有結合親和性を意味する。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、通常、解離定数 (K_d) によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載の方法を含む、当該技術分野において周知の、共通の方法によって測定することができる。低親和性抗体は通常、ゆっくりと抗原と結合し、容易に解離する傾向があり、一方、高親和性抗体は通常、より急速に抗原と結合し、より長く結合状態のままである傾向がある。結合親和性を測定する種々の方法は、当該技術分野では周知であり、そのいずれも、本発明の目的のために使用することができる。具体的な、説明を目的とする実施形態を、以下に記載する。

【0042】

「～未満 (or better)」とは、結合親和性を言及するために本明細書で使用される場合、分子とその結合パートナーの間のより強力な結合を意味する。「～未満 (or better)」とは、本明細書で使用される場合、より強力な結合を意味し、より小さな数値の K_d 値によって表される。抗原に対して「0.6 nM 未満 (or better)」の親和性を有する抗体を例にすると、その抗原に対するその抗体の親和性は0.6 nM 未満 (すなわち0.59 nM、0.58 nM、0.57 nM等)、または0.6 nM 未満のあらゆる数値である。

【0043】

「実質的に同様な」または「実質的に同一の」という言い回しは、本明細書で使用される場合、2つの数値 (通常、一方は本発明の抗体に関連し、もう一方は参照/比較抗体に関連する) 間の類似度が、当業者によって、その2つの値の間の差異が上記値 (例えば、 K_d 値) によって測定される生物学的特性の文脈の中で生物学的および/または統計的な有意性がほとんどまたは全くないと見なされる程度に、十分に高いことを表す。上記2つの値の間の差異は、参照/比較抗体についての値の関数として、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、または約10%未満である。

【0044】

「単離された」、ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、自然には存在しない状態にある、ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物には、それらが自然において存在する状態ではもはやない程度にまで精製されたものも含まれる。一部の実施形態では、単離された、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、実質的に純粋である。

【0045】

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋な」とは、少なくとも50%純粋 (すなわち、混入物なし)、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも98%純粋、または少なくとも99%純粋である物質を意味する。

【0046】

「免疫複合体」または「複合体」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞結合剤 (すなわち、抗FOLR1抗体またはその断片) に連結した化合物またはその誘導体を意味し、一般式 (generic formula) : C-L-Aによって定義され、式中、C=細胞毒

、L＝リンカー、およびA＝細胞結合剤または抗FOLR1抗体もしくは抗体断片である。免疫複合体は、順序を逆にした一般式：A－L－Cによっても定義することができる。

【0047】

「リンカー」は、化合物、通常はメイタンシノイド等の薬剤を、抗FOLR1抗体またはその断片等の細胞結合剤に、安定な共有結合性様式で連結することが可能である、あらゆる化学的部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性のままである条件下で、酸による開裂、光による開裂、ペプチダーゼによる開裂、エステラーゼによる開裂、およびジスルフィド結合の開裂をし易くてもよいし、それに対し実質的に抵抗性であり得る。適切なリンカーは、当該技術分野において周知であり、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチダーゼ不安定性基およびエステラーゼ不安定性基が挙げられる。リンカーとしては、本明細書に記載され、当該技術分野で既知の、荷電リンカー、およびその親水性形態も挙げられる。

10

【0048】

「がん」および「がんの」という用語は、細胞集団が制御されない細胞成長によって特徴づけられる哺乳動物における生理的条件を表しているか、または記述している。がんの例としては、限定はされないが、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病が挙げられる。そのようながんのより具体的な例としては、扁平上皮がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜がん、肝細胞がん、胃腸がん、膵がん、グリア芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝がん、膀胱がん、肝細胞腫、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝癌、および各種頭頸部がんが挙げられる。

20

【0049】

「腫瘍」および「新生物」とは、前がん病変を含む、良性（非がん性）または悪性（がん性）いずれかの、過剰な細胞成長または増殖からもたらされた、いかなる組織塊をも意味する。

【0050】

用語「がん細胞」、「腫瘍細胞」、および文法的等価物 (grammatical equivalent) は、腫瘍または前がん病変に由来する全細胞集団を意味し、腫瘍細胞集団の大部分を成す非腫瘍形成性細胞、および腫瘍形成性幹細胞（がん幹細胞）の両方を含む。本明細書で 사용되는場合、「腫瘍細胞」という用語は、それらの腫瘍細胞をがん幹細胞から区別するための再生および分化する能力を欠く腫瘍細胞を単に意味する場合は、「非腫瘍形成性の」という用語によって修飾される。

30

【0051】

「対象」という用語は、特定の処置の受容者となるあらゆる動物（例えば、哺乳動物）、例えば、限定はされないが、ヒト、ヒト以外の霊長類、げっ歯類等を意味する。典型的には、「対象」および「患者」という用語は、ヒト対象に関連して、本明細書では同義的に使用される。

【0052】

一つまたは複数のさらなる治療薬「と組み合わせでの」投与には、同時 (simultaneous、concurrent) 投与および任意の順番での連続投与が含まれる。

40

【0053】

「医薬製剤」という用語は、活性成分の生物活性が効果的であることを可能にするような形態にあり、その製剤が投与されるであろう対象に対して、許容できないほど毒性がある追加成分を含有しない、調製物を意味する。そのような製剤は無菌であり得る。

【0054】

本明細書に記載されるような抗体の「有効量」は、具体的に定められた目的を実行するのに十分な量である。「有効量」は、定められた目的との関連で、経験的に、および通例の方法で、決定することができる。

【0055】

「治療有効量」という用語は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「治療」

50

するのに効果的な、抗体または他の薬剤の量を意味する。がんの場合では、薬剤の治療有効量によって、がん細胞の数の減少、腫瘍サイズの減少、周辺臓器へのがん細胞浸潤の阻害（すなわち、ある程度の速度減少、そしてある実施形態では停止）、腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の速度減少、そしてある実施形態では停止）、腫瘍増殖のある程度の阻害、および／またはがんに関連する症状のうちの一つまたは複数のある程度の軽減が可能となる。本明細書における「治療」の定義を参照されたい。薬剤が、増殖を阻止する、および／または既存のがん細胞を殺傷することが可能な程度にまで、薬剤は細胞増殖抑制性および／または細胞殺傷性であり得る。ある実施形態では、FOLR1レベルが増加したと見なされることによって、FOLR1標的治療薬の量を減少させて投与して、より大きな投与量でみられたのと同じ治療効果を達成することができる。「予防有効量」とは、

10

【0056】

「好都合に応答する」という用語は、通常、対象において有益な状態を引き起こすことを意味する。がん治療に関して、本用語は、対象に対して治療効果を与えることを意味する。がんにおける好ましい治療効果は、いくつかの方法（W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)を参照）で測定することができる。例えば、腫瘍増殖阻害、分子マーカー発現、血清マーカー発現、および分子イメージング技術は全て、抗がん剤の治療効果を評価するのに使用することができる。腫瘍増殖阻害に関して、NCI基準によれば、

20

【0057】

「標識」という単語は、本明細書で使用される場合、「標識された」抗体を作製するために、抗体に直接的または間接的に結合している、検出可能な化合物または組成物を意味する。標識は、それ自体が検出可能であり得るか（例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識）、または、酵素標識の場合、検出が可能な基質化合物または基質組成物の化学的変質を触媒することができる。

【0058】

「化学療法剤」は、作用機序を問わず、がんの治療に有用な化学物質である。化学療法剤のクラスとしては、限定はされないが、アルキル化剤 (alkylating agent)、代謝拮抗剤、紡錘体毒植物性アルカロイド (spindle poison plant alkaloid)、細胞障害性 (cytotoxic) / 抗癌性抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、抗体、光増感剤、およびキナーゼ阻害剤が挙げられる。化学療法剤には、「標的療法」および従来の化学療法で使用される化合物が含まれる。

30

【0059】

「治療すること (treating)」または「治療 (treatment)」または「治療すること (to treat)」または「軽減すること (alleviating)」または「軽減すること (to alleviate)」等の用語は、1) 診断された病的状態もしくは障害の症状を治癒、鈍化、軽減し、および／またはその進行を停止させる治療的処置、並びに、2) 標的とされた病的状態または障害の発生を予防および／または緩徐化する予防的 (prophylactic or preventive) 処置の両方を意味する。従って、治療を必要としている者には、既に障害を有している者、障害に罹患し易い者、および障害が予防されるべき者が含まれる。ある実施形態では、患者が以下のうちの一つまたは複数を示すならば、対象は、本発明の方法に従って、首尾よくがんの「治療を受けた」ことになる：それぞれ、新薬の承認のための、国立がん研究所および米国食品医薬品局による、一連の基準によって測定される、悪液質の減少、生存期間の増加、腫瘍進行までの期間の延長、腫瘍体積の減少、腫瘍量の減少、および／または腫瘍転移までの期間の延長、腫瘍再発までの期間の延長、腫瘍反応、完全寛解、部分寛解、安定疾患、進行性疾患、無増悪生存期間 (PFS)、全生存 (OS)。Johnso

40

50

n et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411を参照。

【0060】

「無増悪生存期間」(PFS)は、「腫瘍進行までの期間」(YIP)とも称され、処置中および処置後の、がんが増殖しない期間の長さを示す。無増悪生存期間には、患者が完全寛解または部分寛解を経験した時間の量、並びに患者が安定疾患を経験した時間の量が含まれる。

【0061】

「無病生存期間」(DFS)とは、患者が、疾患がないままである、処置中および処置後の期間の長さを意味する。

【0062】

「全生存」(OS)とは、未処置または無処置の個体または患者と比較した場合の、平均余命における延長を意味する。

【0063】

本開示および特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ある(a)」、「ある(an)」、および「その(the)」は、文脈によって特に明示されない限りは、複数形も含む。

【0064】

実施形態が、本明細書において、「～を含む(comprising)」という言葉を用いて記述される場合は常に、「～から成る」および／または「～から実質的に成る」という言葉で記述されている類似の実施形態も提供されることを理解されたい。

【0065】

本明細書で、「Aおよび／またはB」等の言い回しにおいて使用される、「および／または」という用語は、「AおよびB」の両方、「AまたはB」、「A」、および「B」を含むことが意図される。同様に、「A、B、および／またはC」等の言い回しにおいて使用される「および／または」という用語は、以下の実施形態のそれぞれを包含することが意図される：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A（単独）；B（単独）；およびC（単独）。

【0066】

II. 生体試料

生体試料はしばしば、固定液で固定される。ホルマリン（ホルムアルデヒド）およびグルタルアルデヒド等のアルデヒド系固定液が典型的に使用される。アルコール浸漬(Battifora and Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095)等の他の固定法を用いて固定された組織試料も、適切である。使用される試料は、パラフィン中に包埋されていてもよい。一実施形態では、組織試料は、ホルマリン固定およびパラフィン包埋(FFPE)の両方をされる。別の実施形態では、FFPEブロックは、FFPEコア試料用の特定の領域（単数または複数）を選択するために、分析用の一つまたは複数の部分を選択する前に、ヘマトキシリンおよびエオシン染色される。これらの粒状(particulate)標本から組織ブロックを調製する方法は、以前の、種々の予後因子のIHC研究において使用されており、および／または、当業者に周知である（例えば、Abbondanzo et al., Am J Clin Pathol. 1990 May;93(5):698-702、Allred et al., Arch Surg. 1990 Jan;125(1):107-13を参照）。

【0067】

簡潔に説明すると、任意の無処置の器官または組織は、かなり小さな断片に切断され、組織が「固定」されるまで、様々な期間の間、様々な固定液（例えばホルマリン、アルコール等）中でインキュベートされ得る。試料は、実質的に、身体から摘出されたいかなる無傷組織でもあり得る。試料は、組織病理学研究所で通常使用される装置に適合する、適度に小さな断片（単数または複数）に切断され得る。切断断片のサイズは、通常、数ミリメートルから数センチメートルの範囲である。

【0068】

I I I . 検出抗体複合体

本発明はさらに、少なくとも1つの薬剤に連結して検出抗体複合体を形成する、モノクローナルタイプの、抗FOLR1抗体を提供する。診断薬としての抗体分子の有効性を増加させるために、少なくとも1つの所望の分子または部分と連結または共有結合または複合体化することが従来の方法である。そのような分子または部分は、限定はされないが、少なくとも1つのレポーター分子であり得る。レポーター分子は、アッセイを用いて検出し得るあらゆる部分と定義される。抗体に結合されているレポーター分子の非制限的な例としては、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、リン光性分子 (phosphorescent molecule)、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子および／またはバイオチン等のリガンドが挙げられる。

10

【0069】

十分な選択性、特異性または親和性を有するいかなる細胞結合剤 (例えば、抗体またはポリペプチド) も、FOLR1ポリペプチドを検出するための基礎として使用することができる。そのような特性は、当業者に知られている従来の免疫学的スクリーニング法を用いて評価することができる。生物学的に活性な分子に結合するための、抗体分子における部位には、標準的な抗原結合部位に加えて、抗原と結合することができる可変領域に存在する部位が含まれる。さらに、可変領域は抗体の自己結合 (antibody self-binding) に関わっており (Kang et al., 1988)、抗抗体によって認識されるエピトープ (イディオタイプ抗原決定基) を含有する (Kohler et al., 1989)。

【0070】

20

タンパク質結合 (例えば、抗体) 複合体のある例は、タンパク質結合剤 (例えば、抗体) が検出可能な標識に連結している、複合体である。「検出可能な標識」は、それら特有の機能特性、および／または化学的特徴によって検出することができる化合物および／または元素であり、それを使用することによって、それらが結合している抗体の検出、および／または、必要であればさらには定量化までが可能となる。

【0071】

多くの適切な造影剤 (imaging agent) が、当該技術分野において周知であり、それらを抗体に結合するための方法も同様である (例えば、米国特許第5, 021, 236号、同第4, 938, 948号、および同第4, 472, 509号を参照、それぞれは参照によって本明細書に組み込まれる)。使用される造影部分 (imaging moiety) は、例えば、常磁性イオン、放射性同位元素、蛍光色素、NMRで検出可能な物質、および／またはX線画像化であり得る。

30

【0072】

タンパク質結合 (例えば、抗体) 複合体としての使用が企図されている蛍光標識の例としては、例えば、Alexa350、Alexa430、Alexa488、AMCA、BODIPY630/650、BODIPY650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、Dylight488、フルオレセインイソチオシアナート、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、HEX、6-JOE、Oregon Green488、Oregon Green500、Oregon Green514、Pacific Blue、フィコエリトリン、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、テトラメチルローダミン (TMR)、レノグラフィン (Renographin)、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、Texas Red、およびそれら標識の誘導体 (例えば、イソチオシアナートまたは複合体化のための他のリンカーで修飾されたハロゲン化誘導体等) が挙げられる。放射標識の例はトリチウムである。

40

【0073】

本発明において企図されるタンパク質結合 (例えば、抗体) 検出複合体には、in vitro用のものも含まれ、その抗体は、第二の結合リガンドに、および／または、発色基質との接触時に有色の生成物を生じる酵素 (酵素タグ) に連結している。適切な酵素の

50

例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（セイヨウワサビ）水素ペルオキシダーゼおよび／またはグルコースオキシダーゼが挙げられる。好ましい第二の結合リガンドは、ビオチンおよび／またはアビジン並びにストレプトアビジン化合物である。そのような標識の使用は、当業者に周知であり、例えば、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,277,437号、同第4,275,149号および同第4,366,241号に記載されており、それぞれは参照により本明細書に組み込まれる。

【0074】

アジド基を含有する分子も、低強度の紫外線によって生じる反応性ナイトレン中間体を介して、タンパク質への共有結合を形成するのに使用することができる (Potter & Haley, 1983)。具体的には、プリンヌクレオチドの2-アジド類似体および8-アジド類似体は、未精製細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を確認するための部位特異的な光プローブとして使用されている (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985)。2-アジドヌクレオチドおよび8-アジドヌクレオチドも、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインを位置付けるために使用されており (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989、およびDholakia et al., 1989)、抗体結合剤として使用することができる。

10

【0075】

抗体の、その結合部分への結合または接合のための、いくつかの方法が当該技術分野において周知である。いくつかの結合法は、例えば、抗体に結合した、ジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA) 等の有機キレート化剤、エチレントリアミン四酢酸、N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド、および／またはテトラクロロ-3 α -6 α -ジフェニルグリコールウリル-3を使用している金属キレート錯体の使用を含む (米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号、それぞれは参照によって本明細書に組み込まれる)。モノクローナル抗体は、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩等のカップリング剤の存在下で、酵素と反応もし得る。フルオレセインマーカ-とのタンパク質結合 (例えば、抗体) 複合体は、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアン酸塩との反応により、作製される。米国特許第4,938,948号では、乳腺腫瘍のイメージングは、例えば、モノクローナル抗体を用いて達成されており、検出可能なイメージング部分は、メチル-p-ヒドロキシベンズイミダートまたはN-スクシンイミ

20

30

【0076】

他の実施形態では、抗体結合部位を変化させない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域にスルフヒドリル基を選択的に導入することによって、免疫グロブリンを誘導体化することが企図される。この方法に従って作製された抗体複合体が開示され、寿命、特異性および感受性の向上を示している (米国特許第5,196,066号、参照によって本明細書に組み込まれる)。レポーターまたはエフェクター分子がFc領域中の炭水化物残基に結合している、エフェクターまたはレポーター分子の部位特異的結合は、文献 (O'Shannessy et al., 1987) にも開示されている。

40

【0077】

本発明の他の実施形態では、免疫グロブリンは、トリチウム等の核種で放射性標識される。さらなる実施形態では、ナノゴールド (nanogold) 粒子 (約0.5 nm~40 nmのサイズ等) および／または粒子ドット (Quantum Dot) (カリフォルニア州ヘイワード) が使用される。

【0078】

I V. 酵素および基質 (色素原 (chromagen))

基質および指示薬の使用が、FOLR1の検出に企図され、例えば、以下で提供される例示的な実施形態等である。

【0079】

50

西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）は、最初に過酸化水素との複合体を形成し、次にその分解を引き起こし、結果として水および原子状酸素を生じさせる、酵素である。他の多くの酵素と同様、HRPおよびいくつかのHRP様活性は、過剰な基質によって阻害され得る。HRPと過剰な過酸化水素の間で形成された複合体は、触媒的には不活性であり、電子供与体（例えば発色物質）が存在しない場合、可逆的に阻害される。内在性HRP活性の反応停止を引き起こすのは、過剰な過酸化水素および電子供与体の欠如である。

【0080】

アッセイ系で使用される場合、HRPは、規定の基質をその活性型色素原（chromagen）に変換し、それにより色の変化を生じさせることにも使用することができる。HRP酵素は、いくつかの方法によって、抗体、タンパク質、ペプチド、ポリマー、または他の分子に結合され得る。そのような方法は、当該技術分野において周知である。グルタルアルデヒドを、HRPと抗体の混合物を含有する溶液に添加することによって、酵素に対してよりも、互いに結合している、より多くの抗体分子が生じる。二段階手順では、HRPは最初に、二機能性試薬と反応する。第二段階では、活性型HRPのみが抗体と混合され、それによって、さらにより効率的な標識がもたらされ、重合は起こらない。HRPは、二段階のグルタルアルデヒド手順を用いて（ストレプト）アビジンにも結合される。この形態は、例えば、LABおよびLSABが基質である手順で使用される。ビオチンとの結合は2つのステップを含み、ビオチンはまずビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルに、またはビオチンヒドラジドに誘導体化されなければならない、その後、HRP酵素のεアミノ基と反応することができる。

【0081】

3, 3'-ジアミノベンジジン（DAB）は、アルコールおよび他の有機溶剤にかなり難溶性の褐色の最終産物を生じる、HRP等の酵素に対する基質である。DABの酸化は重合も引き起こし、四酸化オスミウムと反応する能力がもたらされ、それによって、その染色強度および電子密度が増加する。重合DABの光学濃度を強めるのに使用されるいくつかの金属および方法の中で、硫化銀と組み合わせた塩化金が、最も好結果であると思われる。

【0082】

3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）は、HRP等の酵素に対する基質である。酸化されると、アルコール溶性である深紅色の最終産物が形成される。従って、AECで処理された試料は、アルコールまたはアルコール溶液（例えば、ハリスヘマトキシリン）に浸漬されてはならない。代わりに、水性の対比染色および封入剤を使用するべきである。AECは都合が悪いことにさらなる酸化を受けやすく、過剰な光に曝された場合、退色する。従って、暗所での貯蔵が推奨される。

【0083】

4-クロロ-1-ナフトール（CN）は、HRP等の酵素に対する基質であり、青色の最終産物として沈殿する。CNはアルコールおよび他の有機溶剤に可溶であるため、試料は、脱水してはならず、アルコール性対比染色剤へ暴露してはならず、または有機溶剤を含有する封入剤と一緒にカバーガラスを被せてはならない。DABと異なり、CNは、沈殿の場所から拡散する傾向がある。

【0084】

p-フェニレンジアミン二塩酸塩／ピロカテコール（ハンカーイエーツ試薬（Hanker-Yates reagent））は、HRP等の酵素に対する電子供与体基質であり、アルコールおよび他の有機溶剤に難溶性、暗青色の反応産物を生じる。重合DABと同様、この反応産物はオスミウムで処理することができる。免疫ペルオキシダーゼ法においてハンカーイエーツ試薬を用いて、様々な結果が得られている。

【0085】

子ウシ腸アルカリホスファターゼ（AP）（分子量100kD）は、P-O結合を切断することによって有機酸エステルからリン酸基を除去（加水分解によって）および移動さ

10

20

30

40

50

せる酵素であり、中間体の酵素－基質結合が短時間に形成される。A Pに対する主要な金属活性化因子は、M g ++、M n ++およびC a ++である。

【0086】

A Pは、非標識アルカリホスファターゼ抗アルカリホスファターゼ（A P A A P）法が公開されるまで、免疫組織化学で広くは用いられていなかった。この方法で利用される可溶性の免疫複合体は、およそ560 k Dの分子量を有する。P A P法と比較した場合のA P A A P法の主な利点は、内在性ペルオキシダーゼ活性によって受ける干渉がないことである。P A P染色では内在性ペルオキシダーゼ活性が破壊される恐れがあるため、A P A A P法は、血液および骨髄のなすりつけ標本に使用されることが推奨される。骨、腎臓、肝臓およびいくつかの白血球からの内在性アルカリホスファターゼ活性は、基質溶液への1 m Mレバミゾールの添加により、阻害され得るが、5 m Mがより有効であることが判明している。腸アルカリホスファターゼはレバミゾールによって十分には阻害されない。

10

【0087】

免疫アルカリホスファターゼ染色法では、酵素が、ナフトールリン酸塩エステル（基質）を、フェノール化合物およびリン酸塩に加水分解する。フェノールは無色のジアゾニウム塩（色素原）にカップリングして、難溶性の、有色アゾ染料を生成する。基質および色素原のいくつかの異なる組み合わせが首尾よく使用されている。

【0088】

ナフトールA S－M Xリン酸塩は、その酸形態で、またはナトリウム塩として、使用され得る。色素原であるF a s t R e d T RおよびF a s t B l u e B Bは、それぞれ、明赤色または明青色の最終産物を生じる。両方ともアルコール性有機溶剤および他の有機溶剤に可溶であり、そのため、水性の封入剤が使用されなければならない。F a s t R e d T Rは、染色細胞がなすりつけ標本である場合に好ましい。

20

【0089】

基質のさらなる例としては、ナフトールA S－B Iリン酸塩、ナフトールA S－T Rリン酸塩、および5－ブロモ－4－クロロ－3－インドキシルリン酸塩（B C I P）が挙げられる。他の可能な色素原としては、例えば、F a s t R e d L B、F a s t G a r n e t G B C、ニトロブルーテトラゾリウム（Nitro Blue Tetrazolium）（N B T）ヨードニトロテトラゾリウムバイオレット（iodonitrotetrazolium Violet）（I N T）、およびそれら構造体の誘導体が挙げられる。

30

【0090】

V. 免疫検出法

さらに別の実施形態では、本発明は、本発明により企図されているリガンド等の生物学的成分に対して、結合、精製、除去、定量化および／または、他に通常の検出を行うための免疫検出法に関する。本発明に従って作製された抗体は、野生型および／または変異型のリガンドタンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドを検出するために使用され得る。本出願の全体にわたって記述されているように、野生型および／または変異型リガンド特異的抗体の使用が企図されている。いくつかの免疫検出法には、少し例を挙げるだけでも、フローサイトメトリー、酵素免疫測定法（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、免疫放射線測定法、フルオロイムノアッセイ、化学発光法、生物発光分析法、およびウエスタンブロットが含まれる。種々の有用な免疫検出法のステップは、例えば、Doolittle M H and Ben-Zeev O, Methods Mol Biol. 1999;109:215-37、Gulbis B and Galand P, Hum Pathol. 1993 Dec;24(12):1271-85、およびDe Jager R et al., Semin Nucl Med. 1993 Apr;23(2):165-79等の科学文献に記載されており、それぞれは参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【0091】

一般的に、免疫結合法（immunobinding method）は、リガンドタンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドを含むとされる試料を入手し、本発明に従って、場合によっては免疫複合体を形成させるのに効率的な条件下で、その試料を第一のリガンド結合ペプチド（例えば、抗リガンド抗体）と接触させることを含む。

50

【0092】

抗原検出の点から、分析される生物試料は、組織切片または検体等の野生型もしくは変異型のリガンドタンパク質—特異的抗原を含むとされるあらゆる試料、ホモジナイズされた組織抽出物、生検吸引液 (biopsy aspirate)、細胞、上記野生型もしくは変異型の F O L R 1 含有組成物のいずれかの分離されたおよび／もしくは精製された形態、または血液および／もしくは血清を含む、組織と接触するあらゆる生体液であり得るが、組織試料または抽出物が好ましい。

【0093】

効率的な条件下で、免疫複合体 (一次免疫複合体) を形成させるのに十分な時間、選択された生物試料を抗体と接触させるには、単に、抗体組成物を試料に添加し、抗体が、存在する任意のリガンドタンパク質抗原と、免疫複合体を形成する、すなわち、それに結合するのに、十分な長さの期間、その混合物をインキュベートするだけでよい。この後、組織切片、E L I S A プレート、ドットブロットまたはウェスタンブロット等の試料—抗体組成物は、通常洗浄されて、あらゆる非特異的に結合した抗体種を取り除かれ、それによって、一次免疫複体内に特異的に結合した抗体のみが検出可能となる。

10

【0094】

一般的に、免疫複合体形成の検出は、当該技術分野において周知であり、多数の手法の適用を通じて達成することができる。これらの方法は、通常、放射性タグ、蛍光タグ、生物学的タグおよび酵素タグ等の標識またはマーカーの検出に基づいている。そのような標識の使用に関する米国特許には、米国特許第 3, 8 1 7, 8 3 7 号、同第 3, 8 5 0, 7 5 2 号、同第 3, 9 3 9, 3 5 0 号、同第 3, 9 9 6, 3 4 5 号、同第 4, 2 7 7, 4 3 7 号、同第 4, 2 7 5, 1 4 9 号および同第 4, 3 6 6, 2 4 1 号が含まれ、それぞれは参照によって本明細書に組み込まれる。当然ながら、当該技術分野において周知の通り、二次抗体および／またはビオチン／アビジンリガンド結合配置等の、第二の結合リガンドの使用を通じたさらなる利点を見出すことができる。

20

【0095】

検出に使用される抗リガンド抗体は、それ自体が検出可能な標識に連結していてもよく、この標識をただ検出するだけで、組成物中の一次免疫複合体の量を決定することが可能となる。あるいは、一次免疫複体内で結合する一次抗体は、その抗体に対し結合親和性を有する第二の結合剤を使用して検出され得る。これらの場合、第二の結合剤は、検出可能な標識に連結していてもよい。第二の結合剤はしばしば、それ自体が抗体であるので、「二次」抗体、または高分子検出系と称し得る。一次免疫複合体を、効率的な条件下で、二次免疫複合体を形成させるのに十分な時間だけ、標識された二次結合剤または抗体／高分子検出系に接触させる。次に、二次免疫複合体を、通常は洗浄し、あらゆる、非特異的に結合した、標識された二次抗体またはリガンドを除去し、次に二次免疫複合体中の残りの標識を検出する。

30

【0096】

さらなる方法には、二段階手法による、一次免疫複合体の検出が含まれる。抗体に対して結合親和性を有する、抗体等の第二の結合剤は、上記のように、二次免疫複合体を形成するのに使用される。洗浄後、二次免疫複合体を、再度、効率的な条件下で、免疫複合体 (三次免疫複合体) を形成させるのに十分な時間だけ、第二の抗体に対して結合親和性を有する第三の結合剤または抗体と接触させる。第三のリガンドまたは抗体は検出可能な標識に連結しており、それによって、このように形成された三次免疫複合体の検出が可能となる。この系は、所望であれば、シグナル増幅を提供し得る。

40

【0097】

別の実施形態では、ビオチン化されたモノクローナルまたはポリクローナル抗体が、標的抗原 (単数または複数) を検出するのに使用され、次に、第二段階の抗体が、複合体化したビオチンに結合したビオチンを検出するのに使用される。その方法では、試験される試料は、最初に、第一段階の抗体を含む溶液中でインキュベートされる。標的抗原が存在する場合、抗体のいくつかは抗原に結合して、ビオチン化抗体／抗原複合体を形成する。

50

次に、抗体／抗原複合体は、ストレプトアビジン（またはアビジン）、ビオチン化DNA、および／または相補的なビオチン化DNAの連続的溶液中でのインキュベーションによって増幅する。各ステップにより、追加のビオチン部位が抗体／抗原複合体に付加される。適切な増幅レベルが達成されるまで、増幅ステップは繰り返され、その時点で、試料はビオチンに対する第二段階の抗体を含む溶液中でインキュベートされる。この第二段階の抗体は、例えば、色素原基質を用いる組織酵素学により抗体／抗原複合体の存在を検出するために使用され得る酵素で、標識されている。適切な増幅により、肉眼で見えるタンパク質結合（例えば、抗体）複合体を生成することができる。

【0098】

免疫検出の別の既知の方法では、免疫PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法が利用される。PCR方法は、抗体を遊離する低pHまたは高塩濃度の緩衝液で洗い流しされる、DNA／ビオチン／ストレプトアビジン／抗体複合体を使用する。次に、得られた洗浄液は、適切なプライマーを用いて、PCR反応を実行するのに、適切な対照と一緒に使用される。特定の実施形態では、PCRの極端な増幅能および特異性は、単一の抗原分子を検出するのに利用され得る。そのような検出は、リアルタイムでも行われ得る。例えば、定量的リアルタイムPCRの使用が企図される。

【0099】

種々の形態の疾患を有する患者の臨床診断および／またはモニタリングにおいて、FOLR1変異体の検出、および／または正常な対象から得られた対応する生物試料におけるレベルと比較した場合のFOLR1レベルの変化は、患者がその疾患に罹患していることを示すものである。しかし、当業者に知られているように、そのような臨床診断は、単独で、この方法に基づいて、必ずしも行われない。当業者は、生物マーカーの種類および／または量における有意差を識別することを熟知しており、それによって生物マーカーの、陽性同定（positive identification）、および／または低レベルおよび／またはバックグラウンドでの変化が示される。実際に、バックグラウンド発現レベルはしばしば「カットオフ」を形成するのに使用され、それより上に増加された検出は有意および／または陽性としてスコア化される。

【0100】

一実施形態では、FOLR1の免疫学的検出（免疫組織化学による）は、強度および均一性（染色細胞－膜のみの割合）の両方についてスコア化される。強度についてのFOLR1発現の比較スケールは、0－陰性、0～1－非常に弱い、1－弱い、1～2－弱い～中程度、2－中程度、2～3－中程度～強い、3－強いとして、相関する。定量的に、スコア0は、膜染色が腫瘍細胞で観察されないことを表す。スコア1は、腫瘍細胞における、かすかな／かろうじて認知できる膜染色を表す。スコア2については、中程度の膜染色が腫瘍細胞において観察される。最後に、スコア3または3＋は、腫瘍細胞における中から強い膜染色を表す。FOLR1発現について0または1のスコアを有する試料は、FOLR1を過剰発現していないと特徴付けることができ、一方、2または3のスコアを有する試料は、FOLR1を過剰発現していると特徴付けることができる。FOLR1を過剰発現している試料は、細胞あたりで発現されるFOLR1分子のコピー数に対応する免疫組織化学スコアによっても等級分けすることができ、生化学的に決定されている：0＝0～10，000コピー／細胞、1＝少なくとも約200，000コピー／細胞、2＝少なくとも約500，000コピー／細胞、および3＝少なくとも約2，000，000コピー／細胞。FOLR1パーセント細胞膜染色均一性についての比較スケールは、以下の通りに相関する：0－陰性、局所的－25％未満、不均一（hetero）－25～75％、および均一（homo）－75％超。

【0101】

VI. 核酸ハイブリダイゼーション

in situハイブリダイゼーションは、通常、スライドに固定された細胞または組織切片上で行われる。in situハイブリダイゼーションは、いくつかの従来法で行われ得る（例えば、Leitch et al. In situ Hybridization: a practical guide

10

20

30

40

50

, Oxford BIOS Scientific Publishers, Microscopy handbooks v. 27 (1994)を参照)。一つの *in situ* 法では、蛍光色素（アルゴンイオンレーザーによって励起されたときに緑色の蛍光を発するフルオレセインイソチオシアナート（FITC）等）が、細胞中の標的ヌクレオチド配列に相補的な核酸配列プローブを標識するのに使用される。標的ヌクレオチド配列を含む各細胞は、標識されたプローブと結合し、使用される特定の蛍光色素を励起するのに適切な波長の光源に細胞を暴露すると、蛍光シグナルを生じる。

【0102】

様々な程度のハイブリダイゼーションの厳密性が使用され得る。ハイブリダイゼーションの条件がより厳密になるにつれて、安定な二重鎖を形成および維持するために、プローブと標的の間により程度の大きな相補性が必要となる。厳密性は、温度上昇、塩濃度低下、またはホルムアミド濃度上昇によって増加する。デキストラン硫酸の添加またはその濃度の上昇によっても、ハイブリダイゼーションの速度および最終シグナル強度を増加させるための標識プローブの有効濃度は増加し得る。ハイブリダイゼーション後、スライドを、ハイブリダイゼーション液中に見出されるものと同様の試薬を通常含んでいる溶液中で、必要な厳密性に応じて数分から数時間に変動する洗浄時間で、洗浄する。より長い、またはより厳密な洗浄は、通常、非特異的バックグラウンドを低下させるが、全体的な感受性を減少させるリスクがある。

【0103】

核酸ハイブリダイゼーション (nucleic hybridization) 分析で使用されるプローブは、RNAオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド、またはDNAオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのいずれかであり得、自然発生のヌクレオチドだけでなく、例えば、ジゴキシゲニン (digoxigenin) dCTP、ビオチン dCTP 7-アザグアノシン、アジドチミジン、イノシン、またはウリジンの様なそれらの類似体も含有し得る。他の有用なプローブとしては、例えば、ペプチドプローブおよびその類似体、分岐遺伝子 DNA (branched gene DNA)、ペプチド模倣薬 (peptidomimetics)、ペプチド核酸 (PNA) 並びに／または抗体が挙げられる。

【0104】

プローブは、標的核酸配列とプローブとの間に安定で特異的な結合が生じるように、目的の標的核酸配列に対し十分な相補性を有するべきである。安定なハイブリダイゼーションに必要とされる相同性の度合いは、ハイブリダイゼーション培地および／または洗浄培地の厳密性によって異なる。完全相同であるプローブが本発明で使用されることが好ましいが、当業者は、より小さいが十分な相同性を示すプローブを、本発明で使用するができることを、容易に理解するだろう（例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)を参照）。

【0105】

プローブは、いくつかの手段、例えば、限定はされないが、*in situ* ハイブリダイゼーション、体細胞雑種パネル、もしくは分取された染色体のスポットブロットによるマッピング、染色体連鎖分析によって生成および選択することができ、または、ヒト細胞株もしくはヒト染色体を有する体細胞雑種、放射線体細胞雑種 (radiation somatic cell hybrid)、染色体領域の顕微解剖 (microdissection) から、もしくはユニークな染色体遺伝子座に特異的なPCRプライマーもしくは隣接性YACクローンの様な他の適切な手段によって特定された、酵母人工染色体 (YAC) 由来の分取染色体ライブラリーから、クローン化および単離することができる。プローブは、プラスミド、ファージ、コスミド、YAC、バクテリア人工染色体 (BAC)、ウイルスベクター、または他の適切なあらゆるベクター中にクローン化された、ゲノムDNA、cDNA、またはRNAであり得る。プローブは、従来方法によって、クローン化されてもよいし、化学合成されてもよい。クローン化の場合、単離されたプローブ核酸断片は、典型的には、λファージ、pBR322、M13、またはSP6もしくはT7プロモーターを含有するベクター等のベ

クターに挿入され、細菌の宿主中でライブラリーとしてクローン化される（例えばSambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989)を参照）。

【0106】

プローブは、例えば蛍光物質を用いる等して、標識されていることが好ましい。蛍光物質の例としては、限定はされないが、希土類キレート（ユウロピウムキレート）、Texas Red、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン（Lissamine）、ウンベリフェロン、フィコエリトリン（phycocrytherin）、フィコシアニン、もしくはSPECTRUM ORANGE（商標）およびSPECTRUM GREEN（商標）等の市販の蛍光物質、並びに／または上記のうちのいずれか一つまたは複数の誘導体が挙げられる。アッセイで使用される複数のプローブは、2つ以上の識別可能な蛍光色または色素色で標識され得る。これらの色の違いによって、特定のプローブのハイブリダイゼーション位置を特定する手段がもたらされる。さらに、空間的に分けられていないプローブは、2種の別の色（例えば、薄赤色＋緑色＝黄色）色素（例えば、青色＋黄色＝緑色）を混合することによって生じる異なる色の光または色素によって、または、一度に一色のみを通過させるフィルターセットを用いることによって、特定することができる。

10

【0107】

プローブは、当業者に知られている従来の方法を用いて、蛍光物質で直接的または間接的に標識することができる。

【0108】

20

VII. 検出キットおよび構成

本明細書に記載されるような、本発明の実施に使用するためのキットも、本発明によって提供される。そのようなキットは、本方法の中で使用される種々の試薬（通常、濃縮された形態で）のうちの一つまたは複数をそれぞれ含む容器を含み得、例えば、マーカーに既に結合されている、または結合剤を抗体もしくは核酸分子にカップリングさせるための試薬を所望により含む、一つまたは複数の結合剤（抗体）（並びにマーカーそれ自体）；増幅による核酸分子の検出に使用される、緩衝液、適切なヌクレオチド三リン酸（例えばdATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP、ATP、CTP、GTPおよびUTP）、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、および一つまたは複数の配列特異的または縮重プライマー；ならびに／または単離（所望により顕微解剖による）のための試薬および器具が、本発明の実施を補助するために含まれる。本発明のリガンド検出法におけるキット構成物について記述している標識もしくは表示、またはそれを使用するための一連の説明書も通常含まれ、その説明書は、添付文書および／またはキットもしくはその構成物の包装を伴っていてもよい。

30

【0109】

さらに別の実施形態では、本発明は、上記免疫検出法を用いて使用するための免疫検出キットに関する。抗体は、野生型および／または変異型のタンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドを検出するために一般的に使用されるため、抗体がキットに含まれることが好ましい。従って、免疫検出キットは、適切な含有手段（container means）中に、野生型および／もしくは変異型のタンパク質、ポリペプチドおよび／もしくはペプチドに結合する第一抗体、並びに／または、所望により、免疫検出試薬、並びに／または、さらに所望により、野生型および／もしくは変異型のタンパク質、ポリペプチドおよび／もしくはペプチドを含む。

40

【0110】

キットの免疫検出試薬は、所与の抗体と会合および／または連結している検出可能な標識を含む、種々の形態のうちのいずれか1つをとり得る。第二の結合リガンドと会合および／または結合している検出可能な標識も企図される。第二のリガンドの例は、第一抗体に対して結合親和性を有する第二の抗体または高分子である。

【0111】

本キット用のさらに適切な免疫検出試薬としては、第二の抗体に対して結合親和性を有

50

する第三の抗体または高分子と共に、第一抗体に対して結合親和性を有する第二の抗体を含み、第三の抗体が検出可能な標識に連結している二成分試薬が挙げられる。上記で言及したように、いくつかの例示的な標識は当該技術分野において周知であり、および／またはそのような標識は全て、本発明と関連して適切に使用され得る。

【0112】

キットは、検出アッセイ用の検量線を作成するために使用され得るように、野生型および／または変異型のタンパク質、ポリペプチドおよび／またはポリペプチドの適切に分注された構成物をさらに含み得、標識型および／または非標識型のいずれであってもよい。キットは、完全に複合体化した形態で、中間体の形態で、および／またはキットの使用者によって複合体化される別個の部分として、抗体標識複合体または高分子標識複合体を含み得る。キットの構成要素は、水媒体および／または凍結乾燥形態のいずれかでパッケージングされ得る。

10

【0113】

キットの包含手段 (container means) としては、通常、抗体が中に配置され得る、および／または好ましくは適切に分注され得る、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、注射器および／または他の包含手段 (container means) が挙げられる。本発明のキットは、通常、商業販売用に厳重に閉じ込められた、抗体、抗原、および／またはあらゆる他の試薬容器を含有するための手段も含む。そのような容器には、所望のバイアルがその中に保持される、射出成形および／または中空成形のプラスチック容器が含まれ得る。

20

【0114】

キットは、FOLR1免疫複合体および／または化学療法剤等の、がんの治療のための一つまたは複数の治療薬をさらに含み得る。

【0115】

キットは、FOLR1検出試薬を含む、対象におけるFOLR1発現を測定するために使用されるFOLR1検出試薬、および使用のための説明書をさらに含み得る。一実施形態では、FOLR1検出試薬は、FOLR1結合ペプチド、タンパク質または分子プローブ (すなわち核酸) を含む。別の実施形態では、FOLR1検出試薬は抗FOLR1抗体である。別の実施形態では、キットは、抗FOLR1抗体と結合する二次抗体をさらに含む。一実施形態では、FOLR1特異的抗体は、 $0.5 \sim 7.5 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $0.9 \sim 3.8 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で含まれる。別の実施形態では、抗体は、 $1.0 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.5 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.9 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.5 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $3.0 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $3.5 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $3.8 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、または最大 $4.2 \mu\text{g/ml}$ の濃度で含まれる。別の実施形態では、抗体は、 $0.9 \sim 3.8 + / - 0.5 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度を達成するための希釈に関する説明書と共に、濃縮液の状態に含まれる。別の実施形態では、キットは、酵素、蛍光物質、放射性標識、および発光団からなる群から選択される検出試薬をさらに含む。別の実施形態では、検出試薬は、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミンからなる群から選択される。

30

【0116】

キットは、FOLR1発現の検出およびスコア化に関する説明書も含み得る。キットは、対照試料または参照試料も含み得る。対照試料または参照試料の例としては、限定はされないが、正常 (正常対照) 試料または腫瘍 (陽性対照) 試料に由来する細胞ペレットまたは組織培養細胞株が挙げられる。細胞株の例としては、KB、NCI-H2110、Igrov-1、Ishikawa、Jeg-3、Skov-3、Hela、T47D、Caco2、SW620、OAW28、HCC827、Ovcar-8、およびOvcar-3、Ov-90、FOLR1を発現することが知られている他の腫瘍細胞株、並びにFOLR1を発現する発現ベクターを安定にまたは一過性に形質移入された細胞株が挙げられる。陽性対照組織の追加の例は、実施例9～11にも見出すことができる。キットは、染色の強度および均一性に関して陽性参照試料および正常参照試料を視覚的に描写する、

40

50

染色の手引きも含み得る。そのような染色の手引きは、正常な肺、脾臓、および／または唾液腺、並びに標準化スコアを有する染色された腫瘍（例えば、卵巣がん、肺がん、腎臓がん、および子宮内膜がん、並びに実施例および図23～25に記載のもの）から得られた参照試料を有し得る。

【0117】

VIII. FOLR1 結合剤

FOLR1と結合するいかなる抗体も、本発明の検出法で使用するすることができる。治療効果のある抗FOLR1抗体の例としては、米国特許出願公開第2012/0009181号に見出すことができ、これは参照によって本明細書に組み込まれる。FOLR1の完全長のアミノ酸（aa）およびヌクレオチド（nt）配列は、当該技術分野において周知であり、それぞれ配列番号1および2によって表されて、本明細書で提供もされる。FOLR1の検出に特に有用な抗体は、マウス抗huFOLR1モノクローナル抗体クローンBN3.2（ライカ社#NCL-L-FRα）である。治療効果のある抗FOLR1抗体の一例は、huMov19（M9346A）である。配列番号3～5のポリペプチドは、huMov19（M9346A）の重鎖の可変領域、およびhuMov19の、可変領域軽鎖バージョン1.00、可変領域軽鎖バージョン1.60をそれぞれ含む。ある実施形態では、huMov19（M9346A）抗体は、10801 ユニバーシティ・ブルーバード（University Boulevard）、マナサス、バージニア州 20110に位置するアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC）に、2010年4月7日に、ブダペスト条約の条項に従って寄託され、ATCC寄託番号PTA-10772およびPTA-10773または10774を有する、プラスミドによってコードされる。本発明の治療法に有用なFOLR1免疫複合体の例が以下に提供される。

【0118】

IX. FOLR1 免疫複合体

本発明には、細胞毒（薬剤）またはプロドラッグに連結または複合体化された、抗FOLR1抗体、抗体断片、機能的等価物、改良抗体およびそれらの本明細書に記載されるような態様を含む、複合体（本明細書では免疫複合体とも称される）の有効性を増加させるための方法も含まれる。FOLR1免疫複合体の例は、米国特許出願公開第2012/0009181号に見出すことができ、これは参照によって本明細書に組み込まれる。特に効果的な、本発明の治療的免疫複合体は、上記のhuMov19抗体を含む。

【0119】

適切な薬剤またはプロドラッグは、当該技術分野において周知である。ある実施形態では、薬剤またはプロドラッグは、細胞毒である。本発明の細胞傷害性複合体に使用される細胞毒は、細胞の死滅をもたらす、または細胞死を誘導する、または何らかの方法で細胞生存率を減少させるあらゆる化合物であり得、例えば、メイタンシノイドおよびメイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC-1065およびCC-1065類似体、デュオカルマイシンおよびデュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン等のエンジン、ドラスタチンおよびドラスタチン類似体、例えばアウリスタチン、トマイマイシン誘導體（derivatives）、レプトマイシン誘導體（derivatives）、メトトレキサート、シスプラチン、カルボプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシルおよびモルホリノドキソルビシンが挙げられる。ある実施形態では、細胞毒は、メイタンシノイドおよびメイタンシノイド類似体である。

【0120】

薬剤またはプロドラッグは、例えば、huMov19等の抗FOLR1抗体、またはその断片に、ジスルフィド結合を介して連結できる。リンカー分子または架橋剤は、抗FOLR1抗体またはその断片と反応し得る反応性化学基を含む。ある実施形態では、細胞結合剤との反応の反応性化学基は、N-スクシンイミジルエステルおよびN-スルホスクシンイミジルエステルである。さらにリンカー分子は反応性化学基を含み、ある実施形態では、薬剤と反応してジスルフィド結合を形成することができるジチオピリジル基を含む

。ある実施形態では、リンカー分子には、例えば、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)(例えば、Carlsson et al., Biochem. J., 173: 723-737 (1978)を参照)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブタノアート(SPD B)(例えば、米国特許第4, 563, 304号を参照)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)2-スルホブタノアート(スルホ-SPD B)(米国特許出願公開第20090274713号を参照)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノアート(SPP)(例えば、CAS登録番号341498-08-6を参照)、2-イミノチオラン、またはアセチル無水コハク酸が含まれる。

【0121】

切断不可能な連結を有する抗体-メイタンシノイド複合体を調製することもできる。そのような架橋剤は当該技術分野において記載されており(サーモサイエンティフィック・ピアス社Crosslinking Technical Handbookおよび米国特許出願公開第2005/0169933号を参照)、例えば、限定はされないが、N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボンキシラート(SMCC)、SMCC(LC-SMCC)の「長鎖」類似体であるN-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシー(6-アミドカプロン酸塩)、 κ -マレイミドウンデカン酸N-スクシンイミジルエステル(KMUA)、 β -マレイミドプロパン酸N-スクシンイミジルエステル(BMPS)、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジルエステル(GMBS)、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(EMCS)、 m -マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル(AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサン酸塩(SMPH)、N-スクシンイミジル4-(p -マレイミドフェニル)-酪酸塩(SMPB)、およびN-(p -マレイミドフェニル)イソシアン酸塩(PMPI)、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾアート(SIAB)、N-スクシンイミジルヨード酢酸塩(SIA)、N-スクシンイミジルプロモ酢酸塩(SBA)、およびN-スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオナート(SBAP)が挙げられる。ある実施形態では、抗体は、文献に記載されるように、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、スルホ-SMCC、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スルホ-MBSまたはスクシンイミジル-ヨード酢酸塩等の架橋剤で改変されて、1~10個の反応性基を導入する(Yoshitake et al, Eur. J. Biochem., 101:395-399 (1979)、Hashida et al, J. Applied Biochem., 56-63 (1984)、およびLiu et al, Biochem., 18:690-697 (1979))。

【0122】

本発明は、約2~約8個の薬剤分子(「薬剤負荷」)、例えばメイタンシノイドが、抗FOLR1抗体またはその断片に連結しており、同じ細胞結合剤に連結したより少ないまたはより多数の薬剤の薬剤負荷と比較して、該複合体の抗腫瘍効果がさらに効果的である、態様を含む。「薬剤負荷」とは、本明細書で使用される場合、細胞結合剤(例えば、抗FOLR1抗体またはその断片)に結合することができる薬剤分子(例えば、メイタンシノイド)の数を意味する。一つの態様では、細胞結合剤に結合することができる薬剤分子の数は、平均して、約2~約8(例えば、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)であり得る。ある実施形態では、薬剤は、N²'-デアセチル-N²'-(3-メルカプト-1-オキ

10

20

30

40

50

ソプロピル)ーメイタンシン(DM1)または N^2 ′-デアセチル- N^2 ′-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)メイタンシン(DM4)である。従って、ある実施形態では、huMo v 19抗体は、DM1またはDM4と複合体化する。別の実施形態では、FR-1-21抗体は、DM1またはDM4と複合体化する。別の実施形態では、FR-1-48抗体は、DM1またはDM4と複合体化する。別の実施形態では、FR-1-49抗体は、DM1またはDM4と複合体化する。別の実施形態では、FR-1-57抗体は、DM1またはDM4と複合体化する。別の実施形態では、FR-1-65抗体は、DM1またはDM4と複合体化する。

【0123】

X. FOLR1発現および治療効果の相関関係

10

ある実施形態では、本発明は、FOLR1標的化抗がん治療に対して応答する可能性が増加した対象を特定するための方法を提供する。本発明は、FOLR1の発現レベル上昇が、FOLR-1標的化抗がん剤の有効性と相関しているという発見に、部分的に基づいている。

【0124】

異種移植モデルを用いた、患者試料の評価および*in vivo*における有効性への相関付けによって、治療に応答する可能性がより高い対象を選択するための発現分析の有効性(power)が示される。IHCにより、腫瘍細胞上のFOLR1発現に関するスコアが提供される: 0(発現なし)~3+(非常に高レベルの発現)。異種移植モデルを用いる*in vivo*データによって、FOLR1発現について1、2、3、または3+、好ましくは2、3、または3+のスコアを獲得した試料は、臨床的に意義のある用量のFOLR1免疫複合体で、FOLR-1標的化抗がん治療に対して応答する可能性が増加していることが示される(例えば、5mg/kg異種移植片の用量のFOLR1免疫複合体は、患者において185mg/m²に達し得る)。従って、上昇したFOLR1スコアを有する個体の特定は、臨床的に意義のある投与量に応答し得る個体の特定を促進するだろう。以下でより詳細に記載されるが、FOLR1治療薬に対する感受性は、2以上のFOLR1スコアリング、特にレベル3のスコアリングと相関した。さらに、より均一なレベルのFOLR1発現は、治療効果とのより良い相関関係を与えた。従って、均一な染色均一性は好ましいが、染色強度の増加と不均一な染色均一性の組み合わせも、FOLR1の発現増加を示す。例えば、2不均一よりも大きなスコアは、FOLR1治療薬を用いた治療に関する、患者の選択基準である。

20

30

【0125】

FOLR1発現分析によって、減少したレベルのFOLR1標的化抗がん治療(「低用量治療」)が、抗腫瘍反応を引き起こすのに効果的であり得る患者も特定される。当該技術分野において理解されるように、化合物は、通常、所望の治療反応を達成する、最も少ない投与量で投与される。これは、臨床的な、しばしば望ましくない副作用を引き起こす治療薬にとって、特に重要である。FOLR1発現レベルが上昇している対象を認識する能力によって、FOLR-1標的化治療薬の投与量の最小化が可能となり、それによって、治療効果を維持しつつ起こり得る副作用を減少させることが可能となる。

【0126】

40

本明細書で示されるように、2不均一またはそれより大きなFOLR1発現スコアは、抗FOLR1免疫複合体への応答性増加と相関している。ある実施形態では、応答性増加は、悪液質、生存期間の増加、腫瘍進行までの期間の延長、腫瘍体積の減少、腫瘍量の減少、および/または腫瘍転移までの期間の延長、腫瘍再発までの期間の延長、腫瘍反応、完全寛解、部分寛解、安定疾患、進行性疾患、無増悪生存期間(PFS)、全生存(OS)である。ある実施形態では、2不均一またはそれより大きなFOLR1発現スコアは、増加するPFS、DFS、またはOSと相関している。

【0127】

検出法および参照/対照試料に対する相関付けで使用するためのキットは、対照試料(陽性および/または陰性)または参照試料を含み得る。陽性対照または陽性参照試料は、

50

組織培養細胞株、正常組織または腫瘍組織に由来し得る。陽性参照試料および陰性参照試料は、SW620、T47D、IGROV-1、HeLa、KB、JEG-3、他の腫瘍細胞株、およびFOLR1をコードする発現ベクターを安定にまたは一過性に形質移入された細胞株を含む細胞株に由来し得る。正常組織試料または腫瘍組織試料および組織培養細胞株は、陰性対照参照試料としても使用され得る。さらなる試料については、実施例9～11および図23～25を参照されたい。

【0128】

XI. 医薬組成物および治療法

FOLR1結合剤（抗体、免疫複合体、およびポリペプチドを含む）は、種々の応用において有用であり、例えば、限定はされないが、がんの治療等の治療的処置（therapeutic treatment）方法が挙げられる。ある実施形態では、薬剤は、腫瘍増殖の阻害、分化の誘導、腫瘍容積の減少、および／または腫瘍の腫瘍形成性の低減に有用である。使用法は、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*での方法であり得る。ある実施形態では、FOLR1結合剤または抗体または免疫複合体、またはポリペプチドは、それが結合するヒトFOLR1の拮抗薬である。

10

【0129】

ある実施形態では、FOLR1結合剤または拮抗薬（例えば、huMov19抗体または免疫複合体）で治療される疾患は、がんである。ある実施形態では、がんは、FOLR1結合剤（例えば、抗体）が結合する葉酸受容体1を発現する腫瘍によって特徴付けられる。

20

【0130】

本発明は、治療有効量のFOLR1結合剤を、対象（例えば、治療を必要としている対象）に投与することを含む、がんを治療する方法を提供する。ある実施形態では、がんは、結腸直腸がん、膵がん、肺がん、卵巣がん、肝がん、乳がん、脳がん、腎がん、前立腺がん、胃腸がん、メラノーマ、子宮頸がん、膀胱がん、グリア芽腫、および頭頸部がんからなる群から選択されるがんである。ある実施形態では、がんは卵巣がんである。ある実施形態では、がんは肺がんである。ある実施形態では、対象はヒトである。

【0131】

本発明は、本明細書に記載の抗体または他の薬剤を用いて、腫瘍増殖を阻害するための方法をさらに提供する。ある実施形態では、腫瘍増殖を阻害する方法は、*in vitro*で、細胞を、FOLR1結合剤（例えば、抗体）と接触させることを含む。例えば、FOLR1を発現する不死化細胞株または癌細胞株は、腫瘍増殖を阻害するための抗体または他の薬剤を添加される培地中で培養される。一部の実施形態では、腫瘍細胞は、例えば、組織生検、胸水、または血液試料等の患者試料から単離され、腫瘍増殖を阻害するためのFOLR1結合剤を添加される培地中で培養される。

30

【0132】

一部の実施形態では、腫瘍増殖を阻害する方法は、*in vivo*において、腫瘍または腫瘍細胞を、FOLR1結合剤（例えば、抗体）と接触させることを含む。ある実施形態では、腫瘍または腫瘍細胞を、FOLR1結合剤と接触させることは、動物モデルにおいて行われる。例えば、FOLR1結合剤は、免疫不全マウス（例えばNOD/SCIDマウス）において増殖された、一つまたは複数のFOLR1を発現している異種移植片に投与して、腫瘍増殖を阻害することができる。一部の実施形態では、FOLR1結合剤は、動物への瘍原性細胞の導入と同時にまたはその直後に投与されて、腫瘍増殖を防止する。一部の実施形態では、FOLR1結合剤は、腫瘍原性細胞が特定の大きさに成長した後に、治療薬として投与される。

40

【0133】

ある実施形態では、腫瘍増殖を阻害する方法は、対象に、治療有効量のFOLR1結合剤を投与することを含む。ある実施形態では、対象はヒトである。ある実施形態では、対象は腫瘍を有するか、または腫瘍を除去されたことがある。

【0134】

50

ある実施形態では、腫瘍は、脳腫瘍、大腸腫瘍、膵腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、肝腫瘍、乳腺腫瘍、腎腫瘍、前立腺腫瘍、胃腸腫瘍、メラノーマ、子宮頸部腫瘍、膀胱腫瘍、グリフ芽腫、および頭頸部腫瘍からなる群から選択される腫瘍である。ある実施形態では、腫瘍は卵巣腫瘍である。

【0135】

ある実施形態では、本発明は、低用量のFOLR1結合剤を用いて腫瘍増殖を阻害する方法を提供する。「低用量」という用語は、本明細書で使用される場合、治療効果を生むのに必要とされる通常または従来の用量未満である、FOLR1結合剤の治療有効量を意味する。

【0136】

従って、ある実施形態では、本発明は、hMo v 1 9抗体およびhMo v 1 9免疫複合体を用いてがんを治療する方法を提供する。ある実施形態では、hMo v 1 9免疫複合体は、hMo v 1 9-S P D B-DM4、hMo v 1 9-スルホ-S P P-DM1、hMo v 1 9-S P P-DM1、またはhMo v 1 9-P E G 4-M a l-DM4である。ある実施形態では、hMo v 1 9免疫複合体 (immunconjuage) は、hMo v 1 9-S P D B-DM4であり、I M G N 8 5 3とも称される。

【0137】

ある実施形態では、製剤は、本発明の精製された抗体または薬剤を、薬剤的に許容できるビヒクル（例えば、担体、賦形剤）と混合することによって、貯蔵および使用用に調製される (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000)。適切な薬剤的に許容できるビヒクルとしては、限定はされないが、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸等の無毒性の緩衝液；塩化ナトリウム等の塩；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、塩化アンモニウムオクタデシルジメチルベンジル；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノールアルコール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；メチルパラベンまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド（例えば約10アミノ酸残基未満）；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、グルコース、マンノース、またはデキストリン等の炭水化物；E D T A等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール等の糖類；ナトリウム等の塩を形成する対イオン；金属錯体（例えばZn-タンパク質複合体）；並びにT W E E Nまたはポリエチレングリコール (P E G) 等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0138】

本発明の医薬組成物は、局所療法または全身療法のための様々な方法で投与することができる。投与は、経皮パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤 (liquids) および散剤等の局所投与（経腔送達および経直腸送達を含む、粘膜に対して等）；経肺投与（例えば、散剤またはエアロゾルの吸入またはガス注入による、例えば噴霧器による）；気管内投与、鼻腔内投与、上皮投与 (epidermal) および経皮投与）；経口投与；または静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内への注射もしくは点滴を含む非経口投与；または頭蓋内投与（例えば、くも膜下腔内投与または脳室内投与）であり得る。

【0139】

本発明の抗体または免疫複合体は、医薬品複合製剤 (pharmaceutical combination formulation) において、または併用療法としての投与計画において、抗がん特性を有する第二化合物と混合され得る。医薬品複合製剤または投与計画の第二化合物は、それらが互いに悪影響を及ぼし合わないよう、組み合わせのA D Cに対して相補的な活性を有することが好ましい。FOLR1結合剤および第二の抗がん剤を含む医薬組成物も提供される

10

20

30

40

50

。

【0140】

疾患の治療に関して、本発明の抗体または薬剤の適切な用量は、治療される疾患の種類、疾患の重症度および経過、疾患の応答性、抗体または薬剤が治療または予防のどちらを目的にして投与されるか、薬歴、患者の臨床歴等に応じて、全て治療医の自由裁量で決まる。抗体または薬剤は、一度に、もしくは数日から数カ月まで続く一連の処置に亘って、または治癒が達成されるまで、もしくは病状の低減が達成されるまで（例えば腫瘍サイズの減少）、投与され得る。最適な用量スケジュールは、患者体内の薬物蓄積の測定から算出することができ、個々の抗体または薬剤の相対的な作用強度に応じて変化する。投与医師は、最適投与量、投与方法、および反復の速度（repetition rate）を、容易に決定することができる。ある実施形態では、投与量は、 $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg} / \text{体重kg}$ であり、毎日、毎週、毎月または毎年、1回または複数回与えられ得る。ある実施形態では、抗体または他のFOLR1結合剤は、二週間毎に一回または三週間毎に1回与えられる。ある実施形態では、抗体または他のFOLR1結合剤の投与量は、約 $0.1 \text{mg} \sim 20 \text{mg} / \text{体重kg}$ である。治療医は、体液または組織内で測定された薬剤の滞留時間および濃度に基づいて、投与の反復速度を推定することができる。

10

【0141】

併用療法は、「相乗作用」を提供することができ、「相乗的」であることを示す、すなわち、活性成分が一緒に使用されたときに達成される効果が、これらの化合物を別々に使用することによりもたらされる効果の合計よりも大きい。相乗効果は、活性成分が、（1）一緒に製剤化されて、混合された単位投与剤形で同時に投与もしくは送達された場合に、（2）別々の製剤として交互に、もしくは同時に送達された場合に、または（3）いくつかの他の投与計画による場合に、達成され得る。交互治療において送達される場合、相乗効果は、化合物が、順次に、例えば別々の注射器中の異なる注射剤によって、投与または送達された場合に、達成され得る。通常、交互治療の間、有効投与量の各活性成分は順次すなわち連続的に投与され、一方、併用療法では、2つ以上の活性成分の有効投与量が一緒に投与される。

20

【0142】

本開示の実施形態は、以下の非限定例を参照することによりさらに定義することができ、それらは、本開示の特定の抗体の調製、および本開示の抗体を使用するための方法を詳細に記述している。材料および方法の両方に対する多くの改変が、本開示の範囲を逸脱することなく実施可能であることは、当業者には明らかである。

30

実施例

【0143】

本明細書に記載の実施例および実施形態が説明のみを目的としており、それに照らし合わせて種々の改変または変更が当業者に示唆され、それが本願の精神および範囲内に含まれることは、理解されるべきである。

【0144】

葉酸受容体-1（FOLR1）は、卵巣腫瘍では高発現し、脳癌、乳癌、膀胱癌、類内膜癌、肺癌、膵癌、および腎癌では高～中程度のレベルで発現することが報告されている。しかし、FOLR1の発現は、正常組織に限定されており、例えば腎臓、肺、脈絡叢、膵臓、乳房、甲状腺、卵巣、前立腺、および肺が挙げられる。

40

【0145】

新鮮凍結組織ホモジネートを用いてFOLR1を定量化する方法が報告されている。全組織ホモジネートは細胞質内発現と膜関連発現とを区別することができず、新鮮凍結試料は臨床の現場では受け入れられない。しかし、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料は、臨床における患者に対して達成され得る。

【実施例1】

【0146】

細胞試料中のFOLR1の免疫組織化学染色—手動の方法

50

ホルマリン固定およびパラフィン包埋した細胞ペレットおよび組織を、以下の染色試薬および染色条件を用いて、試験試料として使用した。

【表 1】

IHC抗体

被験物質
■マウス抗h u F O L R 1モノクローナル抗体クローンBN3. 2 (ライカ社#NC L-L-FR α)
免疫原：葉酸受容体 α 分子の外側領域の189個のアミノ酸に対応している原核性組換えタンパク質
対照物質
■m u I g G 1 (コールター社 (Coulter)) クローン、カタログ番号6602872
二次抗体
■ビオチン化ウマ抗マウス (ベクター社、カタログ番号PK-6100)

10

【表 2】

FFPEアッセイ条件

20

ステップ	条件
抗原回復	B o r g (パイオケア社 (Biocare)) p H 9. 0
ブロッキングステップ	アビジン/ビオチン; ペルオキシド
被験物質または対照物質	2. 0 μ g / m L
希釈	2 % ウマ血清含有 P B S
二次抗体	1 0 μ g / m L
検出系*	アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体; A B C (ベクター・ラボ社 (Vector Labs))
色素原 (chromagen)	D A B (ダコ社 (Dako))
D A B 現像時間	5 分以上

30

【0147】

ホルマリン固定およびパラフィン包埋した (FFPE) 患者卵巣腫瘍生検および卵巣異種移植片腫瘍を、マウス抗 F O L R 1 抗体クローンBN3. 2、(ライカ社、カタログ番号NC L-L-FR α) およびコールター社から得た対照のm u I g G 1を用いて、染色した。p H 9. 5の緩衝液中での抗原回復の後、スライドを、2 % ウマ血清+アビジンを用いてブロッキングした。スライドをP B Sで洗浄し、抗 F O L R 1 抗体または対照m u I g G 1抗体と一緒に室温で60分間インキュベートし、その後、ビオチン化抗マウスI g Gと一緒に30分間、結合した二次抗体を検出するためのアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体と一緒に40分間インキュベートした。D A B (3, 3-ジアミノベンジジンテトラ塩酸塩)と一緒に5分間インキュベートすることによって、色のシグナルが得られた。スライドを、ヘマトキシリンを用いて対比染色した。

40

【0148】

F O L R 1の染色強度および分布パターンを、対照I g G染色 (非特異的)と比較してスコア化した。強度を0~3 (0=染色無し、1=弱い、2=中程度、および3=強い)

50

の段階でスコア化し、分布を、局所的（染色された細胞が25%未満）、不均一（染色された細胞が25～75%）および均一（染色された細胞が75%超）としてスコア化した。

【0149】

下記の通り、FFPE試料は腫瘍マイクロアレイから得られたものであり、ヒト組織ブロックは7種の異なる腫瘍から得られたものである。

【表3-1】

FFPE被験試料

ヒト腫瘍マイクロアレイ (TMA)	説明	商業的供給源
■混合腫瘍	33種のがんからの96コア	バイオマックス社 (Biomax) カタログ番号MC961
■卵巣腫瘍	64コア	バイオチェイン社 (Biochain) カタログ番号T8235725
■NSCLC	80コア	バイオマックス社カタログ番号LC806
■結腸直腸癌	85重複コア	バイオマックス社カタログ番号BC000110
ヒト組織ブロック	数	商業的供給源
■乳腺腫瘍	4	
■結腸直腸癌	4	
■卵巣腫瘍	4	
■NSCLC	8	

【表3-2】

■膀胱腫瘍	1	CHTN
■腎腫瘍	8	
■SCCHN	14	

【0150】

FOLR1被験物質であるマウス抗FOLR1クローンBN3.2を試験して、huFOLR1抗原に対する結合特異性を決定した。報告されたIHC染色法を用いて、300-19およびhuFOLR1を形質移入された300-19 (300-10/FOLR1)の細胞ペレットのFFPE切片を染色し、FOLR1について評価した。FOLR1被験物質は300-19/FOLR1+細胞を特異的に染色し、300-19細胞（それぞれ3均一および陰性）では染色無しという結果が返された。これらの結果は、クローンBN3.2がhuFOLR1抗原を特異的に標的とすることを示している（図1）。

【0151】

BN3.2抗体は、組織試料上のFOLR1発現を検出するのにも使用された。各被験物質および対照物質の、組織および細胞ペレットとの免疫反応性を、顧問病理学者（consulting pathologist）であるDavid Dorfman博士が決定した。細胞ペレット対照を最初に評価し、その後に組織試料を評価した。評価された各組織について、染色

強度および染色均一性の説明が報告された。染色強度スコアおよび均一性尺度を以下に記載する。評価された各組織試料についての最終的な報告スコアは、被験物質のスコアから、それぞれの対照物質のスコアを引いたものである。染色スコアを、校正した細胞ペレット対照に対し比較することによって、各試料のABCレベルを評価した。

【表4】

強度（染色の量）		均一性（染色された細胞の数）	
0	陰性		
1	弱い	0	陰性
2	中程度	局所的	< 25%
3	強い	不均一 (hetero)	25~75%
3+	非常に強い	均一 (homo)	> 75%

10

【0152】

細胞あたりの結合抗体 (antibodies bound per cell) (ABC) 値を、FOLR1陽性腫瘍細胞株 (KB、IGROV1、JEG3、およびOVCA3) について、抗FOLR1-フィコエリトリン (phycoerythrin)、BD Quantibrite Beads、およびフローサイトメトリーを用いて決定し、異なるABC値を有することが示された (図2)。FOLR1陽性腫瘍細胞株から調製された細胞ペレットがIHCによって異なるレベルの染色強度を示すように、染色条件をFOLR1に対して最適化した。KB細胞ペレットは高強度の非常に強い (3+) 均一な染色を示し、IGROV1細胞ペレットは強い (3) 染色を示し、JEG3細胞ペレットは中程度の (2~3) 不均一な染色を示し、一方で、OVCA3細胞ペレットの染色は、低強度の (1~2) 不均一な染色を示した。細胞ペレットから観察されたFOLR1染色強度の傾向は、報告されたABC値に一致し、KB細胞は1, 700, 000という最も高いABC値を示し、IGROV1細胞は260, 000という2番目に最も高いABC値を示し、JEG3はより低いABC値または41, 000ABCを示し、一方で、OVCA3細胞は4, 000という最も低いABC値を示した。染色結果およびそれぞれのABC値を下の表に列挙する。

20

30

【表 5】

細胞株および各細胞ペレット上の h u F O L R 1 についての A B C 値およびそれぞれの染色結果

株化細胞	FOLR 1	
	ABC	スコア
KB	1, 7 0 0, 0 0 0	3+均一
IGROV 1	2 6 0, 0 0 0	3 均一
JEG 3	4 1, 0 0 0	2 ~ 3 不均一
OVCAR 3	4, 0 0 0	1 ~ 2 不均一

C a p a n - 1、J a r、H e c - 1 - A、H e c - 1 - B、I s h i k a w a、N C I H 2 9 2、B T 4 7 4 E E I、P A - 1、O V - 9 0、C a O v - 4、C a O v - 3、A 2 7 8 0、O v c a r - 5、O v c a r - 4、H C T - 1 5、7 8 6 - O、N C I H 8 3 8、N C I H 5 2 2、N C I H 2 1 1 0、N C I H 1 7 3 4、N C I H 2 2 8、および F U. O V - 3 を含む、さらなる細胞株を試験したところ、F O L R 1 陽性であるが、F O L R 1 発現レベルおよび抗 F O L R 1 免疫複合体活性に対する感受性は異なることが判明した。参照の目的のために、一貫した F O L R 1 発現および抗 F O L R 1 免疫複合体に対する感受性を有する細胞株が好ましい。

【 0 1 5 3 】

I H C 法が、卵巣癌および非小細胞肺癌 (N S C L C) の組織試料における F O L R 1 発現を正確に検出できることが、特に重要であった。図 3 に示すように、F O L R 1 発現は、2 不均一 ~ 3 均一のスコアを得た卵巣癌および N S C L C の試料において、正確に検出され得た。これらの試料の A B C 値は、2 不均一のスコアを得た試料のおよそ 4 1, 0 0 0 から、3 均一のスコアを得た試料の 2 6 0, 0 0 0 超まで及んだ。図 4 に示すように、高い染色強度および染色均一性は、卵巣癌、肺腺癌、および細気管支肺胞上皮癌 (b r o n c h i o l o a l v e o l a r c a r c i n o m a) においても観察された。さらに、N S C L C 試料 (図 5) および卵巣癌 (図 6) における F O L R 1 の発現は、組織試料の膜に主に局在化していることがさらに判明した。同一の腫瘍試料並びに異なる腫瘍試料から得られた複数の試料の全般で、発現が検出された。興味深いことに、大腸腫瘍、乳腺腫瘍、または小細胞肺腫瘍から得られた試料のいずれも、2 不均一より大きなスコアを得なかった。

【実施例 2】

【 0 1 5 4 】

K B 異種移植モデルにおいて、同様の標的を持たない (n o n - t a r g e t i n g) 複合体と比較した場合の、h u M o v 1 9 - P E G 4 M a l - D M 4 複合体および h u M o v 1 9 - S P D B - D M 4 複合体の i n v i v o における有効性

標的を持たない h u C 2 4 2 - S P D B - D M 4 と比較した場合の、F O L R 1 を標的とする切断可能な複合体 h u M o v 1 9 - S P D B - D M 4、および標的を持たない h u C 2 4 2 - P E G 4 M a l - D M 4 と比較した場合の切断不可能な複合体 h u M o v 1 9 - P E G 4 - M a l - D M 4 を、K B 細胞 (手動の I H C により、非常に高い F O L R 1 発現、3 + 均一) が S C I D マウスに皮下移植される確立された異種移植モデルを用いて、試験した。マウスを体重によって処置群に無作為抽出し、細胞接種の 3 日後に単独で (S P D B 複合体)、または細胞接種の 3 日、1 0 日、および 1 7 日後の 3 回、毎週、それ

ぞれ5mg/kgおよび10mg/kgの複合体で、処置した。異なる処置群の中央値腫瘍体積を図7にプロットする。huMov19-SPDB-DM4、またはhuMov19-PEG4Mal-DM4のいずれかをを用いた処置によって、PBS対照と比較して中央値腫瘍体積の減少がもたらされたが、一方、それぞれの、標的を持たない複体のいずれを用いた治療も、いかなる有意な作用も生じなかった。

【実施例3】

【0155】

OVCAR-3ヒト卵巢癌異種移植片におけるIMGN853処置の用量反応抗腫瘍活性
確立された卵巢癌皮下異種移植モデルにおいて、IMGN853の抗腫瘍効果を評価した。SCIDマウスに、OVCAR-3卵巢癌細胞(1×10^7 細胞/動物)を、右側腹部に皮下注射して、移植した。腫瘍が約100mm³の大きさに達したら(腫瘍細胞接種から21日後)、マウスを無作為に4つの群(群あたり6匹の動物)に分けた。マウスを、1.2、2.5または5.0mg/kgの、IMGN853の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBSの単回静脈内注射を与えた。腫瘍サイズを週に2回測定することにより腫瘍成長をモニターした。腫瘍サイズを、式：長さ×幅×高さ×1/2を用いて算出した。

10

【0156】

IMGN853は、2.5mg/kgおよび5.0mg/kgの両方の服用レベルで、腫瘍増殖阻害(T/C=0%)の点で、OVCAR-3腫瘍に対して高活性であった(手動のIHC法を用いて3均一のIHCスコア)(図8)。5.0mg/kgのIMGN853で処置された、6匹中6匹のマウスで、完全な腫瘍縮小(CR)が認められた。2.5mg/kgの服用レベルでIMGN853を処置された、6匹中6匹のマウスで部分的な腫瘍縮小(PR)が認められ、6匹中4匹のマウスでCRが認められた。IMGN853は1.2mg/kg服用レベルで活性であったが、結果として、6匹中2匹のPRおよび6匹中1匹のCRにより、18%のT/Cがもたらされた。NCI基準によれば、10%~42%の範囲のT/C値は活性であると見なされ、10%未満のT/Cは高活性であると見なされる。

20

【実施例4】

【0157】

IGROV-1ヒト卵巢癌異種移植片におけるIMGN853処置の用量反応抗腫瘍活性

30

。確立された卵巢癌皮下異種移植モデルにおいて、IMGN853の抗腫瘍効果を評価した。SCIDマウスに、IGROV-1卵巢癌細胞(1×10^7 細胞/動物)を、右側腹部に皮下注射して、移植した。腫瘍が約100mm³の大きさに達したら(腫瘍細胞接種から7日後)、マウスを無作為に4つの群(群あたり6匹の動物)に分けた。マウスを、1.2、2.5または5.0mg/kgの、IMGN853の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBSの単回静脈内注射を与えた。腫瘍サイズを週に2回測定することにより腫瘍成長をモニターした。腫瘍サイズを、式：長さ×幅×高さ×1/2を用いて算出した。

【0158】

40

IMGN853は、2.5mg/kgおよび5.0mg/kgの服用レベルで、IGROV-1腫瘍に対して高活性であり(手動の方法により3均一のIHCスコア)、結果として、両方の服用レベルについて5%のT/C値が得られた(図9)。2.5mg/kg群および5.0mg/kg群の、それぞれ、6匹中5匹のマウスおよび6匹中6匹のマウスにおいて、部分的腫瘍縮小が認められた。IMGN853は、1.2mg/kgの用量では不活性であった(T/C=47%)。

【実施例5】

【0159】

OV-90ヒト卵巢癌異種移植片におけるIMGN853処置の用量反応抗腫瘍活性。

確立された卵巢癌皮下異種移植モデルにおいて、IMGN853の抗腫瘍効果を評価し

50

た。SCIDマウスに、OV-90 卵巣癌細胞 (1×10^7 細胞/動物) を、右側腹部に皮下注射して、移植した。腫瘍が約 100 mm^3 の大きさに達したら (腫瘍細胞接種から 13 日後)、マウスを無作為に 4 つの群 (群あたり 6 匹の動物) に分けた。マウスを、1.2、2.5 または 5.0 mg/kg の、IMGN853 の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBS の単回静脈内注射を与えた。対照群の動物は同じスケジュールで PBS を静脈内投与された。腫瘍サイズを週に 2 回測定することにより腫瘍成長をモニターした。腫瘍サイズを、式：長さ×幅×高さ× $1/2$ を用いて算出した。

【0160】

IMGN853 は、 2.5 mg/kg および 5.0 mg/kg の服用レベルで、OV-90 腫瘍に対して活性を有し (手動の方法により 3 不均一~均一の IHC スコア)、結果として、それぞれ 36% および 18% の T/C 値が得られた (図 10)。 5.0 mg/kg 群において 2 匹の動物に部分的腫瘍縮小が認められ、処置群のいずれにおいても、他の腫瘍縮小は認められなかった。IMGN853 は、 1.2 mg/kg の用量で不活性であった (T/C = 77%)。

【実施例 6】

【0161】

SKOV-3 ヒト卵巣癌異種移植片における IMGN853 処置の用量反応抗腫瘍活性。確立された卵巣癌皮下異種移植モデルにおいて、IMGN853 の抗腫瘍効果を評価した。SCIDマウスに、SKOV-3 卵巣癌細胞 (1×10^7 細胞/動物) を、右側腹部に皮下注射して、移植した。腫瘍が約 100 mm^3 の大きさに達したら (腫瘍細胞接種から 26 日後)、マウスを無作為に 4 つの群 (群あたり 6 匹の動物) に分けた。マウスを、1.2、2.5 または 5.0 mg/kg の、IMGN853 の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBS の単回静脈内注射を与えた。腫瘍サイズを週に 2 回測定することにより腫瘍成長をモニターした。腫瘍サイズを、式：長さ×幅×高さ× $1/2$ を用いて算出した。

【0162】

IMGN853 は、全ての用量において SKOV-3 腫瘍に対して不活性であり (手動の方法により 1~3 局所的の IHC スコア)、IMGN853 で処置された腫瘍の成長は、PBS 対照群と同等であった (図 11)。データ解析は行っておらず、このモデルにおいて IMGN853 が不活性であることを踏まえて試験を早期に終了させた。

【実施例 7】

【0163】

KB ヒト子宮頸部腺癌異種移植片における IMGN853 処置の用量反応抗腫瘍活性。確立された子宮頸部腺癌皮下異種移植モデルにおいて、IMGN853 の抗腫瘍効果を評価した。SCIDマウスに、KB 子宮頸部腺癌細胞 (1×10^7 細胞/動物) を、右側腹部に皮下注射して、移植した。腫瘍が約 100 mm^3 の大きさに達したら (腫瘍細胞接種から 7 日後)、マウスを無作為に 4 つの群 (群あたり 6 匹の動物) に分けた。マウスを、1.0、2.5 または 5.0 mg/kg の、IMGN853 の単回静脈内注射で処置した。対照動物群には、PBS の単回静脈内注射を与えた。腫瘍サイズを週に 2 回測定することにより腫瘍成長をモニターした。腫瘍サイズを、式：長さ×幅×高さ× $1/2$ を用いて算出した。

【0164】

IMGN853 は、 2.5 mg/kg および 5.0 mg/kg の両方の服用レベルで、腫瘍増殖阻害 (T/C = 0%) の点で、KB 腫瘍に対して高活性であった (図 12)。 5.0 mg/kg 処置群における 6 匹中 6 匹のマウス、および 2.5 mg/kg 処置群における 6 匹中 5 匹のマウスに CR が認められ、試験終了 (120 日後) まで腫瘍が存在しないままであった。 1.0 mg/kg の用量は活性であり、37% の T/C が得られたが、部分的縮小も完全縮小も認められなかった。

【実施例 8】

【0165】

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料におけるFOLR1の免疫組織化学染色－自動化法。

IHC染色アッセイは、被験物質として、Novocastrol FOLR1抗体（Novocastrol／ライカ社カタログ番号NCI-L-FR α 、クローンBN3.2）を含むIVDクラスI試薬、およびライカ社製Bond RX自動染色機（stainer）を使用する。結合した被験物質または対照物質は、一次抗体後試薬（post primary reagent）（ウサギ抗マウスIgG）、続いて高分子試薬（polymer reagent）（ヤギ抗ウサギ高分子）、および3,3'-ジアミノベンジジンテトラ塩酸塩（DAB）色素原を含むライカ社製Bond Refine検出系と一緒にインキュベートすることによって検出された。FFPE試料を、下記のように、特定の一次抗体濃度（単数または複数）（ライカ社製希釈剤FOLR1中で希釈することにより調製）で染色した。

10

【表6】

IHC抗体

	葉酸受容体 α （Novocastrol／ライカ社カタログ番号NCI-
被験物質 ⁱ⁾	L-FR α 、ロット番号159506）、マウス、クローンBN3.2
	、原液：75 μ g/mL
対照物質 ⁱ⁾	IgG1（ベックマン・コールター社カタログ番号6602872、ロ
	ット番号2S7SPS04-23および2S7SPS04-26）原液
	濃度：1mg/mL、マウス、クローン2T8-2F5

20

【表 7】

ライカ社製Bond RXを用いるFFPEアッセイ法

ステップ ⁱ⁾	行為	時間
ベーキング (Bake)	温度: 60℃	30分間
脱ろう	Bond脱ろう溶液 (Bond Dewax Solution)	固定
	100%エタノール	固定
抗原回復	Bond ER2	20分間
内在性ペルオキシダーゼ阻害	ペルオキシド (Peroxide) (Refineキットの構成要素)	5分間
被験物質	ライカ社製希釈剤中で1.9 µg/mLのFOUR1	15分間
検出	一次抗体後試薬 (Post Primary Reagent) (Refineキット)	8分間
	高分子 (Polymer) (Refineキット)	8分間
	混合DAB (Mixed DAB) (Refineキット)	10分間
対比染色	ヘマトキシリン (Hematoxylin) (Refineキット)	5分間

【0166】

全ての染色試料を評価し、スコア化した。最初に対照試料を評価し、続いて試験試料を評価した（全体切片および個々のコアはTMAから得た）。評価されたそれぞれの腫瘍組織または細胞ペレットについて、染色された腫瘍細胞の染色強度の説明およびそれぞれの割合を報告した。膜関連染色は全ての試料について記録された。重複スコアが1人の患者から評価された場合、より高い方のスコアのみを分析に含めた。スコアが細胞質染色のみを記載している場合は、最終スコアをゼロ（0）と報告した。強度および均一性を、下の表に記載されるように、各試料に与えた。染色強度および分布パターンを、対照IgG染色（非特異的）と比較してスコア化した。強度を0～3（0＝染色無し、1＝弱い、2＝中程度、および3＝強い）の段階でスコア化し、分布を、局所的（25%未満の染色細胞）、不均一（25～75%の染色細胞）および均一（75%超の染色細胞）としてスコア化した。正常組織では、強度および割合を算出するときに、定義済みの株構造のみを評価した。

【表 8】

強度および均一性の尺度から成る IHC スコア化系

強度（染色の明るさ）		
観察された強度	強度の分類	報告された強度
0	陰性	0
0～1	非常に弱い	1
1	弱い	
1～2	弱い～中程度	2
2	中程度	
2～3	中程度～強い	3
3	強い	
均一性（染色細胞の割合－膜のみ）		
0	陰性	
局所的	< 25%	
不均一（hetero）	25～75%	
均一（homo）	> 75%	

10

20

【0167】

下記の通り、FFPE 腫瘍試料は腫瘍マイクロアレイ（tumor micro array）から得られたものであり、ヒト組織ブロックは7種の異なる腫瘍から得られたものである。

【表 9－1】

FFPE 被験試料：TMA

解剖学上の 部位	製造供給 元	カタログ番号	コード	患者1人 あたりの コア数	患者の合計 人数

30

【表 9 - 2】

腎臓	パントミクス社	K I C 1 5 0 1	P - T - A R R - K I D - 1 2 2 7 1 1 - 1	2	6 9
肺	パントミクス社	L U C 1 5 0 1	P - T - A R R - L N G - 1 2 2 7 1 1 - 1	2	7 0
肺	トライスター社	6 9 5 7 1 0 5 9 / T A 1 2 4 9	P - T - A R R - O V A - 1 2 2 7 1 1 - 1	1	1 1 0
卵巣	バイオチェーン社	T 8 2 3 5 7 2 5 - 5	P - T - A R R - O V A - 1 2 2 1 1 1 - 1	1	6 2
卵巣	パントミクス社	O V C 1 5 0 1	P - T - A R R - O V A - 1 2 2 7 1 1 - 1	2	7 0
卵巣	トライスター社	6 9 5 7 1 0 9 1 / T A 1 3 2 2	P - T - A R R - O V A - 0 1 0 9 1 2 - 1	2	9 6
子宮 (子宮 内膜)	パントミクス社	E M C 1 5 0 1	P - T - A R R - E M E - 1 2 2 7 1 1 - 1	2	7 0

【表 9 - 3】

各種 (Various)	パントミクス社	M T U 4 8 1	P - T - A R R - 1 2 2 7 1 1 - 1	1	4 8
--------------	---------	-------------	---------------------------------------	---	-----

【表 10-1】

FFPE被験試料：全体切片

器官	コード	供給元	診断（供給元の資料による）
卵巣	1	不明	類内膜腺癌
	2	プロテオジェネクス社	類内膜腺癌
	3	CHTN	類内膜腺癌、漿液性腺癌および明細胞腺癌の特徴が混ざった腺癌
	4	CHTN	腺癌、乳頭、漿液、類内膜および明細胞の混合領域で高悪性度（high grade）
	5	CHTN	漿液性乳頭状腺癌
	6	プロテオジェネクス社	漿液性腺癌
	7	プロテオジェネクス社	漿液性乳頭状腺癌
	8	プロテオジェネクス社	漿液性乳頭状腺癌
	9	CHTN	漿液性乳頭状腺癌
	10	プロテオジェネクス社	漿液性乳頭状腺癌
肺	1	CHTN	腺癌、低分化型
	2	CHTN	腺癌、腺房、高分化型、細気管支肺胞の特徴を有する
	3	CHTN	腺癌、粘液の特徴
	4	CHTN	腺癌

【表 10-2】

	5	CHTN	腺癌
	6	CHTN	腺癌（細気管支肺胞性）癌腫
	7	CHTN	腺癌
	8	CHTN	腺癌、中分化型、明細胞の特徴を有する
	9	CHTN	腺癌
	10	CHTN	扁平上皮癌

【0168】

細胞（腫瘍細胞または形質移入細胞）をホルマリン固定およびパラフィン包埋（FFP

10

20

30

40

50

E) した。フローサイトメトリーにより様々な範囲の F O L R 1 発現を示すことが示された F F P E 細胞ペレット試料、および正常ヒト組織を、本試験に使用して、陽性対照および陰性対照を特徴付け、特異性を分析した。様々なレベルの F O L R 1 を示す細胞ペレットおよびそれぞれのスコアを、以下に報告する。細胞ペレットにおける、染色スコアと各 F O L R 1 発現レベル（細胞あたりの結合抗体、A B C、較正フローサイトメトリーにより決定された）の間の相関性は低い。例えば、1～3 不均一のスコアが、それぞれ 4 0, 0 9 8 および 5 6 5, 4 8 1 の A B C 値を示す S W 6 2 0 および I G R O V - 1 に与えられた。さらに、1, 5 0 0, 0 0 0 の A B C 値を示す H e l a 細胞は 2～3 不均一のスコアを得て、一方、8 3 0, 0 0 3 A B C を示す 3 0 0. 1 9 / F R 1 は 3 均一というより高いスコアを生んだ。

10

【表 1 1】

1. 9 μ g / m L の被験物質濃度における細胞ペレットの最終スコア

株化細胞	^a A B C 値	染色スコア
S W 6 2 0	4 0, 0 9 8	1～3 不均一
T 4 7 D	9 7, 5 7 6	1～2 不均一
I G R O V - 1	5 6 5, 4 8 1	1～3 不均一
3 0 0. 1 9 / F R 1	8 3 0, 0 0 3	3 均一
H E L A	1, 5 0 0, 5 8 7	2～3 不均一
K B	4, 0 0 0, 0 0 0	3 均一

20

^a 報告された A B C 値は、細胞集団における細胞あたりの結合抗体の平均であり、以下のように決定された：1. 0 $\times$ 1 0 ⁻⁸ M の濃度の抗 F O L R 1 - P E (1 : 1) を使用して、フローサイトメトリー法および Q u a n t i b r i t e (商 標) B e a d s (B D バイオサイエンス社) を用いることで、各細胞株に対して、A B C 値を決定した。

30

【0 1 6 9】

フローサイトメトリーヒストグラムは、細胞の分布対細胞あたりに結合した抗 F O L R 1 の数 (F O L R 1 発現レベル) を表す。ヒストグラムおよび各 I H C 染色結果は、共に、これらの各細胞株が多様な F O L R 1 発現を有する細胞の不均一な集団を含有することを示している。例外は、均一なフローサイトメトリーヒストグラムおよび I H C 染色スコアの両方を示す 3 0 0. 1 9 / F R 1 細胞株である。このデータは、より均一なレベルの F O L R 1 をそれぞれ発現している細胞株は、A B C 値と各染色スコアの間により良い相関関係を与え得ることを示している。前記アッセイは全ての F O L R 1 陽性細胞ペレット対照において陽性染色を示したが、これらの細胞ペレットの大部分から得られた染色スコアと各 F O L R 1 発現レベルの間の相関は乏しい。従って、この群から得られた細胞ペレットは、高発現対照、中発現対照、および低発現対照と特定され得なかった。I H C およびフローサイトメトリーによる、細胞株における F O L R 1 発現を示す代表的な写真およびヒストグラムを図 1 3 に示す。

40

【0 1 7 0】

アッセイ条件を決定するため、ある範囲に希釈した被験物質および対照物質を試験して、適切な感受性レベルを示す条件を選択した。F O L R 1 陽性および陰性正常組織 (副腎 (皮質 / 髄質) 、乳房 (管および小葉 / 結合組織) 、ファロピウス管 (表面上皮 / 筋肉壁) 、腎臓 (尿細管 / 糸球体) 、肺 (I 型 / I I 型肺細胞 / 肺胞間結合組織) 、脾臓 (管 /

50

ランゲルハンス島)、唾液腺(管/間質)、皮膚(エクリン腺/表皮)、胃(表面上皮/粘膜下層))、および腫瘍組織の全体切片(10個の卵巣腫瘍試料および10個の肺腫瘍試料))から成る、FOLR1陽性細胞ペレットおよびTMAを含む、一連のFFPE試料に対して実験を行った。各試料を、連続希釈した被験物質濃度(0.25、0.5、0.9、1.9、3.8、および7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)または1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または3.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の対照物質濃度で染色した。各希釈における相対的な染色強度を、各試料において比較して、最適希釈を特定した。最適希釈の判定基準は、1)アイソタイプ対照で染色された試料においてバックグラウンド染色を引き起こさず、2)被験物質で染色された陰性組織対照において染色を引き起こさず、3)目的のしるし(indication)を示す試験試料(卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍、NSCLC腫瘍、および腎腫瘍のFFPE組織)間の膜関連FOLR1発現の変動するレベルを識別する、希釈であった。評価された、被験物質の5種の希釈物のうち、1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度が、ライカ社製Bond RX自動プロトコール(ベーキング(Bake)および脱ろう(Dewax)プロトコール、20分間ER2を用いるHIERプロトコール、および追加のすすぎがある染色プロトコールIHC F)を用いる染色結果において、最も良好な動的範囲(dynamic range)を示した。

10

【実施例9】

【0171】

アッセイ自動化染色法の動的範囲(dynamic range)を特徴付ける対照の特定および特徴付け

品質管理: ヒト正常の唾液腺、肺および膵臓を各アッセイで使用されるべき陽性組織対照と見なして、染色手順が期待通りに行われていることを確認した。ヒト正常食道を陰性対照と見なした。これらの対照を以下のように特徴付けした: アッセイの動的な範囲をカバーする対照を確立するために、アッセイの動的範囲を示すことが予期されるいくつかのFOLR1陽性および陰性正常組織試料からなる組織マイクロアレイ(TMA)を、最適化段階および検証段階の間に、アッセイ検証対照として使用した。このTMAにおける特定された構造を有する、以下のような4種の正常組織を、適切なアッセイ対照と見なした: 正常ヒト肺の呼吸上皮(2均一のスコア)、正常ヒト膵臓の管(3均一先端(apical)のスコア)、正常ヒト唾液腺の介在導管(1~2不均一のスコア)、および正常ヒト食道(0のスコア)。合計4回のアッセイの実行にわたって、このTMAから得られた、特定済みの適切なアッセイ対照は、同一の結果を与えた。これらの結果は、選択された対照が一貫した結果を与え、アッセイの動的範囲をカバーしたことを示している。

20

30

【表12】

アッセイの動的範囲をカバーする対照と特定された正常組織における構造

正常な器官	下部構造	染色スコア(対照物質)	染色スコア(被験物質)
食道	全構造	0(陰性の)	0(陰性の)
唾液腺	介在導管	0(陰性の)	1~2不均一
肺	呼吸上皮	0(陰性の)	2均一
膵臓	管	0(陰性の)	3均一先端(apical)

40

先端(apical)染色は、極性化した不均一な膜染色と定義される。

【実施例10】

【0172】

自動染色法の機能解析。

このアッセイの用途は、再現性よく、且つ卵巣、子宮内膜、NSCLC、および腎臓の

50

F F P E 腫瘍組織における、様々なレベルおよび様々な均一性の膜関連 F O L R 1 発現（最適な動的範囲）を区別するだけの適切な感度を以て、F O L R 1 を特異的に検出することである。従って、特異性、再現性、および感度を性能基準と見なした。

【0173】

本試験アッセイでの正常組織染色と既に報告された結果との比較によって、本試験アッセイの特異性および感度を評価した。この試験より得られた染色結果を、F F P E 正常組織を用いる、Scorer et al 2010 (A Full Immunohistochemical Evaluation of a Novel Monoclonal Antibody to Folate Receptor – alpha. The Novocast Journal of Histopathology, REAGENTS: 2010(3):8-12、同一の抗体クローン B N 3. 2 について記述) から、および新鮮凍結正常組織 (イミュノジェン社報告 I M H 2 8 – 0 0 3) に対して I M G N 8 5 3 (h u M o v 1 9 (M 9 3 4 6 A) 抗体) を用いる組織交差反応性 (T C R) 試験から得られた、対応する染色結果と比較した。各方法から得られた染色結果の比較は、3つのアッセイが、異なる相対感度で概して類似した正常組織染色プロファイルを示し、S c o r e r のアッセイが最小の感度であり、本試験アッセイ (I M H 2 8 – 0 1 1) が中間の感度を有し、T C R 試験法が最も感度が高かったことを示している。いくつかの構造は、2つのより感度が高い方法 (本試験アッセイおよび T C R アッセイ) のみで、陽性染色を示した。S c o r e r により使用された最も感度が低いアッセイにおける陽性染色の例で、本試験アッセイおよび T C R 方法においても陽性ではなかったものは存在しなかった。これらの結果は、本試験アッセイの特異性および感度が、正常組織における F O L R 1 発現の評価に適切であることを示している。

【0174】

本試験アッセイの特異性および感受性を、卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍、N S C L C 腫瘍、および腎腫瘍から成る一連の腫瘍 T M A (本アッセイの意図された臨床用途を代表する試料セット) の染色および評価によってさらに特徴付けた。陽性染色は一貫して腫瘍組織に局在化しており、間質、血管、リンパ球および正常な器官組織を含む正常な周囲組織構成要素は、予想通り、陰性または陽性に染色されていた。卵巣癌または N S C L C いずれかの各サブタイプについて、異なる供給元から得られた T M A 間の染色スコアの分布は同様のスコア分布を示し、このことは、この方法が様々な固定および処理条件に対して感度が高くないことを示している。分布パターンは T M A の間で類似していたため、異なるアレイから得られたデータを組み合わせて、スコアを分類した。サブタイプあたり 20 以上の試料を含む腫瘍サブタイプのこれらのスコアの要約を、下の表に列挙する。これらの表に要約されるように、スコアの動的範囲は各腫瘍型について記載され、このアッセイが、卵巣、子宮内膜、N S C L C、および腎臓の F F P E 腫瘍組織における様々なレベルおよび様々な均一性の膜関連 F O L R 1 発現を区別するのに適切な感度を示すことを示している。漿液性卵巣癌、類内膜卵巣癌、N S C L C、子宮内膜癌、および腎明細胞癌の代表的な写真を、図 1 4 ~ 1 8 に示す。例えば、染色の手引きまたは診断キットに有用な追加の代表的な写真を、図 2 3 ~ 2 5 に示す。これらの試験は、本アッセイが特異的であり、診断または比較診断試薬として使用するのに適切な感度を有することを示している。

【表 1 3】

卵巣腫瘍の主なサブタイプの染色スコアの要約

サブタイプ	試料数 (%)						
	合計	≥ 3 不均 — ^a	≥ 2 不均 — ^a	≥ 1 不均 — ^a	1 ~ 3 局所的	あらゆる 陽性	陰性
類子宮内膜	3 5	1 5	1 8	2 0	6	2 6	9
	(1 0 0)	(4 3)	(5 1)	(5 7)	(1 7)	(7 4)	(2 6)
粘液性	2 9	2	4	5	0	5	2 4
	(1 0 0)	(7)	(1 4)	(1 7)	(0)	(1 7)	(8 3)
漿液性	1 2 9	4 4	9 2	9 2	8	1 0 0	2 9
	(1 0 0)	(3 4)	(7 1)	(7 1)	(6)	(7 8)	(2 2)

ⁱ⁾ 局所的な染色パターンは除外した。

10

20

【表 1 4】

NSCLC腫瘍の染色スコアの要約

種類	サブタイプ	試料数 (%)						
		合計	≥ 3 不均 ⁱ⁾	≥ 2 不均 ^a	≥ 1 不均 ^a	1～3 局所的	あらゆる陽性	陰性
腺癌	全種 ^b	6 7	1 7	3 9	4 2	5	4 7	2 0
		(1 0 0)	(2 5)	(5 8)	(6 3)	(7)	7 0	3 0
	特定の細気管支肺胞	7	2	5	5	0	5	2
		(1 0 0)	(2 9)	(7 1)	(7 1)	(0)	(7 1)	(2 9)
扁平上皮癌	全種	7 4	1	4	6	6	1 2	6 2
		(1 0 0)	(1)	(5)	(8)	(8)	(1 6)	(8 4)

ⁱ⁾ 局所的な染色パターンは除外した。

特定の細気管支肺胞上皮癌試料以外の全ての腺癌試料が含まれた。

【表 1 5】

子宮内膜腺癌およびの腎臓明細胞腫瘍の染色スコアの要約

腫瘍／サブタイプ	試料数 (%)						
	合計	≥ 3 不均 ^a	≥ 2 不均 ^a	≥ 1 不均 ^a	1～3 局所的	あらゆる陽性	陰性
子宮内膜／腺癌	5 8	5	2 3	3 0	1 0	4 0	1 8
	(1 0 0)	(9)	(4 0)	(5 2)	(1 7)	(6 9)	(3 1)
腎臓／明細胞	3 4	0	9	2 3	6	2 9	5
	(1 0 0)	(0)	(2 6)	(6 8)	(1 8)	(8 5)	(1 5)

局所的染色パターンは除外した。

【0175】

各試料が高い、中程度、または低いスコアを示す卵巢腫瘍、NSCLC腫瘍、または腎腫瘍の3種のFFPE腫瘍組織試料を用いて、アッセイの実験内(intra-run)再現性および実験間(inter-run)再現性を評価することにより、本試験アッセイの正確さを調べた。実験内再現性については、肺腫瘍、卵巢腫瘍、および腎腫瘍の切片をそれぞれ含む9枚のスライドを、ライカ社製Bond RXの9つの無作為な場所に配置した。実験間再現性については、同一の試料からの切片を含む3枚のスライドを、3つの異なる日に染色した。実験内再現性実験および実験間再現性実験の両方から得られた全てのスライドを評価したところ、各試料について同等の染色結果を示した：肺腫瘍(高い：3均一)、卵巢腫瘍(中程度：2不均一)、および腎腫瘍(低い：1～2不均一)。このデータは、低い、中程度および高い発現レベルを有する組織型の全般で、再現性を示している。

10

【実施例11】

【0176】

IHCによる2不均一以上のFOLR1発現スコアは、IMGN853を用いる治療のための、患者の選択基準である。

腫瘍細胞株におけるFOLR1の発現レベルを、抗体-PE複合体(FR1-24-PE)およびQuant iBRITE系を用いて決定した。3種の卵巢癌細胞株(Igrov-1、Skov-3およびOvcar-3)、絨毛癌細胞株Jeg-3および子宮頸癌細胞株KBが、試験に含まれた。信頼性のあるABC値を得るために、抗体-PE複合体を用いる結合実験は、飽和濃度(全ての利用可能な結合部位が複合体によって占められている濃度)で行われるべきである。FR1-24-PE複合体のそのような濃度を決定するために、多様なFOLR1発現を有する一連のFOLR1陽性細胞株に対して、結合実験を行った。細胞を、広範な濃度範囲のFR1-24-PE複合体と一緒に、氷上で2時間インキュベートし、FACS緩衝液(1%BSA含有PBS)で洗浄し、PBS中1%ホルムアルデヒドで固定し、FACSCaliburフローサイトメーターで分析した。 1×10^{-8} Mの濃度で、複合体は、全試験細胞株Igrov-1、Jeg-3、Skov-3、Ovcar-3、およびKB上の細胞表面の結合部位を飽和させた。続く結合ABC実験では、FR1-24-PE複合体を 1×10^{-8} Mの濃度で使用した。各試料は3連で分析し、数回の独立した実験を各細胞株に対して行った。最も高い発現が見られたのは、およそ4,000, 000 $\pm$ 300, 000のABC値を有したKB細胞であり、次に、400, 000 $\pm$ 85, 000および150, 000 $\pm$ 75, 000のABC値をそれぞれ有したIgrov-1およびJeg-3細胞株であった。2種の細胞株、Skov-3およびOvcar-3は、それぞれ20, 000 $\pm$ 10, 000 ABCおよび7, 000 $\pm$ 4, 000 ABCという、低いFOLR1発現を有した。実験間におけるABC値の有意な変動が、Jeg-3細胞において観察され、そのABC値は40, 000から300, 000まで変動した。分析された他の細胞株について得られたABC値はそれほど変動的ではなかった(以下の表を参照)ため、この変動性は、アッセイの変動性というよりも、その細胞株のいくつかの生物学的特性を反映したものであった可能性が高い。

20

30

【表 16】

株化細胞	ABC (平均±SD、n) i)	実験間変動	
		記録された最も高い ABC	記録された最も低いAB C
KB	4, 000, 000 ±300, 000、 4	4, 500, 000	3, 800, 000
I g r o v - 1	400, 000±8 5, 000、5	480, 000	280, 000
J e g - 3	150, 000±7 5, 000、14	260, 000	40, 000
S k o v - 3	20, 000±10 , 000	28, 000	10, 000
O v c a r - 3	7, 000±4, 0 00	10, 000	4, 000

i) SD—標準偏差；nは、独立した実験の数

FR1-24PE—標識抗体およびQuantibRITE系を用いるFACSに基づいたアッセイによって、ABC値を決定した。独立した実験について、平均値±標準偏差（SD）を算出した。

【0177】

広範囲のFOLR1発現を有するFOLR1陽性細胞株に対するIMGN853の作用強度および特異性を分析した（細胞株のABC値は上に記載）。さらに、FOLR1陰性細胞株NamalwaおよびSW2が実験に含まれた。IMGN853は、FOLR1を高発現する細胞、KB（4, 000, 000±300, 000ABC）、Igrov-1（400, 000±85, 000ABC）およびJeg-3（150, 000±75, 000ABC）に対して、それぞれ0.10±0.01nM、0.50±0.07nMおよび1.00±0.05nMのIC₅₀値で、高い細胞傷害性を有した。過剰な無改変huMov19（M9346A）抗体（0.5μM）により、複合体の作用強度が典型的な非特異的レベルにまで著しく減少した（10～20倍）ことから、3種の細胞株全てに対して細胞殺傷活性はFOLR1依存性であった。IMGN853は、FOLR1低発現体であるSkov-3細胞およびOvcar-3細胞に対して（それぞれ20, 000±10, 000ABCおよび7, 000±4, 000ABC）、およびFOLR1陰性細胞であるNamalwaおよびSW2に対しては、ほんのわずかな活性しか有さず、IC₅₀値は2nMよりも大きかった。これらの細胞株に対するIMGN853の細胞障害活性は低く、huMov19（M9346A）のブロックがそれに影響を及ぼさなかったことから、FOLR1依存的ではなかった。図19および20を参照されたい。

【0178】

マウス異種移植片腫瘍モデルから調製したFFPE試料を、上記の最適化され、有効性が認められたアッセイを用いて、FOLR1陽性について評価した。対照物質で染色されたいかなる異種移植片試料の腫瘍細胞にも、染色は観察されなかった。以下の細胞株から得られたFFPEマウス異種移植片組織は以下の染色パターンを示した：Igrov-1

、KB、およびNCI-H2110はレベル3の強度を有する均一な染色パターンを示し、IshikawaおよびOvcar3はレベル3の強度を有する不均一な染色パターンを示し、LXFA737はレベル2の強度を有する均一な染色パターンを示し、OV-90はレベル2の強度を有する不均一なパターンを示し、SKOV3は陰性であった。腫瘍異種移植片の代表的な写真を、図21および22に示す。

【表17-1】

親細胞株 または腫瘍断片	疾患表示	最終スコア	染色の分類
IGRO V-1	卵巣がん	1～3 均一	3 均一
		1～3 均一	
		1～3 均一	
Ishikawa	子宮内膜癌	2～3 不均一	3 不均一
		1～2 不均一／3 局所的	
		2 不均一／3 局所的	
		2 不均一／3 局所的	
KB	子宮頸癌	3 均一	3 均一
		3 均一	

【表17-2】

LXFA 737	NSCLC	2 均一	2 均一
		2 均一	
NCI-H2110	NSCLC	2～3 均一	3 均一
		2 均一	
OV-90	卵巣がん	1～2 不均一	2 不均一
		陰性 ^a	
OVCA R3	卵巣がん	1～3 不均一	3 不均一
		1～3 不均一	
SKOV-3	卵巣がん	陰性	陰性
		陰性	

【0179】

染色閾値（2 不均一以上）は、最小レベルの発現（染色強度）および最低分布の染色（FOLR1を発現する腫瘍細胞の割合）の両方を必要とする。前臨床のデータによって、卵巣癌におけるこの閾値の正当性が認められる。2 不均一以上のIHCスコアを有するマウス異種移植片腫瘍試料は、*in vivo*において、IMGN853に対する感受性を示す。マウス異種移植片卵巣腫瘍モデルから調製されたFFPE試料を、上記の最適化され、有効性が認められたアッセイを用いて、FOLR1陽性について評価した。2種の卵

巣癌異種移植モデル、OVCAR-3およびIGROV-1が、レベル3の強度を有する不均一または均一な染色パターンを示した。OV-90卵巣癌細胞から得られた異種移植モデルはレベル2の強度を有する不均一な染色パターンを示し、SKOV-3卵巣癌モデルはFOLR1陰性であった。IMGN853は、レベル3のFOLR1強度を有する該2種の卵巣モデルにおいて高活性であり、レベル2のFOLR1強度を有するOV-90モデルにおいて活性であった。SKOV-3モデルでは活性は観察されなかった。異種移植片モデルを、肺腫瘍、子宮内膜腫瘍、および子宮頸部腫瘍を含む他の疾患徴候 (disease indication) についても評価したところ、活性およびFOLR1染色スコアの間に相関性は認められたが、さらなる試料を試験する必要がある。

【0180】

10

【表18】

IMGN853に対する卵巣腫瘍異種移植モデルの感受性対FOLR1発現レベル

異種移植片	In vivoにおける活性 (5mg/kgのIMGN853、単回投与量)	強度スコア、分布
OVCAR3	高活性	3不均一
IGROV-1	高活性	3均一
OV-90	活性	2不均一
SKOV-3	不活性	陰性

20

【表19】

IMGN853に対する他の腫瘍の異種移植モデルの感受性対FOLR1発現レベル

異種移植片	腫瘍の種類	In vivoにおける活性 (5mg/kgのIMGN853、単回投与量)	強度スコア、分布
NCI-H2110	NSCLC	高活性	3均一
Ishikawa	子宮内膜	不活性	2均一
KB	子宮頸部	高活性	3均一

30

【0181】

本明細書で引用された全ての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、および受入番号／データベース配列 (ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の両方を含む) は、個々の刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、または受入番号／データベース配列が、具体的且つ個々に、参照によって組み込まれた場合と同程度に、あらゆる目的のために、その全体が、参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【数 1】

配列表

配列番号 1－ヒト葉酸受容体 1

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKNACCSTNTSQEAHKDVS
LYRFNWNHCGEMAPACKRHFIIQDTCLYECSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWEDCRTSYTCKSNWHKGW
NWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWA
AWPFLLSLALMLLWLLS

10

配列番号 2－ヒト葉酸受容体 1 核酸配列

atggctcagcggatgacaacacagctgctgctccttctagtggtggctgtagtaggggaggctcagacaaggattgc
atgggccaggactgagcttctcaatgtctgcatgaacgccaaagcaccacaaggaaaagccagggcccgaggacaagtgc
atgagcagtgctgacctggaggaagaatgcctgctgtttctaccaacaccagccaggaagcccataaggatgtttctac
ctatatagattcaactggaaccactgtggagagatggcacctgcctgcaaacggcatttcatccaggacacctgcctcta
cgagtgtctccccaacttggggccctggatccagcaggtggatcagagctggcgcaaagagcgggtactgaacgtgcccc
tgtgcaaagaggactgtgagcaatggtgggaagattgtgcacctcctacacctgcaagagcaactggcacaagggtgg
aactggacttcagggtttaacaagtgcgcagtgaggagctgcctgccaaacctttccatttctacttccccacacctgt
tctgtgcaatgaaatctggaactcactcctacaaggtcgaactacagccgaggagtggtgcctgcatccagatgtggt
tcgaccacagccagggaacccaatgaggaggtggcgaggttctatgctgcagccatgagtggggtggggccctgggca
gcctggcctttctgcttagcctggccctaatactgctgtgtggtgctcage

20

配列番号 3－h u M o v 1 9 v H C

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAH
MELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTITVTVSS

30

配列番号 4－h u M o v 1 9 v L C v 1 . 0 0

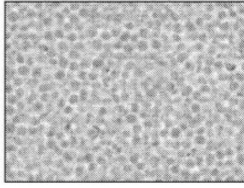
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNIS
PVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGTKLEIKR

配列番号 5－h u M o v 1 9 v L C v 1 . 6 0

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTIS
PVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGTKLEIKR

【図 1】

A. 300-19 細胞



B. FOLR1 を形質移入された 300-19 細胞

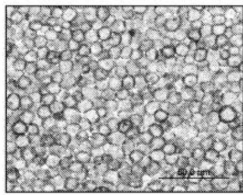
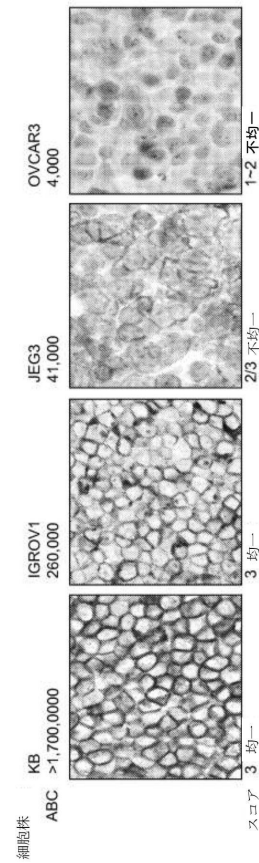


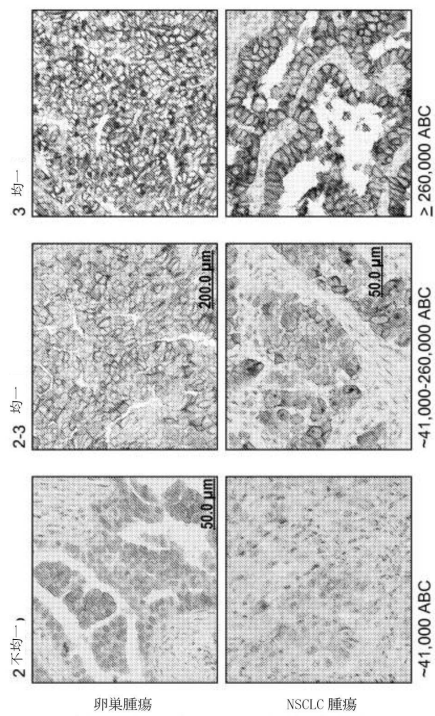
图 1

【図 2】



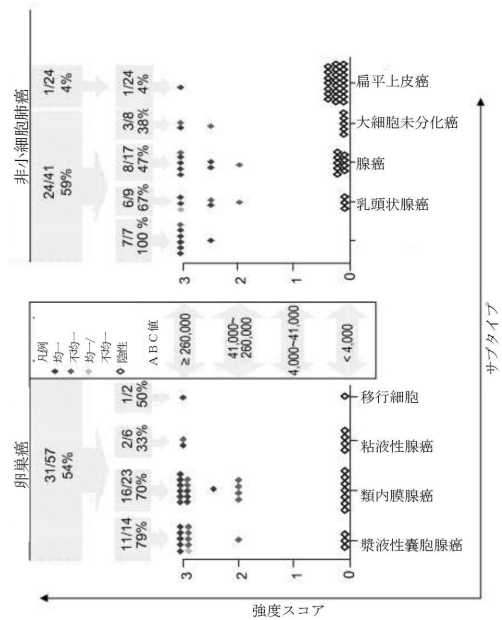
2

【図 3】



3
☒

【图 4】



4. ☒ ☐

【図 5】

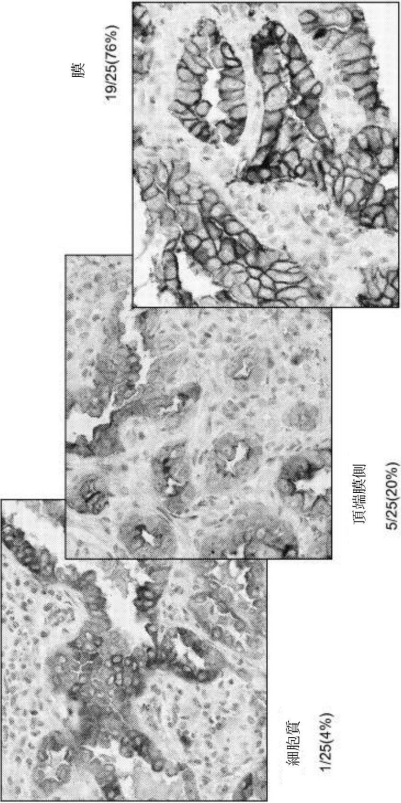


図 5

【図 6】

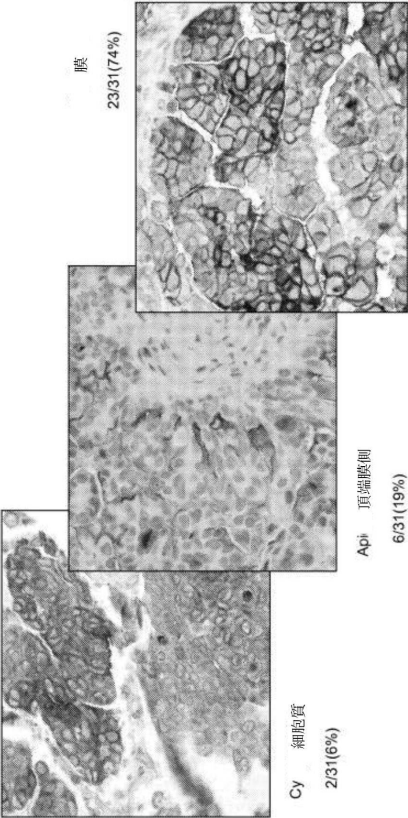


図 6

【図 7】

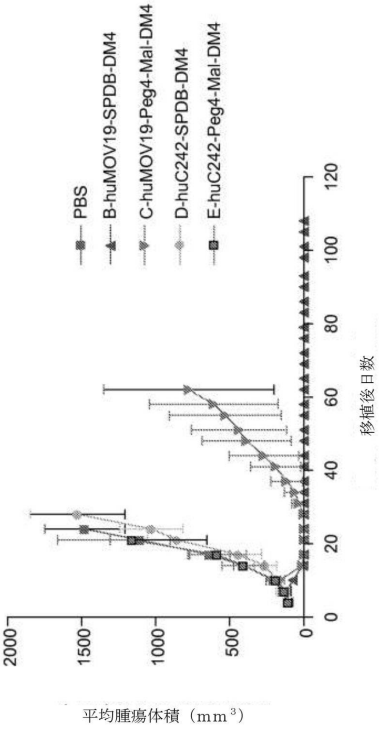


図 7

【図 8】

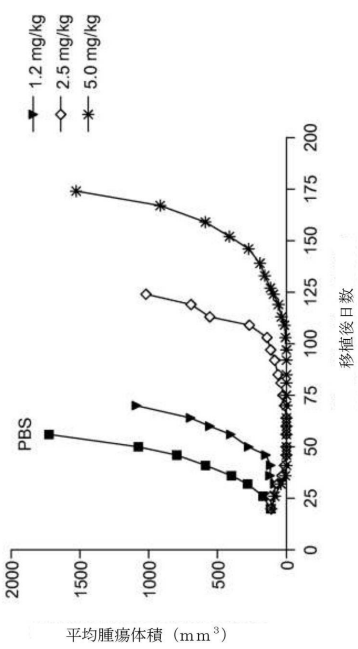


図 8

【図 9】

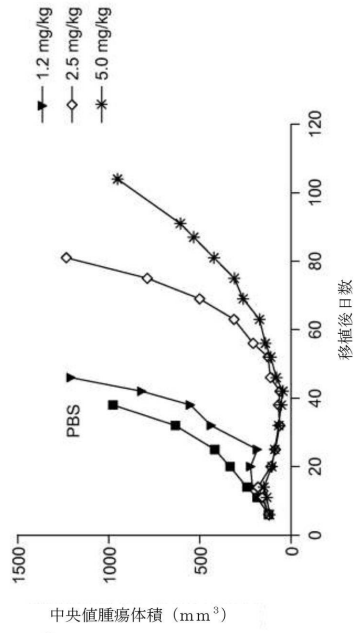


図 9

【図 10】

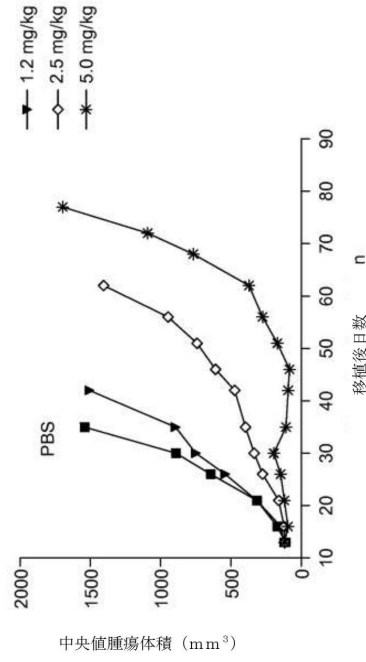


図 10

【図 11】

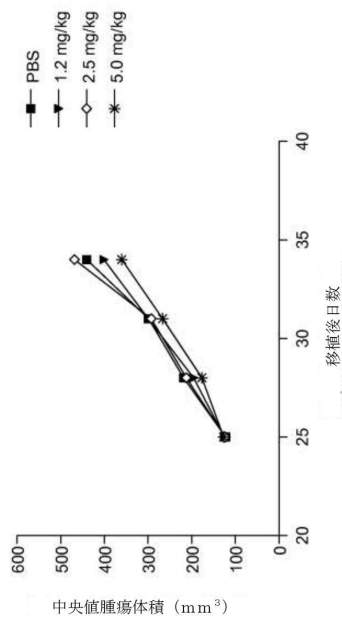


図 11

【図 12】

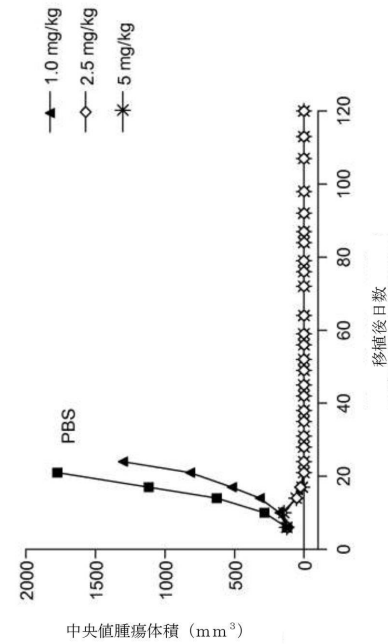


図 12

【図 13】

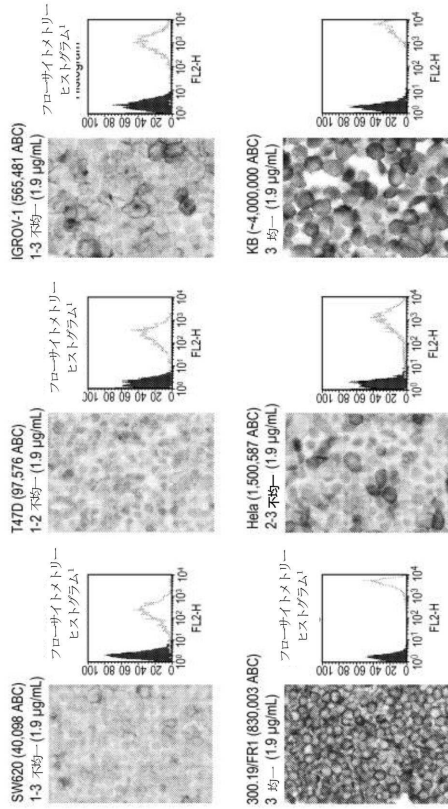


図 13

【図 14】

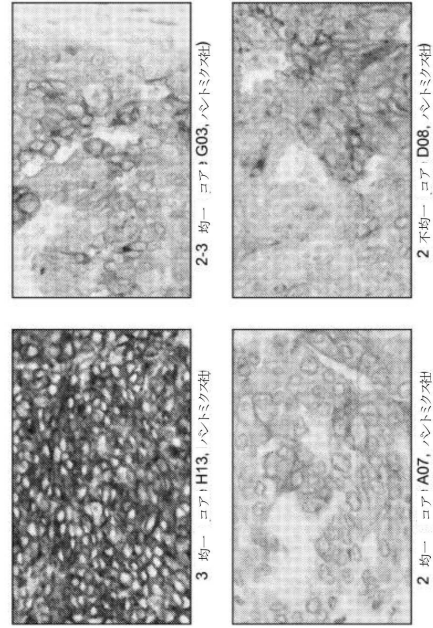


図 14

【図 15】

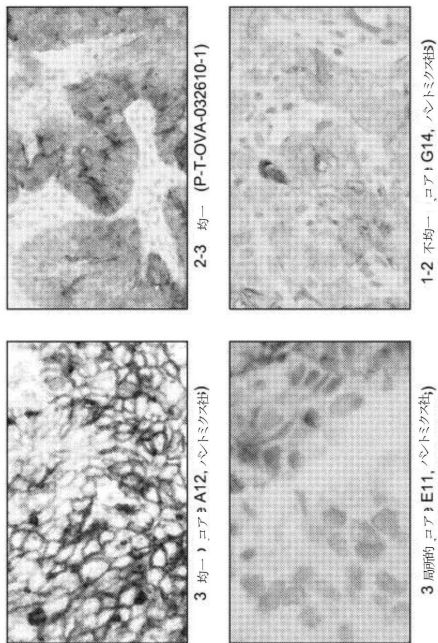


図 15

【図 16】

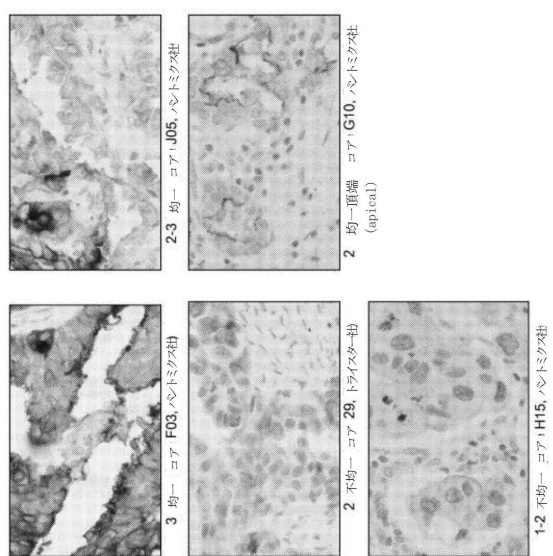


図 16

【図 17】

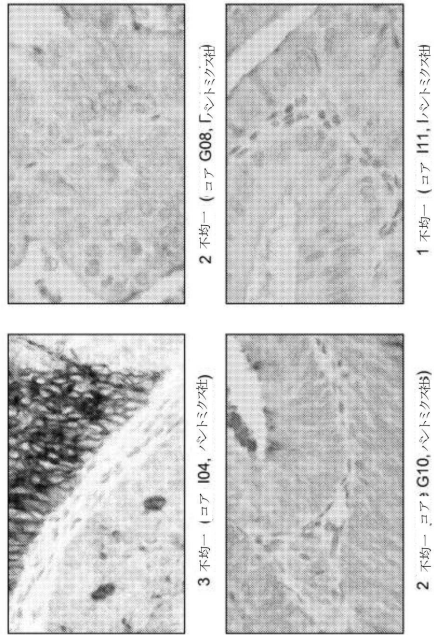


図 17

【図 18】

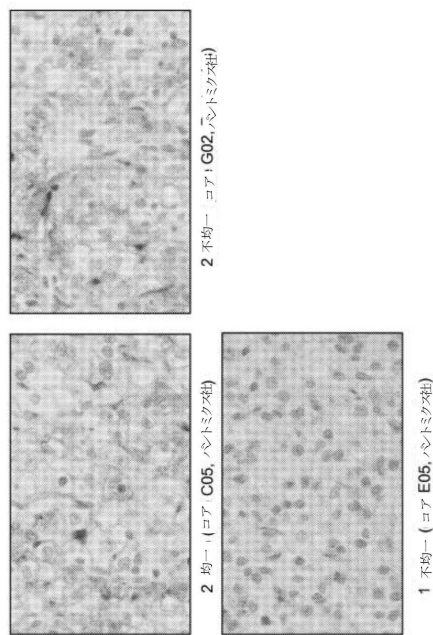


図 18

【図 19】

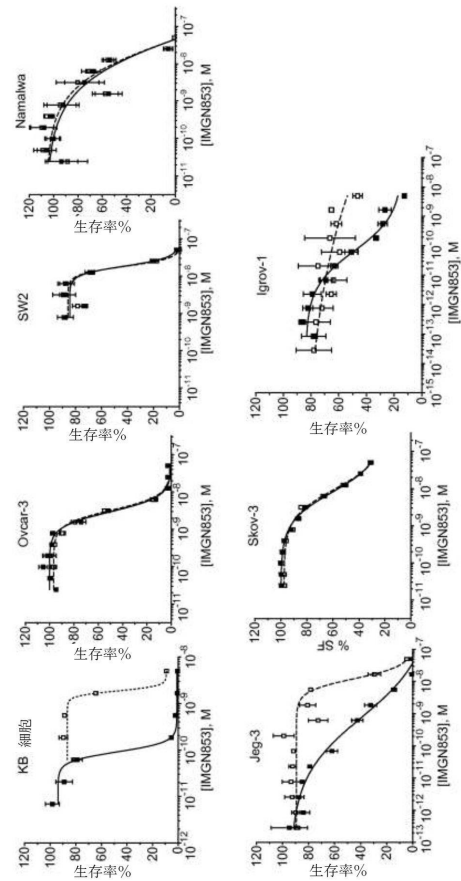


図 19

【図 20】

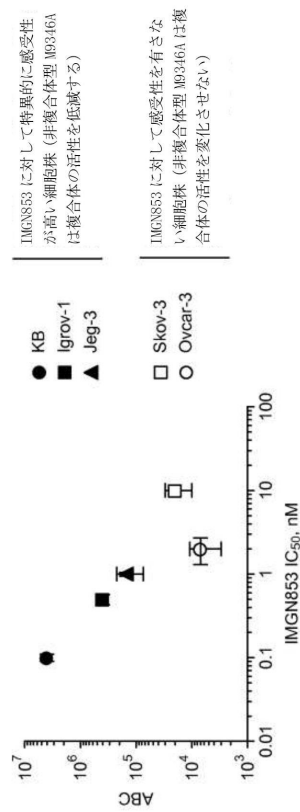


図 20

【図 2 1】

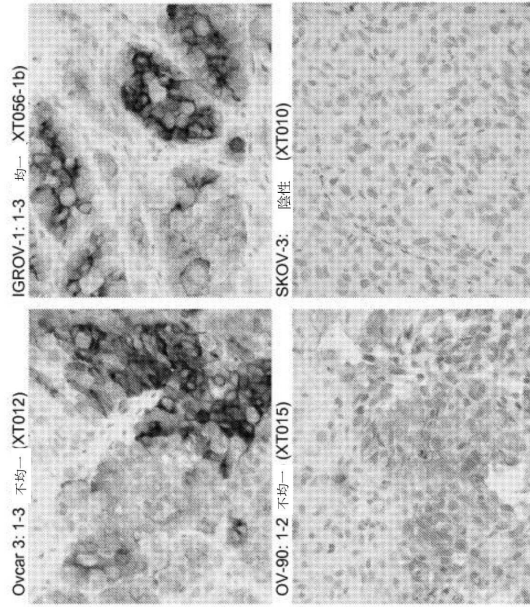


図 2 1

【図 2 2】

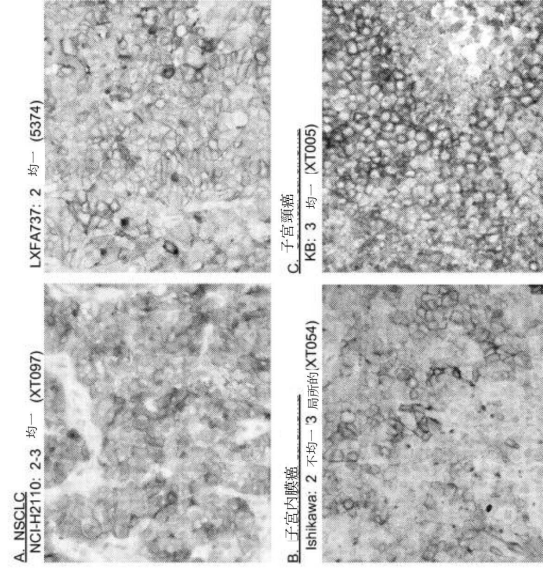


図 2 2

【図 2 3】

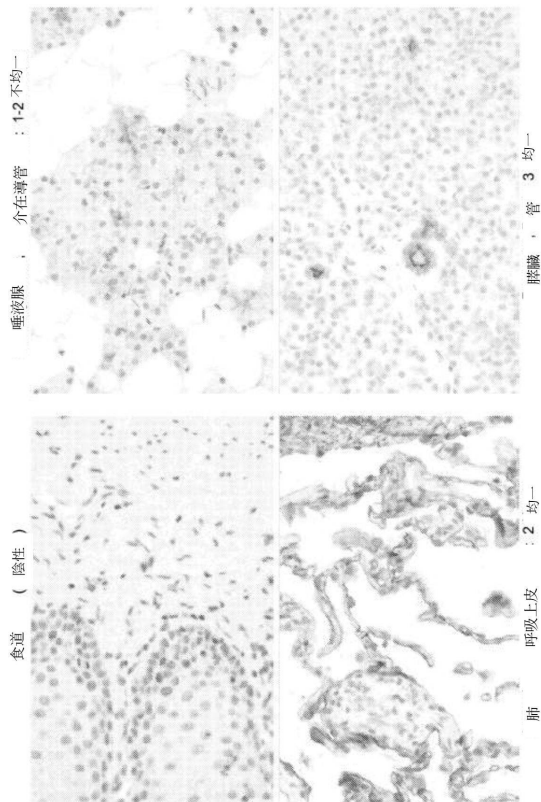


図 2 3

【図 2 4】

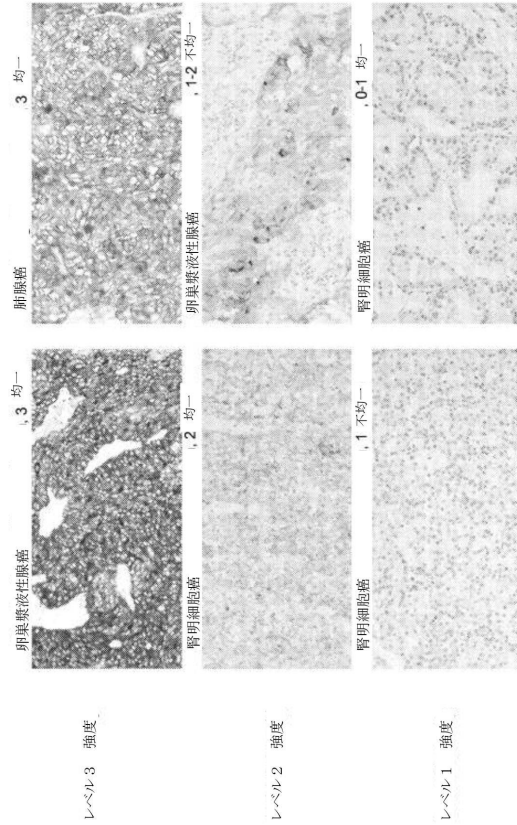


図 2 4

【図 2 5】

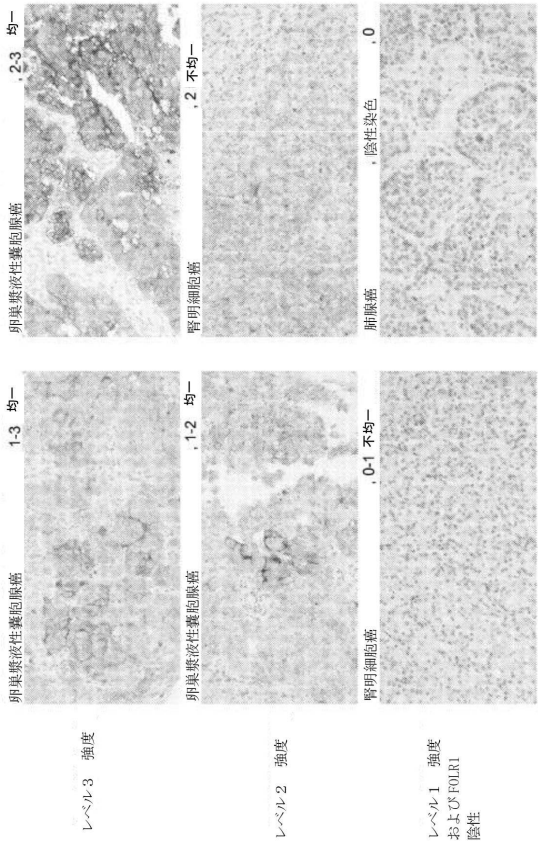


図 2 5

【配列表】

0006018621000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
G 0 1 N	33/536	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N	33/536	C
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/48	P
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
			C 1 2 N	15/00	A

微生物の受託番号 ATCC PTA-10776

- (72)発明者 カーリガン, クリスティーナ エヌ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02478, ベルモント, ダートマス ストリート 5
3エー
- (72)発明者 ホワイトマン, キャスリーン アール.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01887, ウィルミントン, シャウシーン アベニュー
512
- (72)発明者 パイン, ギリアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02468, ワーバン, オークベール ロード 21
- (72)発明者 ラド, シャロン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01803, バーリントン, セブン スプリングス レ
ーン 18エー

審査官 鳥居 福代

- (56)参考文献 特表2008-500025 (JP, A)
特表2010-503386 (JP, A)
特表2009-521206 (JP, A)
特表2008-537778 (JP, A)
Cancer Research, 1994年, Vol.54, No.9, p.2448-2455

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 49/00
A 6 1 K 51/00
G 0 1 N 33/48
G 0 1 N 33/53
G 0 1 N 33/536
G 0 1 N 33/574
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq

專利名称(译)	一种提高FOLR1癌症治疗效果的方法		
公开(公告)号	JP6018621B2	公开(公告)日	2016-11-02
申请号	JP2014502848	申请日	2012-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	伊缪诺金公司		
申请(专利权)人(译)	Imyunojen公司		
当前申请(专利权)人(译)	Imyunojen公司		
[标]发明人	カーリガンクリスティーナエヌ ホワイトマンキャスリーンアール パインギリアン ラドシャロン		
发明人	カーリガン, クリスティーナ エヌ. ホワイトマン, キャスリーン アール. パイン, ギリアン ラド, シャロン		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 A61K49/00 A61K51/00 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/48 G01N33/574 C12N15/09		
CPC分类号	A61K47/6809 A61K47/6849 A61P35/00 A61P43/00 A61K47/6869 C07K16/28 G01N33/57492 A61K47/6851 A61K47/6817 A61K47/6857		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.L A61P35/00 A61K49/00.A A61K49/02.A G01N33/53.U G01N33/53.Y G01N33/536.C G01N33/48.P G01N33/574.A C12N15/00.A		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
優先権	61/471007 2011-04-01 US		
其他公开文献	JP2014513068A JP2014513068A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>ステップ</th><th>条件</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>抗原回復</td><td>B o r g (バイオケア社 (Biocare)) pH9. 0</td></tr> <tr> <td>ブロッキングステップ</td><td>アビジン/ビオチン; ペルオキシド</td></tr> <tr> <td>被験物質または対照物質</td><td>2. 0 μ g / mL</td></tr> <tr> <td>希釈</td><td>2%ウマ血清含有PBS</td></tr> <tr> <td>二次抗体</td><td>1 0 μ g / mL</td></tr> <tr> <td>検出系*</td><td>アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ-複合体; ABC (ペクター・ラボ社 (Vector Labs))</td></tr> <tr> <td>色素原 (chromagen)</td><td>DAB (ダコ社 (Dako))</td></tr> <tr> <td>DAB現像時間</td><td>5分以上</td></tr> </tbody> </table>	ステップ	条件	抗原回復	B o r g (バイオケア社 (Biocare)) pH9. 0	ブロッキングステップ	アビジン/ビオチン; ペルオキシド	被験物質または対照物質	2. 0 μ g / mL	希釈	2%ウマ血清含有PBS	二次抗体	1 0 μ g / mL	検出系*	アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ-複合体; ABC (ペクター・ラボ社 (Vector Labs))	色素原 (chromagen)	DAB (ダコ社 (Dako))	DAB現像時間	5分以上
ステップ	条件																		
抗原回復	B o r g (バイオケア社 (Biocare)) pH9. 0																		
ブロッキングステップ	アビジン/ビオチン; ペルオキシド																		
被験物質または対照物質	2. 0 μ g / mL																		
希釈	2%ウマ血清含有PBS																		
二次抗体	1 0 μ g / mL																		
検出系*	アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ-複合体; ABC (ペクター・ラボ社 (Vector Labs))																		
色素原 (chromagen)	DAB (ダコ社 (Dako))																		
DAB現像時間	5分以上																		
提供了改善靶向人叶酸受体1的癌症疗法的成功的方法。还提供了包含可用于所述方法的试剂的试剂盒。																			

