

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046422**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента	(51) Int. Cl.	<i>C07K 16/00</i> (2006.01)
2024.03.13		<i>C07K 16/28</i> (2006.01)
(21) Номер заявки		<i>C07K 16/30</i> (2006.01)
202092125		<i>C12N 15/13</i> (2006.01)
(22) Дата подачи заявки		<i>C12N 15/63</i> (2006.01)
2019.03.07		<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
		<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
		<i>G01N 33/53</i> (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА ФОЛАТА 1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/642,213	(56) US-A1-20160083471
(32) 2018.03.13	US-A1-20110171213
(33) US	US-A1-20100150902
(43) 2020.12.15	
(86) PCT/US2019/021084	
(87) WO 2019/177854 2019.09.19	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)	
(72) Изобретатель: Ван Минхань, Цзоу Хой, Цзя Хайцюнь (US)	
(74) Представитель: Медведев В.Н. (RU)	

(57) Описаны антитела против FOLR1 и их антигенсвязывающие фрагменты. Описаны также нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, способы получения антител и способы применения антител для лечения или предотвращения заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

B1

046422

046422

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США No. 62/642213, поданной 13 марта 2018 г., полное содержание описания которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против рецептора фолата 1 (FOLR1), к нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Настоящее изобретение относится также к способам получения антител и к способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественные опухоли.

Ссылка на список последовательностей, принятый в электронной форме

Настоящая заявка содержит список последовательностей, принятый в электронной форме через EFS-Web как список последовательностей в формате ASCII с наименованием файла "689204-11WO Sequence Listing" и датой создания 6 марта 2019 г. и имеющий размер 64 кБ. Список последовательностей, принятый через EFS-Web, составляет часть описания, и его полное содержание приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Уровень техники для изобретения

Рецептор фолата 1 (FOLR1), также известный как рецептор фолата α (FR α) или связывающий фолат белок (FBP), представляет собой заякоренный гликофосфатидилинозитолом (GPI) мембранный белок на клеточной поверхности, который имеет высокую аффинность для активной формы фолата, 5-метилтетрагидрофолата (5-MTHF), и транспортирует ее и ее производные в клетки (Salazar and Ratnam, Cancer Metastasis Rev 2007; 26:141-52). FOLR1 стал мишенью в онкологии, поскольку он имеет сверхэкспрессию на конкретных солидных опухолях, например, яичника, легкого и молочной железы (Toffoli et al., Int J Cancer 1997; 74:193-198 и Boogerd et al., Oncotarget 2016; 7:17442-17454), но его экспрессия находится на низких уровнях в ограниченном количестве нормальных тканей человека (Weitman, et al., Cancer Res 1992; 52:3396-3401). В соответствии с этим наблюдением, клинические исследования фазы 1, проведенные до настоящего времени с нацеленными на FOLR1 малыми и крупными молекулами, выявили хорошую переносимость лекарственного средства (Cheung et al., Oncotarget 2016; 7:52553-52574). Таким образом, FOLR1 является опухолеассоциированным/опухолеспецифическим антигеном, и моноклональные антитела (mAb) против FOLR1 можно использовать в качестве потенциальных противораковых терапевтических средств.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают FOLR1.

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- a) SEQ ID NO:38, 39, 40, 62, 63 и 64, соответственно;
- b) SEQ ID NO:17, 18, 19, 41, 42 и 43, соответственно;
- c) SEQ ID NO:20, 21, 22, 44, 45 и 46, соответственно;
- d) SEQ ID NO:23, 24, 25, 47, 48 и 49, соответственно;
- e) SEQ ID NO:26, 27, 28, 50, 51 и 52, соответственно;
- f) SEQ ID NO:29, 30, 31, 53, 54 и 55, соответственно;
- g) SEQ ID NO:32, 33, 34, 56, 57 и 58, соответственно; или
- h) SEQ ID NO:35, 36, 37, 59, 60 и 61, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает FOLR1, предпочтительно, FOLR1 человека.

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- a) SEQ ID NO:86, 87, 88, 110, 111 и 112, соответственно;
- b) SEQ ID NO:65, 66, 67, 89, 90 и 91, соответственно;
- c) SEQ ID NO:68, 69, 70, 92, 93 и 94, соответственно;
- d) SEQ ID NO:71, 72, 73, 95, 96 и 97, соответственно;
- e) SEQ ID NO:74, 75, 76, 98, 99 и 100, соответственно;
- f) SEQ ID NO:77, 78, 79, 101, 102 и 103, соответственно;
- g) SEQ ID NO:80, 81, 82, 104, 105 и 106, соответственно; или
- h) SEQ ID NO: 83, 84, 85, 107, 108 и 109, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает FOLR1, предпочтительно, FOLR1 человека.

рами лизис клеток опухоли.

Настоящее изобретение относится также к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к векторам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению. Злокачественная опухоль может представлять собой любую жидкую или солидную злокачественную опухоль, например, она может быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Настоящее изобретение относится также к способам получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

Способы включают культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Настоящее изобретение относится также к способам получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Способы включают объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение относится также к способам определения уровня FOLR1 у субъекта.

Способы включают (а) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (с) определение уровня FOLR1 у субъекта.

Образец может, например, представлять собой образец ткани или образец крови. Образец ткани может, например, представлять собой образец ткани злокачественной опухоли.

Краткое описание чертежей

Приведенное выше краткое изложение сущности изобретения, так же как следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, станет лучше понятным при чтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. Следует понимать, однако, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1A-1B показано связывание очищенных мышинных mAb против FOLR1 с клетками CHO, стабильно экспрессирующими FOLR1 человека, как показано посредством анализа FACS.

На фиг. 2A-2C показаны результаты для зависимого от дозы связывания химерных mAb против FOLR1 с иммобилизованным внеклеточным доменом FOLR1 в анализе ELISA.

На фиг. 3A-3D показаны результаты для зависимого от дозы связывания химерных mAb против FOLR1 с клетками SK-OV-3 в анализе FACS.

На фиг. 4A-4C показаны результаты для зависимого от дозы связывания гуманизированных mAb F5 с иммобилизованным внеклеточным доменом FOLR1 в анализе ELISA.

На фиг. 5A-5B показаны результаты для зависимого от дозы связывания гуманизированных mAb F10 с иммобилизованным внеклеточным доменом FOLR1 в анализе ELISA.

На фиг. 6A-6B показаны результаты для зависимого от дозы связывания гуманизированных mAb F17 с иммобилизованным внеклеточным доменом FOLR1 в анализе ELISA.

На фиг. 7A-7D показаны результаты для зависимого от дозы связывания гуманизированных mAb F20 с иммобилизованным внеклеточным доменом FOLR1 в анализе ELISA.

На фиг. 8A-8J показаны результаты для зависимого от дозы связывания гуманизированных mAb с клетками SK-OV-3. Фиг. 8A, данные для гуманизированных mAb F5; фиг. 8B-8D, данные для гуманизированных mAb F10; фиг. 8E, данные для гуманизированного mAb F17 mAb; фиг. 8F-8J, данные для гуманизированных mAb F20.

На фиг. 9 показаны результаты для активности антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) четырех гуманизированных mAb против FOLR1.

Подробное описание изобретения

Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в разделе уровень техники и на протяжении описания; полное содержание каждой из этих ссылок приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которое включено в настоящее описание, приведено с целью предоставления контекста по изобретению. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все из этих объектов составляют часть предшествующего уровня техники, применительно к любым описанным или заявленным изобретениям.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. В ином случае, конкретные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, как указано в описании.

Следует отметить, что, как используют в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем описании, следует понимать, как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает 0,9-1,1 мг/мл. Подобным образом, диапазон концентраций 1-10% (мас./об.) включает 0,9-11% (мас./об.). В рамках изобретения, использование числового значения явно включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дроби значений, если контекст явно не указывает на иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий сериям элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в сериях. Специалисту в данной области известно, или он является способным определить с использованием не более, чем общепринятых экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Такие эквиваленты предназначены для включения в изобретение.

В рамках изобретения, термины "содержит", "содержащий", "включает", "включая", "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", или любые другие их варианты, понимают как подразумевающие включение указанного целого или группы целых, но не как исключение любого другого целого или группы целых, и они предназначены, чтобы является неисключительными или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые включают список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не перечисленные или не присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если явно не указано обратное, "или" относится к включительному или, а не к исключительному или. Например, условие А или В удовлетворено посредством любого из следующего: А является истинным (или присутствует) и В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует) и В является истинным (или присутствует), и А и В оба являются истинными (или присутствуют).

В рамках изобретения, соединительный термин "и/или" между множеством перечисленных элементов понимают как включающий как индивидуальные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены посредством "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента в отсутствие второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента в отсутствие первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как включенный в значение, и таким образом, удовлетворяющий требованию термина "и/или", в рамках изобретения. Одновременную применимость более одного из вариантов также понимают как включенную в значение, и таким образом, удовлетворяющую требованию термина "и/или".

В рамках изобретения, термин "состоит из" или его варианты, такие как "состоят из" или "состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, однако на то, что никакие дополнительные целое или группа целых не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В рамках изобретения, термин "в основном состоит из" или варианты, такие как "в основном состоит из" или "в основном состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, и необязательное включение любого из указанного целого или группы целых, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

В рамках изобретения, "субъект" обозначает любое животное, предпочтительно, млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин "млекопитающее", в рамках изобретения, включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, человека и т.д., более предпочтительно, человека.

Термины "справа", "слева", "ниже" и "выше" обозначают направления на чертежах, на которые сделана ссылка.

Следует также понимать, что термины "приблизительно", "около", "как правило", "по существу" и подобные термины, используемые в настоящем описании, применительно к измерению или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанное измерение/характеристика не является точной границей или параметром, и не исключают незначительных отклонений от них, которые являются функционально одинаковыми или сходными, как понятно специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, включающие числовой параметр, включают отклонения, которые, с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округления, ошибок измерения или других систематических ошибок, технологических допусков и т.д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антитела против FOLR1 и кодирующие их полинуклеотиды, полипептиды FOLR1 и кодирующие их полинуклеотиды FOLR1), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, или посредством визуальной проверки.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, назначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и назначают параметры алгоритма программы сравнения последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательностей для тестируемой последовательности (последовательностей), относительно эталонной последовательности, на основании назначенных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), посредством алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), посредством способа поиска сходства Пирсона и Липмана, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), посредством компьютеризированных осуществлений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или посредством визуальной проверки (см., в общем, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, пригодных для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является публично доступным через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) посредством идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T обозначает пороговую оценку сходства соседних слов (Altschul et al, выше). Эти исходные попадания в соседнее слово действуют в качестве затравок для инициации поисков с целью найти более длинные HSP, содержащие их. Попадания в слова затем расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности, пока кумулятивный показатель выравнивания может увеличиваться.

Кумулятивные показатели рассчитывают с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (показатель вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (показатель штрафа за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей, оценочную матрицу используют для расчета кумулятивного показателя. Расширение попадания в слова в каждом направлении прекращают, когда: кумулятивный показатель выравнивания уменьшается на значение X от его максимально достигнутого значения; кумулятивный показатель стремится к нулю или ниже, из-за накопления одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигнут конец какой-либо из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию длину слова (W) 3 и ожидание (E) 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

В дополнение к расчету процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST осуществляет также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одним из измерений сходства, предоставленных алгоритмом BLAST, является наименьшая сумма вероятностей ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может происходить случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,1, более предпочтительно, менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно, менее приблизительно 0,001.

Дополнительным указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются в основном идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, обладает иммунологической перекрестной реакционной способностью по отношению к антителам, образованным против полипептида, закодированного второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является в основном идентичным второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что эти две молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях.

Антитела.

Изобретение, в общем, относится к выделенным антителам против FOLR1, нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Изобретение также относится к способам получения антител и способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественную опухоль. Антитела по изобретению обладают одним или несколькими желательными функциональными свойствами, включая, но без ограничения, высоко аффинное связывание с FOLR1, высокую специфичность для FOLR1 и способность ингибировать рост опухоли у нуждающихся в этом субъектов и в моделях на животных, при введении отдельно или в комбинации с другими видами противораковой терапии.

В общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают FOLR1.

В рамках изобретения, термин "антитело" используют в широком смысле, и он включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, композитные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белковые или пептидные цепи, имеющие специфичность связывания для специфического антигена. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно приписать к пяти главным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG далее подклассифицируют как изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут принадлежать к любому из пяти главных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител из видов позвоночных можно приписать к одному из двух явно отличающихся типов, а именно каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи из крысиных или человеческих антител. В дополнение к тяжелым и легким константным доменам, антитела содержат антигенсвязывающую область, состоящую из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены варибельной области легкой цепи, альтернативно обозначены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно обозначены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В рамках изобретения, термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое является в основном свободным от других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывает FOLR1, является в основном свободным от антител, которые не связывают FOLR1). Кроме того, выделенное антитело является в основном свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

В рамках изобретения, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению можно получать посредством способа гибридомы, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов из отдельных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела можно получать посредством гибридомы, включающей В-клетку, полученную из трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

В рамках изобретения, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, например, такому как диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидным мостиком фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидным мостиком диатело (ds диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент является способным связываться с тем же самым антигеном, с которым связывается исходное антитело или фрагмент исходного антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и фрагмент Fd тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

В рамках изобретения, термин "одноцепочечное антитело" относится к общепринятому в данной области одноцепочечному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом из от приблизительно 15 до приблизительно 20 аминокислот. В рамках изобретения, термин "однодоменное антитело" относится к общепринятому в данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

В рамках изобретения, термин "человеческое антитело" относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого способа, известного в данной области. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид человеческой тяжелой и/или легкой цепи.

В рамках изобретения, термин "гуманизированное антитело" относится к не относящемуся к человеку антителу, модифицированному для увеличения гомологии последовательности с последовательностью человеческого антитела, таким образом, чтобы антигенсвязывающие свойства антитела сохранялись, но его антигенность в организме человека уменьшалась.

В рамках изобретения, термин "химерное антитело" относится к антителу, где аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит из двух или более видов. Переменная область как легкой, так и тяжелой цепей, часто соответствует переменной области антитела, происходящего из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющего желательную специфичность, аффинность и емкость, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, происходящим из другого вида животного (например, человека), чтобы исключить вызов иммунного ответа у этого вида.

В рамках изобретения, термин "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, содержащему множество последовательностей переменной области иммуноглобулина, где последовательность первого переменной области иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность второго переменной области иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы не перекрываются или в основном не перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела, или молекулу тетраспецифического антитела.

В рамках изобретения, термин "биспецифическое антитело" относится к мультиспецифическому антителу, связывающему не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется последовательностью первого переменной области иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательностью второго переменной области иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи и последовательность переменной области легкой

кой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность варибельного домена тяжелой цепи и последовательность варибельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый эпитоп локализован на FOLR1, и второй эпитоп локализован на PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD47, CD73, апелине, DLL3, клаудине 18.2, TIP-1, CD3 и/или других опухолеассоциированных иммуносупрессорах или поверхностных антигенах.

Как применяют в настоящем документе, термин "FOLR1" относится к рецептору фолата 1 (FOLR1), также известному как рецептор фолата α (FR α) или связывающий фолат белок (FBP), представляющий собой заякоренный гликофосфатидилинозитолом (GPI) мембранный белок на клеточной поверхности, который имеет высокую аффинность для активной формы фолата, 5-метилтетрагидрофолата (5-MTHF), и транспортирует ее и ее производные в клетки (Salazar and Ratnam, *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:141-52). FOLR1 стал мишенью в онкологии, поскольку он имеет сверхэкспрессию на конкретных солидных опухолях, например, яичника, легкого и молочной железы (Toffoli et al., *Int J Cancer* 1997; 74:193-198 и Voogerd et al., *Oncotarget* 2016; 7:17442-17454), но его экспрессия находится на низких уровнях в ограниченном количестве нормальных тканей человека (Weitman, et al., *Cancer Res* 1992; 52:3396-3401). В соответствии с этим наблюдением, клинические исследования фазы 1, проведенные до настоящего времени с нацеленными на FOLR1 малыми и крупными молекулами, выявили хорошую переносимость лекарственного средства (Cheung et al., *Oncotarget* 2016; 7:52553-52574). Таким образом, FOLR1 является опухолеассоциированным/опухолеспецифическим антигеном, и моноклональные антитела (mAb) против FOLR1 могут являться потенциальными противораковыми терапевтическими средствами. Кроме того, FOLR1 можно использовать для специфического нацеливания терапевтических молекул на клетки злокачественных опухолей. Иллюстративная аминокислотная последовательность FOLR1 человека представлена посредством No. доступа в GenBank NP_057937 (SEQ ID NO:135).

В рамках изобретения, антитело, которое "специфически связывает FOLR1" относится к антителу, которое связывает FOLR1, предпочтительно, FOLR1 человека, с $KD 1 \times 10^{-7}$ М или менее, предпочтительно, 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно, 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Термин "KD" относится к константе диссоциации, которая получена из отношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражена как молярная концентрация (M). Значения KD для антитела можно определять с использованием принятых в данной области способов, в свете настоящего описания. Например, KD антитела можно определять с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы биосенсора, например, системы Biacore®, или с использованием технологии интерферометрии биослоя, например, системы Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- a) SEQ ID NO:38, 39, 40, 62, 63 и 64, соответственно;
- b) SEQ ID NO:17, 18, 19, 41, 42 и 43, соответственно;
- c) SEQ ID NO:20, 21, 22, 44, 45 и 46, соответственно;
- d) SEQ ID NO:23, 24, 25, 47, 48 и 49, соответственно;
- e) SEQ ID NO:26, 27, 28, 50, 51 и 52, соответственно;
- f) SEQ ID NO:29, 30, 31, 53, 54 и 55, соответственно;
- g) SEQ ID NO:32, 33, 34, 56, 57 и 58, соответственно; или
- h) SEQ ID NO:35, 36, 37, 59, 60 и 61, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает FOLR1, предпочтительно, FOLR1 человека.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- a) SEQ ID NO:86, 87, 88, 110, 111 и 112, соответственно;
- b) SEQ ID NO:65, 66, 67, 89, 90 и 91, соответственно;
- c) SEQ ID NO:68, 69, 70, 92, 93 и 94, соответственно;
- d) SEQ ID NO:71, 72, 73, 95, 96 и 97, соответственно;

- e) SEQ ID NO:74, 75, 76, 98, 99 и 100, соответственно;
- f) SEQ ID NO:77, 78, 79, 101, 102 и 103, соответственно;
- g) SEQ ID NO:80, 81, 82, 104, 105 и 106, соответственно; или
- h) SEQ ID NO:83, 84, 85, 107, 108 и 109, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает FOLR1, предпочтительно, FOLR1 человека.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную одной из SEQ ID NO:15, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную одной из SEQ ID NO:16, 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 14. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную SEQ ID NO:15, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную SEQ ID NO:16, 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 14, соответственно.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, содержащему:

- a) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:16;
- b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:2;
- c) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:4;
- d) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:6;
- e) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:8;
- f) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:10;
- g) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:12; или
- h) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:14.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO:38, 39, 40, 62, 63 и 64, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную SEQ ID NO:16. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:15; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:16.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и

NO:127;

(17) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:128, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:131;

(18) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:128, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:132;

(19) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:128, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:133;

(20) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:128, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:134;

(21) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:129, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:131;

(22) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:129, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:132;

(23) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:129, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:133;

(24) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:129, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:134;

(25) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:130, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:131;

(26) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:130, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:132;

(27) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:130, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:133; или

(28) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:130, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:134.

В другом общем аспекте, изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалисту в данной области понятно, что кодирующую последовательность белка можно изменять (например, заменять, делетировать, вставлять и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалисту в данной области понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалисту в данной области в свете настоящего описания, такой как плаزمид, космид, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный экспрессирующий вектор, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент для осуществления общепринятой функции экспрессирующего вектора, например, промотор, элемент для связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессирующих векторов, способных к доставке нуклеиновых кислот в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем описании для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Общеизвестные способы клонирования или искусственный синтез генов можно использовать для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Такие способы хорошо известны специалисту в данной области в свете настоящего описания.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любую клетку-хозяина, известную специалисту в данной области в свете настоящего описания, можно использовать для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фраг-

ментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TGI или BL21 (для экспрессии, например, scFv или Fab антитела), клетки CHO-DG44 или CHO-K1, или HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, рекомбинантным экспрессирующим вектором трансформируют клетки-хозяева общепринятыми способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрирует в геном клетки-хозяина, таким образом, чтобы рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессировалась.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры клеток (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми способами, известными в данной области, и как описано в настоящем описании.

Фармацевтические композиции.

В другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтическая композиция", в рамках изобретения обозначает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и содержащие их композиции также можно использовать в изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

В рамках изобретения, термин "носитель" относится к любому расширителю, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, содержащей липид везикуле, микросфере, липосомной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, наполнителя или разбавителя могут зависеть от способа введения для конкретного применения. В рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не создает помех для эффективности композиции по изобретению или для биологической активности композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, в свете настоящего описания, любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции антитела, можно использовать по изобретению.

Получение состава фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известно в данной области, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21st edition (2005), и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, регулирующие тоничность средства, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей можно использовать в составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водный состав, как правило, содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды или по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

В одном варианте осуществления, фармацевтическую композицию можно составлять в инъекционной форме, которую можно инъектировать, например, посредством устройства для инъекции (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, в стекловидное тело или интравитально.

В другом варианте осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например, лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или в которую терапевт или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед использованием. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки, и/или покрытые таблетки, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция может также находиться в форме, например, саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для разведения.

Лекарственные формы могут иметь немедленное высвобождение, в этом случае, они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут иметь отсроченное высвобождение, замедленное высвобождение или модифицированное высвобождение, в этом случае, они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления, фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, интрабуккально или подязычно.

pH в водном составе может составлять между pH 3 и pH 10. В одном варианте осуществления изо-

бретения, рН состава составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения, рН состава составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бигин, цитрат, гидрофосфат динатрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, виннокислотную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан, и их смеси. Буфер может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: хлорид бензэтония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенизин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил-4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилетанол, пропил-4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомерсал и их смеси. Консервант может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит изотоническое средство. Неограничивающие примеры варианта осуществления включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол пропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического средства включает сахар. Неограничивающие примеры сахаров могут представлять собой моно-, ди- или полисахариды, или водорастворимые глюконы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксietилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического средства является сахарный спирт, где термин "сахарный спирт" определяют как C(4-8)углеводород, имеющий по меньшей мере одну -ОН-группу. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозитол, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Изотоническое средство может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных изотонических средств, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Неограничивающие примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатирующих агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ, и/или один или несколько ингибиторов протеаз.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как НРС, НРС-SL, НРС-L и НРСМ), циклодекстрины, 2-метилтиэтанол, полиэтиленгликоль (такие как PEG 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), содержащие серу вещества, такие как моноглицерин) или тиогликолевая кислота. Стабилизатор может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующих вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно, поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, состоящим из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может, например, быть выбрано из группы, состоящей из анионных поверхностно-

активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерийных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующем варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеаз, например, таких как ЭДТА и/или соль бензамидина и соляной кислоты (HCl). Ингибитор протеазы может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеаз, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Способы применения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу нацеливания на FOLR1 на поверхности клетки злокачественной опухоли у субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего FOLR1, или фармацевтической композиции по изобретению. Связывание моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с FOLR1 может опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), или другие эффекты, приводящие к гибели подвергаемой нацеливанию клетки злокачественной опухоли. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, служить для привлечения конъюгированных лекарственных средств и/или может формировать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом, чтобы опосредовать гибель подвергаемой нацеливанию клетки злокачественной опухоли.

Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих FOLR1, можно характеризовать посредством способов, известных в данной области, и как описано в настоящем описании. Способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих FOLR1, включают, но без ограничения, анализы аффинности и специфичности, включая анализы Biacore, ELISA и OctetRed; анализы связывания для детекции связывания антител с FOLR1 на клетках злокачественных опухолей или клетках, рекомбинантным способом экспрессирующих FOLR1, посредством FACS. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих FOLR1, включают способы, описанные ниже.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего FOLR1, или фармацевтической композиции по изобретению. Злокачественная опухоль может, например, быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела против FOLR1 или его антигенсвязывающего фрагмента. В рамках изобретения, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, вызывающему желательный биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество можно определять эмпирически и общепринятым образом, применительно к поставленной цели.

В рамках изобретения, применительно к антителам против FOLR1 или их антигенсвязывающим фрагментам, терапевтически эффективное количество обозначает количество антитела против FOLR1 или его антигенсвязывающего фрагмента, модулирующее иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству лекарственного средства, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (ii) уменьшение длительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iii) предотвращение прогрессирования заболевания, нарушения или со-

стояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iv) вызов регрессии заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (v) предотвращение развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vi) предотвращение рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vii) уменьшение случаев госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (viii) уменьшение длительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или ассоциированным с ним симптомом; (x) ингибирование или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома у субъекта; и/или (xi) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(эффектов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозу можно менять, в соответствии с различными факторами, такими как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, общее состояние здоровья), является ли субъект человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства, и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, композиции, описанные в настоящем описании, составляют, чтобы они являлись пригодными для намеченного способа введения субъекту. Например, композиции, описанные в настоящем описании, можно составлять, чтобы они являлись пригодными для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В рамках изобретения, термины "лечить", "лечение" и "обработка" все предназначены для обозначения облегчения или обращения по меньшей мере одного поддающегося измерению физического параметра, относящегося к злокачественной опухоли, который, необязательно, является различным у субъекта, но может являться различным у субъекта. Термины "лечить", "лечение" и "обработка", могут также относиться к вызову регрессии, предотвращению прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к облегчению, предотвращению развития или начала, или уменьшению длительности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно, злокачественная опухоль. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к предотвращению заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к увеличению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к прекращению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, используемым для лечения злокачественной опухоли. Для терапии злокачественной опухоли, представленные композиции можно использовать в комбинации с другим лечением, включая, но без ограничения, химиотерапию, mAb против CD20, mAb против CD47, mAb против TIM-3, mAb против LAG-3, mAb против CD73, mAb против апелина, mAb против CTLA-4, mAb против PD-L1, mAb против PD-1, терапию PD-1/PD-L1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенное средство, радиотерапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), направленную терапию или другие противораковые лекарственные средства. Антитела против FOLR1 можно использовать для конструирования биспецифических антител с партнерами - mAb против PD-1, PD-L1, LAG3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD73, CD47, CD3, апелина, DLL-3, TIG-1, CLDN18.2 и/или других антигенов поверхности опухолей, для лечения злокачественных опухолей/опухолей, экспрессирующих как FOLR1, так и специфический опухолеассоциированный антиген.

В рамках изобретения, термин "в комбинации", в контексте введения двух или более терапевтических средств субъекту, относится к использованию более одного терапевтического средства. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, композицию, описанную в настоящем описании) можно вводить до (например, за 5, 15, 30, 45 мин, 1, 2, 4, 6, 12, 16, 24, 48, 72, 96 ч, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель до), одновременно или после (например, через 5, 15, 30, 45 мин, 1, 2, 4, 6, 12, 16, 24, 48, 72, 96 ч, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель после) введения второго терапевтического средства субъекту.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу определения уровня FOLR1 у субъекта. Способы включают (a) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение уровня FOLR1 у субъекта.

В рамках изобретения, "образец" относится к биологическому образцу, выделенному от субъекта, и может включать, но без ограничения, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биоптаты ткани (например, ткани злокачественной опухоли), лимфатическую жидкость, асцит-

ную жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну, слезу, мокроту, пот, мочу или любой другой продукт секреции, экскреции, или другие физиологические жидкости. "Образец крови" относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму.

В конкретных вариантах осуществления, уровень FOLR1 у субъекта можно определять с использованием анализов, выбранных, но без ограничения, из анализа Вестерн-блоттинга, анализа ELISA и/или иммуногистохимии (ИНС). Относительные уровни белка можно определять с использованием анализа Вестерн-блоттинга и иммуногистохимии (ИНС), и абсолютные уровни белка можно определять с использованием анализа ELISA. При определении относительных уровней FOLR1, уровни FOLR1 можно определять в сравнении между по меньшей мере двумя образцами, например, между образцами от одного и того же субъекта в различных временных точках, между образцами из различных тканей одного и того же субъекта и/или между образцами от различных субъектов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней FOLR1, например, посредством анализа ELISA, абсолютный уровень FOLR1 в образце можно определять посредством получения стандарта для анализа ELISA до тестирования образца. Специалисту в данной области понятно, какие аналитические способы использовать для определения уровня FOLR1 в образце от субъекта с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

Использование способов определения уровня FOLR1 в образце от субъекта может приводить к диагностике аномальных (увеличенных, уменьшенных или недостаточных) уровней FOLR1 при заболевании и к принятию соответствующих терапевтических решений. Такое заболевание может включать, например, злокачественную опухоль. Кроме того, посредством мониторинга уровней FOLR1 у субъекта, риск развития заболевания, как указано выше, можно определять на основании знаний об уровне FOLR1 при конкретном заболевании и/или в ходе прогрессирования конкретного заболевания.

Варианты осуществления

Это изобретение относится к следующим неограничивающим вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- a) SEQ ID NO:38, 39, 40, 62, 63 и 64, соответственно;
- b) SEQ ID NO:17, 18, 19, 41, 42 и 43, соответственно;
- c) SEQ ID NO:20, 21, 22, 44, 45 и 46, соответственно;
- d) SEQ ID NO:23, 24, 25, 47, 48 и 49, соответственно;
- e) SEQ ID NO:26, 27, 28, 50, 51 и 52, соответственно;
- f) SEQ ID NO:29, 30, 31, 53, 54 и 55, соответственно;
- g) SEQ ID NO:32, 33, 34, 56, 57 и 58, соответственно; или
- h) SEQ ID NO:35, 36, 37, 59, 60 и 61, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает FOLR1, предпочтительно, FOLR1 человека.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- a) SEQ ID NO:86, 87, 88, 110, 111 и 112, соответственно;
- b) SEQ ID NO:65, 66, 67, 89, 90 и 91, соответственно;
- c) SEQ ID NO:68, 69, 70, 92, 93 и 94, соответственно;
- d) SEQ ID NO:71, 72, 73, 95, 96 и 97, соответственно;
- e) SEQ ID NO:74, 75, 76, 98, 99 и 100, соответственно;
- f) SEQ ID NO:77, 78, 79, 101, 102 и 103, соответственно;
- g) SEQ ID NO:80, 81, 82, 104, 105 и 106, соответственно; или
- h) SEQ ID NO:83, 84, 85, 107, 108 и 109, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает FOLR1, предпочтительно, FOLR1 человека.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 1 или 2, содержащие варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO:15, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13, или варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO:16, 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 14.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из вариантов осуществления 1-3, содержащие:

Вариант осуществления 10 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту из варианта осуществления 9.

Вариант осуществления 11 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор из варианта осуществления 10.

Вариант осуществления 12 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 13 представляет собой способ лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 12.

Вариант осуществления 14 представляет собой способ нацеливания на FOLR1 на поверхности клетки злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 12.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из любого из вариантов осуществления 1-8, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-8, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ определения уровня FOLR1 у субъекта, включающий:

- получение образца от субъекта;
- приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом из любого из вариантов осуществления 1-8; и
- определение уровня FOLR1 у субъекта.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ из варианта осуществления 17, где образец представляет собой образец ткани.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ из варианта осуществления 18, где образец ткани представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ из варианта осуществления 17, где образец представляет собой образец крови.

Примеры

Пример 1: идентификация моноклональных антител против FOLR1.

Мышей иммунизировали слитым белком, содержащим FOLR1 человека (от Arg25 до Met233), слитый на С-конце с Fc человека (huFOLR1-huFc). Титр в плазме определяли посредством ELISA. После эвтаназии, лимфатические узлы и селезенку собирали для получения гибридом. Гибридомы выращивали в 96-луночных культуральных планшетах, и супернатанты из индивидуальных лунок подвергали скринингу посредством ELISA и FACS с использованием клеток CHO, стабильно экспрессирующих полно-размерный FOLR1 человека. Наилучшие положительные клоны выделяли и секвенировали.

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи для моноклональных антител против FOLR1 представлены в таблицах 1 и 2, и области CDR для моноклональных антител против FOLR1 представлены в таблицах 3-6.

Таблица 1

Последовательности переменных областей тяжелой цепи для mAb против FOLR1

Клоны mAb	VH	ID
F4	EVQLVESGGGLV KPGGSLKLS CAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEW VAFISSGSNTIYYADIVKGRFAISRDN AKNTLFLQMASLRSEDTALYYC ARLAEWDVAYWGQGLTVTSA	1
F5	EVQLVESGGELV KPGGSLKLS CAVSGFTFSNYGMSWVRQTPDKRLEW VATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDN DKNTLYLQMSLKS EDTAMYY CSTQGSSGYVGYWGQGLTVSS	3
F7	EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQSNGKSLEWIGVIDPNYGTNTYNQK FVKGATLTV DQSSITAYMQLNSLTAEDSAVYFC AIKGYGNPAAYWGQGLTVTSA	5
F8	EVMLVESGGGLV KPGGSLKLS CVASGFTLSTYAMSWVRQTPEKRLEW VATISGGGDTYHLDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSLRS EDTALYY	7

	CARQSHYGSSYYFDNWGQGTTLVSS	
F10	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVRQRPKGLEW IGRIYPGDGYTHYNGMFKGKATLTADKSSSTGYMQLSSLTSEDSAVYF CTRHGDFPYWYFDVWGTGTTVTVSS	9
F17	DVQLVESGGGLVQPGRKLSAASGFTFSDFGMHWRQAPERGLEW VAYMSYTPGTFHYADTVKDRFFISRDNKNTLFLQMTSLRSDDTAMY YCARVHVGTVDYWGQTSVTVSS	11
F19	EVKLDDEGGGLVQPGRPMKLSVAVSGFTFSDYWMNWRQSPDKGLE WVAQIGNKFHNYETYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLSRVEDTG IYYCTKLGRGYYVMDYWGQTSVTVSS	13
F20	QVQLQQSGAELVKPGASVQLSCKASGYTFASYYLYWVKQRPQGGL WIGEINPRSGGTNFKSKATVTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CSRSGLRGRFYTMDYWGQTSVTVSS	15

VH: переменная область тяжелой цепи; ID: SEQ ID NO.

Таблица 2

Последовательности переменных областей легкой цепи для mAb против FOLR1

Клоны mAb	VL	ID
F4	DIVLTQSPATLSVTPGDRISLSCRASQNNNNLHWYQQKSHESPRLLIKF ASQSIGIPSRFSGSGSDFTLNINGVETEDFGMYFCQIYSWPQLTFG AGTRLELK	2
F5	DIQMTQSPSSLSAFLGGKVITTCASQDITNFIGWYQHKPGKGRLLISY TSILESGIPSRFSGSGSRDYSFISNLEPEDIATYYCLQYYNLWTFGGGT KLEIK	4
F7	DIQMTQSPSSLSASLGGKVITTCASQDINKYLAWYQHEPGKGRLLIR YTSILESGIPSRFSGSGSRDYSFISNLEPEDIATYYCLQYYNLWTFGG GTKLEIK	6
F8	DIQMTQSPASLSASVGEIVTIICRVSENIDSYLAWYQQKQKSPQLLVY AATNLADGVPSRFSGSGSGSQYSLKINSLQSEDVARYYCQHYTTPPTF GGGTKLDIK	8
F10	DIQMTQSPASLSASVGESVTITCRASENIDSYLAWYQQKQKSPQLLVY AATNLAVGVPSRFSGSGSGTQYTLKINSLQSEDVARYYCQHHYSTPPTF GGGTKLEIK	10
F17	DVVLTQSPATLSVTPGDSVLSLSCRASQNNNNLHWYQQKSHESPRLLIK YASQSIGIPSRFSGSGSDFTLSINNVETEDFGIYFCQSNPALTTFG TGTKVELK	12
F19	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTLNCRASQDITNHLNWFQKPDGTFQLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDFATYFCQQDSQHPWTF GGGTKLEIK	14
F20	NIVMTQSPKMSVSVGERVTLSCAGENVGSYVSWYQQKPEQSPELLI YGASNRYTGVDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADY YCGQTYRFLT FGAGTKLELK	16

VL: переменная область легкой цепи; ID: SEQ ID NO.

Таблица 3

Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против FOLR1

Клоны mAb	HC CDR1	ID	HC CDR2	ID	HC CDR3	ID
F4	GFTFSDYG	17	ISSGSNTI	18	ARLAEWDVAY	19
F5	GFTFSNYG	20	ISSGGSYT	21	STQGSSGYVGY	22
F7	GYSFTDYN	23	IDPNYGT	24	AIKGYGNPAAAY	25
F8	GFTLSTYA	26	ISGGGDT	27	ARQSHYGSSYYFDN	28
F10	GYAFSSW	29	IYPGDGYT	30	TRHGDFPYWYFDV	31
F17	GFTFSDFG	32	MSYTPGTF	33	ARVHVGTVDY	34
F19	GFTFSDYW	35	IGNKFHNYET	36	TKLGRGYYVMDY	37
F20	GYTFASYY	38	INPRSGGT	39	SRSGLRGRFYTMDY	40

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; ID: SEQ ID NO.

HC CDR для mAb против FOLR1 определяли с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4
Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против FOLR1

Клоны mAb	LC CDR1	ID	LC CDR2	ID	LC CDR3	ID
F4	QNINNN	41	FAS	42	QQIYSWPQLT	43
F5	QDITNF	44	YTS	45	LQYYNLWT	46
F7	QDINKY	47	YTS	48	LQYYNLWT	49
F8	ENIDSY	50	AAT	51	QHYYTTPPT	52
F10	ENIDSY	53	AAT	54	QHHYSTPPT	55
F17	QNINNN	56	YAS	57	QQSNSWPALT	58
F19	QDITNH	59	YTS	60	QQDSQHPWT	61
F20	ENVGSY	62	GAS	63	GQTYRFLT	64

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; ID: SEQ ID NO LC CDR для mAb против FOLR1 определяли с использованием способа IMG2 (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 5
Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против FOLR1

Клоны mAb	HC CDR1	ID	HC CDR2	ID	HC CDR3	ID
F4	GFTFSDYGMH	65	FISSGSNTIYYADIVKG	66	ARLAEWDVAY	67
F5	GFTFSNYGMS	68	TISSGGSYTYYPDSVKG	69	STQGSSGYVGY	70
F7	GYSFTDYNMN	71	VIDPNYGTNTYNQKFVG	72	AIKGYGNPAA	73
F8	GFTLSTYAMS	74	TISGGGGDTYHLDTVKG	75	ARQSHYGSSYYFDN	76
F10	GYAFSSWMN	77	RIYPGDGYTHYNGMFKG	78	TRHGDFPYWYFDV	79
F17	GFTFSDFGMH	80	YMSYTPGTFHYADTVKD	81	ARVHVGTVDY	82
F19	GFTFSDYWMN	83	QIGNKFHNYETYYSDSVKG	84	TKLGRGYYVMDY	85
F20	GYTFASYLY	86	EINPRSGGTNFNEKFKS	87	SRSGLRGRFYTMDY	88

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; ID: SEQ ID NO.

HC CDR для mAb против FOLR1 определяли с использованием способа Kabat (Elvin A. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Таблица 6
Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против FOLR1

Клоны mAb	LC CDR1	ID	LC CDR2	ID	LC CDR3	ID
F4	RASQNINNLH	89	FASQSI	90	QQIYSWPQLT	91
F5	KASQDITNFIG	92	YTSILES	93	LQYYNLWT	94
F7	KASQDINKYLA	95	YTSILES	96	LQYYNLWT	97
F8	RVSENIDSYLA	98	AATNLAD	99	QHYYTTPPT	100
F10	RASENIDSYLA	101	AATNLAV	102	QHHYSTPPT	103
F17	RASQNINNLH	104	YASQSI	105	QQSNSWPALT	106
F19	RASQDITNHLN	107	YTSRLHS	108	QQDSQHPWT	109
F20	KAGENVGSYVS	110	GASNRYT	111	GQTYRFLT	112

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; ID: SEQ ID NO.

LC CDR для mAb против FOLR1 определяли с использованием способа Kabat (Elvin A. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Пример 2: продукция и очистка mAb из супернатантов гибридомы.

Мышиные mAb против FOLR1 очищали из сред/супернатантов гибридомы из положительных клонов с использованием аффинной хроматографии с белком А.

Пример 3: анализ FACS связывания очищенных мышиных антител против FOLR1.

Клетки CHO, стабильно трансфицированные полноразмерным FOLR1 человека, переносили в 96-луночный планшет при 200000 клеток/луночку, промывали один раз с использованием буфера для FACS (1×PBS, pH6,8+2% FBS) и инкубировали с очищенными мышиными mAb против FOLR1 из супернатантов гибридомы в различных концентрациях в течение 15 мин на льду. Затем клетки центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 мин и промывали с использованием буфера для FACS три раза. Клетки инкубировали с конъюгированными с PE поликлональными антителами козы против IgG мыши и инкубировали на льду в течение следующих 15 мин. Затем клетки промывали с использованием буфера для FACS три раза, и затем ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем 0,1 мкг/мл PI (йодида пропидия) для отбора по живым/мертвым клеткам. Затем клетки обрабатывали посредством устройства FACS Caliber, и данные анализировали посредством программного обеспечения Flowjo. Результаты связывания очищенных мышиных mAb против FOLR1 с клетками CHO, стабильно экспрессирующими FOLR1 человека, показаны на фиг. 1A-1B. MFI, средняя интенсивность флуоресценции.

Пример 4: продукция и очистка химерных mAb против FOLR1 из культуральных сред от трансфицированных клеток 293E.

Для получения рекомбинантных химерных mAb против FOLR1, экспрессирующими векторами, со-

держащими мышинные вариабельные области (VH и VL), слитые с константными областями тяжелой цепи IgG1 и легкой цепи каппа человека, соответственно, временно трансфицировали клетки 293E. Рекомбинантные антитела, продуцированные в суспензии трансфицированных клеток, очищали с использованием аффинной хроматографии с белком А.

Пример 5: анализ ELISA связывания очищенных химерных mAb против FOLR1.

Очищенные химерные mAb тестировали в анализе ELISA по их способности связываться с иммобилизованным FOLR1 человека. Рекомбинантным внеклеточным доменом FOLR1 человека (Novoprotein, кат.#: C784) в карбонатном буфере для покрытия покрывали 96-луночный планшет при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшет блокировали посредством 5% BSA в TBST в течение 1 ч при комнатной температуре. В каждой лунке индивидуального планшета, mAb в различных концентрациях инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали, и связывание с FOLR1 детектировали посредством антитела против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (hIgG-HRP) (ThermoFisher Scientific, кат.#: H10007), с инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем, после промывки, ELISA проявляли с использованием раствора для одностадийной детекции (ThermoFisher Scientific, кат.#: 34028) и измеряли как оптическую плотность при 450 нм. Результаты показаны на фиг. 2А-2С.

Пример 6: анализ FACS связывания очищенных химерных mAb против FOLR1.

Для оценки связывания химерных mAb против FOLR1 с клетками, как известно, экспрессирующими FOLR1, клетки SK-OV-3 (ATCC® HTB-77™) рассеивали при 80000 клеток на лунку в 96-луночный не связывающий планшет с U-образным дном (Greiner Bio-One, кат.#: 650901). В некоторых экспериментах, использовали 90000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в 50 мкл буфера для FACS (HBSS с 0,1% BSA и 0,05% азидом натрия), содержащего mAb в различных концентрациях, на льду в течение 15 мин. После промывки, клетки инкубировали в 50 мкл буфера для FACS, содержащего 3,5 мкг/мл F(ab')₂ козы против Fc IgG человека, конъюгированного с Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, кат.#: H10120), на льду в течение 15 мин в темноте и снова промывали. Клетки анализировали с использованием проточного цитометра Attune NxT. Результаты связывания химерных mAb против FOLR1 с клетками SK-OV-3 показаны на фиг. 3А-3D. MFI, средняя интенсивность флуоресценции.

Пример 7: анализ Biacore с использованием химерных mAb против FOLR1.

Взаимодействие химерных mAb против FOLR1 и FOLR1 измеряли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Biacore 8k, GE Healthcare). Кратко, mAb против FOLR1 иммобилизовали на сенсорном чипе с белком А (GE Healthcare, кат.#: 29-1275-56) в буфере HBS-P (0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,05% об./об. поверхностно-активное вещество P20) со скоростью потока при инъекции 10 мкл/мл. Рекомбинантный FOLR1 (Novoprotein, кат.#: C784) при вариантах концентрации загружали при скорости потока 30 мкл/мин в буфере HBS-P. После загрузки антигена, поверхность регенерировали с использованием 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5). Сенсограммы приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для оценки Biacore 8k (GE Healthcare). Результаты для аффинности связывания mAb против FOLR1 показаны в таблице 7.

Таблица 7
Значения KD для mAb против FOLR1 из анализа Biacore

Химерное mAb	KD (нМ)
F4	0,547
F5	0,352
F7	2,33
F8	0,721
F10	0,704
F17	0,265
F19	11,8
F20	1,00

Пример 8: гуманизация mAb против FOLR1.

Мышинные mAb против FOLR1 гуманизировали для уменьшения потенциала иммуногенности при использовании у пациентов-людей. Последовательности вариабельных областей тяжелых и легких цепей (VH и VL) сравнивали с последовательностями человеческого антитела в базе данных Protein Data Bank (PDB) и строили модели гомологии. CDR как в тяжелых, так и в легких цепях мышинных mAb прививали в человеческие каркасы, имеющие наивысшую возможность поддержания надлежащей структуры, вероятно, необходимой для связывания антигена. Обратные мутации от человеческих остатков до мышинного остатка или другие мутации разрабатывали при необходимости. Последовательности гуманизированных областей VH и VL показаны в табл. 8. Гуманизированные области VH и VL сливали с константными областями тяжелой цепи IgG1 и легкой цепи каппа человека, соответственно. Конструкции, соответствующие последовательностям mAb, использовали для временной трансфекции в клетках CHO, и очищенные mAb анализировали по их способности связываться с иммобилизованным внеклеточным доменом FOLR1 в ELISA. Контроль изотипа тестировали в анализах для подтверждения отсутствия неспецифиче-

ского связывания выше фона анализа. Результаты для гуманизованных клонов F5 показаны на фиг. 4А-4С; результаты для гуманизованных клонов F10 показаны на фиг. 5А-5В; результаты для гуманизованных клонов F17 показаны на фиг. 6А-6В; результаты для гуманизованных клонов F20 показаны на фиг. 7А-7Д.

Гуманизованные mAb против FOLR1 тестировали по их способности связываться с клетками SK-OV-3 с использованием анализа FACS. Данные показаны на фиг. 8А-8J.

Антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) mAb измеряли с использованием набора ADCC Reporter Bioassay Core Kit (Promega, кат. # G7010), в соответствии с протоколом, представленным производителем. Кратко, приблизительно 12500 клеток SK-OV-3 на лунку смешивали с различными концентрациями тестируемых антител в буфере для анализа ADCC в 96-луночном микропланшете с половинным объемом лунок (Corning-Costar, кат. #3696). Затем, приблизительно 37500 на лунку клеток ADCC Bioassay Effector cells добавляли до конечного объема 37,5 мкл и перемешивали. Планшет инкубировали при 37°C в течение 6 ч без встряхивания. Для измерения активности люциферазы, 12,5 мкл смеси для анализа удаляли из каждой лунки и добавляли 25 мкл реагента для анализа люциферазы Bio-Glo. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин с встряхиванием. 30 мкл смеси на лунку переносили в белый планшет (BRAND, кат. #781621) для измерения люминесценции в многорежимном считывателе для планшетов EnVision 2102. Результаты для активности ADCC 4 гуманизованных mAb показаны на фиг. 9. RLU, относительные световые единицы.

Таблица 8

Последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи гуманизованных mAb против FOLR1

VH/VL	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ID:
F5-H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWV ATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCST QGSSGYVGYWGQGLTLTVSS	113
F5-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWV ATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCST QGSSGYVGYWGQGLTLTVSS	114
F5-H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWV ATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCSTQ GSSGYVGYWGQGLTLTVSS	115
F5-H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWV ATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCST QGSSGYVGYWGQGLTLTVSS	116
F5-L1	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDITNFIGWYQHKGPKAPKLLISYT SILESGVPSRFSGSGSGRDYTLTISLQPEDFATYYCLQYYNLWTFGGGK VEIK	117
F5-L2	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDITNFIGWYQHKGPKAPKLLISYT SILESGVPSRFSGSGSGtDYTLTISLQPEDFATYYCLQYYNLWTFGGGK VEIK	118
F10-H1	EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYAFSSSWMNWVRQAPGQGLEWI GRIYPGDGYTHYNGMFKGRASLTADKSTSTGYMELSSLRSEDVAVFFCTR HGDFPYWYFDVWGRGTLTVSP	119
F10-H2	EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYAFSSSWMNWVRQAPGQGLEWI GRIYPGDGYTHYNGMFKGRASLTADKSTSTGYMELSSLRSEDVAVFFCTR HGDFPYWYFDVWGRGTLTVSS	120
F10-L1	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASENIDSYLAWYQQKPGRAPKLLVYA ATNLAVGVPSPRFSGSGSGTEYTLTISLQSDDFATYYCQHHYSTPPTFGQG TKLEIK	121
F10-L2	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASENIDSYLAWYQQKPGRAPKLLVYA ATNLAVGVPSPRFSGSGSGTEYTLTISLQpDDFATYYCQHHYSTPPTFGQG TKLEIK	122
F10-L3	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASENIDSYLAWYQQKPGRAPKLLVYA ATNLAVGVPSPRFSGSGSGTEYTLTISLQSeDFATYYCQHHYSTPPTFGQG TKLEIK	123
F17-H1	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSDFGMHWIRQAPGKGLEWVA YMSYTPGTFHYADTVKDRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR VHVGTVDYWGQGLTLTVSS	124
F17-H2	EVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSDFGMHWIRQAPGKGLEWV AYMSYTPGTFHYADTVKDRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCA RVHVGTVDYWGQGLTLTVSS	125
F17-L1	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQINNNLHWFQKPGQAPRLLIKYA SQSISGIPARFSGSGSDFTLTISLSEtEDFAVYFCQQSNSWPALTFGQGTK VEIK	126
F17-L2	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQINNNLHWFQKPGQAPRLLIKYA SQSISGIPARFSGSGSDFTLTISLSEtEDFAVYFCQQSNSWPALTFGQGTK	127

	VEIK	
F20-H1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFASYLYWVRQAPGQGLEWIG GEINPRSGGTNFNEKFKSRATVTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCSR S GRLRGFYTM DYWGQGLTVTVSS	128
F20-H2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFASYLYWVRQAPGQGLEWIG GEINPRSGGTNFNEKFKSRATVTVDaSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCSR S GRLRGFYTM DYWGQGLTVTVSS	129
F20-H3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFASYLYWVRQAPGQGLEWIG GEINPRSGGTNFNEKFKSKATVTVDKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSR S SGRLRGFYTM DYWGQGLTVTVSS	130
F20-L1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKAGENVGSYVSWYQQKPGQPPKLLIY GASNRYTGV PDRFSGSGSATDFLTISLQAEDVAVYYCGQTYRFLTFGQ G GTKVEIK	131
F20-L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKAGENVGSYVSWYQQKPGQsPKLLIYG ASNRYTGV PDRFSGSGSATDFLTISLQAEDVAVYYCGQTYRFLTFGQGT K KVEIK	132
F20-L3	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAGENVGSYVSWYQQKPGKAPKLLIY GASNRYTGV PARFSGSGSATEFTLTISLQPDDFATY YCGQTYRFLTFGQ G TKVEVK	133
F20-L4	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAGENVGSYVSWYQQKPGKAPKLLIY GASNRYTGV PARFSGSGSATEFTLTISLQPeDFATY YCGQTYRFLTFGQGT K KVEVK	134

Специалисту в данной области понятно, что изменения можно вносить в варианты осуществления, описанные выше, без отклонения от их широкого изобретательского замысла. Понятно, таким образом, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для включения модификаций в пределах содержания и объема настоящего изобретения, как определено посредством настоящего описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, с полипептидными последовательностями SEQ ID NO:29, 30, 31, 53, 54 и 55, соответственно, или SEQ ID NO:77, 78, 79, 101, 102 и 103, соответственно, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с FOLR1, предпочтительно, сFOLR1 человека.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее

вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO:120, 9 или 119; или

вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO:122, 10, 121 или 123.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащее:

- вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:120; и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:122;
- вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:9; и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:10;
- вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:119; и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:121;
- вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:119; и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:122;
- вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:119; и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:123;
- вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:120; и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:121;
- вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:120; и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:123.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным, человеческим или гуманизированным.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является способным связываться с FOLR1 и индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли.

6. Биспецифическое антитело, отличающееся тем, что содержит моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.

7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.

8. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.7.

9. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.8.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5 или биспецифическое антитело по п.6 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Способ нацеливания на FOLR1 на поверхность злокачественной клетки или для лечения злокачественной опухоли у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.10.

12. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, включающий:

культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту по п.7, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

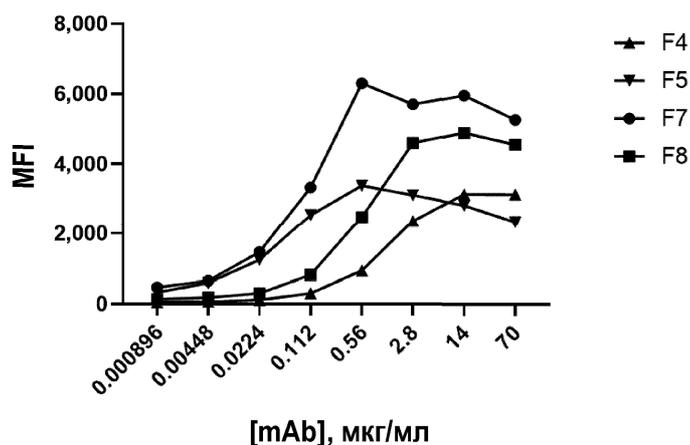
13. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, включающий объединение указанного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

14. Способ определения уровня FOLR1 у пациента, где способ включает:

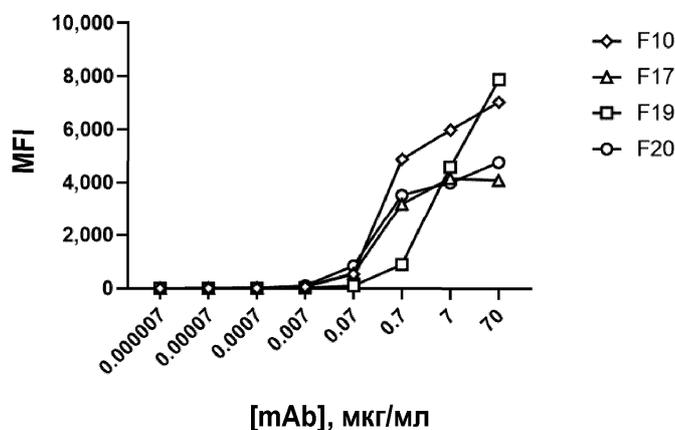
а) получение образца у пациента;

б) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-5; и

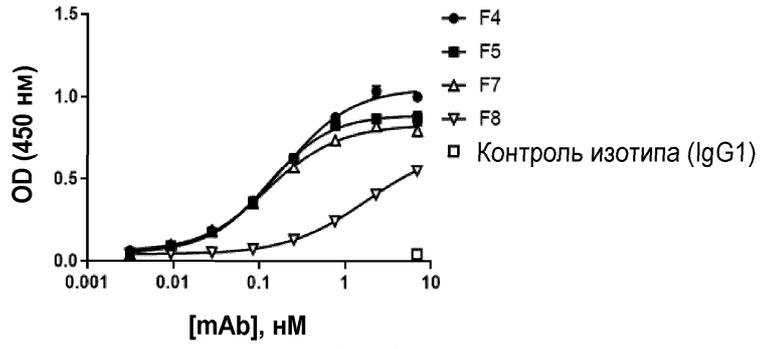
с) определение уровня FOLR1 у пациента.



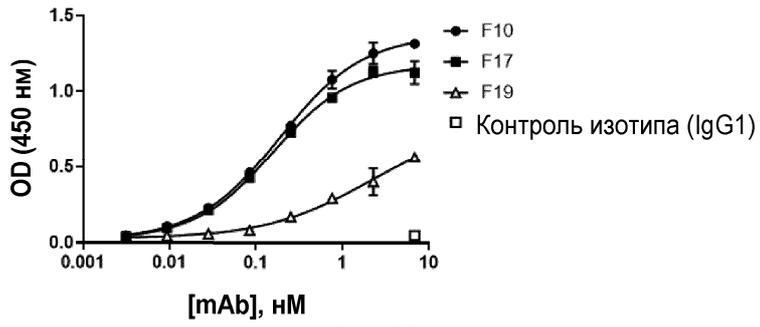
Фиг. 1А



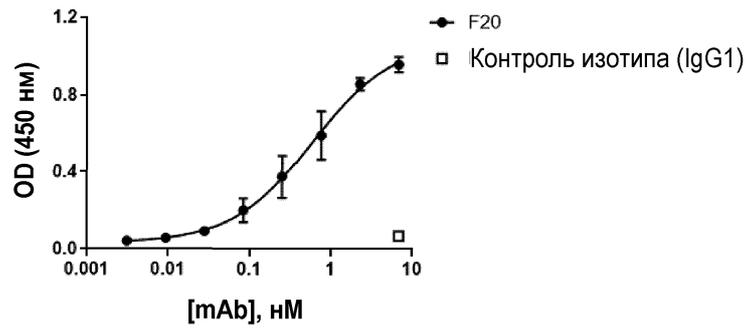
Фиг. 1В



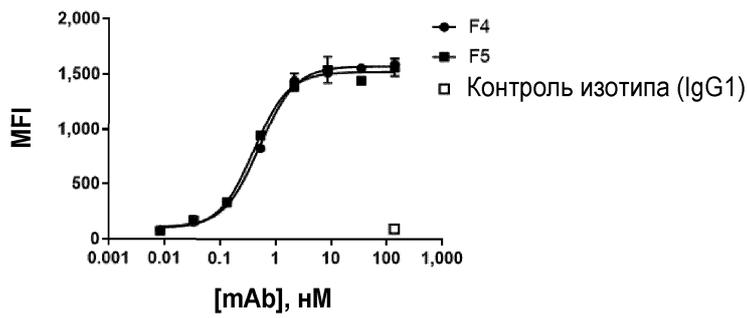
Фиг. 2А



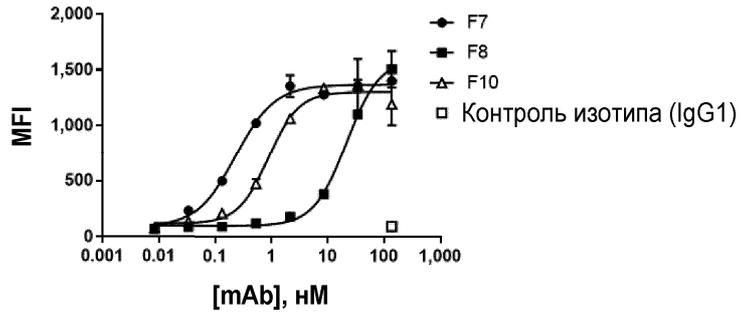
Фиг. 2В



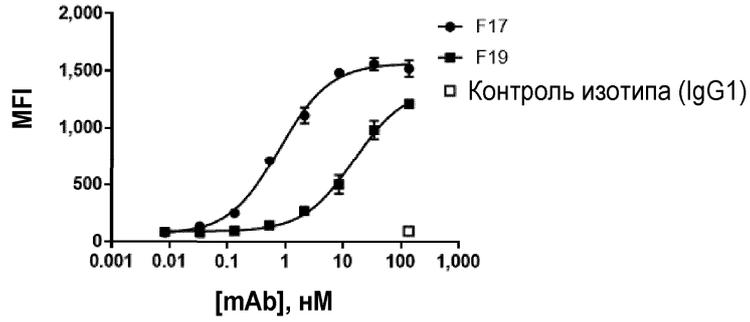
Фиг. 2С



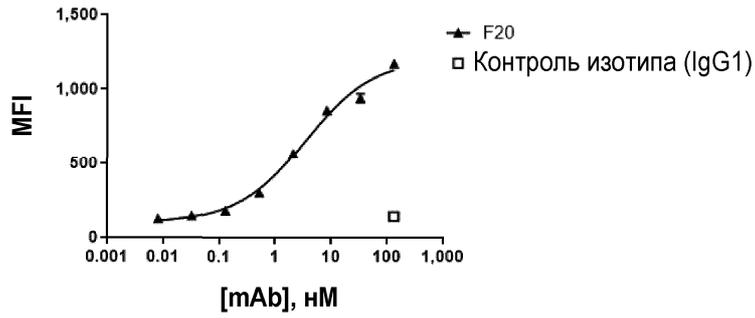
Фиг. 3А



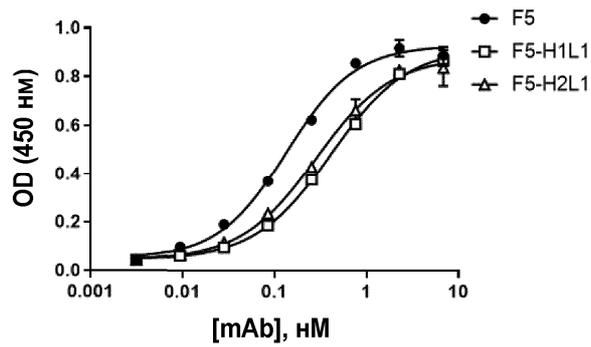
Фиг. 3В



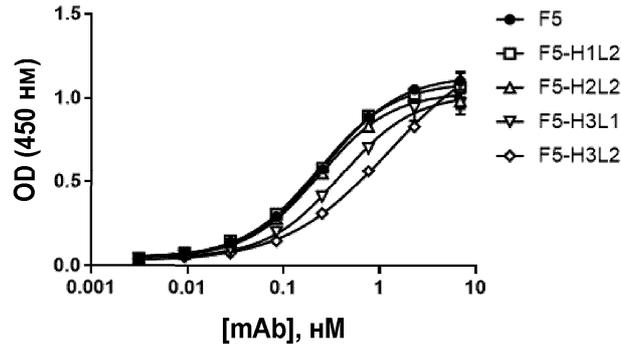
Фиг. 3С



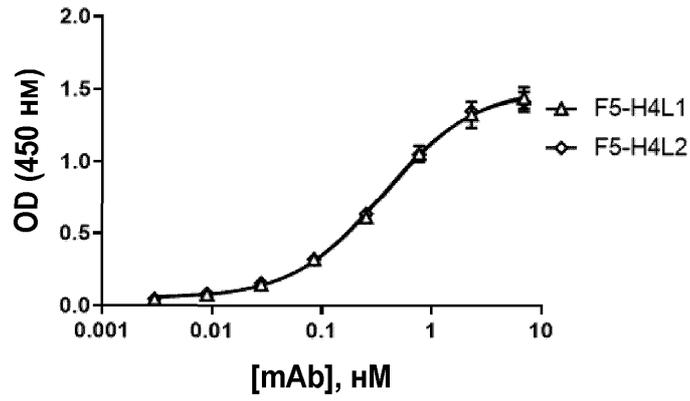
Фиг. 3D



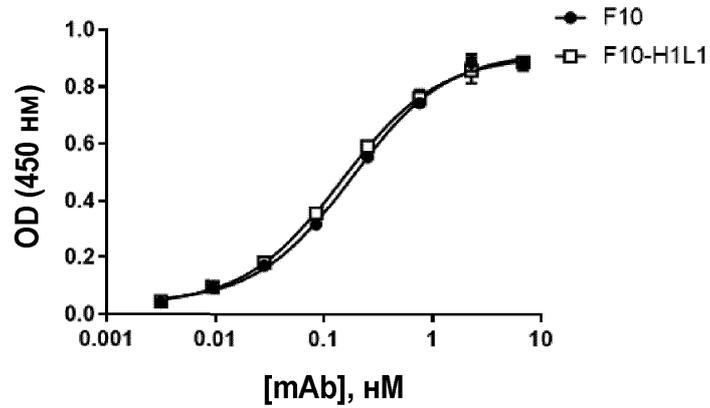
Фиг. 4А



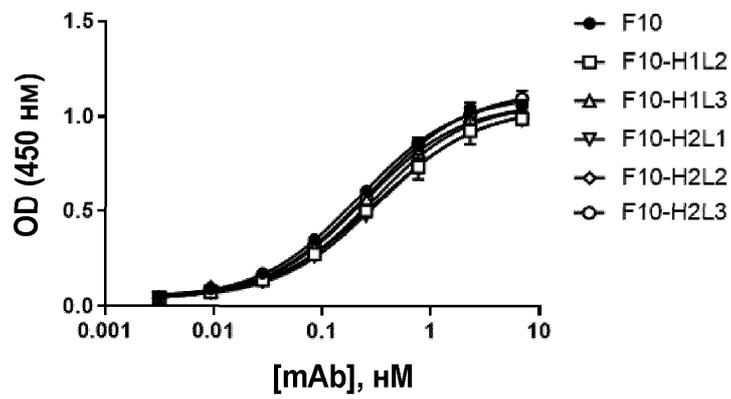
Фиг. 4В



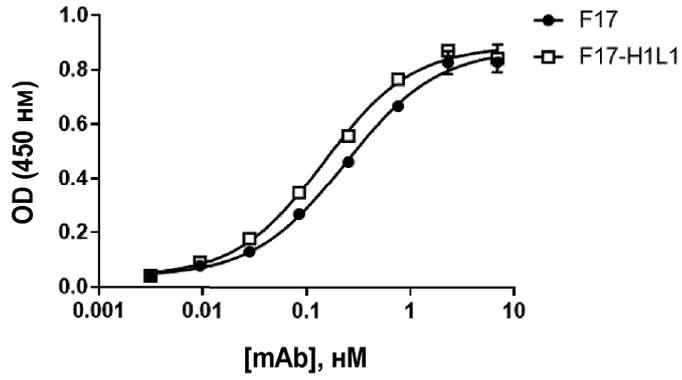
Фиг. 4С



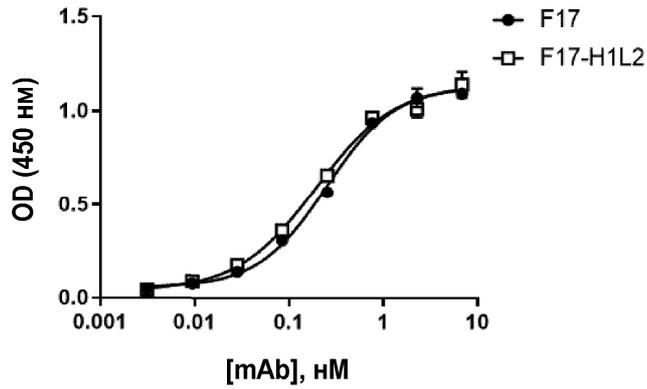
Фиг. 5А



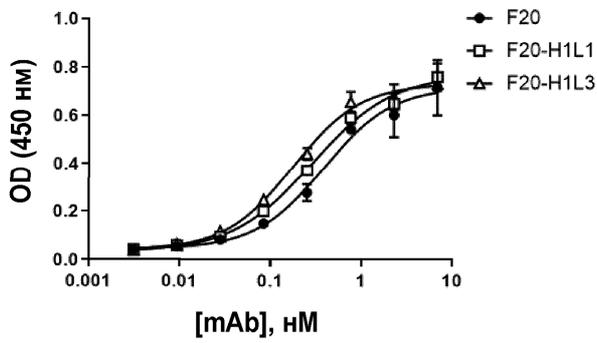
Фиг. 5В



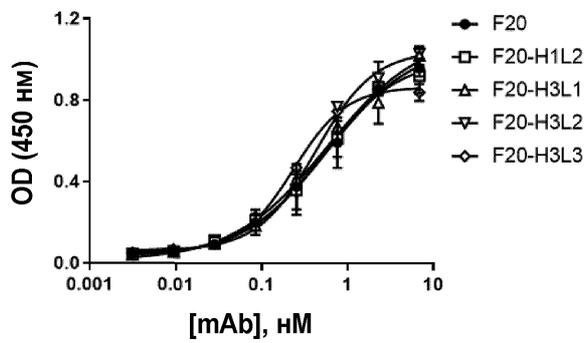
Фиг. 6А



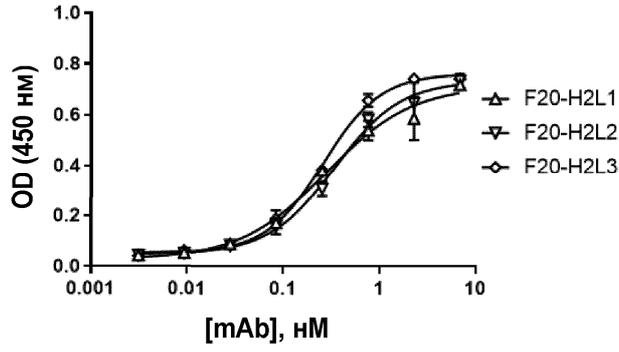
Фиг. 6В



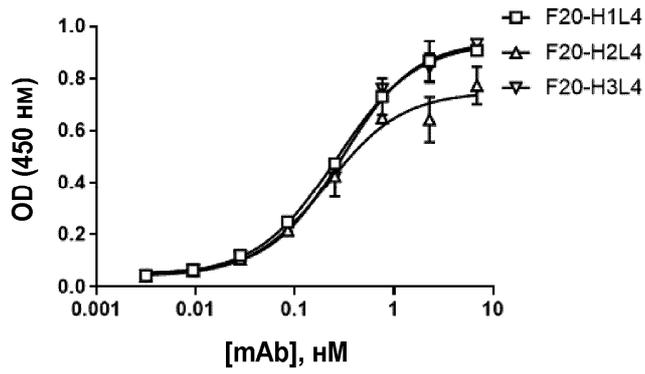
Фиг. 7А



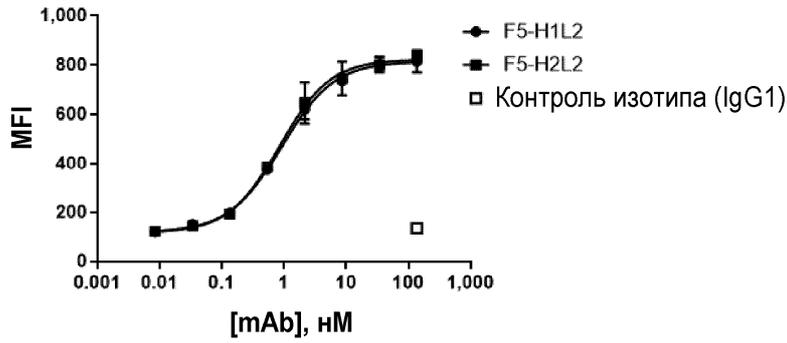
Фиг. 7В



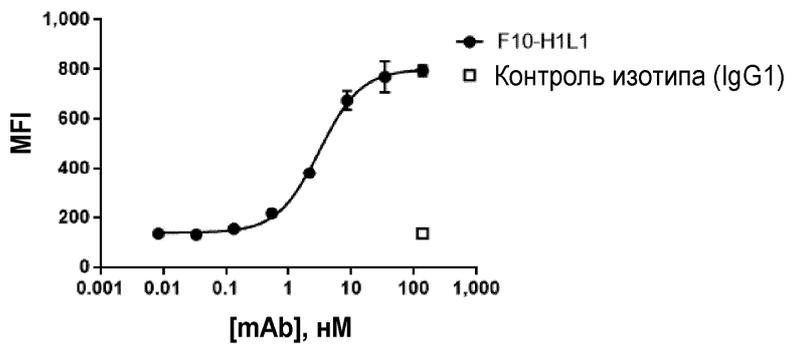
Фиг. 7С



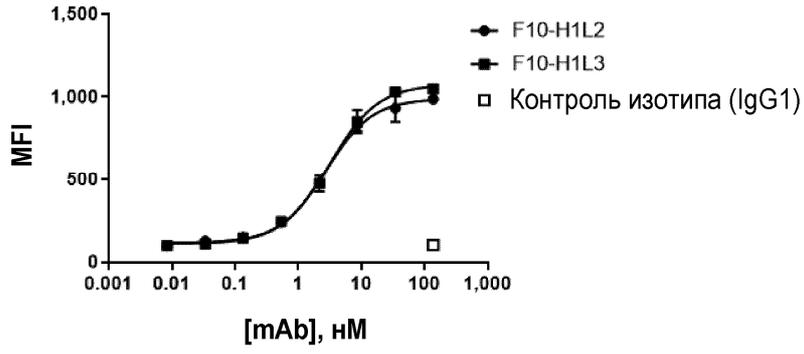
Фиг. 7D



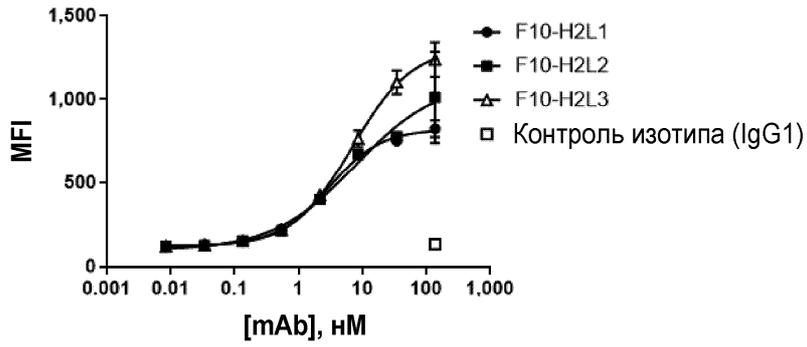
Фиг. 8А



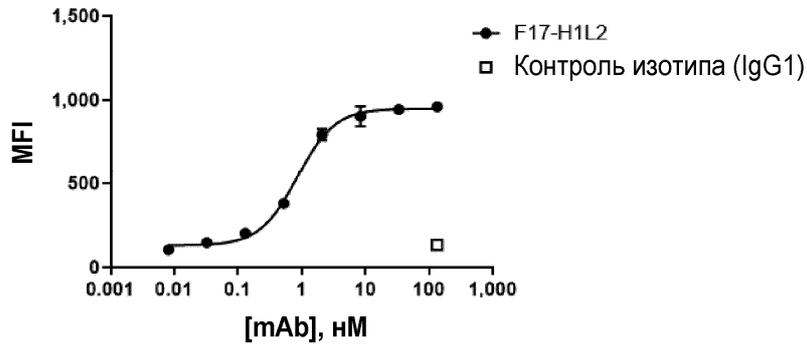
Фиг. 8В



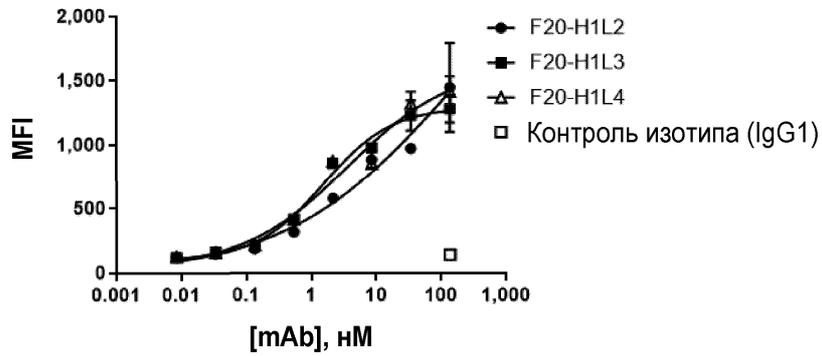
Фиг. 8С



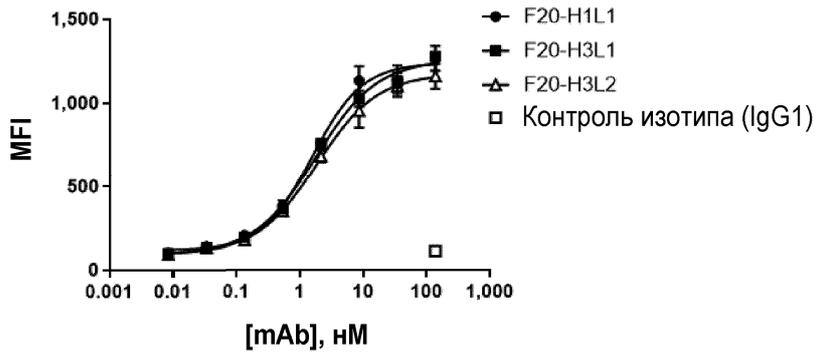
Фиг. 8D



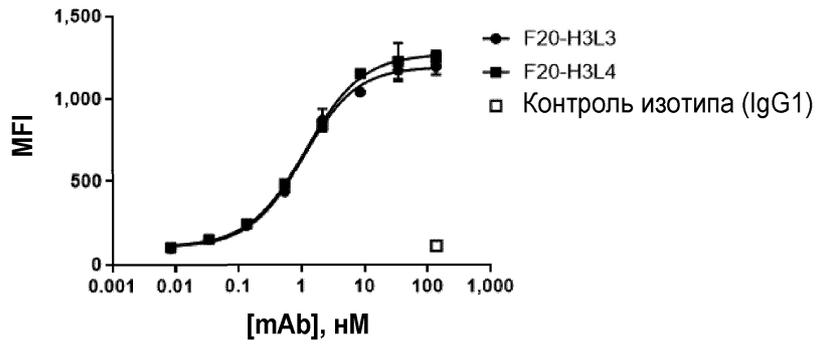
Фиг. 8E



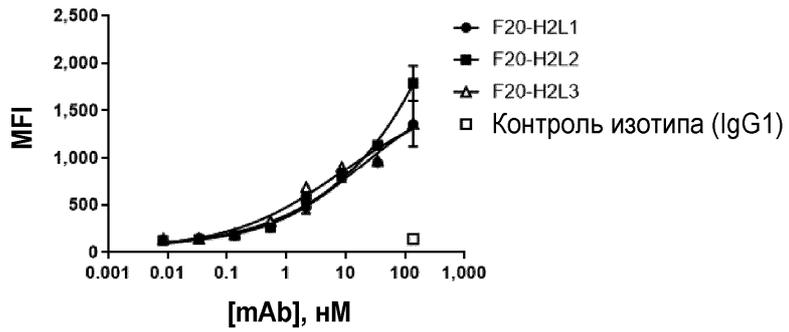
Фиг. 8F



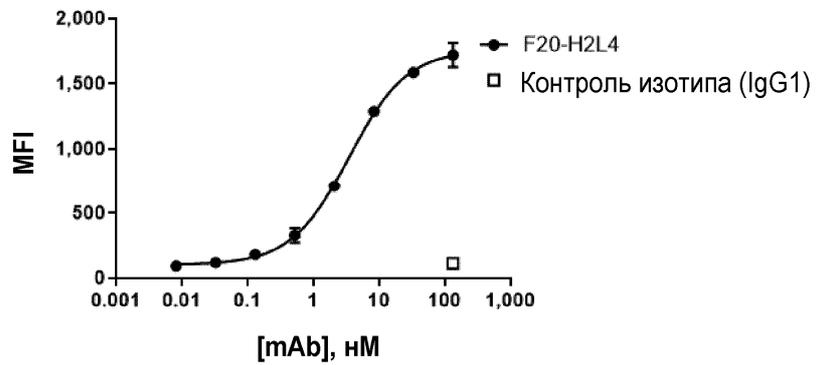
Фиг. 8G



Фиг. 8H



Фиг. 8I



Фиг. 8J

