



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138466
(43) 공개일자 2017년12월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 47/6803 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2017-7032201
- (22) 출원일자(국제) 2016년04월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년11월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/059338
- (87) 국제공개번호 WO 2016/174053
국제공개일자 2016년11월03일
- (30) 우선권주장
15305642.9 2015년04월27일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
피에르 파브르 메디카먼트
프랑스, 에프-92100 불로뉴-빌랑꾸르, 벨라스 아
벨-강스, 45
- (72) 발명자
주앙노, 알쌍드라
프랑스, 74130 봉느빌르, 튀 데 로씨에레, 152
- (74) 대리인
한인열

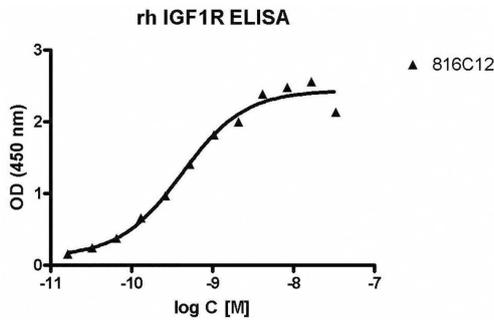
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 새로운 IGF-1R 항체 및 암의 진단을 위한 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 IGF-1R과 결합할 수 있는 새로운 항체, 상세하게는 단일클론 항체, 뿐만 아니라 상기 항체를 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열들에 관한 것이다.

대표도 - 도1



	816C12
S자형 용량-반응 (가변 기울기)	
최상 맞춤-수치	0.1163
비탁	2.438
경점	-9.380
로그 EC50	1.116
경사 기울기	4.173e-010
EC50	

(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)

G01N 33/57492 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/65 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로서,

- i) 서열번호 1의 서열의 CDR-H1, 서열번호 2의 서열의 CDR-H2 및 서열번호 3의 서열의 CDR-H3를 가진 중쇄; 및
 - ii) 서열번호 4의 서열의 CDR-L1, 서열번호 5의 서열의 CDR-L2 및 서열번호 6의 서열의 CDR-L3를 가진 경쇄:
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는, IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 7의 서열 또는 서열번호 7의 서열과 적어도 90%의 상동성을 가진 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인; 및/또는 서열번호 8의 서열 또는 서열번호 8의 서열과 적어도 90%의 상동성을 가진 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 3

IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로서,

파리, 파스퇴르 연구소, CNCM에 2014년 9월 17일자로 수탁번호 제 I-4894호로 제출된 하이브리도마에 의해 분비된 것을 특징으로 하는, IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

IGF-1R을 발현하는 종양성 세포들의 검출을 위한 제제로서 또는 IGF-1R을 발현하는 종양성 세포들의 발현 수준을 결정하는 데 사용되는, IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

IGF-1R의 발현과 연관된 종양원성 장애를 *시험관내* 또는 *생체외* 진단하거나 예후 판단하는 데 사용되는, IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

종양원성 장애를 가진 환자가 IGF-1R 경로를 표적하는 저해제, 바람직하게 단독의, 조합된 또는 결합된 IGF-1R 항체로의 치료로부터 유익을 얻을 수 있는지 여부를 결정하는 데 사용되는, IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 7

개체에서 IGF-1R을 발현하는 종양성 세포들의 존재 및/또는 위치를 *시험관내* 또는 *생체외*에서 검출하는 방법으로서,

- (a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 생물학적 시료와 상기 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 결합을 검출하는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 8

개체에서 IGF-1R을 발현하는 종양성 세포들의 백분율을 *시험관내* 또는 *생체외*에서 검출하는 방법으로서,

(a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 생물학적 시료에서 IGF-1R을 발현하는 세포들의 백분율을 정량하는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 9

개체의 종양성 세포들에서 IGF-1R의 발현 수준을 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 방법으로서,

(a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 생물학적 시료에서 상기 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 IGF-1R과 결합의 수준을 정량하는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 10

개체에서 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 점수를 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 방법으로서,

(a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계;

(b) 상기 생물학적 시료에서 상기 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 IGF-1R과 결합의 수준을 형광 활성화 세포 선별법 (FACS) 또는 면역조직화학법 (IHC)에 의해 정량하는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 획득된 정량된 수준을 양성 세포들의 염색의 강도 및 백분율인 2개의 매개변수들을 기초로 하는 적당한 척도와 비교하여 종양성 세포들 또는 종양을 점수 매기는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 11

종양원성 장애가 IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물로의 치료에 감수성을 가지는지 여부를 결정하는 방법으로서,

(a) 제 10항의 방법에 따라 개체의 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태를 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 단계; 및

(b) 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태가 IGF-1R(+)인 경우라면, 종양원성 장애가 IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물로의 치료에 감수성을 가지는 것으로 결정하는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 12

종양원성 장애로 고생하는 개체에서 IGF-1R과 연관된 상기 장애를 완화하도록 설계된 치료적 요법의 효능을 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 방법으로서,

(a) 제 9항에 따라 첫 번째 생물학적 시료에서 IGF-1R의 첫 번째 발현 수준을 결정하고, 상기 첫 번째 생물학적 시료는 상기 치료의 첫 번째 시간대에 해당하는 단계;

(b) 제 9항에 따라 두 번째 생물학적 시료에서 IGF-1R의 두 번째 발현 수준을 결정하고, 상기 두 번째 생물학적 시료는 상기 치료의 두 번째 이후의 시간대에 해당하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 획득된 상기 두 번째 발현 수준 대비 단계 (a)에서 획득된 상기 첫 번째 발현 수준의 비율을 계산하는 단계; 및

(d) 단계 (c)의 비율이 1 초과일 때, 상기 치료적 요법의 효능이 높은 것으로 결정하거나; 단계 (c)의 비율이 1 이하일 때, 상기 치료적 요법의 효능이 낮은 것으로 결정하는 단계:

를 포함하는, 방법.

청구항 13

IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물의 치료량의 투여로부터 유익을 얻을지 여부가 예측되는 암 환자를 선별하는 방법으로서,

(a) 제 9항에 따라 IGF-1R의 발현 수준을 결정하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계;

(c) 기준 발현 수준 대비 단계 (a)에서 획득된 발현 수준의 비율이 1 초과인 경우라면, IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물로의 치료로부터 유익을 얻을 것으로 예측되는 것으로서 환자를 선별하는 단계; 및

(d) 기준 발현 수준 대비 단계 (a)에서 획득된 발현 수준의 비율이 1 이하인 경우라면, IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물로의 치료로부터 유익을 얻을 것으로 예측되지 않는 것으로서 환자를 선별하는 단계:

를 포함하는, 방법.

청구항 14

환자에서 IGF-1R을 발현하는 종양성 세포들의 검출을 위한 키트로서,

적어도 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 15

종양원성 장애를 가진 환자가 IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물로의 치료로부터 유익을 얻을 수 있는지 여부를 결정하는 키트로서, 적어도 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IGF-1R과 결합할 수 있는 새로운 항체, 상세하게는 단일클론 항체, 뿐만 아니라 상기 항체를 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열들에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] IGF-1R (또는 때로 IGF1R)이라고 불리는 인슐린-유사 성장인자 I 수용체는 인슐린 수용체 IR과 70%의 상동성을 가지는, 타이로신 키나제 활성을 가진 수용체이다. IGF-1R은 분자량 대략 350,000의 당단백질이다. 이것은 디설파이드 결합들에 의해 연결된 각각의 절반이 세포의 α -소단위체 및 막통과 β -소단위체로 구성된 헤테로-사량체 수용체이다. IGF-1R은 매우 높은 친화도 (Kd #1 nM)로 IGF1 및 IGF2와 결합하지만, 100 내지 1,000배 더 낮은 친화도로 인슐린과 동일하게 결합할 수 있다. 역으로 IR은 IGF들이 100배 더 낮은 친화도로만 인슐린 수용체와 결합하더라도, 매우 높은 친화도로 인슐린과 결합한다. IGF-1R 및 IR의 타이로신 키나제 도메인들은 상동성이 약한 영역들이 각각 α -소단위체 및 β -소단위체의 C-말단 부분 위에 위치하는 시스테인-강화 부위와 관련되긴 하더라도 매우 높은 서열 상동성을 가진다. α -소단위체에서 관찰되는 서열 차이들은 리간드들의 결합 영역에 위치하고, 따라서 IGF들 및 인슐린 각각에 대한 IGF-1R 및 IR의 상대적 친화도들의 기원이 된다. β -소단위체의 C-말단 부분에서 차이들은 두 가지 수용체들의 신호전달 경로들에서 다양성 (divergence)의 결과를 가져오고; IGF-1R은 분열생성, 분화 및 항-세포사멸 효과들을 매개하는 반면, IR의 활성화는 대사적 경로들의 수준의 효과들에 관여한다.

- [0003] 발암기전에서 IGF 시스템의 역할은 지난 10년간 활발한 연구의 주제가 되어왔다. 이러한 관심은 그의 분열생성 및 항세포사멸 특성들에 추가하여, IGF-1R이 형질전환된 표현형의 확립 및 유지를 위해 요구되는 것으로 여겨지는 사실의 발견으로 이어졌다. 사실상, IGF-1R의 과다발현 또는 전신적 활성화가 다양한 많은 세포들에서 우태아 혈청이 결여된 배지의 사용과는 독립적인 세포들의 성장 그리고 누드 마우스에서 종양들의 형성을 유발하는 점은 잘 확립되어 왔다. 이것은 과다발현된 유전자들의 매우 다양한 산물들이 많은 성장인자들의 수용체들을 포함하여, 세포들을 형질전환할 수 있기 때문에 그 자체로 독특한 특성이 아니다. 그러나, 형질전환에서 IGF-1R가 담당하는 주요한 역할을 명백하게 보여주었던 결정적인 발견은, IGF-1R을 코딩하는 유전자가 불활성된 IGF-1R⁻ 세포들이 보통 세포들을 형질전환할 수 있는 소의 파필로마 바이러스의 E5, EGFR 또는 PDGFR의 과다발현, SV 40의 T 항원, 활성화된 Ras 또는 이들 마지막 인자들 둘의 조합과 같은 서로 다른 제제들에 의한 형질전환과는 전적으로 구별되는 점을 보여주었다.
- [0004] 이러한 맥락에서 IGF-1R은 종양학에서의 흥미로운 표적으로서 오랫동안 고려되어 왔다. IGF-1R (인간화 또는 인간 항체들 또는 소분자들)을 목표로 하는 매우 많은 프로젝트들이 암들의 치료를 위한 IGF-1R 항체들을 개발하도록 시작되었으며, 70개 이상의 임상시험들이 다양한 적응증들에서 수행되어 왔다. 그럼에도 불구하고, 지금까지 이들 프로젝트들은 전혀 성공하지 못하였고, 시판되는 IGF-1R 항체들도 전혀 존재하지 않는다.
- [0005] 본 발명은 종양원성 장애들, 특히 IGF-1R의 발현을 특징으로 하는 것들 또는 비전형 IGF-1R 발현에 의해 매개되는 것들을 검출하고/거나 모니터링하는 진단적 또는 예후적 생체마커로서 사용될 수 있는 적어도 하나의 시약을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0006] 적절한 진단적 또는 예후 판단 도구로서 사용될 수 있는 소중한 항체를 개발하려는 이전의 시도들이 보고되어 왔지만, 이들 중 어느 것도 전혀 만족스럽지 못하다.
- [0007] 다음의 실시예들로부터 자명해질 바와 같이, 본 발명자들은 오늘날 IGF-1R을 발현하는 종양들을 점수 매기는 데 공통적으로 사용되는 시판되는 항체들이 위양성 및/또는 위음성 결과를 주기 때문에 적절하지 않게 여겨지는 점을 확인하고 놀랐다. 이러한 문제는 IGF-1R 항체들의 실제 활성이 아닌 환자들의 선별로 인해, IGF-1R 항체들의 임상 시험들의 실패를 부분적으로 유발시켰다.
- [0008] 더구나, 시판되는 항체들을 사용하여 수행된 첫 번째 연구들은 표적화 ADC 요법의 IGF-1R 점수 및 항-종양 활성 간의 모순을 보여주었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 기존의 항체들과는 정반대로 IGF-1R 표적화 요법의 약리학과 상관되는 염색을 할 수 있는 새로운 항체를 제공하여 이러한 문제를 해결하려고 의도한다.

[0010]

과제의 해결 수단

- [0011] 첫 번째 관점에서, 본 발명의 주제는 분리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로서, IGF-1R 바람직하게 인간 IGF-1R과 높은 친화도로 결합하고, 이로써 IGF-1R 발현에 의해 매개되는 병리학적 과다증식 종양원성 장애들을 진단하는 방법들에 사용될 수 있는, 분리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.
- [0012] 본 발명의 한 가지 구현에는 서열번호들 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 서열들의 6개 CDR들을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 관한 것이다.
- [0013] 상세한 구현예에서, 본 발명은 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로서,
- [0014] i) 서열번호 1의 서열의 CDR-H1, 서열번호 2의 서열의 CDR-H2 및 서열번호 3의 서열의 CDR-H3를 가진 중쇄; 및
- [0015] ii) 서열번호 4의 서열의 CDR-L1, 서열번호 5의 서열의 CDR-L2 및 서열번호 6의 서열의 CDR-L3를 가진 경쇄;
- [0016] 를 포함하는 것을 특징으로 하는, IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 관한 것이다.
- [0017] 용어들 "항체", "항체들", "ab" 또는 "면역글로불린"은 가장 넓은 의미에서 상호교환적으로 사용되고 단일클론 항체들, 분리된, 조각된, 화학적으로 합성된, 또는 재조합 항체들 (예로, 전장의 또는 미가공의 단일클론 항체

들), 다중클론 항체들, 다가의 항체들 또는 다중특이적 항체들 (예로, 이중특이적 항체들), 그들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편도 역시 포함한다. 한 가지 구현예에서, 본 발명은 재조합 항체에 관한 것이다.

- [0018] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 표현 "IGF-1R 항체"는 "항-IGF-1R 항체"와 유사한 것으로서 해석되어야 하고, IGF-1R과 결합할 수 있는 항체를 의미한다.
- [0019] 본 발명에 따른 항체의 "IGF-1R 결합 단편" 또는 "항원 결합 단편"에 의하여, 이것은 항체의 표적 (일반적으로 항원이라고도 역시 약칭됨)과 결합하는 능력을 보유하는 임의의 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 가리키도록 의도된다. 한 가지 구현예에서, 이러한 "항원 결합 단편들"은 Fv, scFv (단일 사슬의 sc), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc 단편들 또는 다이아체들, 또는 반감기가 폴리(에틸렌)글리콜 ("PEG화")(Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG 또는 Fab'-PEG라고 불리는 PEG화된 단편들) (폴리(에틸렌)글리콜의 "PEG")과 같은 폴리(알킬렌)글리콜의 첨가와 같은 화학적 변형, 또는 리포솜 내로 도입에 의해 증가되었던 임의의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 상기 단편들은 본 발명에 따른 항체의 특징적인 CDR들의 적어도 하나를 가진다. 바람직하게, 상기 "항원 결합 단편들"은 그들이 유래된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 사슬의 부분적 서열로 구성되거나 이를 포함할 것이고, 상기 부분적 서열은 표적에 대하여 이것이 유래된 항체와 동일한 결합 특이도 및 충분한 친화도, 바람직하게 이것이 유래된 항체의 친화도의 적어도 동등 내지 1/100, 더욱 바람직한 방식으로 적어도 1/10까지의 친화도를 보유하기에 충분하다.
- [0020] 바람직하게, 상기 "IGF-1R 결합 단편" 또는 "항원-결합 단편"은 적어도,
- [0021] i) 서열번호 1의 서열의 CDR-H1, 서열번호 2의 서열의 CDR-H2 및 서열번호 3의 서열의 CDR-H3; 및
- [0022] ii) 서열번호 4의 서열의 CDR-L1, 서열번호 5의 서열의 CDR-L2 및 서열번호 6의 서열의 CDR-L3:
- [0023] 를 포함한다.
- [0024] "결합하는" 또는 "결합하다" 등에 의하여, 항체, 또는 그의 임의의 항원-결합 단편은 생리적 조건들 하에서 비교적 안정한 항원과 복합체를 형성하는 것으로 의도된다. 특이적 결합은 적어도 약 1×10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수를 특징으로 할 수 있다. 두 분자들이 결합하는지 여부를 결정하는 방법들은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들면 평형 투석법, 표면 플라즈몬 공명법 등을 포함한다. 애매함의 회피를 위해, 이것은 상기 항체가 또 다른 항원과 낮은 수준으로 결합 또는 이에 개입할 수 없는 점을 의미하지는 않는다. 그럼에도 불구하고 한 가지 구현예로서, 상기 항체는 상기 항원과 결합한다.
- [0025] CDR 부위들 또는 CDR(들)에 의하여, IMGT에 의해 정의되는 바와 같이 면역글로불린들의 중쇄들 및 경쇄들의 과다가변 부위들을 가리키도록 의도된다.
- [0026] 독특한 IMGT 번호매김 (IMGT unique numbering)은 어떤 항원 수용체, 사슬 유형 또는 종이라도 가변 도메인들을 비교하도록 정의되어 왔다 [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M. P., Pommie C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. 독특한 IMGT 번호매김에서, 보존되는 아미노산들은 항상 동일한 위치들, 예를 들면 23번 시스테인 (1번째-CYS), 41번 트립토판 (보존된-TRP), 89번 소수성 아미노산, 104번 시스테인 (2번째-CYS), 118번 페닐알라닌 또는 트립토판 (J-PHE 또는 J-TRP)을 보유한다. 독특한 IMGT 번호매김은 구조적 부위들 (FR1-IMGT: 1 내지 26번 위치, FR2-IMGT: 39 내지 55번 위치, FR3-IMGT: 66 내지 104번 위치 및 FR4-IMGT: 118 내지 128번 위치) 및 상보성 결정 부위들 (CDR1-IMGT: 27 내지 38번 위치, CDR2-IMGT: 56 내지 65번 위치 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117번 위치)의 표준화된 구획을 제공한다. "공간들 (gap)"은 채워지지 않은 위치를 나타내기 때문에, CDR-IMGT 길이들 (괄호들 사이에 나타나고 점들로 분리됨, 예로 [8.8.13])는 결정적인 정보가 된다. 독특한 IMGT 번호매김은 IMGT 진주목걸이라고 명명되는 [Ruiz, M. and Lefranc, M. P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. and Lefranc, M. P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] 2차원 그래픽 전시들 및 IMGT/3D 구조-DB의 3차원 구조들 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M. P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]에 사용된다.
- [0027] 본 명세서에서 명시적 논쟁이 없는 경우라면, 상보성-결정 부위들 또는 CDR들은 IMGT 번호매김 체계에 따라 정의된 바와 같이 면역글로불린의 중쇄들 및 경쇄들의 과다가변 부위들을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

- [0028] 그럼에도 불구하고, CDR들은 카밧 번호매김 체계에 따라 역시 정의될 수 있다 (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 제 5판, 미국 보건복지부, NIH, 1991 및 이후 개정판들). 3가지 중쇄 CDR들 및 3가지 경쇄 CDR들이 존재한다. 본 명세서에서, 용어들 "CDR" 및 "CDR들"은 경우에 따라서 그들이 인식하는 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합 친화도를 부여하는 대부분의 아미노산 잔기들을 포함하는 부위들의 하나 이상 또는 심지어 전부를 가리키는 데 사용된다. 본 출원의 해석을 단순화하기 위하여, 카밧에 따른 CDR들은 정의되지 않는다. 그럼에도 불구하고, 당업자에게라면 IMGT에 따른 CDR들의 정의를 사용하여 카밧에 따른 CDR들을 정의하는 것이 자명할 것이다.
- [0029] 상세한 구현예에서, 본 발명에 따른 IGF-1R 항체는 서열번호 7의 서열 또는 서열번호 7의 서열과 적어도 90%의 상동성을 가진 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 상세한 구현예에서, 본 발명에 따른 IGF-1R 항체는 서열번호 8의 서열 또는 서열번호 8의 서열과 적어도 90%의 상동성을 가진 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 보다 또 다른 구현예에 따르면, 816C12라고 약칭되는 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열 또는 서열번호 7의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 상동성을 가진 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고/거나; 서열번호 8의 아미노산 서열 또는 서열번호 8의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 상동성을 가진 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0032] 본 발명의 의미에서, 두 개의 핵산들 또는 아미노산들의 서열들 간의 "상동성 백분율"은 최적의 정렬에 따라 획득되어 비교되는 두 개의 서열들 간에 일치하는 뉴클레오타이드들 또는 아미노산 잔기들의 백분율을 의미하고, 이러한 백분율은 순수하게 통계적이고 이 두 서열들 간의 차이들은 그들의 길이를 따라 무작위적으로 분포한다. 두 개의 핵산 또는 아미노산 서열들 간의 서열 비교는 통상적으로 그들을 최적으로 정렬시킨 이후 서열들을 비교하여 수행되고, 상기 비교는 분절마다 또는 "정렬창 (alignment window)"을 사용하여 수행될 수 있다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬은 수동적인 비교와 더불어 스미스 및 워터만의 로칼 상동성 알고리즘 [Smith and Waterman (1981) *Ad. App. Math.* 2:482]에 의해, 네들만 및 운쉬의 로칼 상동성 알고리즘 [Neddleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443]에 의해, 피어슨 및 립만의 유사도 탐색 방법 [Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444]에 의해, 또는 이들 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 소프트웨어에 의해 (위스콘신 유전학 소프트웨어 패키지, 유전학 컴퓨터 그룹, 575 Science Dr., Madison, WI에서의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 또는 비교 소프트웨어 BLAST N 또는 BLAST P에 의해) 수행될 수 있다. 기준 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 가지는 아미노산 서열을 위해, 바람직한 예들은 기준 서열, 소정의 변형들 (modification), 명확하게는 적어도 하나의 아미노산의 결실 (deletion), 부가 (addition) 또는 치환 (substitution), 절단 (truncation) 또는 연장 (extension)을 포함한다. 하나 이상의 연속적 또는 비-연속적 아미노산(들)의 치환들 경우에서, 치환된 아미노산은 "동등한" 아미노산에 의해 대체되는 치환이 바람직하다. 본 명세서에서 용어 표현 "동등한 아미노산들"은 해당하는 항체들의 생물학적 활성들을 변형시키지 않고도 구조적 아미노산들 및 하기 정의된 특정한 예들의 하나로 치환될 수 있는 임의의 아미노산들을 가리키도록 의미한다.
- [0033] 동등한 아미노산들은 치환된 아미노산들과의 그들의 구조적 상동성을 기초로 하거나 생성될 수 있는 다양한 항원 결합 단백질들 간의 생물학적 활성의 비교 테스트들의 결과들을 기초로 하여 결정될 수 있다.
- [0034] 비-제한적인 예로서, 하기 표 1은 해당하는 변형된 항원 결합 단백질의 생물학적 활성의 유의한 변형을 유발하지 않고도 수행될 수 있는 가능한 치환들을 정리하고 있고; 역 치환들 (inverse substitution)도 동일한 조건들 하에서 자연적으로 가능하다.

표 1

원 잔기	치환(들)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0035]

[0036] 본 발명의 상세한 관점은 항체 또는 그의 임의의 항원 결합 단편이 인슐린 수용체 (IR)와 결합하지 않는 것이다.

[0037] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 단일클론 항체로 구성된다.

[0038] 용어 "단일클론 항체" 또는 "Mab"는 본 명세서에서 사용되는 바 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 획득된 항체를 말하고, 예로 집단의 개별 항체들은 소량으로 존재할 수 있는 자연적으로 생기는 가능한 돌연변이들을 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체들은 매우 특이적이어서, 단일한 에피토프에게로 유도된다. 이러한 단일클론 항체들은 B 세포들 또는 하이브리도마의 단일한 클론에 의해 생산될 수 있다. 단일클론 항체들도 역시 재조합될 수 있고, 예로 단백질 공학에 의해 생산된다. 단일클론 항체들은 파지 항체 라이브러리들로부터도 역시 분리될 수 있다. 또한, 다양한 결정기들 또는 에피토프들에게로 유도되는 다양한 항체들을 전형적으로 포함하는 다중클론 항체들의 제조들과는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원의 단일한 에피토프에게로 유도된다. 본 발명은 자연적 출처들로부터의 정제에 의해 분리되거나 획득된 또는 유전적 재조합 또는 화학적 합성에 의해 획득된 항체들에 관한 것이다.

[0039] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 재조합 항체로 구성된다. 용어 "재조합 항체"는 살아있는 세포들 내에서 재조합 DNA의 발현의 결과로부터 나온 항체를 말한다. 본 발명의 재조합 항체는 당업자에게 잘 숙지되어 있는, 생물학적 유기체들에서 발견되지 않을 DNA 서열들을 제작하는 유전적 재조합의 연구실 방법들을 사용하여 획득된다.

[0040] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 화학적으로 합성된 항체로 구성된다.

[0041] "IGF-1R 항체"는 (정반대의 명시가 없더라도) 상기 IGF-1R 항체의 마우스뿐만 아니라 키메라 및 인간화 형태들을 포함한다.

[0042] 보다 명확하게, 다음의 표 2는 IMGT에 따라 정의된 항체 816C12의 서열들을 도시한다.

표 2

항체	CDR 번호매김	중쇄	경쇄	서열번호
816C12I-4894	IMGT	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
		가변 도메인		7
			가변 도메인	8

[0043]

[0044] 한 가지 구현예에서, 본 명세서에서의 단일클론 항체는 하기에 기술된 바와 같은 마우스, 키메라 및 인간화 항체를 포함한다. 항체는 프랑스 미생물 배양들의 기탁기관 (프랑스 파리 파스퇴르 연구소, CNCM)에 제출된 마우스 기원의 하이브리도마로부터 유래될 수 있고, 상기 하이브리도마는 Balb/C 면역화된 마우스 비장 세포들/림프 세포들 및 골수종 Sp 2/O-Ag 14 세포주의 세포들의 융합에 의해 획득된다.

[0045] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 본 발명에 따른 단일클론 항체를 분비할 수 있는 마우스 하이브리도마, 명확하게 프랑스 파리, 파스퇴르 연구소, CNCM에 2014년 9월 17일자로 수탁번호 제 I-4894호로 기탁된 마우스 기원의 하이브리도마에 관한 것이다.

[0046] 본 명세서에서 816C12라고 약칭되는, 상기 하이브리도마 I-4894에 의해 분비되는 단일클론 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 명백하게 본 발명의 일부를 형성한다.

[0047] 본 발명은 파리, 파스퇴르 연구소, CNCM에 2014년 9월 17일자로 수탁번호 제 I-4894호로 제출된 하이브리도마에 의해 분비되는 것을 특징으로 하는, IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 관한 것이다.

[0048] 본 발명은 또한 파리, 파스퇴르 연구소, CNCM에 2014년 9월 17일자로 수탁번호 제 I-4894호로 제출된 마우스 하이브리도마를 기술하고 있다.

[0049] 본 발명의 새로운 관점은 분리된 핵산으로서, 다음의 핵산들,

[0050] a) 본 발명에 따른 항체를 코딩하는 핵산;

[0051] b) 서열번호 9 또는 10의 서열들 또는 최적의 정렬 이후에 서열번호 9 또는 10의 서열들과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 상동성을 가진 서열로부터 선택되는 서열을 포함하는 핵산; 및

[0052] c) a) 또는 b)에서 정의된 바와 같은 핵산들의 상보적인 핵산들;

[0053] 로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 분리된 핵산들에 관한 것이다.

[0054] 하기 표 3은 본 발명의 항체 816C12에 관한 다양한 뉴클레오타이드 서열들을 요약하고 있다.

표 3

항체	중쇄	경쇄	서열번호
816C12 I-4894	가변 도메인		9
		가변 도메인	10

[0055]

[0056] 본 발명의 상세한 설명에서 상호교환적으로 사용되는 용어들 "핵산 (nucleic acid)", "핵산 서열 (nucleic sequence)", "핵산 서열 (nucleic acid sequence)", "폴리뉴클레오타이드 (polynucleotide)", "올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)", "폴리뉴클레오타이드 서열 (polynucleotide sequence)" 및 " 뉴클레오타이드 서열 (nucleotide sequence)"은, 변형 여부와 상관없이 핵산의 단편 또는 부위를 정의하고, 비자연적 뉴클레오타이드를 포함하기도 하고, 이중가닥 DNA, 단일가닥 DNA 또는 상기 DNA들의 전사 산물들 중 어느 하나로 존재하는 뉴클레오타이드들의 정확한 서열을 의미한다.

[0057] 본 명세서에서는 본 발명이 자연적인 염색체 환경에서, 예로 자연적 상태로의 뉴클레오타이드 서열들에 관한 것이 아닌 점도 역시 포함되어야 한다. 본 발명의 서열들은 분리되었고/거나 정제되었고, 예로 그들은 예를 들면 사본으로 직접 또는 간접적으로 수집되었으며, 그들의 환경이 적어도 부분적으로 변형되었던 것이다. 재조합 유전학에 의해, 예를 들면 숙주 세포들에 의해 획득되거나, 화학적 합성에 의해 획득된 분리된 핵산들도 역시 본 명세서에서 언급되어야 한다.

[0058] 본 발명은 또한 본 발명에 기술된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0059] 본 발명은 명확하게 이러한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 클로닝 및/또는 발현 벡터들을 목표로 한다.

[0060] 본 발명의 벡터들은 바람직하게 주어진 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열들의 발현 및/또는 분비를 허용하는 요소들을 포함한다. 벡터는 이에 따라 프로모터, 해독 개시 및 종결 신호들, 뿐만 아니라 적합한 전사 조절 부위들을 포함해야 한다. 이것은 숙주세포에서 안정한 방식으로 유지될 수 있어야 하고, 선택적으로 해독된 단백질의 분비를 특징하는 특이적 신호들을 가질 수 있다. 이들 다양한 요소들은 사용된 숙주 세포에 따라 당업자에 의해 선택되고 최적화된다. 이러한 목적을 위해, 뉴클레오타이드 서열들은 선택된 숙주 내의 자가-복제하는 벡터들 내에 삽입되거나 선택된 숙주에 통합되는 벡터들일 수 있다.

[0061] 이러한 벡터들은 당업자에 의해 전형적으로 사용되는 방법들에 의해 제조되고, 결과로 얻은 클론들은 리포펙션, 전기천공법, 열 충격법 또는 화학적 방법들과 같은 표준 방법들에 의해 적합한 숙주 내로 도입될 수 있다.

[0062] 본 벡터들은 예를 들면 플라스미드 또는 바이러스 기원의 벡터들이다. 그들은 본 발명의 뉴클레오타이드 서열들을 클론하거나 발현하기 위하여 숙주 세포들을 형질전환하는 데 사용된다.

[0063] 본 발명은 또한 본 발명에서 기술된 바와 같은 벡터에 의해 형질전환되거나 이를 포함하는 분리된 숙주 세포들을 포함한다.

[0064] 숙주 세포들은 예를 들면 박테리아 세포들뿐만 아니라 효모 세포들 또는 동물 세포들, 명확하게는 포유동물 세포들과 같은 원핵 또는 진핵 시스템들 중에서 선택될 수 있다. 곤충 또는 식물 세포들도 역시 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형질전환된 세포를 가지는, 인간이 아닌 동물들에 관한 것이다.

[0066] 본 발명의 또 다른 관점은 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 단편들 중 하나의 생산 방법으로서,

[0067] a) 본 발명에 따른 숙주 세포에 적합한 배양 조건들의 배지에서 배양 단계; 및

[0068] b) 이에 따라 배양 배지로부터 또는 상기 배양된 세포들로부터 생산된 상기항체 또는 그의 기능적 단편들 중 하나의 회수 단계:

- [0069] 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명에 따른 형질전환된 세포들은 본 발명에 따른 재조합 폴리펩타이드들의 제조 방법들에 사용된다. 본 발명에 따른 벡터 및/또는 벡터에 의해 형질전환된 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는, 재조합 형태로 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 제조 방법들도 역시 본 명세서에 포함된다. 바람직하게, 본 발명에 따른 벡터에 의해 형질전환된 세포는 상기 언급된 폴리펩타이드의 발현 및 상기 재조합 펩타이드의 회수를 허용하는 조건들 하에서 배양된다.
- [0071] 이미 언급된 바와 같이, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 시스템들 중에서 선택될 수 있다. 상세하게, 이러한 원핵 또는 진핵 시스템들에서 분비를 용이하게 하는 본 발명의 뉴클레오타이드 서열들을 확인하는 것이 가능하다. 이러한 서열을 보유하는 본 발명에 따른 벡터는 이에 따라 분비될 재조합 단백질들의 생산에 유리하게 사용될 수 있다. 따라서, 이들 관심 있는 재조합 단백질들의 정제는 그들이 숙주 세포들 내부가 아닌 세포 배양의 상청액에 존재하는 사실에 의해 용이하게 될 것이다.
- [0072] 본 발명의 항체의 생체마커로서 용도도 역시 개시된다. 본 방법들은 이에 제한되는 것은 아니지만, IGF-1R의 발현과 연관된 전립선암, 골육종, 폐암, 유방암, 자궁내막암, 교모세포종, 결장암, 위암, 신장암, 췌장암, 두경부암 또는 임의의 다른 암으로 대표되는, IGF-1R의 발현과 연관된 다양한 과다증식 종양원성 장애들을 검출하거나 진단하는 데 사용될 수 있다. 당업자에 의해 인식되고 있을 바와 같이, 특정한 장애와 연관된 항체 발현의 수준은 기존 병태의 특성 및/또는 중증도에 의존하여 변화할 것이다.
- [0073] 당업자에게 숙지되어 있는 임의의 통상적인 방식들로 (예로, 국소적, 비경구적, 근육내 등) 본 발명의 항체들의 투여는 시료에서 이상증식 세포들을 검출할 뿐만 아니라 의사가 IGF-1R의 발현과 연관되거나 이에 의해 매개되는 과다증식성 장애의 치료를 진행하는 환자의 치료적 요법을 모니터링하도록 허용하는 매우 유용한 방법을 제공할 것이다.
- [0074] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IGF-1R의 발현과 연관된 다양한 병리들의 검출, 진단, 예후 판단 및 병기 결정을 포함하여 다양한 의학적 또는 연구 목적들의 용도를 찾을 것이다.
- [0075] 본 발명의 구현에는 상기에 기술된 바와 같이, IGF-1R을 발현하는 종양성 세포들의 검출을 위한 제제로서 사용되는 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 관한 것이다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 구현에는 상기에 기술된 바와 같이, IGF-1R의 발현과 연관된 종양원성 장애의 *시험관내* 또는 *생체외* 진단하거나 예후 판단하는 데 사용되는 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 관한 것이다.
- [0077] 본 명세서에서 사용되는 바, 질환을 "진단"하는 것은 IGF-1R의 발현과 연관되거나 이에 의해 매개되는 병리학적 과다증식 종양원성 장애의 존재를 확인하거나 검출하고, 질환의 진행을 모니터링하며, IGF-1R의 발현과 연관된 장애를 지시하는 세포들 또는 시료들을 확인하는 과정을 말한다.
- [0078] 본 명세서에서 사용되는 바, "예후 판단"은 질환으로부터 회복의 가망성 또는 질환의 가능한 발생 또는 결과의 예측을 의미한다. 예를 들면, 개체로부터 얻은 시료가 IGF-1R 항체로 염색에 대해 음성인 경우라면, 해당 개체의 "예후 판단"은 시료가 IGF-1R 항체로 염색에 대해 양성인 경우보다 낮다. 시료들은 이하 본 명세서에서 더욱 상술될 바와 같이 IGF-1R 발현 수준들에 대하여 적당한 척도로 점수 매겨질 수 있다.
- [0079] IGF-1R 항체는 검출가능/정량가능한 신호를 획득하도록 면역결합체 또는 표지된-항체의 형태로 존재할 수 있다. 적합한 표지들 또는 기타 적당한 검출가능한 생체분자들 또는 화학물질들과 함께 사용될 때, IGF-1R 항체는 상세하게 *시험관내* 및 *생체내* 진단 및 예후 판단 적용들에 유용하다.
- [0080] 면역검정법들에 사용되는 표지들은 일반적으로 당업자들에게 숙지되어 있고, 효소들, 방사성 동위원소들 그리고 콜로이드성 골드 또는 라텍스 비드들과 같은 채색된 입자들을 포함하는 형광성, 발광성 및 색소생성 물질들을 포함한다. 적합한 면역검정법들은 효소-결합 면역흡착 검정법들 (엘라이자)를 포함한다. 다양한 유형들의 표지들 및 IGF-1R 항체들과 표지들을 결합하는 방법들은 하기에 설명된 것들과 같이 당업자들에게 잘 숙지되어 있다.
- [0081] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "IGF-1R의 발현과 연관된 종양원성 장애"는 장애로 고생하는 개체에서 IGF-1R의 높은 수준들의 존재 (비전형)가 장애의 병리생리학 또는 장애의 악화를 부여하는 요인에 기여하는 것으로 확인되거나 의심되었던 질환들 또는 기타 장애들을 포함하도록 의도된다. 대안적으로, 이러한 장애들은 예를 들면 장애로 고생하는 개체의 침범된 세포들 또는 조직들의 세포 표면 상에서 IGF-1R의 수준들의 증가로 입증될

수 있다. IGF-1R 수준들의 증가는 IGF-1R 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

- [0082] 소정의 구현예들에서, IGF-1R에 관한 바 "증가된 발현"은 대조군과 대비하여 (RNA 발현 또는 단백질 발현에 의해 측정된 바와 같은) 발현에서 통계학적으로 유의한 증가를 나타내는 단백질 또는 유전자 발현 수준들을 말한다.
- [0083] 한 가지 구현예는 종양원성 장애를 가진 환자가 IGF-1R 경로를 표적하는 저해제, 바람직하게 단독의, 조합된 또는 결합된 IGF-1R 항체로의 치료로부터 유익을 얻을 수 있는지 여부를 결정하는 데 사용되는, 상기에 기술된 바와 같은 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.
- [0084] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 표현 "IGF-1R 경로를 표적하는 저해제"는 IGF-1R의 리간드(들) 또는 IGFR 자체 둘 중 하나와 결합하여, IGF-1R의 타이로신 키나제 활성을 감소시키거나 억제할 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. 이러한 저해제들의 예들은 단백질, 펩타이드들, 항체들 또는 항체-약물-결합체들, 또는 IGF-1R 길항제들로서 작용하는 임의의 화학적 화합물, IGF-1R 유전자 또는 IGFR 리간드(들) 중 하나를 인코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드들 또는 siRNA, 또는 당업자에 의해 숙지되어 있는 임의의 기타 약물 또는 화합물이다.
- [0085] 보다 상세하게, 본 명세서의 의미에서, IGF-1R 경로를 표적하는 저해제는 IGF-1R와 결합하고 그의 리간드(들)의 결합을 억제할 수 있는 임의의 화합물 또는 분자를 포괄하도록 의도된다.
- [0086] 훨씬 더 상세하게, 본 명세서의 의미에서, IGF-1R 경로를 표적하는 저해제는 IGF-1R와 결합하는 임의의 단일클론 항체를 포괄하도록 의도된다.
- [0087] 또 다른 바람직한 구현예에서, IGF-1R 경로를 표적하는 저해제는 항체-약물-결합체 (ADC)로서, 항체 분체가 IGF-1R를 표적하고 약물 분체가 세포독성제, 세포증식억제제, 독소들 등과 같은 임의의 약물들로부터 선택될 수 있는 항체-약물-결합체로 구성된다. 대표적인 구현예에서, 약물 분체는 아우리스타틴, 유사체 또는 유도체로 구성될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 목적은 또한, 개체에서 IGF-1R을 발현하는 종양성 세포들의 존재 및/또는 위치를 시험관내 또는 생체외에서 검출하는 방법으로서,
- [0089] (a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 상기에 기술된 바와 같은 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; 및
- [0090] (b) 상기 생물학적 시료와 상기 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 결합을 검출하는 단계;
- [0091] 를 포함하는, 방법을 기술하는 것이다.
- [0092] 본 발명은 또한, 개체에서 바람직하게는 개체의 세포들의 표면에서 IGF-1R의 발현을 검출하고/거나 정량하고/거나 발현의 수준을 결정하는 시험관내 또는 생체외 방법으로서,
- [0093] (a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 상기에 기술된 바와 같은 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; 및
- [0094] (b) 상기 생물학적 시료와 상기 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 결합을 검출하고/거나 정량하고/거나 결합의 수준을 결정하는 단계;
- [0095] 를 포함하는, 방법에 관한 것이다.
- [0096] IGF-1R 항체의 결합은 당업자라면 입수가 가능한 다양한 검정법들에 의해 검출되고/거나 정량되고/거나 결정될 수 있다. 검정법들을 수행하는 임의의 적합한 수단들이 본 발명의 범주 내에 포함되기는 하지만, 상세하게 형광 활성화 세포 선별법 (FACS), 엘라이자, 웨스턴 블롯팅 및 면역조직화학법 (IHC)이 언급될 수 있다. 바람직한 방법들로는 IHC 및 FACS를 포함한다.
- [0097] 본 발명은 또한 개체에서 IGF-1R을 발현하는 종양성 세포들의 백분율을 시험관내 또는 생체외에서 검출하는 방법으로서,
- [0098] (a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 상기에 기술된 바와 같은 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; 및
- [0099] (b) 상기 생물학적 시료에서 IGF-1R을 발현하는 세포들의 백분율을 정량하는 단계;

- [0100] 를 포함하는, 방법을 기술하고 있다.
- [0101] 또 다른 구현예는 개체의 종양성 세포들에서 IGF-1R의 발현 수준을 시험관내 또는 생체외에서 결정하는 방법으로서,
- [0102] (a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 상기에 기술된 바와 같은 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; 및
- [0103] (b) 상기 생물학적 시료에서 상기 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 IGF-1R과 결합의 수준을 정량하는 단계;
- [0104] 를 포함하는, 방법이다.
- [0105] 당업자에게라면 자명할 바와 같이, IGF-1R 항체의 IGF-1R와 결합의 수준은 당업자에게 숙지되어 있는 임의의 수단들에 의해 정량될 수 있다. 바람직한 방법들은 엘라이자 검정법들, 면역형광법, IHC, 방사선-면역검정법 (RIA) 또는 FACS와 같은 면역효소적 방법들의 사용이 관여한다.
- [0106] 본 발명에 따르면, 상기 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 IGF-1R과 결합의 수준은 형광 활성화 세포 선별법 (FACS) 또는 면역조직화학법 (IHC)에 의해 정량된다.
- [0107] "생물학적 시료"는 개체로부터 채취할 수 있는 임의의 시료일 수 있다. 이러한 시료는 본 발명의 생체마커의 발현 수준들의 결정을 허용해야 한다. 시료의 특성은 이에 따라 종양의 특성에 의존적일 것이다.
- [0108] 바람직한 생물학적 시료들은 암이 액체 종양인 경우라면, 혈액 시료, 혈장 시료 또는 림프 시료와 같은 시료들을 포함한다.
- [0109] 바람직한 생물학적 시료들은 암이 고체 종양인 경우라면, 생검 시료 또는 수술적 절제 요법으로부터 채취한 시료와 같은 시료들을 포함한다.
- [0110] 바람직하게, 생물학적 시료는 인간 기원의 혈청, 전혈 세포들, 조직 시료 또는 생검과 같은 생물학적 액체이다. 시료는 예를 들면 생검된 조직을 포함하고, 이는 IGF-1R의 발현과 연관된 병리학적 종양원성 장애의 존재에 대하여 편리하게 검정될 수 있다.
- [0111] 일단 테스트된 생물학적 시료들에서 IGF-1R 발현 수준이 결정된 경우라면, 결과들은 대조군의 결과들과 비교될 수 있고, 이들은 테스트된 생물학적 시료들과 유사한 방식으로 획득되지만 IGF-1R의 발현과 연관된 종양원성 장애를 가지지 않는 개체들로부터 획득된다. IGF-1R의 수준이 테스트된 생물학적 시료에서 유의하게 증가되는 경우라면, 이것이 유래한 개체가 상기 장애를 가지거나 발생시킬 증가된 가망성이 존재하는 것으로 판단될 수 있다.
- [0112] 본 발명은 IGF-1R를 발현하는 종양의 시험관내 또는 생체외 진단 또는 예후 판단의 방법으로서, (i) 본 발명에 따라 개체의 종양성 세포들 또는 종양에서 IGF-1R의 발현 수준을 시험관내 또는 생체외에서 결정하는 방법에 의해 IGF-1R의 발현 수준을 결정하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)의 발현 수준을 정상 조직 또는 IGF-1R를 발현하지 않는 조직으로부터 얻은 IGF-1R의 기준 발현 수준과 비교하는 단계:를 포함하는, 방법에 관한 것이다.
- [0113] 표적화 항종양 요법의 개발에 관하여, 면역조직학적 기법들로의 진단은 수용체 발현 수준에 대한 제자리 정보를 주고, 이에 따라 이러한 치료에 필요한 수용체들의 발현 수준에 이어서 치료에 대한 감수성을 가진 환자들을 선별하도록 한다.
- [0114] 병기 결정은 강력한 예후적 수치를 가지고, 최적의 요법을 설계하기 위한 판단기준을 제공한다 (Simpson et al., J. Clin. Oncology, 18: 2059 (2000)). 예를 들면, 고형 종양들을 위한 치료 선택은 종양 병기 결정을 기초로 하고, 이는 보통 암에 관한 미국 조인트 위원회 (AJCC)로부터 나온 종양/림프절/전이 (TNM) 테스트를 사용하여 수행된다. 이러한 테스트 및 병기 결정 시스템이 고형 암이 환자에서 진단되었던 병기에 관한 일정 소중한 정보를 제공하지만, 이것이 명확하지 않고 불충분한 점은 공통적으로 인식되고 있다. 상세하게, 이것은 종양 진행의 가장 초기 병기들을 확인하는 데 실패하고 있다.
- [0115] 또 다른 구현예는 개체에서 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 점수를 시험관내 또는 생체외에서 결정하는 방법으로서,
- [0116] (a) 상기 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 상기에 기술된 바와 같은 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계;

- [0117] (b) 상기 생물학적 시료에서 상기 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 IGF-1R과 결합의 수준을 형광 활성화 세포 선별법 (FACS) 또는 면역조직화학법 (IHC)에 의해 정량하는 단계: 및
- [0118] (c) 단계 (b)에서 획득된 정량된 수준을 양성 세포들의 염색의 강도 및 백분율인 2개의 매개변수들을 기초로 하는 적당한 척도와 비교하여 종양성 세포들 또는 종양을 점수 매기는 단계:
- [0119] 를 포함하는, 방법으로 구성된다.
- [0120] 한 가지 구현예에서, IGF-1R 항체는 조직 시료들이 포르말린-고정되고/거나, 포물 치환 고정되고/거나, 글리코-픽스 고정되고/거나, 파라핀 포매되고/거나 냉동될 때, IGF-1R를 결합할 수 있다.
- [0121] 임의의 통상적인 위험 분석 방법은 IGF-1R의 예후적 수치를 추정하는 데 사용될 수 있다. 대표적인 분석 방법 들로는 콕스 회귀 분석법을 포함하고, 이는 검열된 사례들의 존재 시 생존 또는 시간-대-사건 데이터를 모델링 하는 절반매개변수 방법이다 (Hosmer and Lemeshow, 1999; Cox, 1972). 다른 생존 분석법들 예로 생명 표들 또는 카플란-메이어와는 대조적으로, 콕스는 모델들에서 예측인자 변수들 (공변수들)의 포함을 허용한다. 통상 적인 분석 방법 예로 콕스를 사용하여, 질환 재발의 발병까지의 시간 (무-질환 생존 시간 또는 전이성 질환까지 의 시간) 또는 질환으로부터 사망까지의 시간 (전반적 생존 시간)과 일차 종양의 IGF-1R 발현 상태의 상관성을 고려하는 가설들을 테스트할 수 있다. 콕스 회귀 분석법은 콕스 비율적 위험 분석법으로도 역시 알려져 있다. 이러한 방법은 환자 생존 기간에 종양 마커의 예후적 수치를 테스트하는 표준이 된다. 다중변수 방식으로 사용 될 때, 여러 공변수들의 효과가 동시에 테스트되고, 이로써 독립적인 예후적 수치를 가지는 개별적인 공변수들, 예로 가장 유용한 마커들이 확인될 수 있다. 용어 음성 또는 양성 "IGF-1R 상태"는 [IGF-1R (-)] 또는 [IGF-1R (+)]라고도 역시 약칭될 수 있다.
- [0122] 시료는 암의 진단 또는 모니터링 동안 "점수 매김"될 수 있다. 가장 단순한 형태로인 점수 매김은 면역조직화 학법에 의한 시료들의 시각적 조사에 의해 판단되는 바와 같이 분류상 음성 또는 양성일 수 있다. 보다 정량적 인 점수 매김에는 2개 매개변수들, 염색의 강도 및 시료화된 염색된 ("양성") 세포들의 비율을 판단하는 단계가 관여한다.
- [0123] 본 발명의 의미 내에서 "IGF-1R 상태"는 면역조직화학법 (IHC), 형광 활성화 세포 선별법 (FACS) 또는 당업자에 의해 숙지된 기타 방법들과 같은 임의의 방법들에 의해 측정된 바와 같이 IGF-1R의 발현 수준의 결정을 기초로 하는 IGF-1R 양성 [IGF-1R (+)] 또는 IGF-1R 음성 [IGF-1R (-)]으로 종양의 분류에 관한 것이다.
- [0124] 한 가지 구현예에서, 표준화를 입증하도록 시료들은 서로 다른 척도들 상에서 IGF-1R 발현 수준들에 대하여 점 수 매겨질 수 있고, 이들 대부분은 반응 산물의 강도 및 양성 세포들의 백분율의 평가를 기초로 한다 (Payne et al., Predictive markers in breast cancer - the present, Histopathology, 2008, 52: 82-90).
- [0125] 또 다른 구현예에서, 상세하게 본 발명의 방법의 단계 (c)에서 상기 점수 매김은 염색의 강도 및 양성 세포들의 백분율을 기초로 하여 적당한 척도를 사용하는 것을 포함한다.
- [0126] 첫 번째 예로서, 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체의 IHC 평가를 위한 퀵 올레드 점수 매김 (Quick Allred scoring)으로의 유추에 의해, 시료들은 반응의 강도 및 염색된 세포들의 비율에 대한 점수들을 조합하는 0부터 8까지의 광범위한 척도 상에 IGF-1R 발현 수준들에 대한 점수가 매겨질 수 있다 (Harvey JM, Clarck GM, Osborne CK, Allred DC, J. Clin. Oncol., 1999, 17: 1474-1481). 보다 상세하게, 반응 강도의 첫 번째 판단 기준은 0부터 3까지의 척도 상에 점수 매겨지고, 0은 "무반응성"에 해당하고 3은 "강한 반응성"에 해당한다. 반응 비율의 두 번째 판단기준은 0부터 5까지의 척도 상에 점수 매겨지고, 0은 "무반응성"에 해당하고 5는 "67 내지 100%의 반응 비율"에 해당한다. 다음으로 반응 강도의 점수 및 반응 비율 점수는 0 내지 8의 전체 점수를 생성하도록 합산된다. 0 내지 2의 전체 점수는 음성으로서 고려되는 한편 3 내지 8의 전체 점수는 양성으로서 고려된다.
- [0127] 이러한 척도에 따르면, 본 명세서에서 사용되는 종양들 또는 종양성 세포들의 음성 또는 양성 "IGF-1R 상태" 용 어들은 각각 올레드 척도 상에서 점수들 0 내지 2 또는 3 내지 8에 해당하는 IGF-1R의 발현 수준들을 말한다.
- [0128] 본 명세서에서 하기 표 4는 올레드 방법에 따라 IHC 결과들을 해석하는 지침들을 설명한다.

표 4

면역 반응성의 강도	점수 1	반응 비율	점수 2
무반응성	0	무반응성	0
약한 반응성	1	<1%	1
적당한 반응성	2	1-10%	2
강한 반응성	3	11-33%	3
	-	34-66%	4
	-	67-100%	5
전체 점수		해석	
(점수 1 + 점수 2)			
0-2		음성	
3-8		양성	

[0129]

[0130] 본 발명에 따르면, 본 방법은 상기 적당한 척도가, 무반응성은 0으로 점수 매겨지고, 67 내지 100% 반응 비율의 비율로의 강한 반응성은 8로 점수 매겨지는 0 내지 8의 척도인 것을 특징으로 한다.

[0131] 따라서, 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따라 개체에서 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 점수를 시험관내 또는 생체외에서 결정하는 방법들은 단계 (c)에서 상기 적당한 척도가, 무반응성은 0으로 점수 매겨지고 67 내지 100% 반응 비율의 비율로의 강한 반응성은 8로 점수 매겨지는 0 내지 8의 척도인 것을 특징으로 한다.

[0132] 다른 말로 하면, 개체로부터 얻은 종양 또는 종양성 세포들의 상태를 시험관내 또는 생체외에서 결정하는 방법으로서,

[0133] (a) 올레드 척도에 따라 개체로부터 얻은 종양 또는 종양성 세포들을 점수 매기는 단계; 및

[0134] (b) i) 종양 또는 종양성 세포들의 상태가 3 내지 8의 올레드 점수로 [IGF-1R (+)]인 것으로 결정하거나;

[0135] ii) 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 0 내지 2의 올레드 점수로 [IGF-1R (-)]인 것으로 결정하는 단계:

[0136] 를 포함하는, 방법이 기술되고 청구된다.

[0137] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 3의 올레드 점수로 [IGF-1R (+)]이다.

[0138] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 4의 올레드 점수로 [IGF-1R (+)]이다.

[0139] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 5의 올레드 점수로 [IGF-1R (+)]이다.

[0140] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 6의 올레드 점수로 [IGF-1R (+)]이다.

[0141] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 7의 올레드 점수로 [IGF-1R (+)]이다.

[0142] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 8의 올레드 점수로 [IGF-1R (+)]이다.

[0143] 본 발명의 또 다른 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 3 내지 8의 올레드 점수로 [IGF-1R (+)]이다.

- [0144] 본 명세서에서 기술된 또 다른 상세한, 개체에서 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태를 시험관내 또는 생체 외에서 결정하는 방법으로서,
- [0145] (a) 본 발명의 방법에 따라 개체로부터 얻은 IGF-1R 종양성 세포들 또는 종양을 점수 매기는 단계;
- [0146] (b) 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태를 3 내지 8의 점수로 [IGF-1R (+)]인 것으로 결정하는 단계; 및
- [0147] (c) 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태를 0 내지 2의 점수로 [IGF-1R (-)]인 것으로 결정하는 단계;
- [0148] 를 포함하는, 방법이 기술된다.
- [0149] 두 번째 예로서, 예를 들면 HER-2 수용체의 IHC 평가를 위한 통상적인 점수 매김으로의 유추에 의해, 시료들은 염색의 강도 (바람직하게 막 염색) 및 0부터 3+까지의 조합된 척도 내의 염색을 보여주는 세포들의 비율을 통합하는 약간 더 단순한 점수 매김 방법으로 IGF-1R 발현 수준들에 대하여 점수 매겨질 수 있다.
- [0150] 단순화된 척도라고 말하는 이러한 척도에서, 0 및 1+는 음성인 반면 2+ 및 3+는 양성 염색을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 점수들 1+ 내지 3+는 각각의 양성 점수가 점수 0 (음성)과 비교할 때 재발 및 치명적 질환에 대한 유의하게 더 높은 위험성과 연관될 수 있고, 양성 점수들 중에서 증가되는 강도는 추가적인 위험성 감소를 제공할 수 있기 때문에 양성으로서 기록될 수 있다.
- [0151] 일반적으로 말하자면, 본 상세한 설명에서 사용되는 용어들 종양 또는 종양성 세포들의 음성 또는 양성 "IGF-1R 상태"는 단순화된 척도 상에서 각각 점수들 0 내지 1+ 또는 2+ 내지 3+에 해당하는 IGF-1R의 발현 수준들을 말한다. 침습성 종양의 완전한 주위 막 반응성만이 고려되어야 하고, 종종 "닭장 와이어" 모양을 닮아 있다. 현재의 지침들 하에서, IGF-1R에 대한 경계선 (2+ 또는 3+의 점수)으로서 점수 매겨진 시료들은 심화 평가를 거치도록 요구된다. 비제한적인 예로서 대조군들이 예상된 바와 다르게, 인공물들이 대부분의 시료에 포함되며, 시료가 과도한 항원 복구를 제시하는 정상 유방 도관들 (내부 대조군들)의 강한 막 양성을 가지는 경우라면, IHC 분석은 거절되어 반복되거나 FISH 및 다른 방법에 의해 테스트되어야 한다.
- [0152] 보다 명확하게, 본 명세서에서 하기 표 5는 이들 매개변수들을 요약하고 있다.

표 5

IGF-1R 상태	IHC 설명
0	10% 이하의 종양성 세포에서 반응성 또는 막 반응성 없음
1 ⁺	희미한/거의 감지불가능한 막 반응성이 10% 이상의 종양성 세포에서 검출된다. 세포는 막의 일부에서만 면역 반응성을 가진다.
2 ⁺	약한 내지 적당한 완전 반응성이 10% 이상의 종양성 세포에서 관찰된다.
3 ⁺	강한 완전 반응성이 10% 이상의 종양성 세포에서 관찰된다.

- [0153]
- [0154] 본 발명의 방법은 상기 적당한 척도가 종양 세포들의 막 반응성 없음이 0으로 점수 매겨지고, 10% 이상의 종양 세포들에서 강한 완전한 반응성이 3+으로 점수 매겨지는 0 내지 3+의 척도인 것을 특징으로 한다.
- [0155] 보다 자세하게, 상기에 기술된 바와 같이, 상기 적당한 척도는 종양 세포들의 막 반응성 없음이 0으로 점수 매겨지고; 10% 이상의 종양 세포들에서 희미한 감지가 가능한 반응성이 1+로 점수 매겨지고; 10% 이상의 종양 세포들에서 약한 내지 적당한 완전한 반응성이 2+로 점수 매겨지고; 10% 이상의 종양 세포들에서 강한 완전한 반응성이 3+로 점수 매겨지는 0 내지 3+의 척도이다.

- [0156] 다른 말로 하면, 개체로부터 얻은 종양 또는 종양성 세포들의 상태를 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 방법으로서, (a) 상기에 기술된 바와 같이 단순화된 척도에 따라 개체로부터 얻은 종양 또는 종양성 세포들을 점수 매기는 단계; 및 (b) 종양 또는 종양성 세포들의 상태가 2+ 또는 3+의 점수로 [IGF-1R (+)]인 것으로 결정하는 단계; 또는 (c) 종양 또는 종양성 세포들의 상태가 0 또는 1+의 점수로 [IGF-1R (-)]인 것으로 결정하는 단계를 포함하는, 방법이 기술되고 청구된다.
- [0157] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 2+의 점수로 [IGF-1R (+)]이다.
- [0158] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 3+의 점수로 [IGF-1R (+)]이다.
- [0159] 본 발명의 상세한 관점에서, 종양 또는 종양성 세포들의 상태는 2+ 또는 3+의 점수로 [IGF-1R (+)]이다.
- [0160] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 개체에서 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태를 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 방법으로서,
- [0161] (a) 상기에 기술된 본 발명의 방법에 따라 상기 개체로부터 얻은 상기 IGF-1R 종양성 세포들 또는 상기 종양을 점수 매기는 단계; 및
- [0162] (b) i) 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태가 2+ 또는 3+의 점수로 [IGF-1R (+)]인 것으로 결정하거나;
- [0163] ii) 종양성 세포들의 IGF-1R 상태가 0 또는 1+의 점수로 [IGF-1R (-)]인 것으로 결정하는 단계를
- [0164] 를 포함하는, 방법에 관한 것이다.
- [0165] 일반적으로, 테스트 또는 검정법의 결과들은 임의의 다양한 포맷들로 제시될 수 있다. 결과들은 정량적으로 제시될 수 있다. 예를 들면, 테스트 보고서는 아마도 검출 한계들의 지시와 함께 특정한 폴리펩타이드가 검출되었는지 여부만을 역시 표시할 수 있다. 결과들은 반정량적으로 도시될 수 있다. 예를 들면, 다양한 범위들이 정의될 수 있고, 범위들은 소정의 정도의 정량적 정보를 제공하는 점수 (예로, 사용된 척도에 의존하여 0 내지 3+ 또는 0 내지 8)로 배정될 수 있다. 이러한 점수는 다양한 요인들, 예로 IGF-1R이 검출된 세포들의 수, (IGF-1R의 발현 또는 IGF-1R-보유 세포들의 수준을 표시할 수 있는) 신호의 강도 등을 반영할 수 있다. 결과들은 정량적인 방식으로, 예로 IGF-1R이 단백질 농도로서 검출되는 세포들의 백분율 등으로서 도시될 수 있다.
- [0166] 당업자에 의해 이해될 바와 같이, 테스트에 의해 제공되는 결과의 유형은 테스트의 기술적인 한계들 및 폴리펩타이드의 검출과 연관된 생물학적 유의성에 의존하여 변화할 것이다. 예를 들면, 소정의 폴리펩타이드들의 경우에 순수하게 정량적인 결과 (예로, 폴리펩타이드가 소정의 검출 수준에서 검출되는지 여부)는 유의한 정보를 제공한다. 다른 경우들에서는 더욱 정량적인 결과 (예로, 테스트된 시료에서 폴리펩타이드의 발현 수준의 정상 수준 대비 비율)가 필요하다.
- [0167] 또 다른 관점에서, 개체에서 병리학적 과다증식 종양원성 장애 또는 IGF-1R의 발현과 연관된 병리학적 병태에 대한 감수성을 진단하는 방법으로서,
- [0168] (a) 본 발명에 따른 IGF-1R를 발현하는 세포들의 검출 방법 및/또는 IGF-1R의 발현 수준을 결정하는 방법에 의해 시료에서 IGF-1R를 보유하는 세포들의 존재 또는 부재를 결정하는 단계; 및
- [0169] (b) 상기 IGF-1R를 보유하는 세포들의 존재 또는 부재를 기초로 하여 병리학적 병태 또는 병리학적 병태에 대한 감수성을 진단하는 단계;
- [0170] 를 포함하는, 방법이 기술된다.
- [0171] 본 명세서에서 기술된 방법들에서, IGF-1R를 발현하는 세포들의 검출 또는 IGF-1R의 수준들에서 증가는 일반적으로 IGF-1R 매개성 장애를 가지거나 이를 가진 것으로 의심되는 환자를 지시한다.
- [0172] 본 발명은 또한 암을 발생시킬 개인의 위험성을 예측하는 방법으로서, 본 발명에 따른 IGF-1R를 발현하는 세포들의 검출 방법 및/또는 IGF-1R의 발현 수준을 결정하는 방법에 의해 조직 시료에서 IGF-1R의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 방법을 제공하고, 여기에서 IGF-1R 발현의 높은 수준은 암을 발생시킬 높은 위험성을 지시한다.
- [0173] 본 발명은 또한 종양 공격성을 평가하는 방법에 관한 것이다.
- [0174] "종양 공격성"은 본 명세서에서 사용되는 바 빠르게 성장하고 신속하게 확산하려는 종양을 말한다.

- [0175] 한 가지 구현예에서, 상기 종양 공격성을 평가하는 방법은
- [0176] (a) 본 발명에 따른 IGF-1R를 발현하는 세포들의 검출 방법 및/또는 IGF-1R의 발현 수준을 결정하는 방법에 의해, 종양 시료의 세포들에 의해 발현된 IGF-1R의 수준을 결정하는 단계;
- [0177] (b) 본 발명에 따른 IGF-1R를 발현하는 세포들의 검출 방법 및/또는 IGF-1R의 발현 수준을 결정하는 방법에 의해, 동일한 개인으로부터 채취한 동등한 조직 시료에서 발현된 IGF-1R의 수준을 이후 시간대에 결정하는 단계; 및
- [0178] (c) 단계 (a)에서 획득된 발현 수준 및 단계 (b)에서 획득된 것 간의 비율을 결정하고, 시간 경과 시 종양 시료에서 IGF-1R 발현의 비율은 암 진행의 위험성들에 관한 정보를 제공하는 단계;
- [0179] 를 포함한다.
- [0180] 바람직한 구현예에서, 1 초과인 단계 (b)에서 획득된 수준 대비 단계 (a)에서 획득된 수준의 비율은 공격성을 지시한다. 또 다른 구현예에서, 1 이하의 비율은 비공격성을 지시한다.
- [0181] 본 발명의 또 다른 관점은 본 발명에 따른 발현의 검출 방법, 및/또는 IGF-1R 발현을 정량하는 방법, 및/또는 발현 수준을 결정하는 방법이 관여하여 IGF-1R 경로를 표적하는 요법의 투여에 반응하여 IGF-1R 발현을 모니터링하는 것이다. 이러한 모니터링은 상기 요법이 IGF-1R의 저하조절 및/또는 분해를 촉발시킬 때 매우 유용할 수 있다.
- [0182] 본 발명은 목적은 또한 종양원성 장애가 IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물로의 치료에 감수성을 가지는지 여부를 결정하는 방법으로서,
- [0183] (a) 상기에 기술된 바와 같이 본 발명의 점수매김의 방법에 따라 개체의 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태를 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 단계; 및
- [0184] (b) 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태가 IGF-1R(+)인 경우라면, 종양원성 장애가 IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물로의 치료에 감수성을 가지는 것으로 결정하는 단계;
- [0185] 를 포함하는, 방법을 기술하는 것이다.
- [0186] 상세하게, 세포 표면 상에서 IGF-1R 발현을 모니터링하는 것은 임상 시험들 및 "개인화된" 요법들 동안 치료의 효능을 평가하는 결정적인 도구가 될 수 있다.
- [0187] 본 출원은 이에 따라 개체를 위한 적당한 치료적 요법을 결정하는 방법들을 제공한다.
- [0188] 본 발명에 따른 발현의 검출 방법 및/또는 발현 수준을 결정하는 방법에 의해 결정될 수 있는 IGF-1R 수준의 증가 또는 감소는 IGF-1R와 연관된 암의 진화를 지시한다. 따라서, 다양한 조직들 또는 세포들에 존재하는 IGF-1R를 발현하는 세포들의 수에서 증가 또는 IGF-1R의 농도에서 변화들을 측정하여, IGF-1R와 연관된 악성을 개선하려는 목적을 가진 특정한 치료적 요법이 효과적인지 여부를 결정하는 것이 가능하다.
- [0189] 본 발명의 또 다른 목적은 또한 종양원성 장애로 고생하는 개체에서 IGF-1R과 연관된 상기 장애를 완화하도록 설계된 치료적 요법의 효능을 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 방법으로서,
- [0190] (a) 상기에 기술된 바와 같이 본 발명에 따른 발현의 검출 방법 및/또는 발현 수준을 결정하는 방법에 의해 첫 번째 생물학적 시료에서 IGF-1R의 첫 번째 발현 수준을 결정하고, 상기 첫 번째 생물학적 시료는 상기 치료의 첫 번째 시간대에 해당하는 단계;
- [0191] (b) 상기에 기술된 바와 같이 본 발명에 따른 발현의 검출 방법 및/또는 발현 수준을 결정하는 방법에 의해 두 번째 생물학적 시료에서 IGF-1R의 두 번째 발현 수준을 결정하고, 상기 두 번째 생물학적 시료는 상기 치료의 두 번째 이후의 시간대에 해당하는 단계;
- [0192] (c) 단계 (b)에서 획득된 상기 두 번째 발현 수준 대비 단계 (a)에서 획득된 상기 첫 번째 발현 수준의 비율을 계산하는 단계; 및
- [0193] (d) 단계 (c)의 비율이 1 초과일 때, 상기 치료적 요법의 효능이 높은 것으로 결정하거나; 단계 (c)의 비율이 1 이하일 때, 상기 치료적 요법의 효능이 낮은 것으로 결정하는 단계;
- [0194] 를 포함하는, 방법이다.

- [0195] 바람직한 구현예에서, 중앙원성 장애로 고생하는 개체에서 IGF-1R과 연관된 상기 장애를 완화하도록 설계된 상기 치료적 요법은 상기 개체에 IGF-1R를 표적하는 요법의 투여를 포함한다.
- [0196] 본 발명의 목적은 또한 본 발명에 따른 발현의 검출 방법 및/또는 발현 수준을 결정하는 방법을 사용하여 IGF-1R의 발현과 연관된 중앙원성 장애를 촬영하는 생체내 방법을 제공하는 것이다. 이러한 방법은 중앙성 세포들을 생체내에 정착시키는 데 뿐만 아니라 그들의 침습성을 모니터링하는 데 유용하다. 마찬가지로, 본 방법은 이전에 IGF-1R-매개성 암으로 진단된 환자들에서 진행 및/또는 치료에 대한 반응을 모니터링하는 데 유용하다.
- [0197] 한 가지 구현예는 개체에서 IGF-1R을 발현하는 중앙성 세포들의 위치를 검출하는 방법으로서,
- [0198] (a) 상기 개체에 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계; 및
- [0199] (b) 상기 IGF-1R 항체의 결합을 검출하고, 여기에서 상기 결합은 중앙성 세포들의 존재를 지시하는 단계:
- [0200] 를 포함하는, 방법이다.
- [0201] IGF-1R를 발현하는 중앙의 존재의 검출에 관하여, 당업자에 의해 숙지되어 있는 많은 기법들이 사용될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 바람직한 수단들은 IHC 및 FACS이다.
- [0202] 또 다른 관점에서, 본 발명은 생체내 촬영 시약을 제공하고, 상기 시약은 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 IGF-1R 항체는 바람직하게 표지되고, 더욱 바람직하게는 방사선 표지된다.
- [0203] 본 발명은 또한 IGF-1R-매개성 암으로 고생하는 환자의 의학적 촬영에서 상기 시약의 용도를 고려한다.
- [0204] 본 발명의 방법은
- [0205] (a) 본 발명의 촬영 시약의 촬영-유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계; 및
- [0206] (b) 상기 시약을 검출하는 단계:
- [0207] 를 포함한다.
- [0208] 바람직한 구현예에서, 촬영 시약은 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 활성 분체를 포함한다.
- [0209] "활성 분체"는 본 명세서에서 사용되는 바 상기 촬영 시약의 생체내 검출을 허용하는 제제이다. 본 발명에 따른 활성 분체는 상세하게 테크네튬-99m (99mTc), 구리-67 (Cu-67), 스칸듐-47 (Sc-47), 루테튬-77 (Lu-177) 구리-64 (Cu-64), 이트륨-86 (Y-86) 또는 요오드-124 (I-124)와 같은 방사성 원소들을 포함한다.
- [0210] 촬영 시약은 인간과 같은 포유동물에서 진단적 용도를 위한 유효량으로 투여되고, 다음으로 촬영 시약의 정착 및 축적이 검출된다. 촬영 시약의 정착 및 축적은 방사성 핵종 촬영법, 방사성 섬광조영술, 핵자기 공명 촬영법, 컴퓨터화된 단층촬영법, 양전자 방출 단층촬영법, 컴퓨터화된 축 단층촬영법, X-선 또는 자기공명 촬영 방법, 형광 검출법 및 화학발광 검출법에 의해 검출될 수 있다.
- [0211] 표적화 항중앙 요법의 개발에 관하여, 면역조직학적 기법들로의 진단은 예로 중앙의 크기 및/또는 위치를 고려하는 수용체 발현 수준에 대한 제자리 정보를 준다. 진단은 이에 따라 이러한 치료에 필요한 수용체들의 발현 수준에 이어서 치료에 대한 감수성을 가진 환자들을 선별하도록 한다.
- [0212] 본 발명의 상세한 흥미로운 관점은 IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물의 치료량의 투여로부터 유익을 얻을지 여부가 예측되는 암 환자를 선별하는 방법으로서,
- [0213] (a) 상기에 기술된 본 발명의 방법에 따라 IGF-1R의 발현 수준을 결정하는 단계;
- [0214] (b) 상기 단계 (a)의 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계;
- [0215] (c) 기준 발현 수준 대비 단계 (a)에서 획득된 발현 수준의 비율이 1 초과인 경우라면, IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물의 치료로부터 유익을 얻을 것으로 예측되는 것으로서 환자를 선별하는 단계; 및
- [0216] (d) 기준 발현 수준 대비 단계 (a)에서 획득된 발현 수준의 비율이 1 이하인 경우라면, IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물의 치료로부터 유익을 얻을 것으로 예측되지 않는 것으로서 환자를 선별하는 단계:
- [0217] 를 포함하는, 방법이다.
- [0218] IGF-1R의 발현 수준은 유리하게 "기준 수준" 또는 "기준 발현 수준"이라고도 역시 말하는 대조군 세포 또는 시

료의 수준들과 대비하여 비교되거나 측정된다. "기준 수준", "기준 발현 수준", "대조군 수준" 및 "대조군"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. "대조군 수준"은 일반적으로 질환 또는 암이 없는 비교가능한 대조군 세포에서 측정되는 개별적 기저선 수준을 의미한다. 상기 대조군 세포는 암성 환자에서도 종양의 부위인 조직이 여전히 건강한 비종양 조직을 포함하기 때문에, 동일한 개인으로부터 얻을 수 있다. 이것은 병든 시료 또는 테스트 시료가 획득된 정상이거나 동일한 질환을 나타내지 않은 또 다른 개인으로부터도 역시 기원할 수 있다. 본 발명의 맥락 내에서, 용어 "기준 수준"은 환자의 시료를 포함하는 암 세포에서 IGF-1R 발현의 테스트 수준을 평가하는 데 사용되는 IGF-1R 발현의 "대조군 수준"을 말한다. 예를 들면, 환자의 생물학적 시료에서 IGF-1R의 수준이 IGF-1R의 기준 수준보다 더 높을 때, 세포들은 IGF-1R의 높은 수준의 발현 또는 과다발현을 가지는 것으로 고려될 것이다. 기준 수준은 다수의 방법들에 의해 결정될 수 있다. 발현 수준들은 이에 따라 IGF-1R을 보유하는 세포들을 정의할 수 있거나, 대안적으로는 IGF-1R의 발현 수준이 IGF-1R를 발현하는 세포들의 수와는 독립적이다. 따라서 각각의 환자를 위한 기준 수준은 IGF-1R의 기준 비율에 의해 처방될 수 있고, 여기에서 기준 비율은 본 명세서에서 기술된 기준 수준들을 결정하는 임의의 방법들에 의해 결정될 수 있다.

[0219] 예를 들면, 대조군은 선결정된 수치일 수 있고, 이는 다양한 형태들을 취할 수 있다. 이것은 중앙값 또는 평균 값과 같은 단일한 컷오프 수치일 수 있다. "기준 수준"은 개인적으로 모든 환자에게 동일하게 적용가능한 단일한 숫자일 수 있거나, 기준 수준이 환자들의 특이적 소집단들에 따라 변화할 수 있다. 따라서, 예를 들면 동일한 암의 경우에 늙은 남성들은 젊은 남성들과 다른 기준 수준을 가질 수 있을 것이고, 동일한 암의 경우에 여성들은 남성들과 다른 기준 수준을 가질 수 있을 것이다. 대안적으로, "기준 수준"은 테스트될 신생물성 세포들의 조직과 동일한 조직으로부터 얻은 비-종양원성 암 세포들에서 IGF-1R의 발현 수준을 측정하여 결정될 수 있다. 마찬가지로, "기준 수준"은 동일한 환자 내에서 비-종양의 IGF-1R 수준들과 대비한 환자의 신생물성 세포들에서 IGF-1R의 소정의 비율일 수 있다. "기준 수준"은 또한 *시퀀스내* 배양된 세포들의 IGF-1R 수준일 수 있고, 이는 종양 세포들을 모방하도록 조작될 수 있거나, 기준 수준을 정확하게 결정하는 발현 수준을 수득하는 임의의 다른 방식으로 조작될 수 있다. 한편으로, "기준 수준"은 증가된 IGF-1R 수준들을 가지지 않는 그룹들 및 증가된 IGF-1R 수준들을 가지는 그룹들과 같은 비교 그룹들을 기초로 하여 확립될 수 있다. 비교 그룹들의 또 다른 예는 특정한 질환, 병태 또는 증상을 가지는 그룹들 및 질환이 없는 그룹들일 것이다. 예를 들면 테스트된 집단이 저-위험성 그룹, 중-위험성 그룹 및 고-위험성 그룹과 같은 그룹들로 동일하게 (또는 차별되게) 나뉘어지는 선결정된 수치가 배정될 수 있다.

[0220] 기준 수준은 또한 동일한 암을 가지는 환자들의 집단들에서 IGF-1R 수준의 비교에 의해 결정될 수 있다. 이것은 예를 들면 히스토그램 분석법에 의해 달성될 수 있고, 여기에서 환자들의 전체 코호트는 그래프로 제시되고, 첫 번째 축은 IGF-1R의 수준을 나타내고, 두 번째 축은 종양 세포들이 IGF-1R를 주어진 수준으로 발현하는 코호트에서 환자들의 수를 나타낸다. 환자들의 2개 이상의 분리된 그룹들은 IGF-1R의 동일한 또는 유사한 수준들을 가지는 코호트의 소집합 집단들의 확인에 의해 결정될 수 있다. 다음으로 기준 수준의 결정은 이들 분리된 그룹들을 가장 잘 구별하는 수준을 기초로 하여 이루어질 수 있다. 기준 수준은 또한 그 중 하나가 IGF-1R가 되는 둘 이상의 마커들의 수준들을 나타낼 수도 있다. 둘 이상의 마커들은 예를 들면 각각의 마커 수준의 수치들의 비율에 의해 나타내질 수 있다.

[0221] 마찬가지로, 외관상으로 건강한 집단은 IGF-1R의 발현과 연관된 병태를 가진 것으로 알려진 집단이 가진 것과 다른 '정상' 범위를 가질 것이다. 따라서, 선택된 선결정된 수치는 개인이 속하는 카테고리들 고려할 수 있다. 적당한 범위들 및 카테고리들은 단지 당업자들에 의한 일상적인 실험법만으로 선택될 수 있다. "상승된", "증가된"에 의하여, 이것은 선택된 대조군과 대비하여 높음을 의미한다. 전형적으로 대조군은 적당한 연령 계층에서 외관상으로 건강한 정상 개인들을 기초로 할 것이다.

[0222] 또한 본 발명에 따른 대조군들은 선결정된 수치들에 추가하여, 실험적 물질들과 동시에 테스트된 물질들의 시료들일 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예들로는 동일한 개체로부터 동시에 획득된 조직 또는 세포들, 예를 들면 단일한 생검의 일부들 또는 개체로부터 얻은 단일한 세포 시료의 일부들을 포함한다.

[0223] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 IGF-1R의 발현과 연관된 종양원성 장애를 *생체내*에서 촬영하는 약제학적 조성물로서, 상기에 기술된 본 발명에 따른, 표지된 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0224] 또 다른 관점에서, 환자에서 IGF-1R를 발현하는 종양성 세포들의 검출을 위한 키트로서, 상기에 기술된 바와 같이 적어도 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 바람직하게 항체 816C12를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트도 역시 기술된다.

- [0225] 진단적 검정법들을 수행하기 위한 지침들과 선결정된 양들의 시약들의 조합을 포함하는 포장된 물질들, 예로 키트들도 역시 본 발명의 범주 내에 속한다. 키트는 *시험관내* 예로 엘라이자로 IGF-1R의 검출 및 정량을 위한 IGF-1R 항체들을 포함한다. IGF-1R 항체가 효소로 표지된 곳에서, 키트는 효소에 의해 요구되는 지질들 및 보조인자들 (예로, 검출가능한 발색단 또는 형광단을 제공하는 기질 전구물질)을 포함할 것이다. 또한, 다른 추가물들이 안정화제들, 완충액들 (예로, 차단 완충액 또는 용해 완충액) 등과 같이 포함될 수 있다. 이러한 키트는 바이알들, 튜브들 등과 같은 하나 이상의 용기들을 수용하도록 구획화된 보관용기 (receptacle)를 포함할 수 있고, 이러한 용기들은 본 발명의 개별적 요소들을 보유한다. 예를 들면, 하나의 용기는 불용성 또는 부분적 용해성 담체와 결합된 첫 번째 항체를 포함할 수 있다. 두 번째 용기는 용해성, 검출가능-표지된 두 번째 항체를 동결건조된 형태로 또는 용액에 포함할 수 있다. 보관용기는 또한 검출가능하게 표지된 세 번째 항체를 동결건조된 형태로 또는 용액에 보유하는 세 번째 용기를 포함할 수 있다. 이러한 특성의 키트는 본 발명의 샌드위치 검정법에 사용될 수 있다. 표지 또는 포장 삽입물은 조성물의 상세한 설명뿐만 아니라 의도된 *시험관내* 또는 진단적 용도를 위한 지침들을 제공할 수 있다.
- [0226] 다양한 시약들의 상대적 양들은 검정법의 민감도를 실질적으로 최적화하는 시약들의 용액에서 농도를 제공하도록 광범위하게 변화될 수 있다. 상세하게, 시약들은 용해 시 적당한 농도를 가지는 시약 용액을 제공할 부형제들을 포함하는, 보통 동결건조된, 건조 분말들로서 제공될 수 있다.
- [0227] 또한 다른 관점에서, 본 명세서에서 상술된 본 발명에 따른 IGF-1R 항체들 또는 그들의 항원-결합 단편들은 검출가능한 분체와 함께 제공되고 이로 표지됨으로써, 그들은 상기 언급된 항원을 가지는 세포들을 진단하거나 확인하도록 예를 들면 키트들에 포장되어 사용될 수 있다. 이러한 표지들의 비제한적인 예들은 플루오로세린 이소티오시아네이트와 같은 형광단들, 발색단들, 방사선 핵종들, 바이오틴 또는 효소들을 포함한다. 이러한 표지된 IGF-1R 항체들은 예를 들면 항원의 조직학적 정착, 엘라이자, 세포 선별법, 뿐만 아니라 IGF-1R 및 이러한 항원을 보유하는 세포들을 검출하거나 정량하는 다른 면역학적 기법들에 사용될 수 있다.
- [0228] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편들을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트에 관한 것이다.
- [0229] 본 발명은 또한 키메라 또는 인간화 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편들을 포함하고, 이는 본 발명에 따른 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편들의 서열번호들 1 내지 6의 서열들을 가지는 6개의 CDR들로부터 획득될 수 있는 것을 특징으로 하는 키트에 관한 것이다.
- [0230] 세포들로부터 IGF-1R의 정제 또는 면역침전을 위해 양성 대조군으로서 유용한 키트들도 역시 제공된다. IGF-1R의 분리 및 정제를 위해, 키트는 본 명세서에서 상술된 바와 같이 본 발명에 따른, 비드들 (예로, 세파로스 비드들)과 결합된 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편들을 포함할 수 있다. *시험관내*, 예로 엘라이자로 IGF-1R의 검출 및 정량을 위한 항체들을 포함하는 키트들이 제공될 수 있다. 키트는 용기 및 용기 상의 또는 이와 연관된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 예로 희석제들 및 완충액들, 대조군 항체들을 포함하는 추가적인 용기들이 포함될 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물의 상세한 설명뿐만 아니라 의도된 *시험관내* 또는 진단적 용도를 위한 지침들을 제공할 수 있다.
- [0231] 보다 상세하게, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 방법들에 의한 개체에서 종양성 세포들 또는 종양의 IGF-1R 상태의 *시험관내* 또는 *생체외* 결정을 위한 키트에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 실시예에서 기술된 바와 같이, 본 발명은 IHC 및/또는 FACS 방법들에 의한 종양 또는 종양성 세포들의 IGF-1R 상태의 결정을 위한 키트에 관한 것이다.
- [0232] 상세한 구현예에서, 본 발명은 상기에 기술된 바와 같은 본 발명의 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 적어도 포함하고 상기 항체는 표지되는, 키트로 구성된다.
- [0233] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 키트는 상기 IGF-1R 항체 및 IGF-1R 간의 결합 정도를 검출하는 데 유용한 시약을 더 포함한다.
- [0234] 또 다른 바람직한 구현예에서, IGF-1R-발현 종양에서 IGF-1R의 발현 수준을 *시험관내* 또는 *생체외*에서 결정하는 데 유용한 본 발명의 키트는 상기 표지된 IGF-1R 항체 및 IGF-1R 간의 결합 수준을 정량하는 데 유용한 시약을 더 포함한다.
- [0235] 또한 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 키트는 i) 상기 표지된 IGF-1R 항체 및 IGF-1R 간의 결합 정도를 검출하는 데 유용한 시약; 및 ii) IGF-1R 발현 수준을 점수 매기는 데 유용한 양성 및 음성 대조군 시료들;을 더

포함한다.

- [0236] 상기 키트는 마우스 항체들 또는 인간/인간화 항체들에 대해 특이적인 다중클론 항체를 더 포함하고, 바람직하게는 마우스, 인간화 또는 인간 항체들에 대해 특이적인 상기 다중클론 항체는 표지된다.
- [0237] 본 발명의 상세한 구현예에 따르면, IGF-1R 경로를 표적하는 저해제의 치료적 투여로부터 유익을 얻을 수 있는 지 여부가 예측된 암 환자를 *시험관내*에서 선별하는 키트는 i) 상기 IGF-1R 항체 및 IGF-1R 간의 결합 정도를 검출하는 데 유용한 시약; ii) IGF-1R 저해제에 대한 민감성과 상관되었던 대조군 수준; 및/또는 iii) IGF-1R 저해제에 대한 저항성과 상관되었던 대조군 수준:을 포함할 수 있다.
- [0238] 본 발명은 또한 종양원성 장애를 가진 환자가 IGF-1R 경로를 표적하는 항체 약물로의 처리로부터 유익을 얻을 수 있는지 여부를 결정하는 키트로서, 상기에 기술된 바와 같이 본 발명의 IGF-1R 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트에 관한 것이다.
- [0239] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 상기 키트는
- [0240] i) 종양성 세포들의 표면 상에서 상기 IGF-1R 항체 및 IGF-1R 간의 결합 정도를 검출하는 시약; 및/또는
- [0241] ii) 종양성 세포들의 표면 상에서 상기 IGF-1R 항체 및 IGF-1R 간의 결합 정도를 정량하는 시약;
- [0242] 을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0243] 본 발명의 다른 특징들 및 장점들은 실시예들 및 하기에 간단한 설명이 주어진 도면들과 함께 상세한 설명과 연속하여 기술된다.

도면의 간단한 설명

- [0244] 도 1은 rhIGF1R 엘라이자에서 816C12 항체로 획득된 OD 수치들의 그래프 도시를 나타낸 것이다.
- 도 2a 내지 2c는 816C12 (도 2a), G11 항-IGF-1R 항체 (로슈 벤타나사) (도 2b) 또는 AF-305 (R & D 시스템사) 항-IGF-1R 항체 (도 2c)를 사용한 파라핀 포매된 종양 MCF-7의 인식의 면역조직화학 (IHC) 양상들을 나타낸 것이다.
- 도 3은 MCF-7 이종이식 모델에서 항-IGF-1R ADC의 *생체내* 활성을 나타낸 것이다.
- 도 4a 내지 4c는 816C12 (도 4a), G11 항-IGF-1R 항체 (로슈 벤타나사) (도 4b) 또는 AF-305 (R & D 시스템사) 항-IGF-1R 항체 (도 4c)를 사용한 파라핀 포매된 종양 SBC-5의 인식의 면역조직화학 (IHC) 양상들을 나타낸 것이다.
- 도 5는 SBC-5 이종이식 모델에서 항-IGF-1R ADC의 *생체내* 활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0245] **실시예 1: 816C12의 생성 및 선별**
- [0246] IGF-1R에게로 유도되어 생성되는 Mab들이 하기에 기술된 바와 같이 생산되어 선별되었다.
- [0247] 암컷 Balb/C 마우스들이 프런드 아류반트와 함께 10 ug의 재조합 인간 IGF-1R 단백질 (R & D 시스템사, 391-GR)로의 피하 주사에 의해 면역접종되었다. 면역접종은 2주 간격들로 3번 반복되었다. 4번째 주사는 아류반트의 존재 시 복강내 주사에 의해 이루어졌다.
- [0248] 3일 경과 이후에, 비장 세포들이 50% PEG와 함께 SP20Ag14 골수종 세포들과 융합되었다. 14일의 HAT 대사적 선별 이후에, 하이브리도마 상정액들이 인간 MCF7 유방암 세포들을 사용하는 FACS에 의해 테스트되었다. MCF7 결합 항체들만이 유지되었다.
- [0249] 관심 있는 항체들이 다음으로 제한 희석법에 의해 클론되었다. 클로닝 이후 8일째, 상정액들이 MCF7 세포들을 사용하는 FACS에 의해 다시 한 번 선별되었다. 3개의 양성 클론들이 유지되었다. 분비된 항체들의 이소형 (isotyping)이 서던 바이오테크놀로지사 (카탈로그 번호 5300-05)로부터 얻은 SBA 클론 이소타입핑 시스템-HRP 키트를 사용하여 결정된다. 마지막으로, 1개의 클론이 증식되고 냉동된다.
- [0250] 또한 816C12 항체의 특징 분석들이 다음으로 rhIGF-1R 또는 rmIGF-1R 또는 rhIR 엘라이자와 같이 하이브리도마 상정액을 사용하여 수행되었다. 직접적 엘라이자들 모두에서, 관심 있는 단백질들이 각각의 웰들에 고정되었다

(1 ug/ml). 포화 과정 이후에, 하이브리도마 상청액들이 웰들에 첨가되었다. 1시간의 배양 기간 및 세척 단계 이후에, 염소 항-마우스 IgG - HRP 표지된 다중클론 항체의 용액이 TMB 기질의 첨가 이전에 검출에 사용되었다. 반응은 OD를 450 nm 파장에서 분광광도계로 해독하기 이전에 1 M H₂SO₄ 용액으로 정지시켰다. 데이터는 다음의 표 6에 제시되어 있다.

표 6

엘라이자에 의해 5 µg/ml 에서 획득된 OD 수치들			
	rhIGF-1R 코팅	rmIGF-1R 코팅	rhIR 코팅
816C12	2.622	0.065	0.055
양성 CTRL	2.338	1.293	1.077
음성 CTRL	0.055	0.065	0.048

[0251]

[0252] rhIGF-1R 코팅 상에서 816C12 항체의 용량 반응 곡선이 도 1에 제시되어 있다. EC₅₀ 수치들은 프리즘 응용을 사용하여 결정된다.

[0253] 데이터는 816C12 항체만이 rh IGF-1R을 0.41 nM의 EC₅₀으로 인식하는 것을 보여주었다. 이것은 IGF-1R의 마우스 형태 또는 인간 IR 어느 것과도 결합하지 않는다.

[0254] **실시예 2: MCF-7 이종이식 모델에서 본 발명의 항체로의 병기 결정 및 IGF-1R을 표적하는 ADC의 활성의 상관성의 평가**

[0255] 약리학과 종양들의 등급 결정을 상호관련시키기 위하여, 종양들이 등급화되었고 (섹션 2.1), 다음으로 MCF-7 이종이식 모델 상에서 생체내 실험들이 내재화되는 것으로 알려진 IGF-1R를 표적하는 항체 분체 및 아우리스타틴으로 구성되는 약물 분체를 포함하는 ADC로 시행되었다 (섹션 2.2).

[0256] **2.1: MCF-7 이종이식 모델 상에서 IGF-1R 발현의 면역조직화학 검출**

[0257] MCF-7 이종이식편으로부터 얻은 조직의 절편들이 탈과라핀화되어 재수화되었으며, 98°C에서 열-유도된 에피토프 복구를 위해 98°C로 미리 데워진 비등하는 수조에 넣은 표적 복구 완충액 1× (다코사 S1699)에 40분 동안, 다음으로 표적 복구 완충액에 20분의 추가 시간 동안 놓아두었다. 트리스 완충 식염수 - 0.05% 트윈 20 (TBS-T) (다코사 S3006)에서 3번 세척들 이후에, 내인성 퍼옥시다제 활성이 퍼옥시다제 차단 시약 (다코사 K4007)을 사용하여 차단되었다. 절편들은 TBS-T로 세척되었고, 816C12 단일클론 항체 (5 ug/mL) 또는 음성 대조군으로서 IgG1/카파 (5 ug/ml, X0931, 다코사) 둘 중 하나와 상온에서 1시간 동안 배양 이전에 차단 시약 (올트라V 블록-TA-125UB- 램비전사)과 5분 동안 배양되었다. 절편들은 TBS-T로 세척되었고, 엔비전 (다코사)와 30분 동안 배양되었다. 디아미노벤지딘이 갈색 반응 산물 (다코사 K3468)의 현상에 사용되었다. 슬라이드들은 반대염색 (다코사 S3309)하도록 헤마톡실린에 2분 동안 침지되었다.

[0258] 본 발명의 항-IGF-1R 단일클론 항체 816C12는 MCF-7의 세포막을 차별적으로 염색한다. 이러한 IHC 과정에서, 갈색 반응 산물은 세포막의 양성 염색과 상호관련되고, 갈색 반응 산물의 결여는 세포막의 음성 염색 및 미관찰과 상호관련된다. 막성 알고리즘을 사용하여, MCF-7 종양 세포들의 염색에 대한 점수 매김은 3+이었다 (도 2a). G11 항체 (로슈 벤타나사) 또는 AF-305 (R & D 시스템사) 항-IGF-1R 항체들을 사용하여, 동일한 종양의 절편은 2+로 점수 매겨졌다 (각각 도 2b 및 2c).

[0259] **2.2: MCF-7 이종이식 모델에서 항-IGF-1R ADC의 생체내 활성**

[0260] 항-IGF-1R ADC가 MCF-7 이종이식 모델에서 생체내 평가되었다.

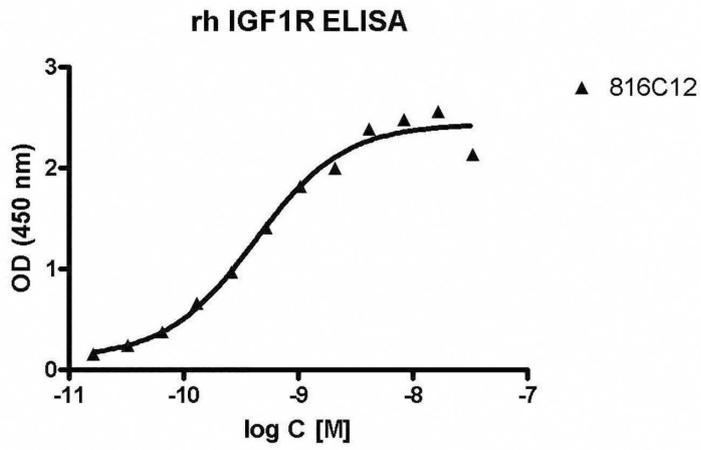
[0261] 모든 동물 절차들은 과학적 목적들에 사용되는 동물들의 보호에 관한 2010/63/UE 안내서의 지침들에 따라 수행되었다. 프로토콜은 피에르 파브르 연구소의 동물 윤리 위원회에 의해 승인되었다. 5백만 개의 MCF-7 세포들

이 7주령의 스위스-누드 마우스 내에 피하로 주사되었다. 세포 주사 이전에 에스트로겐 펠릿들 (아메리카 이노 베아타브 리서치사)이 MCF-7 종양들의 생체내 성장에 필요한 에스트로겐들을 방출하도록 마우스의 좌측 옆구리에 이식되었다.

- [0262] MCF-7 세포 이식 이후 12일째, 종양들이 120 내지 150 mm³의 평균 크기에 도달했을 때, 동물들은 종양 크기 및 관점에 따라 6마리의 그룹들로 나뉘었다. 항-IGF-1R ADC는 6회의 4일마다 주사 사이클 동안 복강내 주사에 의해 접종되었다 (Q4d4). 동물들의 건강 상태가 매일 모니터링되었다. 종양 부피는 연구 종결 시까지 전자 칼리퍼로 매주 2번 측정되었다. 종양 부피는 다음의 공식 $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$:로 계산된다. 독성은 동물들의 무게에 따라 매주 3번 평가되었다. 통계학적 분석들은 맨-윌트니 테스트를 사용하여 각각의 측정에서 수행되었다.
- [0263] 항-IGF-1R ADC의 주사는 3+ 등급이 매겨진 종양의 경우에 예상되지만 2+ 등급이 매겨진 종양에서는 그렇지 않은 바와 같이, 종양 성장을 유의하게 억제하였고, 심지어 완전한 종양 성장 퇴행을 유도하였다 (도 3).
- [0264] **실시예 3: SBC-5 이종이식 모델에서 본 발명의 항체로의 병기 결정 및 IGF-1R을 표적하는 ADC의 활성의 상관성의 평가**
- [0265] 약리학과 종양들의 등급 결정을 상호관련시키기 위하여, 종양들이 등급화되었고 (섹션 3.1), 다음으로 SBC-5 이종이식 모델 상에서 생체내 실험들이 IGF-1R를 표적하는 항체 분체 및 아우리스타틴으로 구성되는 약물 분체를 포함하는 ADC로 시행되었다 (섹션 3.2).
- [0266] **3.1: SBC-5 이종이식 모델 상에서 IGF-1R 발현의 면역조직화학 검출**
- [0267] IGF-1R의 수준이 이전 실시예 2의 섹션 2.1에서 기술된 동일한 프로토콜을 사용하여 분석되었다.
- [0268] IGF-1R이 816C12로 검출될 때, 낮은 수준들이 검출되었다 (1+) (도 4a). IGF-1R이 G11 항체 (로슈 벤타나사) 또는 AF-305 (R & D 시스템사) 항-IGF-1R 항체들로 검출될 때, 동일한 종양으로부터 얻은 절편들은 3+ 점수가 매겨졌다 (각각 도 4b 및 4c).
- [0269] **3.2: SBC-5 이종이식 모델에서 항-IGF-1R ADC의 생체내 활성**
- [0270] 항-IGF-1R ADC가 SBC-5 이종이식 모델에서 생체내 평가되었다.
- [0271] 모든 동물 절차들은 과학적 목적들에 사용되는 동물들의 보호에 관한 2010/63/UE 안내서의 지침들에 따라 수행되었다. 프로토콜은 피에르 파브르 연구소의 동물 윤리 위원회에 의해 승인되었다. 5백만 개의 MCF-7 세포들이 7주령의 무흉선 마우스 내에 피하로 주사되었다. MCF-7 세포 이식 이후 12일째, 종양들이 150 mm³의 평균 크기에 도달했을 때, 동물들은 종양 크기 및 관점에 따라 6마리의 그룹들로 나뉘었다. 항-IGF-1R ADC는 6회의 4일마다 주사 사이클 동안 복강내 주사에 의해 접종되었다 (Q4d6). 동물들의 건강 상태가 매일 모니터링되었다. 종양 부피는 연구 종결 시까지 전자 칼리퍼로 매주 2번 측정되었다. 종양 부피는 다음의 공식 $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$:로 계산된다. 독성은 동물들의 무게에 따라 매주 3번 평가되었다. 통계학적 분석들은 맨-윌트니 테스트를 사용하여 각각의 측정에서 수행되었다.
- [0272] 1+ 등급이 매겨진 종양의 경우에 예상되지만 3+ 등급이 매겨진 종양에서는 그렇지 않은 바와 같이, SBC-5 종양성 세포들의 종양 진행은 항-IGF-1R ADC의 주사에 의해 영향을 받지 않았다 (도 5).

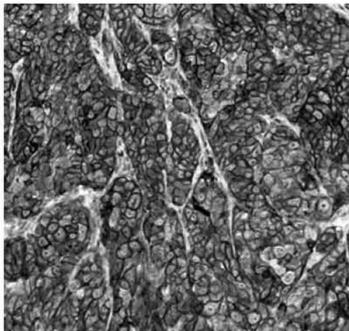
도면

도면1

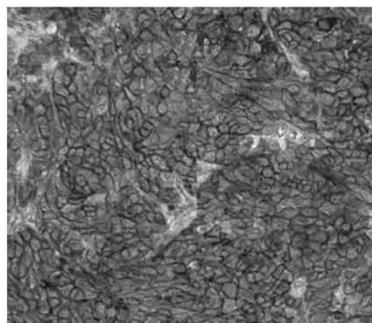


	816C12
S자형 용량-반응 (가변 기울기)	
최상 맞춤-수치	0.1163
바닥	2.438
정점	-9.380
로그 EC50	1.116
경사 기울기	4.173e-010
EC50	

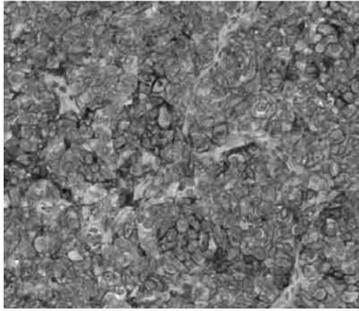
도면2a



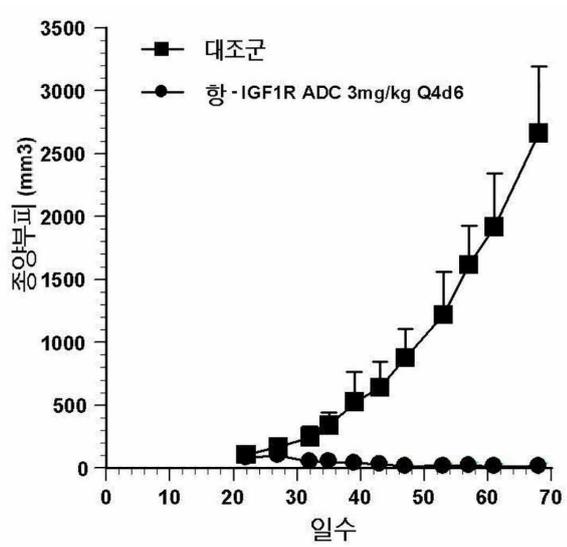
도면2b



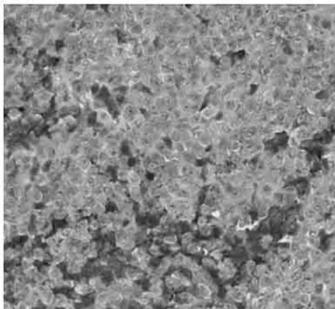
도면2c



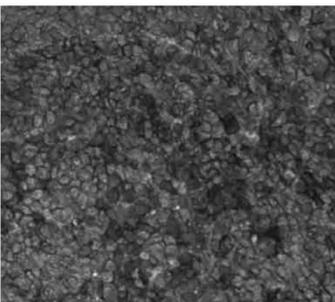
도면3



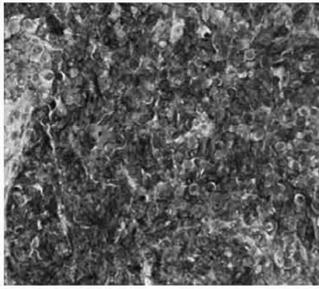
도면4a



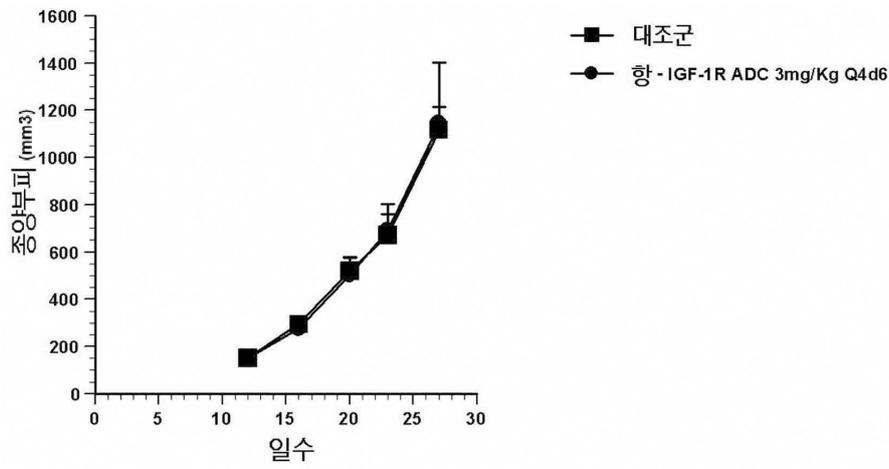
도면4b



도면4c



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

JOUHANNEAUD, Alexandra

<120> IGF-1R ANTIBODY AND ITS USE FOR THE DIAGNOSIS OF CANCER

<130> D34866

<140> PCT/EP2016/059338

<141> 2016-04-27

<150> EP 15305642.9

<151> 2015-04-27

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, heavy chain, CDR-H1

<400> 1

Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr Val

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, heavy chain, CDR-H2

<400> 2

Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr

1 5

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, heavy chain, CDR-H3

<400> 3

Val Ser Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, light chain, CDR-L1

<400> 4

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, light chain, CDR-L2

<400> 5

Tyr Thr Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, light chain, CDR-L3

<400> 6

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, heavy chain, Variable domain

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Val Leu His Trp Met Lys Arg Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Ser Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, light chain, Variable domain

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105

<210> 9

<211> 363

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, heavy chain, Variable domain

<400> 9

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcttgcaagg ctctggaca cacattcact agctatgttt tgcaactggat gaagcggaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctc acaatgatgt tactaagtac 180

aatgagaatt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatactccag cacagtctac 240

atggaggatca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtgt attactgtgt aagtaccgcc 300

tactatggta acggccggta ctctgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> 816C12 I-4894, light chain, Variable domain

<400> 10

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtctcatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagatattg ccacttattt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321