

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2018-516877**

**(P2018-516877A)**

(43) 公表日 **平成30年6月28日(2018.6.28)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/22 (2006.01)</b>	C07K 16/22	4H045
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00	A
<b>C12N 15/00 (2006.01)</b>	C12N 15/00	ZNA
<b>G01N 33/574 (2006.01)</b>	G01N 33/574	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2017-556212 (P2017-556212)	(71) 出願人	500033483 ビエール、ファーブル、メディカマン フランス国ブローニュ、ピヤンクール、ブ ラス、アベル、ガンズ、45
(86) (22) 出願日	平成28年4月27日 (2016.4.27)	(74) 代理人	100091982 弁理士 永井 浩之
(85) 翻訳文提出日	平成29年12月26日 (2017.12.26)	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/059338	(74) 代理人	100082991 弁理士 佐藤 泰和
(87) 国際公開番号	W02016/174053	(74) 代理人	100105153 弁理士 朝倉 悟
(87) 国際公開日	平成28年11月3日 (2016.11.3)	(74) 代理人	100126099 弁理士 反町 洋
(31) 優先権主張番号	15305642.9		
(32) 優先日	平成27年4月27日 (2015.4.27)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IGF-1R抗体および癌の診断のためのその使用

(57) 【要約】

本発明は、IGF-1R発現腫瘍細胞の検出法において使用される、CDR配列aを特徴とするIGF-1R(インスリン様成長因子受容体-1)抗体に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

i) 配列番号 1 の配列の C D R - H 1、配列番号 2 の配列の C D R - H 2 および配列番号 3 の配列の C D R - H 3 を有する重鎖と；

ii) 配列番号 4 の配列の C D R - L 1、配列番号 5 の配列の C D R - L 2 および配列番号 6 の配列の C D R - L 3 を有する軽鎖と

を含んでなる、I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメント。

**【請求項 2】**

配列番号 7 の配列、もしくは配列番号 7 の配列と少なくとも 90% の相同性を有する任意の配列の重鎖可変ドメイン；および / または配列番号 8 の配列、もしくは配列番号 8 の配列と少なくとも 90% の相同性を有する任意の配列の軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項 1 に記載の I G F - 1 R 抗体。

10

**【請求項 3】**

I - 4 8 9 4 の番号で 2 0 1 4 年 9 月 1 7 日に C N C M、パスツール研究所、パリに寄託されたハイブリドーマにより分泌される、I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメント。

**【請求項 4】**

I G F - 1 R 発現腫瘍細胞の検出のため、または I G F - 1 R 発現腫瘍細胞の発現レベルを決定するための薬剤として使用するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

**【請求項 5】**

I G F - 1 R の発現に関連する発癌性障害の *in vitro* または *ex vivo* の診断または予後予測において使用するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメント。

**【請求項 6】**

発癌性障害を有する患者が I G F - 1 R 経路を標的とする阻害剤、好ましくは、I G F - 1 R 抗体単独、組合せまたはコンジュゲートによる処置から利益を受け得るかどうかの決定において使用するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメント。

**【請求項 7】**

被験体において I G F - 1 R 発現腫瘍細胞の存在および / または位置を *in vitro* または *ex vivo* で検出するための方法であって、

30

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；および

(b) 前記 I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメントの、前記生体サンプルとの結合を検出する工程

を含んでなる、方法。

**【請求項 8】**

被験体において I G F - 1 R を発現する腫瘍細胞のパーセンテージを *in vitro* または *ex vivo* で検出するための方法であって、

40

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；および

(b) 前記生体サンプルにおいて I G F - 1 R を発現する細胞のパーセンテージを定量する工程

を含んでなる、方法。

**【請求項 9】**

被験体において腫瘍細胞の I G F - 1 R の発現レベルを *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法であって、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；および

50

(b) 前記 IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントの、前記生体サンプル中の IGF-1R との結合のレベルを定量する工程を含んでなる、方法。

【請求項 10】

被験体において腫瘍細胞または腫瘍の IGF-1R スコアを *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法であって、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを請求項 1～3 のいずれか一項に記載の IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；

(b) 蛍光活性化細胞選別 (FACS) または免疫組織化学 (IHC) により、前記 IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントの、前記生体サンプル中の IGF-1R との結合のレベルを定量する工程；および

(c) 工程 (b) で得られた定量レベルを、染色強度および陽性細胞のパーセンテージという 2 つのパラメーターに基づく適当な尺度と比較することにより、腫瘍細胞または腫瘍をスコア化する工程

を含んでなる、方法。

【請求項 11】

発癌性障害が、IGF-1R 経路を標的とする抗体薬による処置に感受性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 請求項 10 に記載の方法に従い、被験体の腫瘍細胞または腫瘍の IGF-1R 状態を *in vitro* または *ex vivo* で決定する工程、および

(b) 腫瘍細胞または腫瘍の IGF-1R 状態が IGF-1R (+) である場合に、前記発癌性障害が、IGF-1R 経路を標的とする抗体薬による処置に感受性があると決定する工程

を含んでなる、方法。

【請求項 12】

発癌性障害に罹患している被験体において、IGF-1R に関連する前記障害を緩和するように計画された治療計画の有効性を *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法であって、

(a) 前記処置の第 1 の時点に相当する第 1 の生体サンプルにおいて、請求項 9 に従い、IGF-1R の第 1 の発現レベルを決定する工程；

(b) 前記処置のその後の第 2 の時点に相当する第 2 の生体サンプルにおいて、請求項 9 に従い、IGF-1R の第 2 の発現レベルを決定する工程；

(c) 工程 (b) で得られた前記第 2 の発現レベルに対する工程 (a) で得られた前記第 1 の発現レベルの比を計算する工程；および

(d) 工程 (c) の比が 1 より大きい場合に前記治療計画の有効性が高いと決定する；または工程 (c) の比が 1 以下である場合に前記治療計画の有効性が低いと決定する工程を含んでなる、方法。

【請求項 13】

治療量の IGF-1R 経路を標的とする抗体薬の投与から利益を受けるまたは受けないと予測される癌患者を選択するための方法であって、

(a) 請求項 9 に記載の方法に従い、IGF-1R の発現レベルを決定する工程；

(b) 前工程 (a) の発現レベルを参照発現レベルと比較する工程；および

(c) 参照発現レベルに対する (a) で得られた発現レベルの比が 1 より大きい場合に、前記患者を IGF-1R 経路を標的とする抗体薬による処置から利益を受けると予測されるところとして選択する工程；または

(d) 参照発現レベルに対する (a) で得られた発現レベルの比が 1 以下である場合に、前記患者を IGF-1R 経路を標的とする抗体薬による処置から利益を受けると予測されないところとして選択する工程

を含んでなる、方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

患者における IGF-1R 発現腫瘍細胞の検出のためのキットであって、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントを少なくとも含んでなる、キット。

【請求項 15】

発癌性障害を有する患者が IGF-1R 経路を標的とする抗体薬による処置から利益を受け得るかどうかを決定するためのキットであって、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントを少なくとも含んでなる、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IGF-1R と結合し得る新規な抗体、特に、モノクローナル抗体、ならびに前記抗体をコードするアミノ酸配列および核酸配列に関する。

【背景技術】

【0002】

IGF-IR (または時には IGF1R) と呼ばれるインスリン様成長因子 1 受容体は、チロシンキナーゼ活性を有し、インスリン受容体 IR と 70% の相同性を有する受容体である。IGF-1R は、分子量が約 350,000 の糖タンパク質である。これは、ヘテロ四量体の受容体であり、その半分はそれぞれジスルフィド架橋によって連結しており、細胞外 - サブユニットおよび膜貫通 - サブユニットからなる。IGF-1R は、極めて高い親和性 ( $K_d \# 1 \text{ nM}$ ) で IGF1 および IGF2 と結合するが、同様にインスリンとも 100 分の 1 ~ 1000 分の 1 の親和性で結合し得る。逆に、IGF は 100 分の 1 の親和性でしかインスリン受容体と結合しないが、IR は極めて高い親和性でインスリンと結合する。 - サブユニット上に存在するシステインに富む領域と - サブユニットの C 末端部分にそれぞれ相同性の低い区域があるが、IGF-1R と IR のチロシンキナーゼドメインは極めて高い配列相同性を有している。 - サブユニットに見られる配列の差異はリガンドの結合区域に存在するため、それは IGF とインスリンのそれぞれに対する IGF-1R と IR の相対的親和性の源となっている。 - サブユニットの C 末端部分における差異は、2 つの受容体のシグナル伝達経路における相違をもたらし、IGF-1R は細胞分裂促進作用、分化作用および抗アポトーシス作用を媒介し、一方、IR の活性化は主として代謝経路のレベルでの作用に關与する。

【0003】

発癌における IGF 系の役割は、ここ 20 年で集中的な研究の対象となってきた。この関心は、IGF-1R が、その細胞分裂促進特性および抗アポトーシス特性に加えて、形質転換された表現型の確立と維持に必要であると思われるという事実の発見に従ったものである。実際に、IGF-1R の過剰発現または構成的活性化が、多様な細胞において、ウシ胎仔血清を含まない培地で補助に依存することなく細胞の増殖をもたらし、ヌードマウスにおいて腫瘍の形成をもたらすということが十分に確認されている。成長因子の多数の受容体を含め、過剰発現した遺伝子の多様な産物が細胞を形質転換し得ることから、このこと自体は固有の特性ではない。しかしながら、形質転換において IGF-1R が果たす主要な役割を明らかに立証した重要な発見は、IGF-1R をコードする遺伝子が不活性化された IGR-1R<sup>-</sup>細胞が、ウシパピローマウイルスの E5 タンパク質などの、通常は細胞を形質転換することができる様々な物質、EGFR もしくは PDGFR の過剰発現、SV40 の T 抗原、活性化された Ras、またはこれら最後の 2 つの因子の組合せによる形質転換に全く不応であるということを立てている。

【0004】

このような点で、IGF-1R は、長年、腫瘍学において興味深い標的と考えられてきた。IGF-1R (ヒト化もしくはヒト抗体または小分子) を標的とする多数のプロジェクトが、癌の処置のための IGF-1R アンタゴニストの開発に着手し、様々な適応で 70 を超える臨床試験が実施されてきた。しかしながら、現時点でこれらのプロジェクトに成功したものは無く、上市している抗 IGF-1R 抗体は無い。

10

20

30

40

50

## 【発明の開示】

## 【0005】

本発明は、発癌性障害、特に、IGF-1Rの発現を特徴とするものまたは異常なIGF-1R発現により媒介されるものを検出および/または監視するための診断または予後予測バイオマーカーとして使用可能な少なくとも1つの試薬を提供することを目的とする。

## 【0006】

適切な診断または予後予測ツールとして使用できる有用な抗体を開発するためのこれまでの試みが報告されているが、これらには満足のものはいくつも無い。

## 【0007】

以下の例から明らかとなるように、本発明者らは、IGF-1R発現腫瘍のスコア化にこれまで慣用されていた市販の抗体は、それらが偽陽性および/または偽陰性を示すことから適切でないと思われることを示していることに驚いた。この問題は、1つには、IGF-1R抗体の実際の活性というよりもむしろ患者の選択のために、IGF-1R抗体を用いた臨床試験の失敗をもたらした。

## 【0008】

さらに、市販の抗体を用いて実施した最初の研究は、IGF-1Rのスコア化と標的ADC療法の抗腫瘍活性の間の矛盾を示した。

## 【0009】

本発明は、既存のものとは異なり、IGF-1R標的療法の薬理学と関連するものを分離することができる新規な抗体を提供することによってこの問題を改善しようとするものである。

## 【0010】

第1の態様において、本発明の主題は、IGF-1R、好ましくは、ヒトIGF-1Rと高い親和性で結合する単離された抗体、またはその抗原結合フラグメントであり、従って、IGF-1R発現により媒介される病的過剰増殖性発癌性障害を診断するための方法において有用であり得る。

## 【0011】

本発明の1つの実施態様は、配列番号1、2、3、4、5および6の配列の6つのCDRを含んでなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

## 【0012】

特定の実施態様では、本発明は、

i) 配列番号1の配列のCDR-H1、配列番号2の配列のCDR-H2および配列番号3の配列のCDR-H3を有する重鎖と；

ii) 配列番号4の配列のCDR-L1、配列番号5の配列のCDR-L2および配列番号6の配列のCDR-L3を有する軽鎖と

を含んでなることを特徴とする、IGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。

## 【0013】

用語「抗体（単数）」、「抗体（複数）」、「ab」、または「免疫グロブリン」は、最も広義で互換的に使用され、それらが所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体、単離された、操作された、化学的に合成された、または組換え型の抗体（例えば、全長または完全モノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体または多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）およびまたその抗体フラグメントが含まれる。1つの実施態様では、本発明は、組換え抗体に関する。

## 【0014】

本明細書で使用する場合、「IGF-1R抗体」という表現は、「抗IGF-1R抗体」と同様と解釈されるべきであり、IGF-1Rと結合し得る抗体を意味する。

## 【0015】

抗体の「IGF-1R結合フラグメント」または「抗原結合フラグメント」は、抗体の

10

20

30

40

50

I G F - 1 R 標的 (一般には抗原とも呼ばれる) と結合する能力を保持するいずれのペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質も示すものとする。1つの実施態様では、このような「抗原結合フラグメント」は、F v、s c F v (s c は一本鎖)、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F a b '、s c F v - F c フラグメントもしくはダイアボディ、またはポリ (エチレン) グリコール (「ペグ化」) ( F v - P E G、s c F v - P E G、F a b - P E G、F ( a b ' )<sub>2</sub> - P E G または F a b ' - P E G と呼ばれるペグ化フラグメント) (「P E G」はポリ (エチレン) グリコール) などのポリ (アルキレン) グリコールの添加などの化学修飾により、または本発明による抗体の特徴的 C D R のうち少なくとも1つを有する前記フラグメントをリポソーム内に組み込むことによりその半減期が延長されている任意のフラグメントからなる群において選択される。好ましくは、前記「抗原結合フラグメント」は、それらが由来する抗体の可変重鎖または軽鎖の部分配列から構成されるか、または前記部分配列を含んでなり、前記部分配列は、それが由来する抗体と同じ結合特異性、および標的に対して十分な、好ましくは、それが由来する抗体の親和性の少なくとも 1 / 1 0 0、より好ましい様式では少なくとも 1 / 1 0 に相当する親和性を保持するのに十分なものである。

#### 【 0 0 1 6 】

好ましくは、前記「I G F - 1 R 結合フラグメント」または「抗原結合フラグメント」は、少なくとも

i ) 配列番号 1 の配列の C D R - H 1、配列番号 2 の配列の C D R - H 2 および配列番号 3 の配列の C D R - H 3 ; ならびに

i i ) 配列番号 4 の配列の C D R - L 1、配列番号 5 の配列の C D R - L 2 および配列番号 6 の配列の C D R - L 3

を含んでなる。

#### 【 0 0 1 7 】

「結合」または「結合する」などとは、抗体、またはその任意の抗原結合フラグメントが抗原と、生理学的条件下で比較的安定な複合体を形成することが意図される。特異的結合は、少なくとも約  $1 \times 10^{-6}$  M 以下の平衡解離定数を特徴とし得る。2分子が結合するかどうかを決定するための方法は当技術分野で周知であり、例えば、平衡透析および表面プラズモン共鳴などが挙げられる。疑念を避けるため、それは前記抗体が別の抗原と、低レベルで結合または干渉できないことを意味するものではない。しかしながら、1つの実施態様として、前記抗体は前記抗原のみと結合する。

#### 【 0 0 1 8 】

C D R 領域または C D R とは、I M G T により定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を示すことが意図される。

#### 【 0 0 1 9 】

I M G T 独自ナンバリングは、抗原受容体であれ、鎖型であれ、または種であれ、可変ドメインを比較するために定義されている [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pomie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol, 27, 55-77 (2003)]. I M G T 独自ナンバリングでは、保存されているアミノ酸は、常に同じ位置を持ち、例えば、システイン 2 3 ( 1 s t - C Y S )、トリプトファン 4 1 ( C O N S E R V E D - T R P )、疎水性アミノ酸 8 9、システイン 1 0 4 ( 2 n d - C Y S )、フェニルアラニンまたはトリプトファン 1 1 8 ( J - P H E または J - T R P ) などである。I M G T 独自ナンバリングは、フレームワーク領域の標準的な画定 ( F R 1 - I M G T : 1 ~ 2 6 番、F R 2 - I M G T : 3 9 ~ 5 5 番、F R 3 - I M G T : 6 6 ~ 1 0 4 番および F R 4 - I M G T : 1 1 8 ~ 1 2 8 番) および相補性決定領域の標準的な画定 : C D R 1 - I M G T : 2 7 ~ 3 8 番、C D R 2 - I M G T : 5 6 ~ 6 5 番および C D R 3 - I M G T : 1 0 5 ~ 1 1 7 番を提供する。ギャップは占有されていない位置を表すので、C D R - I M G T 長 (括弧内に示され、ドットで仕切られる、例えば [ 8 . 8 . 1 3 ] ) は重要な情報となる。I M G T 独自ナンバリン

グは、IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)]と呼ばれる2Dグラフ、およびIMGT / 3D structure - DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]における3D構造において使用される。

【0020】

本明細書に相反する記載がなければ、相補性決定領域またはCDRは、IMGTナンバリングシステムに従って定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を意味するものと理解されるべきである。

【0021】

しかしながら、CDRはまたKabatナンバリングシステム(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, および後続版)に従って定義することもできる。3つの重鎖CDRと3つの軽鎖CDRが存在する。本明細書では、用語CDR(単数または複数)は、場合に応じて、抗体が認識する抗原またはエピトープに対するその抗体の結合親和性を担うアミノ酸残基の大多数を含むこれらの領域の1以上もしくはさらには全体を示すために使用される。本出願の通読を簡単にするために、KabatによるCDRは定義しない。しかしながら、IMGTによるCDRの定義を用いてKabatによるCDRを定義することは当業者には自明であろう。

【0022】

特定の実施態様では、本発明によるIGF-1R抗体は、配列番号7の配列、または配列番号7の配列と少なくとも90%の同一性を有する任意の配列の重鎖可変ドメインを含んでなることを特徴とする。

【0023】

特定の実施態様では、本発明によるIGF-1R抗体は、配列番号8の配列、または配列番号8の配列と少なくとも90%の同一性を有する任意の配列の軽鎖可変ドメインを含んでなることを特徴とする。

【0024】

さらに別の実施態様によれば、816C12と呼ばれる抗体は、配列番号7のアミノ酸配列もしくは配列番号7の配列と最適なアラインメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなる重鎖可変ドメイン配列を含んでなること；ならびに/または配列番号8のアミノ酸配列もしくは配列番号8の配列と最適なアラインメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン配列を含んでなることを特徴とする。

【0025】

本発明の意味において、核酸またはアミノ酸の2配列間の「同一性パーセンテージ」は、最適なアラインメントの後に得られる、比較する2配列間の同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは、純粋に統計学的なものであり、2配列間の差異はそれらの長さに沿ってランダムに分布している。2つの核酸配列またはアミノ酸配列間の比較は、それらを最適にアラインした後に配列を比較することによって慣例的に行われ、前記比較はセグメントにより、または「アラインメントウィンドウ」を使用することによって行うことができる。比較のための配列の最適なアラインメントは、手による比較の他、Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482]のローカルホモロジーアルゴリズムの手段によるか、Neddleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443]のローカルホモロジーアルゴリズムの手段によるか、Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]の類似性検索法の手段によるか、またはこれらのアルゴリズムを用いるコンピューターソフトウェア(the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)のGAP、B

10

20

30

40

50

E S T F I T、F A S T A および T F A S T A、または比較ソフトウェア B L A S T N R もしくは B L A S T P による) の手段によって行うことができる。参照アミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、95% および 98% の相同性を示すアミノ酸配列については、好ましい例として、参照配列、特定の改変、特に、少なくとも 1 つのアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、末端切断または延長を含むものが挙げられる。1 以上の連続または非連続アミノ酸の置換の場合、置換アミノ酸が「等価な」アミノ酸により置換される置換が好ましい。ここで、「等価なアミノ酸」という表現は、構造アミノ酸の 1 つに関しておそらく置換されるが、対応する抗体の、また、以下に定義される具体例の、生物活性を変更しないいずれのアミノ酸も示すものとする。

【0026】

等価なアミノ酸は、それらが置換されるアミノ酸との構造的相同性が、または生成される可能性のある種々の抗原結合タンパク質間の生物活性の比較試験の結果かのいずれかに基づいて決定され得る。

【0027】

限定されない例として、下表 1 は、対応する改変抗原結合タンパク質の生物活性に有意な改変をもたらさずに行えると思われる潜在的置換をまとめたものであり、同じ条件下で逆の置換も当然可能である。

【0028】



【表 1】

表 1

元の残基	置換
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	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

10

20

30

40

50

## 【0029】

本発明の特定の態様は、前記抗体、またはその抗原結合フラグメント体がインスリン受容体 (IR) に結合しないというものである。

## 【0030】

別の実施態様では、本発明の抗体は、モノクローナル抗体からなる。

## 【0031】

用語「モノクローナル抗体」または「M a b」は、本明細書で使用される場合、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、その集団の個々の抗体は、わずかな量で見られ得る潜在的な自然発生突然変異以外は同一である。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一のエピトープに向けられている。このようなモノクローナル抗体は、B細胞の単一のクローンまたはハイブリドーマにより生産され得る。モノクローナル抗体はまた、組換え型であってもよく、すなわち、タンパク質工学により生産され得る。モノクローナル抗体はまた、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。加えて、一般に種々の決定基またはエピトープに対する種々の抗体を含むポリクローナル抗体の作製とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一のエピトープに対するものである。本発明は、天然源から単離されたもしくは精製により得られた、または遺伝子組換え

もしくは化学合成により得られた抗体に関する。

【0032】

別の実施態様では、本発明の抗体は組換え抗体からなる。用語「組換え抗体」は、生きた細胞内での組換えDNAの発現から生じる抗体を意味する。本発明の組換え抗体は、当業者に周知の遺伝子組換えの実験法を用いて生物には見られないDNA配列を作出することにより得られる。

【0033】

別の実施態様では、本発明の抗体は化学的に合成された抗体からなる。

【0034】

「IGF-1R抗体」は、(相反する記載がなければ)マウスを含み、前記IGF-1R抗体のキメラ型およびヒト化型も含む。

【0035】

より明確にするために、下表2にIMGTに従って定義される抗体816C12の配列を示す。

【0036】

【表2】

表2

抗体	CDRナンバリング	重鎖	軽鎖	配列番号
816C12 I-4894	IMGT	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
		可変ドメイン		7
			可変ドメイン	8

【0037】

1つの実施態様では、本明細書のモノクローナル抗体は、マウス、キメラおよびヒト化抗体を含む。抗体は、微生物培養物の仏国コレクション(CNCM、パスツール研究所、パリ、フランス)に提出されたマウス起源のハイブリドーマに由来してもよく、前記ハイブリドーマは、Balb/C免疫マウス脾細胞/リンパ球と骨髓腫Sp2/O-Ag14細胞株の細胞の融合により得られたものである。

【0038】

別の態様によれば、本発明は、本発明によるモノクローナル抗体を分泌し得るマウスハイブリドーマ、特に、I-4894の番号で2014年9月17日にCNCM、パスツール研究所、パリ、フランスに寄託されたマウス起源のハイブリドーマに関する。

【0039】

前記ハイブリドーマI-4894により分泌される、本明細書で816C12と呼ばれるモノクローナル抗体またはその任意の抗原結合フラグメントは、明らかに本発明の一部をなす。

【0040】

本発明は、I-4894の番号で2014年9月17日にCNCM、パスツール研究所、パリに寄託されたハイブリドーマにより分泌されることを特徴とする、IGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0041】

10

20

30

40

50

本発明はまた、I - 4894の番号で2014年9月17日にCNCM、パスツール研究所、パリに寄託されたマウスハイブリドーマを記載する。

【0042】

本発明の新たな態様は、以下の核酸：

a) 本発明による抗体をコードする核酸；

b) 配列番号9もしくは10の配列、または配列番号9もしくは10の配列と最適なラインメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の相同性を有する配列から選択される配列を含んでなる核酸；ならびに

e) a) または b) に定義される核酸の相補的核酸

から選択されることを特徴とする単離された核酸に関する。

10

【0043】

以下の表3に、本発明の抗体816C12に関する種々のヌクレオチド配列をまとめる。

【0044】

【表3】

表3

抗体	重鎖	軽鎖	配列番号
816C12	可変ドメイン		9
I-4894		可変ドメイン	10

20

【0045】

本明細書において互換的に使用される用語「核酸」、「核配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は、非天然ヌクレオチドを含有するまたは含有しない核酸のフラグメントまたは領域を定義し、二本鎖DNA、一本鎖DNAまたは前記DNAの転写産物のいずれかである、修飾されたまたは修飾されていないヌクレオチドの厳密な配列を意味する。

【0046】

また、本発明はそれらの天然の染色体環境の、すなわち、天然状態のヌクレオチド配列に関するものではないということも本明細書に含まれるべきである。本発明の配列は単離および/または精製されたものであり、すなわち、それらは例えば複製により直接的または間接的にサンプリングされたものであり、それらの環境は少なくとも部分的に改変されている。組換え遺伝学により、例えば宿主細胞の手段により得られた、または化学合成により得られた単離された核酸もまた本明細書に記載されるべきである。

30

【0047】

本発明はまた、本発明に記載される核酸を含んでなるベクターに関する。

【0048】

本発明は特に、このようなヌクレオチド配列を含むクローニングおよび/または発現ベクターを対象とする。

40

【0049】

本発明のベクターは好ましくは、所与の宿主細胞内でヌクレオチド配列の発現および/または分泌を可能とするエレメントを含む。よって、ベクターは、ベクターは、プロモーター、翻訳開始および終結シグナル、ならびに好適な転写調節領域を含まなければならない。ベクターは宿主細胞内で安定に維持可能でなければならず、場合により、翻訳されたタンパク質の分泌を指定する特異的シグナルを有してよい。これらの種々のエレメントは使用する宿主細胞に応じて当業者により選択および最適化される。この目的で、ヌクレオチド配列は、選択された宿主内で自己複製するベクターに挿入できるか、または選択された宿主の組み込みベクターであり得る。

【0050】

50

このようなベクターは当業者により一般に使用される方法によって作製され、得られたクローンは、リポフェクション、エレクトロポレーション、熱ショックまたは化学法などの標準的方法により好適な宿主に導入することができる。

【0051】

ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルス起源のベクターである。ベクターは本発明のヌクレオチド配列をクローニングまたは発現するように、宿主細胞を形質転換させるために使用される。

【0052】

本発明はまた、本発明に記載のベクターにより形質転換されたまたは本発明に記載のベクターを含んでなる宿主細胞を含んでなる。

10

【0053】

宿主細胞は、原核生物系または真核生物系、例えば、細菌細胞、また例えば、酵母細胞または動物細胞、特に哺乳動物細胞の中から選択することができる。昆虫または植物細胞も使用可能である。

【0054】

本発明はまた、本発明による形質転換細胞を有する、ヒト以外の動物に関する。

【0055】

本発明の別の態様は、本発明による抗体、またはその機能的フラグメントの1つの生産のための方法に関し、前記方法は以下の工程：

20

a) 本発明による宿主細胞の培地および好適な培養条件での培養；および

b) このようにして生産された前記抗体、またはその機能的フラグメントの、前記培養培地または前記培養細胞からの回収を含んでなることを特徴とする。

【0056】

本発明による形質転換細胞は、本発明による組換えポリペプチドの作製のための方法に使用される。本発明によるベクターおよび/または本発明によるベクターにより形質転換された細胞を使用することを特徴とする、組換え型の本発明によるポリペプチドの作製のための方法もまた本発明に含まれる。好ましくは、本発明によるベクターにより形質転換された細胞は、前記ポリペプチドの発現および前記組換えペプチドの回収を可能とする条件下で培養される。

30

【0057】

既述のように、宿主細胞は、原核生物系または真核生物系の中から選択することができる。特に、このような原核生物系または真核生物系において分泌を促進する本発明のヌクレオチド配列を特定することができる。よって、このような配列を有する本発明によるベクターは、分泌される組換えタンパク質の生産に有利に使用することができる。実際に、対象とするこれらの組換えタンパク質の精製は、それらのタンパク質が宿主細胞内部ではなく細胞培養の上清中に存在するという事実により容易となる。

【0058】

また、本発明の抗体のバイオマーカーとしての使用も開示される。これらの方法は、限定されるものではないが、前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、膠芽腫、結腸癌、胃癌、腎臓癌、膵臓癌、頭頸部癌またはIGF-1Rの発現に関連する他の任意の癌により例示される、IGF-1Rの発現に関連する種々の過剰増殖性発癌性障害を検出または診断するために使用可能である。当業者に認識されているように、特定の障害に関連する抗体発現のレベルは、既存の病態の性質および/または重篤度によって異なる。

40

【0059】

当業者に公知の従来の方法（例えば、局所、非経口、筋肉内など）のいずれかにおける本発明の抗体の投与は、サンプル中の異形成細胞を検出する、ならびに臨床医がIGF-1Rの発現に関連するまたはその発現により媒介される過剰増殖性障害の処置下の患者の治療計画を監視することを可能とする、極めて有用な方法を提供する。

【0060】

50

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントは、IGF-1Rの発現に関連する種々の病態の検出、診断、予後予測および病期分類を含む、種々の医学目的または研究目的で使用が見出せる。

【0061】

本発明の1つの実施態様は、IGF-1R発現腫瘍細胞の検出用の薬剤として使用するための、上記のようなIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0062】

本発明のもう1つの実施態様は、IGF-1Rの発現に関連する発癌性障害の*in vitro*または*ex vivo*での診断または予後予測において使用するための、上記のようなIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントである。

10

【0063】

本明細書で使用する場合、疾患を「診断する」とは、IGF-1Rの発現に関連するまたはその発現により媒介される病的過剰増殖性発癌性障害の存在を特定または検出する、前記疾患の進行を監視する、およびIGF-1Rの発現に関連する障害の指標となる細胞またはサンプルを特定または検出するプロセスを意味する。

【0064】

本明細書で使用する場合、「予後予測」とは、疾患からの回復の見込みまたは起こり得る疾患の発生または転帰の予測を意味する。例えば、被験体由来のサンプルがIGF-1R抗体による染色に対して陰性であれば、その被験体の「予後予測」は、サンプルがIGF-1R染色に対して陽性である場合よりも良好である。サンプルは、以下により詳細に説明されるように、IGF-1R発現レベルに関して適当な尺度でスコア化できる。

20

【0065】

IGF-1R抗体は、検出可能/定量可能なシグナルを得るために免疫複合体または標識抗体の形態で存在してもよい。好適な標識または他の適当な検出可能な生体分子または化学物質と併用すれば、IGF-1R抗体は*in vitro*および*in vivo*での診断および予後予測の用途に特に有用となる。

【0066】

イムノアッセイで使用するための標識は一般に当業者に知られ、酵素、放射性同位元素、および蛍光、発光および発色物質（金コロイドまたはラテックスビーズなどの有色粒子を含む）を含む。好適なイムノアッセイとしては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）が含まれる。以下に示されるものなど、様々なタイプの標識およびそれらの標識をIGF-1R抗体とコンジュゲートする方法は当業者に周知である。

30

【0067】

本明細書で使用する場合、用語「IGF-1Rの発現に関連する発癌性障害」は、障害に罹患している被験体における高レベルのIGF-1R（異常）の存在がその障害の病態生理またはその障害の増悪に寄与する因子のいずれかを担うことが示されているまたは疑われる疾患および他の障害を含むことが意図される。あるいは、このような障害は、例えば、その障害に罹患している被験体の、影響を受けた細胞または組織の細胞表面におけるIGF-1Rのレベルの増大をエビデンスとし得る。IGF-1Rレベルの増大は、IGF-1R抗体を用いて検出され得る。

40

【0068】

特定の実施態様では、「発現の増大」は、それがIGF-1Rに関する場合、対照と比べて発現の統計学的に有意な増大（RNA発現またはタンパク質発現により測定）を示すタンパク質または遺伝子発現レベルを意味する。

【0069】

1つの実施態様は、IGF-1R経路を標的とする阻害剤、好ましくは、IGF-1R抗体単独、組合せまたはコンジュゲートによる処置から利益を受け得るかどうかの決定において使用するための、上記のようなIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントである。

【0070】

50

本明細書で使用する場合、「IGF-1R経路を標的とする阻害剤」という表現は、IGF-1Rの1もしくは複数のリガンドへのまたはIGFRそれ自体への結合により、IGF-1Rのチロシンキナーゼ活性を低下させるまたは阻害することができるいずれの化合物も意味する。このような阻害剤の例は、タンパク質、ペプチド、抗体もしくは抗体-薬物コンジュゲート、またはIGF-1R遺伝子もしくはIGFRリガンドの1つをコードする遺伝子の発現を阻害するIGF-1Rアンタゴニスト、アンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはsiRNAとして作用する任意の化学化合物、または当業者に公知の他の任意の薬物もしくは化合物である。

【0071】

より詳しくは、本明細書の意味において、IGF-1R経路を標的とする阻害剤は、IGF-1Rと結合し、その1または複数のリガンドの結合を阻害することができるいずれの化合物または分子も包含することが意図される。

10

【0072】

いっそうより詳しくは、本明細書の意味において、IGF-1R経路を標的とする阻害剤は、IGF-1Rと結合するいずれのモノクローナル抗体も包含することが意図される。

【0073】

別の好ましい実施態様では、IGF-1R経路を標的とする阻害剤は抗体-薬物コンジュゲート(ADC)からなり、ここで、抗体部分はIGF-1Rを標的とし、薬物成分は細胞傷害剤、細胞増殖抑制剤、毒素などの任意の薬物から選択することができる。1つの例示的実施態様では、薬物成分はアウリスタチン、類似体または誘導体からなり得る。

20

【0074】

また、被験体においてIGF-1R発現腫瘍細胞の存在および/または位置を*in vitro*または*ex vivo*で検出するための方法を記載することも本発明の目的であり、前記方法は、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを上記のような本発明によるIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程;および

(b) 前記IGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントの、前記生体サンプルとの結合を検出する工程  
を含んでなる。

30

【0075】

本発明はまた、被験体の細胞内、好ましくは細胞の表面のIGF-1Rの発現を検出するおよび/またはそのレベルを定量および/または決定するための*in vitro*または*ex vivo*法を対象とし、前記方法は、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを上記のような本発明によるIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程;および

(b) 前記IGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントの、前記生体サンプルとの結合を検出するおよび/またはそのレベルを定量および/または決定する工程  
を含んでなる。

40

【0076】

IGF-1R抗体の結合は、当業者に利用可能な種々のアッセイにより検出および/または定量および/または決定することができる。アッセイを実施するためのいずれの好適な手段も本発明内に含まれるが、蛍光活性化細胞選別(FACS)、ELISA、ウエスタンブロット法および免疫組織化学(IHC)が特に挙げられる。好ましい方法として、IHCおよびFACSが含まれる。

【0077】

本発明はまた、被験体においてIGF-1Rを発現する腫瘍細胞のパーセンテージを*in vitro*または*ex vivo*で検出するための方法も記載し、前記方法は、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを上記のようなIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程;および

50

(b) 前記生体サンプルにおいて IGF-1R を発現する細胞のパーセンテージを定量する工程を含んでなる。

【0078】

別の実施態様は、被験体において腫瘍細胞または腫瘍の IGF-1R の発現レベルを *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法であり、前記方法は、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを上記のような IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；および

(b) 前記 IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントの、前記生体サンプル中の IGF-1R との結合のレベルを定量する工程

を含んでなる。

【0079】

当業者に明らかなように、IGF-1R に対する IGF-1R 抗体の結合レベルは、当業者に公知のいずれの手段により定量してもよい。好ましい方法は、ELISA アッセイ、免疫蛍光、IHC、ラジオイムノアッセイ (RIA)、または FACS などの免疫酵素的方法の使用を含む。

【0080】

本発明の方法によれば、IGF-1R に対する前記 IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントの結合レベルは、蛍光活性化細胞選別 (FACS) または免疫組織化学 (IHC) により定量される。

【0081】

「生体サンプル」は、被験体から採取可能ないずれのサンプルであってもよい。このようなサンプルは、本発明のバイオマーカーの発現レベルの決定を可能とするものでなければならぬ。よって、サンプルの性質は腫瘍の性質に依存する。

【0082】

好ましい生体サンプルには、癌が液性腫瘍であれば、血液サンプル、血漿サンプル、またはリンパサンプルなどのサンプルが含まれる。

【0083】

好ましい生体サンプルには、癌が固形腫瘍であれば、生検サンプルまたは外科的切除療法から採取されるサンプルなどのサンプルが含まれる。

【0084】

好ましくは、生体サンプルは、ヒト起源の血清、全血細胞、組織サンプルまたは生検などの体液である。サンプルは例えば、好都合には IGF-1R の発現に関連する病的発癌性障害の存在に関してアッセイ可能な生検組織を含み得る。

【0085】

供試生体サンプルにおいて IGF-1R 発現レベルの決定がひと度なされれば、それらの結果を対照サンプルの結果と比較することができ、対照サンプルの結果は、IGF-1R の発現に関連する発癌性障害を持たない個体から、供試生体サンプルと同様にして得られる。IGF-1R のレベルが供試生体サンプルにおいて有意に高ければ、それが由来した被験体が前記障害を有するまたは発症する高い見込みが存在すると結論付けることができる。

【0086】

本発明は、IGF-1R 発現腫瘍の *in vitro* または *ex vivo* での診断または予後予測の方法に関し、前記方法は、(i) 本発明に従い、上記のように、被験体において腫瘍細胞または腫瘍の IGF-1R の発現レベルを *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法により、IGF-1R の発現レベルを決定する工程、および (ii) 工程 (i) の発現レベルを IGF-1R 非発現組織からの IGF-1R の参照発現レベルと比較する工程を含んでなる。

【0087】

標的抗腫瘍療法の開発に関して、免疫組織学的技術を用いた診断は、受容体発現レベル

10

20

30

40

50

に関する *in situ* 情報を与え、従って、このような処置に必要とされる受容体の発現レベルに従って処置可能な患者を選択することを可能とする。

【0088】

病期決定は潜在的予後予測値を持ち、最適な療法を計画するための基準を提供する。Simpson et al., J. Clin. Oncology 18:2059 (2000)。例えば、固形腫瘍のための処置選択は腫瘍の病期分類に基づき、この分類は通常、米国癌合同委員会(American Joint Committee on Cancer) (AJCC) の腫瘍/結節/転移(TNM)検査を用いて実施される。この検査および病期分類体系は患者において固形癌が診断された病期に関していくつかの有用な情報を提供するが、それは不正確かつ不十分であると一般に認識されている。特に、これは腫瘍進行の最初期病期を特定することができない。

10

【0089】

別の実施態様は、被験体において腫瘍細胞または腫瘍のIGF-1Rスコアを *in vivo* または *ex vivo* で決定するための方法からなり、前記方法は、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを上記のようなIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；

(b) 蛍光活性化細胞選別(FACS)または免疫組織化学(IHC)により、前記IGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントの、前記生体サンプル中のIGF-1Rとの結合のレベルを定量する工程；および

(c) 工程(b)で得られた定量レベルを、染色強度および陽性細胞のパーセンテージという2つのパラメーターに基づく適当な尺度と比較することにより、腫瘍細胞または腫瘍をスコア化する工程を含んでなる。

20

【0090】

1つの実施態様において、IGF-1R抗体は、組織サンプルがホルマリン固定、ホルモール置換固定、Glyco-fix固定、パラフィン包埋および/または凍結された際もIGF-1Rと結合し得る。

【0091】

IGF-1Rの予後予測値を推定するために、いずれの従来ハザード分析法を用いてもよい。代表的な分析方法にはCox回帰分析が含まれ、この分析は、打ち切り例の存在下で生存または事象までの時間のデータをモデル化するためのセミパラメトリック法である(Hosmer and Lemeshow, 1999; Cox, 1972)。例えば生命表またはカプラン-マイヤーなどの他の生存分析とは対照的に、Coxは、モデルに予測因子変数(共変量)の包含を可能とする。例えばCoxなどの慣例の分析法を用い、原発腫瘍のIGF-1R発現状態と、いずれかの疾患再発の発症までの時間(無病生存期間、または転移性疾患までの時間)、または疾患による死亡までの時間(全生存期間)との相関に関する仮説を検定することができる可能性がある。Cox回帰分析はまた、Cox比例ハザード分析としても知られる。この方法は、患者生存期間に対して腫瘍マーカーの予後予測値を検定するために標準的なものである。多変量モードで使用する場合、いくつかの共変量の影響が並行して検定され、その結果、独立した予後予測値を有する個々の共変量、すなわち、最も有用なマーカーが同定できる。陰性または陽性「IGF-1R状態」という用語はまた、[IGF-1R(-)]または[IGF-1R(+)]と表すこともできる。

30

40

【0092】

癌の診断または監視の際にサンプルを「スコア化」することができる。その最も簡単な形では、スコア化は、免疫組織化学によるサンプルの視覚的検査により判断されるカテゴリー的陰性または陽性であり得る。より定量的なスコア化は、サンプリングされる細胞の染色強度または染色(「陽性」)比率の2つのパラメーターを判断することを含む。

【0093】

「IGF-1R状態」は、本発明の意味の範囲内で、免疫組織化学(IHC)、蛍光活性化細胞選別FACS、または当業者公知の他の方法などの任意の方法により測定されるIGF-1Rの発現レベルの決定に基づく、IGF-1R陽性[IGF-1R(+)]

50



または I G F - 1 R 陰性 [ I G F - 1 R ( - ) ] クラスへの腫瘍の分類に関する。

【 0 0 9 4 】

1 つの実施態様では、標準化を保証するために、サンプルを I G F - 1 R 発現レベルに関して異なる尺度でスコア化することができ、それらのほとんどは反応生成物の強度および陽性細胞のパーセンテージの評価に基づく (Payne et al., Predictive markers in breast cancer - the present, Histopathology 2008, 52, 82-90)。

【 0 0 9 5 】

別の実施態様では、前記スコア化は、特に本発明の方法の工程 ( c ) において、染色強度および陽性細胞のパーセンテージに基づく適当な尺度を使用することを含んでなる。

【 0 0 9 6 】

第 1 の例として、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体の I H C 評価のための Q u i c k A l l r e d スコアリングを用いた類推により、サンプルは、反応性の強度と染色された細胞の比率のスコアを合算した 0 ~ 8 のグローバル尺度で I G F - 1 R 発現レベルに関してスコア化することができる (Harvey JM, Clarck GM, Osborne CK, Allred DC; J. Clin. Oncol. 1999; 17; 1474-1481)。より詳しくは、反応性の強度の第 1 の基準は、0 ~ 3 の尺度でスコア化され、0 は「反応性無し」に相当し、3 は「強い反応性」に相当する。反応性の比率の第 2 の基準は、0 ~ 5 の尺度でスコア化され、0 は「反応性無し」に相当し、5 は「67 ~ 100 % の比率の反応性」に相当する。次に、反応性強度のスコアおよび反応性比率のスコアが合算され、合計スコア 0 ~ 8 となる。合計スコア 0 ~ 2 は陰性に見なされ、合計スコア 3 ~ 8 は陽性に見なされる。

【 0 0 9 7 】

この尺度によれば、本明細書で使用される腫瘍または腫瘍細胞の陰性または陽性「 I G F - 1 R 状態」という用語は、それぞれ A l l r e d 尺度でスコア 0 ~ 2 または 3 ~ 8 に相当する I G F - 1 R の発現レベルを意味する。

【 0 0 9 8 】

下記の表 4 は、A l l r e d 法による I H C 結果を解釈するためのガイドラインを示す。

【 0 0 9 9 】

【表 4】

表 4

免疫反応性の強度	スコア 1	反応性比率	スコア 2
反応性無し	0	反応性無し	0
弱い反応性	1	<1%	1
中等度の反応性	2	1-10%	2
強い反応性	3	11-33%	3
	-	34-66%	4
	-	67-100%	5
合計スコア		解釈	
(スコア 1 + スコア 2)			
0-2		陰性	
3-8		陽性	

【 0 1 0 0 】

本発明によれば、前記方法は、前記適当な尺度が0～8の尺度であることを特徴とし、反応性無しは0、67～100%の反応性比率の強い反応性は8のスコアとされる。

【0101】

よって、好ましい実施態様では、本発明に従い、被験体において腫瘍細胞または腫瘍のIGF-1Rスコアを*in vitro*または*ex vivo*で決定するための方法は、工程(c)において、前記適当な尺度が0～8の尺度であることを特徴とし、反応性無しは0、67～100%の反応性比率の強い反応性は8のスコアとされる。

【0102】

言い換えれば、被験体由来の腫瘍または腫瘍細胞の状態を*in vitro*または*ex vivo*で決定する方法が記載および特許請求され、前記方法は、

(a)被験体由来の腫瘍または腫瘍細胞をAllred尺度に従ってスコア化する工程；および

(b)-i)腫瘍または腫瘍細胞の状態が3～8のAllredスコアを有する[IGF-1R(+)]であると決定する工程；または

-ii)腫瘍または腫瘍細胞の状態が0～2のAllredスコアを有する[IGF-1R(-)]であると決定する工程

を含んでなる。

【0103】

本発明の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞の状態は、3のAllredスコアを有する[IGF-1R(+)]である。

【0104】

本発明の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞の状態は、4のAllredスコアを有する[IGF-1R(+)]である。

【0105】

本発明の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞の状態は、5のAllredスコアを有する[IGF-1R(+)]である。

【0106】

本発明の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞の状態は、6のAllredスコアを有する[IGF-1R(+)]である。

【0107】

本発明の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞の状態は、7のAllredスコアを有する[IGF-1R(+)]である。

【0108】

本発明の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞の状態は、8のAllredスコアを有する[IGF-1R(+)]である。

【0109】

本発明の別の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞の状態は、3～8のAllredスコアを有する[IGF-1R(+)]である。

【0110】

本明細書では、被験体において腫瘍細胞または腫瘍のIGF-1R状態の*in vitro*または*ex vivo*での決定に関して本明細書に記載される別の特定の方法は、

(a)請求項18の方法に従って、前記被験体由来の腫瘍細胞または腫瘍のIGF-1Rをスコア化する工程；および

(b)腫瘍細胞または腫瘍のIGF-1R状態を、3～8のスコアを有する[IGF-1R(+)]であると決定する工程；または

(c)腫瘍細胞または腫瘍のIGF-1R状態を、0～2のスコアを有する[IGF-1R(-)]であると決定する工程

を含んでなることを特徴とする。

【0111】

第2の例として、例えばHER-2受容体のIHC評価のための従来スコア化を用い

10

20

30

40

50

た類推により、サンプルは、染色の強度（好ましくは膜染色）および染色を示す細胞の比率を 0 ~ 3 + の合算尺度に統合するいくらか簡素なスコア化法で I G F - 1 R 発現レベルに関してスコア化してもよい。

【 0 1 1 2 】

簡易尺度と呼ばれるこの尺度において、0 および 1 + は陰性であり、2 + および 3 + は陽性染色を表す。しかしながら、スコア 1 + ~ 3 + は、各陽性スコアは、スコア 0（陰性）と比較した場合に再発および致命的疾患の有意に高いリスクと関連付けることができるので、陽性として記録することができるが、陽性スコアの中での強度増加はさらなるリスク軽減をもたらし得る。

【 0 1 1 3 】

一般的に言えば、本明細書で使用される腫瘍または腫瘍細胞の陰性または陽性「 I G F - 1 R 状態」という用語は、それぞれ簡易尺度でスコア 0 ~ 1 + または 2 + ~ 3 + に相当する I G F - 1 R の発現レベルを意味する。浸潤性腫瘍の完全な周囲膜性反応性だけが考慮されるべきであり、しばしば「金網」の外観になぞらえられる。原稿のガイドラインでは、 I G F - 1 R のベースライン（スコア 2 + または 3 + ）としてスコア化されたサンプルはさらなる評価を受ける必要がある。 I H C 分析は拒絶されるべきであり、反復されるか、または限定されない例として、対照が予想通りではない場合には、 F I S H または他の任意の方法により試験され、アーチファクトはほとんどのサンプルを巻き込み、サンプルは正常な乳管（内部対照）の強い膜性陽性を持ち、過度な抗原賦活を示唆する。

【 0 1 1 4 】

より明瞭にするために、以下の表 5 にこれらのパラメーターをまとめる。

【表 5】

表 5

IGF-1R 状態	IHC の記述
0	10%未満の腫瘍細胞に反応性が無いかまたは膜性の反応性
1 <sup>+</sup>	10%を超える腫瘍細胞にかすかな/わずかな知覚できる膜性の反応性が検出される。これらの細胞は膜の部分にのみ免疫反応性がある。
2 <sup>+</sup>	10%を超える腫瘍細胞に中等度の完全な膜性の反応性が見られる。
3 <sup>+</sup>	10%を超える腫瘍細胞に強い完全な反応性が見られる。

【 0 1 1 5 】

本発明の方法は、前記適当な尺度が尺度 0 ~ 3 + であることを特徴とし、ここで、腫瘍細胞の膜性反応性にスコア 0 が付けられるものはなく、10%を超える腫瘍細胞における強い完全な反応性にスコア 3 + が付けられる。

【 0 1 1 6 】

より詳細には、上記のように、前記適当な尺度は 0 ~ 3 の尺度であり、腫瘍細胞の膜性反応性にスコア 0 が付けられ；10%を超える腫瘍細胞のかすかに知覚できる膜性反応性にスコア 1 + が付けられ；10%を超える腫瘍細胞の弱い~中等度の完全な膜性反応性にスコア 2 + が付けられ；10%を超える腫瘍細胞の強い完全な反応性にスコア 3 + が付けられる。

## 【0117】

言い換えれば、被験体由来の腫瘍または腫瘍細胞(a tumor of of tumoral cells)の状態を *in vitro* または *ex vivo* で決定する方法が記載され、特許請求され、前記方法は、(a) 上記のような簡易尺度に従って被験体由来の腫瘍または腫瘍細胞をスコア化する工程；および (b) 腫瘍または腫瘍細胞の状態がスコア 2 + または 3 + を有する [ I G F - 1 R ( + ) ] であることを決定する工程；または (c) 腫瘍または腫瘍細胞の状態がスコア 0 または 1 + を有する [ I G F - 1 R ( - ) ] であることを決定する工程を含んでなる。

## 【0118】

本発明の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞は、スコア 2 + を有する [ I G F - 1 R ( + ) ] である。 10

## 【0119】

本発明の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞は、スコア 3 + を有する [ I G F - 1 R ( + ) ] である。

## 【0120】

本発明の別の特定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞は、スコア 2 + または 3 + を有する [ I G F - 1 R ( + ) ] である。

## 【0121】

別の実施態様では、本発明は、被験体における腫瘍細胞または腫瘍の I G F - 1 R 状態を *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法に関し、前記方法は、 20

(a) 従前に記載の本発明の方法に従い、前記被験体由来の前記 I G F - 1 R 腫瘍細胞または前記腫瘍をスコア化する工程；および

(b) - i ) 腫瘍細胞または腫瘍の I G F - 1 R 状態が、スコア 2 + または 3 + を有する [ I G F - 1 R ( + ) ] である工程；または

- i i ) 腫瘍細胞の I G F - 1 R 状態が、スコア 0 または 1 + を有する [ I G F - 1 R ( - ) ] である工程

を含んでなる。

## 【0122】

一般に、試験またはアッセイの結果は、様々な形式のいずれかで提示することができる。これらの結果は質的に提示することができる。例えば、試験報告書は、おそらくは検出 30  
限界の指標も伴って、特定のポリペプチドが検出されたかどうかだけを示してもよい。これらの結果は半定量的と表示されてもよい。例えば、様々な範囲が定義されてよく、その範囲に、定量的情報の特定の程度を示すスコアを割り当ててもよい（例えば、使用する尺度に応じて 0 ~ 3 + または 0 ~ 8 ）。このようなスコアは、例えば、I G F - 1 R が検出される細胞の数、シグナルの強度（I G F - 1 R または I G F - 1 R 保有細胞の発現レベルを示し得る）などの様々な因子を反映し得る。結果は、例えば、I G F - 1 R が検出される細胞のパーセンテージとして、タンパク質濃度としてなど、定量的方式で表示してもよい。

## 【0123】

当業者が認識しているように、試験により提供される出力のタイプは、その試験の技術 40  
的限界およびそのポリペプチドの検出に関連する生物学的重要性によって異なり得る。例えば、特定のポリペプチドの場合、単に質的な出力（例えば、ポリペプチドが特定の検出レベルで検出されるかどうか）は、重要な情報を提供する。他の場合では、より定量的な出力（例えば、正常レベルに対して供試サンプルのポリペプチドの発現レベルの比）が必要である。

## 【0124】

別の態様では、被験体において病的過剰増殖性発癌性障害または I G F - 1 R の発現に関連する病状に対する感受性を診断する方法が記載され、前記方法は、

(a) I G F - 1 R 発現細胞の検出のための、および / または本発明に従い I G F - 1 R の発現レベルを決定するための方法により、サンプルにおいて I G F - 1 R 保有細胞の 50

有無を決定する工程；

(b) 前記 IGF-1R 保有細胞の有無に基づいて病状または病状に対する感受性を診断する工程を含んでなる。

【0125】

本明細書に記載の方法では、IGF-1R 発現細胞の検出または IGF-1R のレベルの増加は一般に、IGF-1R 介在障害を有するまたは呈する疑いのある患者の指標となる。

【0126】

本発明はまた、個体の癌発症リスクを予測するための方法を提供し、前記方法は、IGF-1R 発現細胞の検出のための、および/または本発明に従い IGF-1R の発現レベルを決定するための方法により、組織サンプルにおいて IGF-1R の発現レベルを検出することを含んでなり、高レベルの IGF-1R 発現が高い癌発症リスクの指標となる。

10

【0127】

本発明はまた、腫瘍侵襲性を評価するための方法に関する。

【0128】

「腫瘍侵襲性」は、本明細書で使用する場合、急速に増殖する腫瘍および急速に拡散する傾向を意味する。

【0129】

1つの実施態様では、腫瘍侵襲性を評価するための前記方法は、

20

(a) IGF-1R 発現細胞の検出のための、および/または本発明に従い IGF-1R の発現レベルを決定するための方法により、腫瘍サンプルにおいて細胞により発現される IGF-1R のレベルを決定する工程、

(b) IGF-1R 発現細胞の検出のための、および/または本発明に従い IGF-1R の発現レベルを決定するための方法により、その後の時点で同じ個体から採取した等価の組織サンプルで発現される IGF-1R のレベルを決定する工程、および

(c) 工程(a)で得られた発現レベルと工程(b)で得られた比の間の比を決定する工程

を含んでなり、時間に対する腫瘍サンプルの IGF-1R 発現の比は、癌進行のリスクに関する情報を提供する。

30

【0130】

好ましい実施態様では、工程(b)で得られたレベルに対する工程(a)で得られたレベルの比が1より大きい場合、侵襲性を示す。別の実施態様では、1以下の比は、非侵襲性を示す。

【0131】

本発明の別の態様は、本発明に従い、発現の検出のため、および/または IGF-1R を定量するため、および/または発現のレベルを決定するための方法を含むことにより、IGF-1R 経路を標的とする療法の投与に応答した IGF-1R 発現の監視である。このような監視は、前記療法が IGF-1R のダウンレギュレーションおよび/または分解を標的とする場合に極めて有用であり得る。

40

【0132】

発癌性障害が IGF-1R 経路を標的とする抗体薬による処置に感受性があるかどうかを決定するための方法を記載することも本発明の目的であり、前記方法は、

(a) 上記のような本発明のスコア化の方法に従い、被験体の腫瘍の腫瘍細胞の IGF-1R 状態を *in vitro* または *ex vivo* で決定する工程、および

(b) 腫瘍細胞または腫瘍の IGF-1R 状態が IGF-1R (+) である場合に、発癌性障害が、IGF-1R 経路を標的とする抗体薬による処置に感受性があると決定する工程

を含んでなる。

【0133】

50

特に、細胞表面での IGF-1R 発現の監視は、臨床試験および「個別化」療法の際に処置の有効性を評価するための重要なツールであり得る。

【0134】

よって、本出願は、被験体に適当な治療計画を決定するための方法を提供する。

【0135】

本発明に従い、発現の検出のため、および/または発現のレベルを決定するための方法により決定され得る IGF-1R レベルの増大または低減は、IGF-1R に関連する癌の評価の指標となる。よって、IGF-1R を発現する細胞の数の増加または種々の組織もしくは細胞に存在する IGF-1R の濃度の変化を測定することにより、IGF-1R に関連する悪性腫瘍の改善を狙いとする特定の治療計画が効果的であるかどうかを決定することができる。

10

【0136】

本発明のもう一つの目的はまた、IGF-1R に関連する発癌性障害に罹患している被験体において前記障害を緩和するように計画された治療計画の有効性を *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法であり、前記方法は、

(a) 前記処置の第1の時点に相当する第1の生体サンプルにおいて、上記のように本発明に従い、発現の検出のため、および/または発現のレベルを決定するための方法により、IGF-1R の第1の発現レベルを決定する工程；

(b) 前記処置のその後の第2の時点に相当する第2の生体サンプルにおいて、上記のように本発明に従い、発現の検出のため、および/または発現のレベルを決定するための方法により、IGF-1R の第2の発現レベルを決定する工程；

20

(c) 工程(b)で得られた前記第2の発現レベルに対する工程(a)で得られた前記第1の発現レベルの比を計算する工程；および

(d) 工程(c)の比が1より大きい場合に前記治療計画の有効性が高いと決定する；または工程(c)の比が1以下である場合に前記治療計画の有効性が低いと決定する工程を含んでなる。

【0137】

好ましい実施態様では、IGF-1R に関連する発癌性障害に罹患している被験体において前記障害を緩和するように計画された前記治療計画は、前記被験体に対する IGF-1R 経路標的療法の投与を含む。

30

【0138】

また、本発明に従い、発現の検出のため、および/または発現のレベルを決定するための方法を用いて、IGF-1R の発現に関連する発癌性障害をイメージングする *in vivo* 法を提供することも本発明の目的である。このような方法は、*in vivo* で腫瘍細胞を位置決定し、ならびにそれらの浸潤性を監視するために有用である。同様に、本方法は、IGF-1R 介在癌と従前に診断された患者において進行および/または処置に対する応答を監視するために有用である。

【0139】

1つの実施態様は、被験体において IGF-1R 発現腫瘍細胞の位置を検出するための方法であり、前記方法は、

40

a) 前記被験体に本発明による IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する工程；および

b) 前記 IGF-1R 抗体の結合を検出する工程

を含んでなり、

前記結合は腫瘍細胞の存在を示す。

【0140】

発現腫瘍の存在の検出については、当業者に公知の多くの技術を使用することができる。しかしながら、好ましい手段は IHC および FACS である。

【0141】

別の態様では、本発明は、*in vivo* イメージング試薬を提供し、前記試薬は、本

50

発明による I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメントを含んでなり、前記 I G F - 1 R 抗体は、好ましくは標識され、より好ましくは放射性標識される。

【0142】

本発明はまた、I G F - 1 R 介在癌に罹患している患者のメディカルイメージングにおける前記試薬の使用も企図する。

【0143】

本発明の方法は、

- (a) 前記患者にイメージングに有効な量の本発明の造影試薬を投与する工程、および
- (b) 前記試薬を検出する工程

を含んでなる。

10

【0144】

好ましい実施態様では、前記造影剤は、本発明による I G F - 1 R 抗体またはその抗原結合フラグメントと活性部分を含んでなる。

【0145】

「活性部分」は、本明細書で使用する場合、前記造影試薬の *in vivo* 検出を可能とする薬剤である。本発明による有効部分としては、特に、テクネチウム - 99m (99mTc)、銅 - 67 (Cu - 67)、スカンジウム - 47 (Sc - 47)、Lutetium - 77 (Lu - 177)、銅 - 64 (Cu - 64)、イットリウム - 86 (Y - 86) またはヨウ素 - 124 (I - 124) などの放射性元素が含まれる。

【0146】

造影剤は、ヒトなどの哺乳動物における診断使用に有効な量で投与され、その後、造影剤の局在および蓄積が検出される。造影剤の局在および蓄積は、放射性核種イメージング、ラジオシンチレーショングラフィ、核磁気共鳴画像法、コンピューター断層撮影法、ポジトロン放出断層撮影法、コンピューター体軸断層撮影法、X線または磁気共鳴画像法、蛍光検出、および化学発光検出により検出可能である。

20

【0147】

標的抗腫瘍療法の開発に関して、免疫組織学的技術による診断は、*in situ* で受容体発現レベルに関する、例えば、腫瘍の大きさおよび/または位置に関する情報を与える。よって、診断は、このような処置に必要とされる受容体の発現レベルに従い、処置を受け得る患者を選択することを可能とする。

30

【0148】

本発明の特に興味深い態様は、治療量の I G F - 1 R 経路を標的とする抗体薬の投与から利益を受けるまたは受けないと予測される癌患者を選択するための方法であり、前記方法は、

- (a) 上記の本発明の方法に従い、I G F - 1 R の発現レベルを決定する工程；

- (b) 前工程 (a) の発現レベルを参照発現レベルと比較する工程；および

(c) 参照発現レベルに対する (a) で得られた発現レベルの比が 1 より大きい場合に、前記患者を I G F - 1 R 経路を標的とする抗体薬による処置から利益を受けると予測されるところとして選択する工程；または

(d) 参照発現レベルに対する (a) で得られた発現レベルの比が 1 以下である場合に、前記患者を I G F - 1 R 経路を標的とする抗体薬による処置から利益を受けると予測されないところとして選択する工程

40

を含んでなる。

【0149】

I G F - 1 R の発現レベルは、有利には、「参照レベル」または「参照発現レベル」とも呼ばれる対照細胞またはサンプル中のレベルに関して比較または測定される。「参照レベル」、「参照発現レベル」、「対照レベル」および「対照」は本明細書では互換的に使用される。「対照レベル」は、同等の対照細胞、すなわち、一般には無病または無癌で測定される個別のベースラインレベルを意味する。前記対照細胞は、癌患者であっても、腫瘍の部位である組織はまだ非腫瘍性の健康な組織を含んでいるので、同じ個体に由来して

50

もよい。前記対照細胞はまた、正常な別の個体に起源してもよく、または罹患または試験サンプルが得られたものと同じ疾患を呈しない。本発明の範囲内で、用語「参照レベル」は、癌細胞を含有する患者のサンプルにおいて IGF-1R の発現の試験レベルを評価するために使用される IGF-1R の発現の「対照レベル」を意味する。例えば、患者の生体サンプルにおける IGF-1R のレベルが IGF-1R の参照レベルよりも高い場合、それらの細胞は IGF-1R の高レベルの発現または過剰発現を有すると考えられる。参照レベルは、複数の方法により決定することができる。よって、発現レベルは、IGF-1R 保有細胞あるいはまた IGF-1R を発現する細胞の数に依存しない IGF-1R の発現レベルを定義し得る。従って、各患者の参照レベルは IGF-1R の参照比により規定され得、参照比は本明細書に記載の参照レベルを決定するための方法のいずれかによって決定することができる。

10

#### 【0150】

例えば、対照は所定の値であってよく、それは様々な形態と採ることができる。対照は中央値または平均値などの単一のカットオフ値であり得る。「参照レベル」は、総ての患者に個々に等しく適用可能な単一の数であり得るか、または参照レベルは、患者の特定の部分集団によって異なり得る。よって、例えば、同じ癌に関して高齢者は若年者とは異なる参照レベルを持ち得、同じ癌に関して女性は男性とは異なる参照レベルを持ち得る。あるいは、「参照レベル」は、供試される新生細胞の組織と同じ組織に由来する非腫瘍形成性の癌細胞において IGF-1R の発現レベルを測定することにより決定することもできる。同様に、「参照レベル」は、同じ患者内の非腫瘍細胞における IGF-1R レベルに対する、患者の新生細胞の IGF-1R の特定の比であってよい。「参照レベル」は、*in vitro* 培養細胞の IGF-1R のレベルであり得、培養細胞は腫瘍細胞を模倣するように操作してもよく、または参照レベルを正確に決定する発現レベルを得る他のいずれの様式で操作してもよい。他方、「参照レベル」は、IGF-1R レベルが上昇していない群および IGF-1R レベルが上昇している群などの比較群に基づいて確立することもできる。比較群の別の例は、特定の疾患、病態または症状を有する群および疾患を有さない群である。例えば、試験集団が低リスク群、中リスク群および高リスク群などの群に等分割（不等分割）されるような所定の値を構成することができる。

20

#### 【0151】

参照レベルはまた、同じ癌を有する患者の集団において IGF-1R のレベルを比較することにより決定することもできる。これは、例えばヒストグラム分析により達成することができ、この場合、患者の全コホートがグラフ表示され、第1軸は IGF-1R のレベルを表し、第2軸は腫瘍細胞が所与のレベルで IGF-1R を発現するコホート内の患者の数を表す。2以上の別個の患者群を、同じまたは類似のレベルの IGF-1R を有するコホートの集団のサブセットの同定により決定することができる。次に、参照レベルの決定は、これらの別個の群を最も良く識別するレベルに基づいてなすことができる。参照レベルはまた、2以上のマーカー（そのうちの1つは IGF-1R である）のレベルを表し得る。2以上のマーカーは、例えば、各マーカーのレベルの値の比により表すことができる。

30

#### 【0152】

同様に、外見的に健康な集団は、IGF-1R の発現に関連する病態を有することが分かっている集団が有するものとは異なる「正常」範囲を有する。よって、選択された所定の値は、ある個体が入るカテゴリーを考慮したものであってよい。適当な範囲およびカテゴリーは、当業者により慣例の実験だけを用いて選択することができる。「上昇」「増大」とは、選択された対照に比べて高いことを意味する。一般に、対照は適当な年齢層における外見的に健康な正常個体に基づく。

40

#### 【0153】

また、本発明による対照は、所定の値に加え、その試験材料と並行して試験された材料のサンプルであってよいということも理解されるであろう。例としては、同じ対照から同時に得られた組織または細胞、例えば、単一の生検の一部、または被験体由来の単細胞

50



サンプルの一部が含まれる。

【0154】

別の実施態様では、本発明は、標識された、上記の本発明による IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメント、またはその抗原結合そのフラグメントと薬学上許容可能な担体とを含んでなる IGF-1R の発現に関連する発癌性障害の *in vivo* イメージングのための医薬組成物に関する。

【0155】

別の態様においてはまた、患者において IGF-1R 発現腫瘍細胞を検出するためのキットも記載され、前記キットは上記のような IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメント、好ましくは抗体 816C12 を少なくとも含んでなることを特徴とする。

10

【0156】

所定量の試薬の組合せを、診断アッセイを実施するための説明書とともに含んでなるパッケージングされた材料、例えばキットも本発明の範囲内にある。このキットは *in vitro* での、例えば、ELISA での IGF-1R の検出および定量のための IGF-1R 抗体を含有する。IGF-1R 抗体が酵素で標識される場合、このキットは前記酵素に必要とされる基質および補因子（例えば、検出可能な発色団または蛍光団をもたらす基質前駆体）を含む。加えて、安定剤、バッファー（例えば、ブロッキングバッファーまたは溶解バッファー）などの他の添加剤が含まれてもよい。このようなキットは、バイアルおよびチューブなどの 1 以上の容器を受容するための区画化された受器を含んでよく、このような容器は本発明の別個の要素を保持する。例えば、1つの容器は、不溶性または部分的可溶性の担体と結合した第 1 の抗体を含有し得る。第 2 の容器は、凍結乾燥形態または溶液として可溶性の検出可能に標識された第 2 の抗体を含有し得る。この受器はまた、検出可能に標識された第 3 の抗体を凍結乾燥形態または溶液として保持する第 3 の容器を含有する。この性質のキットは、本発明のサンドイッチアッセイで使用可能である。ラベルまたは添付文書は、組成物の説明ならびに意図される *in vitro* または診断使用に関する説明書を提供し得る。

20

【0157】

種々の試薬の相対的量は、アッセイの感受性を実質的に最適化する試薬の溶液中の濃度をもたらすように広く変更可能である。特に、これらの試薬は、溶解時に適当な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含むドライパウダー、通常には凍結乾燥品として提供され得る。

30

【0158】

なおさらなる態様では、検出可能な部分で標識された、本発明に従って本明細書に詳説される IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供され、これにより、それらは上述の抗原を有する細胞を診断または同定するために、例えばキットとしてパッケージングされ使用され得る。このような標識の限定されない例としては、フルオレセインイソチオシアネートなどの蛍光団；発色団、放射性核種、ビオチンまたは酵素が挙げられる。このような標識 IGF-1R 抗体は、例えば、抗原の組織学的局在、ELISA、細胞選別、ならびに IGF-1R およびこの抗原を有する細胞検出または定量するための他の免疫学的技術に使用可能である。

40

【0159】

本発明はまたキットを対象とし、前記キットは、本発明に従い、IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントを含んでなることを特徴とする。

【0160】

本発明はまたキットを対象とし、前記キットは、本発明に従い、IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントの配列番号 1~6 の配列の配列を有する 6 つの CDR から得ることができる、キメラもしくはヒト化 IGF-1R 抗体またはその抗原結合フラグメントを含んでなることを特徴とする。

【0161】

また、細胞から IGF-1R を精製するまたは免疫沈降させるための陽性対照として有

50

用なキットも提供される。IGF-1Rの単離および精製のためには、キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）にカップリングした本発明に従って本明細書に詳説されるIGF-1R抗体または抗原結合フラグメントを含有し得る。例えば、ELISAにおけるIGF-1Rの検出および定量化のための抗体を含有するキットが提供可能である。キットは、容器と容器上のまたは容器に不随したラベルまたは添付文書を含んでなる。例えば、希釈剤およびバッファー、対照抗体を含有するさらなる容器が含まれてもよい。ラベルまたは添付文書は、組成物の説明ならびに意図される *in vitro* または診断使用に関する説明書を提供し得る。

【0162】

より詳しくは、本発明は、本明細書に記載の方法による被験体における腫瘍の腫瘍細胞のIGF-1R状態の *in vitro* または *ex vivo* 決定のためのキットに関する。好ましい実施態様では、例に記載されるように、本発明は、IHCおよび/またはFACS法により腫瘍または腫瘍細胞のIGF-1R状態の決定のためのキットに関する。

10

【0163】

特定の実施態様では、本発明は、上記のような本発明のIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントを少なくとも含んでなるキットからなり、前記抗体が標識されている。

【0164】

好ましい実施態様では、本発明によるキットは、前記IGF-1R抗体とIGF-1Rの間の結合の程度を検出するために有用な試薬をさらに含んでなる。

20

【0165】

別の好ましい実施態様では、IGF-1R発現腫瘍におけるIGF-1Rの発現レベルを *in vitro* または *ex vivo* で決定するために有用な本発明のキットは、前記標識IGF-1R抗体とIGF-1Rの間の結合レベルの定量に有用な試薬をさらに含んでなる。

【0166】

さらに別の実施態様では、本発明によるキットは、i) 前記標識IGF-1R抗体とIGF-1Rの間の結合の程度を検出するために有用な試薬；およびii) IGF-1R発現レベルのスコア化に有用な陽性および陰性対照サンプルをさらに含んでなる。

【0167】

前記キットは、マウス抗体またはヒト/ヒト化抗体に特異的なポリクローナル抗体をさらに含んでなり得、好ましくは、前記マウス、ヒト化またはヒト抗体に特異的なポリクローナル抗体は標識される。

30

【0168】

本発明の特定の実施態様によれば、IGF-1R経路を標的とする阻害剤の治療的投与から地益を受けるまたは受けないと予測される癌患者を *in vitro* で選択するためのキットは、i) 前記IGF-1R抗体とIGF-1Rの間の結合の程度を検出するために有用な試薬；ii) IGF-1R阻害剤に対する感受性と相関が見出されている対照レベル、および/またはiii) IGF-1R阻害剤に対する耐性と相関が見出されている対照レベルを含んでなり得る。

40

【0169】

本発明はまた、発癌性障害を有する患者がIGF-1R経路を標的とする抗体薬による処置から利益を受ける可能性があるかどうかを決定するキットに関し、前記キットは、上記のような本発明のIGF-1R抗体またはその抗原結合フラグメントを少なくとも含んでなることを特徴とする。

【0170】

別の実施態様では、前記キットは、

i) 腫瘍細胞の表面での前記IGF-1R抗体とIGF-1Rの間の結合の程度を検出するための試薬；および/または

ii) 腫瘍細胞の表面での前記IGF-1R抗体とIGF-1Rの間の結合の程度を定

50

量するための試薬

をさらに含んでなることを特徴とする。

【0171】

本発明の他の特徴および利点は、実施例および図面による説明の続きで明らかとなり、図面の凡例を以下に示す。

【図面の簡単な説明】

【0172】

【図1】図1：rhIGF1R ELISAにおいて816C12抗体で得られたOD値のグラフ表示。データフィッティングおよびEC<sub>50</sub>の決定はプリズムアプリケーションを用いて決定される。

【図2】図2A～2C：816C12（図2A）、G11抗IGF-1R抗体（Roche Ventana）（図2B）またはAF-305（R&D system）抗IGF-1R抗体（図2C）を用いた、パラフィン包埋腫瘍MCF-7の認識の免疫組織化学（IHC）パターン。

【図3】図3：MCF-7異種移植モデルにおける抗IGF-1R ADCのin vivo活性。

【図4】図4A～4C：816C12、G11抗IGF-1R抗体（Roche Ventana）（図4B）またはAF-305（R&D system）抗IGF-1R抗体（図4C）によるパラフィン包埋腫瘍SBC-5の認識の免疫組織化学（IHC）パターン。

【図5】図5：SBC-5異種移植モデルにおける抗IGF-1R ADCのin vivo活性。

【実施例】

【0173】

実施例1：816C12の作出および選択

IGF-1Rに対して生成されるMabを下記のように生産し、選択した。

【0174】

雌Balb/Cマウスを、フロイントのアジュバントを伴う10μgの組換えヒトIGF-1Rタンパク質（Rand D Systems、391-GR）の皮下注射により免疫誘導した。免疫誘導は2週間間隔で3回繰り返した。4回目の注射はアジュバントの存在下、腹腔内注射により行った。

【0175】

3日後、脾細胞を、50%PEGを用いてSP2OAg14骨髓腫細胞と融合させた。14日のHAT代謝選択の後、ハイブリドーマ上清を、ヒトMCF7乳癌細胞を用いてFACSにより試験した。MCF7結合抗体のみを維持した。

【0176】

次に、対象抗体を限界希釈によりクローニングした。クローニング8日後に、上清を、MCF7細胞を用いるFACSによりもう一度選択した。3つの陽性クローンを維持した。分泌される抗体のアイソタイプを、Southern BiotechnologiesからのSBAクローノタイピングシステム-HRPキット（Cat：5300-05）を用いて決定する。最後に、1つのクローンを拡大培養し、凍結させる。

【0177】

次に、816C12抗体のさらなる特性決定を、rhIGF-1RまたはrmIGF-1RまたはrhIR ELISAなど、ハイブリドーマ上清を用いて行った。総ての直接ELISAにおいて、対象タンパク質を各ウェルの底部に固定化した（1μg/ml）。飽和後、ハイブリドーマ上清をウェルに加えた。1時間のインキュベーション期間と洗浄工程の後、ヤギ抗マウスIgG-HRP標識ポリクローナル抗体の溶液を検出に使用し、その後、TMB基質を加えた。反応を1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液で停止させた後、分光光度計にて450nmの波長でODを読み取った。データを表6に示す。

【0178】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6

ELISA により 5 $\mu$ g/ml で得られた OD 値			
	rhIGF-1R コーティング	rmlIGF-1R コーティング	rhIR コーティング
816C12	2.622	0.065	0.055
陽性 CTRL	2.338	1.293	1.077
陰性 CTRL	0.055	0.065	0.048

10

## 【0179】

rhIGF-1Rコーティングに対する816C12抗体の用量応答極性を図1に示す。EC<sub>50</sub>値はプリズムアプリケーションを用いて決定する。

## 【0180】

データは、816C12抗体はEC<sub>50</sub> 0.41nMでrhIGF-1Rのみを認識すること示した。前記抗体はマウス型のIGF-1RにもヒトIRにも結合しない。

20

## 【0181】

実施例2：MCF-7異種移植モデルにおける病期分類と本発明の抗体との相関およびIGF-1Rを標的とするADCの活性の評価

腫瘍グレードと薬理学とを相関させるために、腫瘍グレードを決定し(第2.1節)、その後、MCF-7異種移植モデルにて、内部移行されることが知られているIGF-1Rを標的とする抗体部分と、アウリスタチンからなる薬物成分とを含んでなるADCを用いてin vivo試験を行った(第2.2節)。

## 【0182】

2.1：MCF-7異種移植モデルでのIGF-1R発現の免疫組織化学的検出

MCF-7異種移植片由来組織の切片を脱パラフィンし、再水和させ、熱誘導エクトプ賦活化のため、98に予温した沸騰浴中のTarget Retrievalバッファ-1x(Dako S1699)中に98で40分間、次いで、Target Retrievalバッファ中にさらに20分間置いた。トリス緩衝生理食塩水-0.05%ツイーン20(TBS-T)(Dako S3006)中で3回洗浄した後、内因性のペルオキシダーゼ活性を、ペルオキシダーゼブロッキング試薬(Dako K4007)を用いて5分間遮断した。切片をTBS-Tで洗浄し、ブロッキング試薬(Ultra V block-TA-125UB-LabVision)とともに5分間インキュベートした後、816C12モノクローナル抗体(5 $\mu$ g/ml)または陰性対照としてのマウスIgG1/(5 $\mu$ g/ml、X0931、Dako)のいずれかとともに室温で1時間インキュベートした。切片をTBS-Tで洗浄し、Envision(Dako)とともに30分間インキュベートした。褐色の反応生成物の現像のためにジアミノベンジジンを使用した(Dako K3468)。これらのスライドを対比染色のためヘマトキシリン中に2分間浸漬した(Dako S3309)。

30

40

## 【0183】

本発明の抗IGF-1Rモノクローナル抗体816C12は、MCF-7の細胞膜を差次的に染色する。このIHC手順では、褐色の反応生成物は細胞膜の陽性染色に相関し、褐色の反応生成物の欠如は、細胞膜の陰性染色および可視化されないことに関連する。膜アルゴリズムを用い、MCF-7腫瘍細胞の染色に関するスコアは3+であった(図2A)。G11抗体(Roche Ventana)またはAF-305(R&D system)抗IGF-1R抗体を用いたところ、同じ腫瘍の切片はスコア2+であった(それ

50

ぞれ図 2 B および 2 C )。

【 0 1 8 4 】

2 . 2 : M C F - 7 異種移植モデルにおける抗 I G F - 1 R A D C の i n v i v o 活性

抗 I G F - 1 R A D C を、M C F - 7 異種移植モデルにて i n v i v o で評価した。

【 0 1 8 5 】

全動物手順は、科学目的で使用される動物の保護に関する 2 0 1 0 / 6 3 / U E 指令の指針に従って実施した。プロトコールは、ピエール・ファール・インスティテュートの動物倫理委員会により承認された。5 0 0 万個の M C F - 7 細胞を 7 週齢のスイス/ヌードマウスに皮下注射した。細胞の注射前に、M C F - 7 腫瘍の i n v i v o 増殖に必要なエストロゲンを放出するために、マウスの左側腹部にエストロゲンペレット ( I n n o v a t i v e R e s e a r c h o f A m e r i c a ) を移植した。

10

【 0 1 8 6 】

M C F - 7 細胞移植 7 日後、腫瘍が 1 2 0 ~ 1 5 0 m m <sup>3</sup> の平均サイズに達したところで、動物を腫瘍サイズと外観に従って 6 個体のマウス群に分けた。抗 I G F - 1 R A D C を、4 日ごとに 6 回の注射 ( Q 4 d 4 ) の腹腔内注射により接種した。動物の健康状態を毎日監視した。腫瘍体積を試験の終了まで週に 2 回、電子カリパスで測定した。腫瘍体積は、下式： / 6 × 長さ × 幅 × 高さに従って計算する。毒性は、週に 3 回、動物の体重を追跡して評価した。統計分析は各測定でマン・ホイットニー検定を用いて行った。

20

【 0 1 8 7 】

抗 I G F - 1 R A D C の注射は有意に阻害し、さらには予想されたように、腫瘍グレード 3 + については腫瘍増殖の完全な退縮を誘導したが ( 図 3 )、腫瘍グレード 2 + についてはそうではなかった。

【 0 1 8 8 】

実施例 3 : S B C - 5 異種移植モデルにおける病期分類と本発明の抗体との相関および I G F - 1 R を標的とする A D C の活性の評価

腫瘍グレードと薬理学とを相関させるために、腫瘍グレードを決定し ( 第 3 . 1 節 )、その後、S B C - 5 異種移植モデルにて、内部移行されることが知られている I G F - 1 R を標的とする抗体部分と、アウリスタチンからなる薬物成分とを含んでなる A D C を用いて i n v i v o 試験を行った ( 第 3 . 2 節 )。

30

【 0 1 8 9 】

3 . 1 S B C - 5 異種移植モデルに対する I G F - 1 R 発現の免疫組織化学的検出

I G F - 1 R のレベルは、以上の実施例 2 の第 2 . 1 節に記載されているものと同じプロトコールを用いて分析した。

【 0 1 9 0 】

I G F - 1 R を 8 1 6 C 1 2 で検出した場合、低レベルが検出された ( 1 + ) ( 図 4 A )。I G F - 1 R を G 1 1 抗体 ( R o c h e V e n t a n a ) または A F - 3 0 5 ( R & D s y s t e m ) 抗 I G F - 1 R 抗体で検出した場合、同じ腫瘍からの切片がスコア 3 + とされた ( それぞれ図 4 B および 4 C )。

40

【 0 1 9 1 】

3 . 2 : S B C - 5 異種移植モデルにおける抗 I G F - 1 R A D C の i n v i v o 活性

抗 I G F - 1 R A D C を、S B C - 5 異種移植モデルにて i n v i v o で評価した。

【 0 1 9 2 】

全動物手順は、科学目的で使用される動物の保護に関する 2 0 1 0 / 6 3 / U E 指令の指針に従って実施した。プロトコールは、ピエール・ファール・インスティテュートの動物倫理委員会により承認された。5 0 0 万個の S B C - 5 細胞を 7 週齢の無胸腺マウスに皮下注射した。細胞移植 1 2 日後、腫瘍が 1 5 0 m m <sup>3</sup> の平均サイズに達したところで

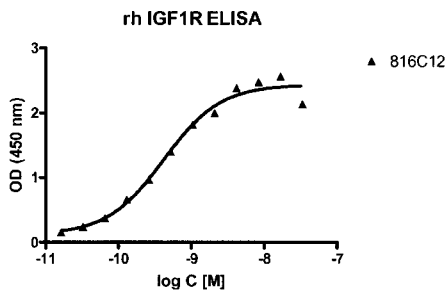
50

、動物を腫瘍サイズと外観に従って6個体のマウス群に分けた。抗IGF-1R ADCを、4日ごとに6回の注射(Q4d4)の腹腔内注射により接種した。動物の健康状態を毎日監視した。腫瘍体積を試験の終了まで週に2回、電子カリパスで測定した。腫瘍体積は、下式： $\frac{1}{6} \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ に従って計算する。毒性は、週に3回、動物の体重を追跡して評価した。統計分析は各測定でマン・ホイットニー検定を用いて行った。

【0193】

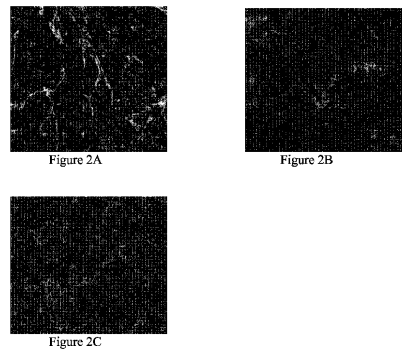
予想されたように、腫瘍グレード1+については、SBC-5腫瘍細胞の腫瘍進行は抗IGF-1R ADCの注射により影響を受けなかったが(図5)、腫瘍グレード3+についてはそうではなかった。

【図1】



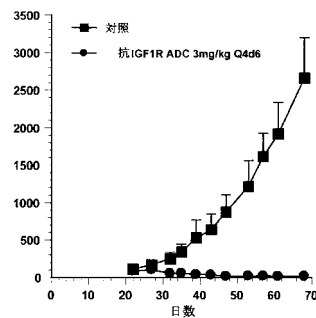
816C12	
S字用量応答(可変勾配) ベストフィット値	
下限	0.1163
上限	2.438
LOGEC50	-9.380
Hill 勾配	1.116
EC50	4.173e-010

【図2A - 2C】



FIGURES 2A-2C

【図3】



【 图 4 A - 4 C 】



Figure 4A

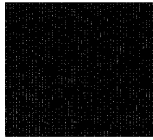


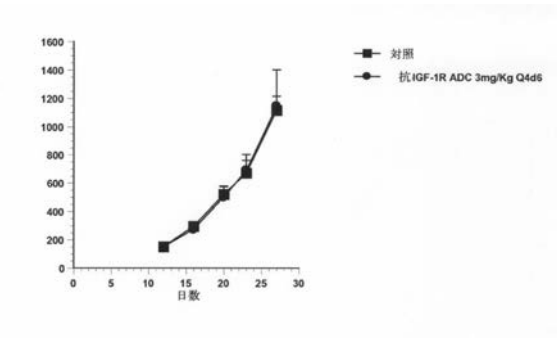
Figure 4B



Figure 4C

FIGURES 4A-4C

【 图 5 】



【 配列表 】

2018516877000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/059338

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/28 G01N33/574 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/126876 A2 (BIOGEN IDEC INC [US]; HARIHARAN KANDASAMY [US]; GRAFF CHRISTILYN [US];) 8 November 2007 (2007-11-08) See tables 5, 6; claims 1-266 -----	1-15
X	US 2013/084243 A1 (GOETSCH LILIANE [FR] ET AL) 4 April 2013 (2013-04-04) claims 1-66 -----	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 June 2016		29/06/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Nauche, Stéphane



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/059338

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007126876 A2	08-11-2007	AU 2007245164 A1	08-11-2007
		BR P10709843 A2	26-07-2011
		CA 2646406 A1	08-11-2007
		EA 200802061 A1	28-04-2009
		EP 1999149 A2	10-12-2008
		JP 2009532027 A	10-09-2009
		KR 20080113268 A	29-12-2008
		SG 170799 A1	30-05-2011
		US 2007243194 A1	18-10-2007
		US 2010098710 A1	22-04-2010
		US 2010099147 A1	22-04-2010
		WO 2007126876 A2	08-11-2007
		US 2013084243 A1	04-04-2013
US 2015078996 A1	19-03-2015		

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 アレクサンドラ、ジュアンオー  
フランス国ボンヌビル、リュ、デ、ロジエール、 1 5 2  
Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 FA71