



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107690439 A

(43)申请公布日 2018.02.13

(21)申请号 201680024231.3

(72)发明人 A·茹阿诺

(22)申请日 2016.04.27

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

(30)优先权数据

15305642.9 2015.04.27 EP

代理人 程伟 韩文华

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.26

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/059338 2016.04.27

G01N 33/574(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/174053 EN 2016.11.03

A61P 35/00(2006.01)

(83)生物保藏信息

CNCM I-4894 2014.09.17

(71)申请人 皮埃尔法布雷医药公司

地址 法国布洛涅-比扬古

权利要求书2页 说明书21页

序列表4页 附图4页

(54)发明名称

IGF-1R抗体及其诊断癌症的用途

(57)摘要

本发明涉及特征在于CDR序列a的IGF-1R(胰岛素样生长因子受体-1)抗体,所述抗体用于表达IGF-1R的肿瘤细胞的检测方法中。

1. 一种IGF-1R抗体或其抗原结合片段,特征在于其包含:
 - i) 重链,其具有序列SEQ ID No.1所示的CDR-H1、序列SEQ ID No.2所示的CDR-H2以及序列SEQ ID No.3所示的CDR-H3;以及
 - ii) 轻链,其具有序列SEQ ID No.4所示的CDR-L1、序列SEQ ID No.5所示的CDR-L2以及序列SEQ ID No.6所示的CDR-L3。
2. 根据权利要求1所述的IGF-1R抗体,特征在于其包含:序列SEQ ID No.7所示的、或者和序列SEQ ID No.7具有至少90%同源性的任何序列所示的重链可变结构域;和/或序列SEQ ID No.8所示的、或者和序列SEQ ID No.8具有至少90%同源性的任何序列所示的轻链可变结构域。
3. 一种IGF-1R抗体或其抗原结合片段,特征在于其是由杂交瘤所分泌的,所述杂交瘤以编号I-4894于2014年9月17日保藏在巴黎巴斯德研究所CNCM。
4. 权利要求1至3任一项所述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段作为试剂的用途,其中所述的试剂用于检测表达IGF-1R的肿瘤细胞或者用于确定表达IGF-1R的肿瘤细胞的表达水平。
5. 权利要求1至3任一项所述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段用于体外或离体诊断或预后致癌疾病的用途,其中所述的致癌疾病和IGF-1R表达相关。
6. 权利要求1至3任一项所述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段用于确定患有致癌疾病的患者是否可能受益于治疗的用途,其中所述的治疗使用靶向IGF-1R通路的抑制剂,优选仅IGF-1R抗体、组合的IGF-1R抗体或缀合的IGF-1R抗体。
7. 一种用于体外或离体检测受试者中表达IGF-1R的肿瘤细胞的存在和/或位置的方法,所述方法包括步骤:
 - (a) 用权利要求1至3任一项所述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;以及
 - (b) 检测所述IGF-1R抗体或其抗原结合片段与所述生物样本的结合。
8. 一种用于体外或离体检测受试者中表达IGF-1R的肿瘤细胞的百分比的方法,所述方法包括步骤:
 - (a) 用权利要求1至3任一项所述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;以及
 - (b) 对所述生物样本中表达IGF-1R的细胞的百分比进行定量。
9. 一种用于体外或离体确定受试者中肿瘤细胞中IGF-1R的表达水平的方法,所述方法包括步骤:
 - (a) 用权利要求1至3任一项所述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;以及
 - (b) 对所述IGF-1R抗体或其抗原结合片段与所述生物样本中IGF-1R结合的水平进行定量。
10. 一种用于体外或离体确定受试者中肿瘤细胞或肿瘤的IGF-1R评分的方法,所述方法包括步骤:
 - (a) 用权利要求1至3任一项所述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;

(b) 通过荧光激活细胞分选 (FACS) 或免疫组织化学 (IHC) 对所述 IGF-1R 抗体或其抗原结合片段与所述生物样本中 IGF-1R 结合的水平进行定量; 以及

(c) 通过将步骤 (b) 所得的定量水平与基于两种参数的适当的等级进行比较从而对肿瘤细胞或肿瘤进行评分, 其中所述的两种参数是染色强度和阳性细胞百分比。

11. 一种用于确定致癌疾病是否对治疗易感的方法, 其中所述的治疗使用靶向 IGF-1R 通路的抗体药物, 所述方法包括步骤:

(a) 根据权利要求 10 所述的方法, 体外或离体确定受试者中肿瘤细胞或肿瘤的 IGF-1R 状态, 以及

(b) 当肿瘤细胞或肿瘤的 IGF-1R 状态是 IGF-1R (+) 时, 则确定所述致癌疾病易感于使用靶向 IGF-1R 通路的抗体药物的治疗。

12. 一种用于体外或离体确定患有 IGF-1R 相关致癌疾病的受试者中治疗方案效率的方法, 其中所述的治疗方案经设计用于缓解所述致癌疾病, 所述方法包括步骤:

(a) 根据权利要求 9 确定第一生物样本中 IGF-1R 的第一表达水平, 所述第一生物样本对应于所述治疗的第一时间点;

(b) 根据权利要求 9 确定第二生物样本中 IGF-1R 的第二表达水平, 所述第二生物样本对应于所述治疗的第二更晚时间点;

(c) 计算步骤 (a) 中获得的所述第一表达水平相对于步骤 (b) 中获得的所述第二表达水平的比例; 以及

(d) 当步骤 (c) 的所述比例大于 1 时, 确定所述治疗方案的效率高; 或者, 当步骤 (c) 的所述比例小于或等于 1 时, 确定所述治疗方案的效率低。

13. 一种用于选择癌症患者的方法, 其中预测所述癌症患者受益于或不受益于施用治疗量的靶向 IGF-1R 通路的抗体药物, 所述方法包括步骤:

(a) 根据权利要求 9 的方法确定 IGF-1R 的表达水平;

(b) 将前述步骤 (a) 的表达水平和参考表达水平进行比较; 以及

(c) 当 (a) 中获得的表达水平相对于参考表达水平的比例大于 1 时, 则选择预测受益于靶向 IGF-1R 通路的抗体药物治疗的患者; 或者

(d) 当 (a) 中获得的表达水平相对于参考表达水平的比例小于或等于 1 时, 则选择预测不受益于靶向 IGF-1R 通路的抗体药物治疗的患者。

14. 一种试剂盒, 其用于检测患者中表达 IGF-1R 的肿瘤细胞, 特征在于所述试剂盒至少包含权利要求 1 至 3 任一项所述的 IGF-1R 抗体或其抗原结合片段。

15. 一种试剂盒, 其用于确定患有致癌疾病的患者是否可能受益于治疗, 所述的治疗使用靶向 IGF-1R 通路的抗体药物, 特征在于所述试剂盒至少包含权利要求 1 至 3 任一项所述的 IGF-1R 抗体或其抗原结合片段。

IGF-1R抗体及其诊断癌症的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及能够结合IGF-1R的新型抗体,尤其是单克隆抗体,以及编码所述抗体的氨基酸和核酸序列。

背景技术

[0002] 称为IGF-1R的胰岛素样生长因子1受体(或者有时候称为IGF1R)是一种具有酪氨酸激酶活性的受体,与胰岛素受体IR具有70%的同源性。IGF-1R是分子量约350,000的糖蛋白。它是异四聚体受体,其由二硫桥连接的每半部分由细胞外的 α -亚单元和跨膜的 β -亚单元组成。IGF-1R以很高的亲和力(affinity)结合IGF1和IGF2(Kd#1nM),但是同样能够以低100至1000倍的亲和力结合胰岛素。相反地,虽然IGF仅以低100倍的亲和力结合胰岛素受体,IR仍以很高的亲和力结合胰岛素。IGF-1R和IR的酪氨酸激酶结构域具有很高的序列同源性,虽然同源性较弱的区域分别涉及位于 α -亚单位的富含半胱氨酸的区域和 β -亚单位C-末端部分。在 α -亚单位中观察到的序列的差异位于配体的结合区域,且因此产生了IGF-1R和IR分别对IGF和胰岛素的相对亲和力。在 β -亚单位C-末端部分中的差异导致在两种受体的信号转导途径中的分歧;IGF-1R介导促有丝分裂、分化和抗凋亡作用,然而IR的激活主要涉及在代谢途径的水平的作用。

[0003] 在最近20年当中,IGF系统在致癌作用中的作用成为深入研究的课题。发现下述的事实之后,这种兴趣随之而来:即除了它的促有丝分裂和抗凋亡特性之外,IGF-1R似乎是建立和维持转化表型所需要的。事实上,已经证实IGF-1R的过表达或组成型激活在很多不同的细胞中导致细胞不依赖于无胎牛血清介质的支持而进行生长,并且导致在裸鼠中形成肿瘤。这本身不是一种独特的特性,因为很多不同的过表达基因的产物能够转化细胞,包括很多生长因子的受体。然而,清楚地表明IGF-1R在转化中起到的主要作用的关键发现中,已经表明IGF-1R细胞(其中编码IGF-1R的基因被灭活)是对不同试剂的转化完全耐受的,而这些试剂通常是能够转化细胞的,比如牛乳头瘤病毒的E5蛋白、EGFR或PDGFR的过表达、SV40的T抗原、激活的Ras或最后这两种因子的组合。

[0004] 在这种情况下,很长时间以来IGF-1R被认为是在肿瘤学中感兴趣的靶标。大量靶向IGF-1R的项目(人源化或人抗体或小分子)已经开始开发IGF-1R拮抗剂用于治疗癌症,并且在多种适应症中,已经进行超过70项临床试验。然而,目前这些项目没有成功,并且市场上没有IGF-1R抗体。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于,提供至少一种试剂,其能够用作检测和/或监测致癌疾病的诊断或预后的生物标记物,尤其是特征在于表达IGF-1R的那些、或者异常的IGF-1R表达所介导的那些致癌疾病。

[0006] 已经报道了开发能用作相关诊断或预后工具的有价值抗体的先前尝试,但是这些均没有满足要求。

[0007] 根据以下实施例,将变得显而易见,本发明人已经出乎意料地证实,目前用于给表达IGF-1R的肿瘤进行评分的常用商业抗体,似乎并不相关,因为它们存在假阳性和/或假阴性。这一问题在一定程度上导致IGF-1R抗体的临床试验失败,这是因为患者的选择,而非IGF-1R抗体的真实活性。

[0008] 此外,使用商业抗体进行的第一研究显示出IGF-1R评分和靶向ADC疗法的抗肿瘤活性之间的分歧。

[0009] 本发明通过提供新型抗体而意图纠正这一问题,所述的新型抗体不同于现有的那些,其能够限制(straining)与IGF-1R靶向疗法的药理学相关。

[0010] 第一方面中,本发明的主题是一种分离的抗体或其抗原结合片段,其以高亲和力结合IGF-1R,优选人IGF-1R,并且能够因此用于诊断IGF-1R表达所介导的病理性增殖过度性致癌疾病的方法中。

[0011] 本发明的一个实施方式涉及一种抗体或其抗原结合片段,其包含序列SEQ ID No.1、2、3、4、5和6所示的六个CDR。

[0012] 在一个具体的实施方式中,本发明涉及IGF-1R抗体或其抗原结合片段,其特征在于其包含:

[0013] i) 重链,其具有序列SEQ ID No.1所示的CDR-H1、序列SEQ ID No.2所示的CDR-H2以及序列SEQ ID No.3所示的CDR-H3;以及

[0014] ii) 轻链,其具有序列SEQ ID No.4所示的CDR-L1、序列SEQ ID No.5所示的CDR-L2以及序列SEQ ID No.6所示的CDR-L3。

[0015] 以最广泛的意义,术语“抗体(antibody)”、“抗体(antibodies)”、“ab”、或“免疫球蛋白”可以互换使用,并且包括单克隆抗体、分离的、工程化的、化学合成的或重组的抗体(例如,全长或完整单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体或多特异性抗体(例如,双特异性抗体)以及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。在一个实施方式中,本发明涉及一种重组抗体。

[0016] 如本说明书所用,表述“IGF-1R抗体”应当解释为类似于“抗-IGF-1R抗体”,是指能够结合IGF-1R的抗体。

[0017] 抗体的“IGF-1R结合片段”或“抗原结合片段”,意在表示保留了抗体结合IGF-1R靶标(一般也称为抗原)能力的任何肽、多肽或蛋白。在一个实施方式中,这样的“抗原结合片段”选自Fv、scFv(sc表示单链)、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv-Fc片段或双特异抗体、或通过化学修饰,如添加聚(亚烷基)二醇如聚乙二醇(“聚乙二醇化”) (聚乙二醇化片段被称为Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG或Fab'-PEG) (“PEG”表示聚乙二醇)、或通过并入脂质体中来延长其半衰期的任意片段,所述片段具有至少一个根据本发明抗体的特征CDR。优选地,所述“抗原结合片段”将由如下构成或包含其所衍生自的抗体的可变重链或轻链的部分序列,所述部分序列足以保留与其所来自的抗体相同的结合特异性以及足够的亲和力,优选所述足够的亲和力等于其所来自的抗体对靶标亲和力的至少1/100、更优选的方式至少1/10。

[0018] 优选地,所述“IGF-1R结合片段”或“抗原结合片段”至少包含:

[0019] i) 序列SEQ ID No.1所示的CDR-H1、序列SEQ ID No.2所示的CDR-H2以及序列SEQ ID No.3所示的CDR-H3;以及

[0020] ii) 序列SEQ ID No.4所示的CDR-L1、序列SEQ ID No.5所示的CDR-L2以及序列SEQ ID No.6所示的CDR-L3。

[0021] “结合”等,意图表示抗体或其任何抗原结合片段与抗原形成生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合的特征在于至少约 1×10^{-6} M或更小的平衡解离常数。确定两个分子是否结合的方法是本领域中公知的,并包括例如平衡透析、表面等离子体共振等。为避免疑问,这并不意味着所述抗体不能以低水平结合或干扰另一个抗原。然而,作为一个实施方式,所述抗体仅结合所述抗原。

[0022] CDR区或CDR意指IMGT所定义的免疫球蛋白重链和轻链的高变区。

[0023] 无论抗原受体、链类型或物种如何,都将IMGT独特的编号限定用来比较可变结构域(Lefranc M.-P., Immunology Today 18,509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7,132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. 和Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003))。在IMGT独特编号中,保守性氨基酸总是具有相同位置,例如半胱氨酸23(第1个CYS)、色氨酸41(保守性TRP)、疏水性氨基酸89、半胱氨酸104(第2个CYS)、苯丙氨酸或色氨酸118(J-PHE或J-TRP)。IMGT独特编号提供了框架区(FR1-IMGT:位置1至26,FR2-IMGT:39至55,FR3-IMGT:66至104和FR4-IMGT:118至128)和互补决定区CDR1-IMGT:27至38,CDR2-IMGT:56至65和CDR3-IMGT:105至117的标准化定界。由于空位代表未占用的位置,CDR-IMGT长度(在括号之间显示,并用点分开,例如[8.8.13])成为关键信息。在2D图解中使用IMGT独特编号,命名为IMGT珍珠链(Colliers de Perles)(Ruiz, M.和Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q.和Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)),并在IMGT/3D结构DB中的3D结构中使用(Kaas, Q., Ruiz, M.和Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004))。

[0024] 必须理解的是,在本说明书中没有矛盾的说明,互补决定区或CDR的意思是根据IMGT编号系统定义的免疫球蛋白重链和轻链的高变区。

[0025] 然而,也可根据Kabat编号系统定义CDR(Kabat等人, Sequences of proteins of immunological interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991和之后的版本)。有三个重链CDR和三个轻链CDR。此处,取决于情况,术语“CDR”用于指代一个或多个、或甚至全部含有大多数氨基酸残基的区域,所述氨基酸残基负责其所识别的抗原或表位的抗体结合亲和力。为了简化本申请的阅读,未定义根据Kabat的CDR。然而,使用根据IMGT的CDR的定义、根据Kabat定义CDR将是本领域技术人员显而易见的。

[0026] 在一个具体的实施方式中,根据本发明的IGF-1R抗体,特征在于其包含序列SEQ ID No.7所示的、或者和序列SEQ ID No.7具有至少90%同源性的任何序列所示的重链可变结构域。

[0027] 在一个具体的实施方式中,根据本发明的IGF-1R抗体,特征在于其包含序列SEQ ID No.8所示的、或者和序列SEQ ID No.8具有至少90%同源性的任何序列所示的轻链可变结构域。

[0028] 根据另一个实施方式,称为816C12的抗体,特征在于其包含重链可变结构域序列和/或其包含轻链可变结构域序列,所述重链可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID

No.7、或者最佳比对之后和序列SEQ ID No.7具有至少80%、优选85%、90%、95%和98%同源性的序列；所述轻链可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID No.8、或者最佳比对之后和序列SEQ ID No.8具有至少80%、优选85%、90%、95%和98%同源性的序列。

[0029] 在本发明的含义中，两个核酸或氨基酸序列之间的“同源性百分比”意指待比较的两条序列间在最佳比对后获得的相同核苷酸或氨基酸残基的百分比，此百分比是纯粹统计上的，两条序列间的差异沿其长度随机分布。两条核酸或氨基酸序列的比较传统上通过在其最佳比对后比较序列来实施，所述比较能通过节段(segment)或通过使用“比对窗口”来执行。除了手动比较之外，通过Smith和Waterman的局部同源性算法(1981)(Ad.App.Math.2:482)、通过Neddleman和Wunsch的局部同源性算法(1970)(J.Mol.Biol.48:443)、通过Pearson和Lipman的相似性搜索法(1988)(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444)或通过使用这些算法的计算机软件(Wisconsin遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,遗传学计算组,575Science Dr.,Madison,WI,或通过比较软件BLAST NR或BLAST P)可以实施待比较的序列的最佳比对。对于显示出与参考氨基酸序列有至少80%、优选至少85%、90%、95%或98%同源性的氨基酸序列,优选的实例包括包含参考序列、某些修饰(特别是删除、插入或取代至少一个氨基酸、截短或延长)的那些。在一个或多个连续或不连续的氨基酸被取代的情况下,优选在取代中所取代的氨基酸被“等价”氨基酸所代替。在此,表述“等价氨基酸”意指可能取代一个结构氨基酸、而不改变相应抗体生物学活性的任意氨基酸,以及下面定义的那些具体实例的任意氨基酸。

[0030] 可以根据其与它们所取代的氨基酸的结构同源性、或者根据可能生成的各种抗原结合蛋白间生物活性比较测试的结果,来确定等价氨基酸。

[0031] 作为非限制性实例,下面表1总结了可以实施而不导致相应修饰的抗原结合蛋白生物活性显著变化的可能取代;在同一条件下自然可以做相反的取代。

[0032] 表1

[0033]

原始残基	取代
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

[0034] 本发明的一个具体的方面是抗体或其任何抗原结合片段,不与胰岛素受体 (IR) 结合。

[0035] 在另一个实施方式中,本发明的抗体由单克隆抗体组成。

[0036] 如在此使用的术语“单克隆抗体”或“Mab”指从大体上同质的抗体群获得的抗体,即除了可能以最小量存在的可能天然出现的突变之外,群中的单个抗体是相同的。单克隆抗体是针对单表位高度特异性的。可以通过单克隆的B细胞或杂交瘤生产这样的单克隆抗体。单克隆抗体也可以是重组的,即通过蛋白工程生产。单克隆抗体也可以是从噬菌体抗体库中分离的。此外,与典型地包括针对不同决定簇或表位的不同抗体的多克隆抗体的制备不同,每种单克隆抗体针对抗原的单表位。本发明涉及一种从天然来源通过纯化分离或者获得的抗体,或者通过基因重组或化学合成获得的抗体。

[0037] 在另一个实施方式中,本发明的抗体由重组抗体组成。术语“重组抗体”指在活细胞中由重组DNA的表达获得的抗体。本发明的重组抗体通过使用本领域技术人员公知的基因重组的实验室方法产生不会在生物体中发现的DNA序列而获得。

[0038] 在另一个实施方式中,本发明的抗体由化学合成抗体组成。

[0039] “IGF-1R抗体”包括(无相反说明)鼠、还包括嵌合和人源化形式的所述IGF-1R抗体。

[0040] 为了更清楚,下表2示出根据IMGT定义的抗体816C12的序列。

[0041] 表2

抗体	CDR 编号	重链	轻链	SEQ ID No.
[0042] 816C12 I-4894	IMGT	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
		可变结构域		7
			可变结构域	8

[0043] 在一个实施方式中,在此的单克隆抗体包括鼠、嵌合和人源化的抗体。抗体可以衍生自提交于法国国家微生物保藏中心(法国,巴黎,巴斯德研究所,CNCM)的鼠源杂交瘤,所述杂交瘤通过免疫的Ba1b/C小鼠脾细胞/淋巴细胞和骨髓瘤Sp2/0-Ag 14细胞系的细胞融合获得。

[0044] 根据另一方面,本发明涉及一种鼠杂交瘤,其能够分泌根据本发明的单克隆抗体,尤其是以编号CNCM I-4894于2014年9月17日保藏在法国巴黎巴斯德研究所CNCM的鼠源杂交瘤。

[0045] 此处,由所述杂交瘤CNCM I-4894分泌的称为816C12的单克隆抗体或其任何抗原

结合片段,显然构成本发明的部分。

[0046] 本发明涉及一种IGF-1R抗体或其抗原结合片段,特征在于其由以编号CNCM I-4894于2014年9月17日提交至巴黎巴斯德研究所CNCM的杂交瘤所分泌。

[0047] 本发明还描述了以编号CNCM I-4894于2014年9月17日提交至巴黎巴斯德研究所CNCM的鼠杂交瘤。

[0048] 本发明的一个新的方面涉及一种分离的核酸,特征在于其选自以下核酸:

[0049] a) 核酸,其编码根据本发明的抗体;

[0050] b) 核酸,其包含选自序列SEQ ID No.9或10的序列、或者和序列SEQ ID No.9或10最佳比对之后具有至少80%、优选85%、90%、95%和98%同源性的序列;以及

[0051] e) a) 或b) 中限定的核酸的互补核酸。

[0052] 下表3总结了关于本发明抗体816C12的各种核苷酸序列。

[0053] 表3

抗体	重链	轻链	SEQ ID No.
816C12 I-4894	可变结构域		9
		可变结构域	10

[0055] 在本说明书中互换使用的术语“核酸”、“核序列”、“核酸序列”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”,表示无论有无修饰的确定核酸的片段或区域的精确核苷酸序列,其含有或不含有非天然核苷酸,是双链DNA、单链DNA或所述DNA的转录产物。

[0056] 此处还应当包括,本发明不涉及处于其天然染色体环境中的核苷酸序列,即天然状态。本发明的序列已经被分离和/或纯化,即例如通过复制,它们被直接地或间接地取样,它们的环境已经至少部分改变。在此还提及了例如通过宿主细胞的基因重组的方式获得分离的核酸,或者通过化学合成获得分离的核酸。

[0057] 本发明还涉及包含本发明所述核酸的载体。

[0058] 本发明尤其针对含有此类核苷酸序列的克隆和/或表达载体。

[0059] 本发明的载体优选含有在给定宿主细胞中允许核苷酸序列表达和/或分泌的元件。因而载体必须包含启动子、翻译起始和终止信号、还有适当的转录调控区。它必须能够在宿主细胞中以稳定的方式维持,并且任选地具有指导翻译蛋白分泌的特异信号。根据所用的宿主细胞,本领域技术人员能选择和优化这些不同元件。为此目的,核苷酸序列能被插入至所选宿主内的自主复制载体,或者是所选宿主的整合载体。

[0060] 此类载体以本领域技术人员通常使用的方法制备,而且产生的克隆能以如脂质转染、电穿孔、热激或化学方法的标准方法引入至适当的宿主。

[0061] 载体是例如质粒或病毒来源的载体。它们被用于转化宿主细胞以克隆或表达本发明的核苷酸序列。

[0062] 本发明还包括转化有或包含本发明上述载体的宿主细胞。

[0063] 宿主细胞能选自原核或真核系统,如细菌细胞例如,还有酵母细胞或动物细胞,特别是哺乳动物细胞。还能使用昆虫或植物细胞。

[0064] 本发明还涉及具有根据本发明的转化细胞的动物(除了人)。

[0065] 本发明的另一方面涉及一种用于生产根据本发明的抗体、或其功能片段之一的方法,其特征在于所述方法包括下列步骤:

[0066] a) 在介质中及在适当培养条件下培养根据本发明的宿主细胞;及

[0067] b) 从培养介质或从所述培养的细胞中回收因此生产的抗体、或其功能片段之一。

[0068] 根据本发明的转化细胞可用于制备根据本发明的重组多肽的方法中。用于制备根据本发明的重组形式的多肽的方法也包括在本说明书中,特征在于所述方法使用根据本发明的载体和/或转化有根据发明的载体的细胞。优选地,转化有根据本发明的载体的细胞在允许前述多肽得以表达和所述重组肽得以回收的条件下培养。

[0069] 如已提及的,宿主细胞能选自原核或真核系统。尤其是,可能鉴定有利于在此原核或真核系统中分泌的本发明的核苷酸序列。携带这样序列的根据本发明的载体因此能有利地用于生产待分泌的重组蛋白。事实上,蛋白在细胞培养物上清中而非在宿主细胞内存在的事实将有利于这些兴趣重组蛋白的纯化。

[0070] 还公开了本发明的抗体作为生物标记物的用途。方法可用于检测或诊断各种和IGF-1R表达有关的过度增殖性致癌疾病,例如但不限于,前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、结肠癌、胃癌、肾癌、胰腺癌、头颈癌或者和IGF-1R表达有关的任何其他癌症。正如本领域普通技术人员将认识到的,和特定疾病相关的抗体表达水平,将随着已有病症的性质和/或严重程度的不同而不同。

[0071] 按照本领域技术人员已知的任何常规方式施用本发明的抗体(例如,局部、肠胃外、肌肉内等),将提供极为有用的检测样本中发育异常的细胞的方法,并允许医师监测经受过度增殖性疾病治疗的患者的治疗方案,所述过度增殖性疾病和IGF-1R表达有关或者由IGF-1R表达所介导。

[0072] 本发明的抗体、或其抗原结合片段将在各种医学或研究目的中找到用武之地,包括和IGF-1R表达有关的各种病理学的检测、诊断、预后和分期(staging)。

[0073] 如上述,本发明的一个实施方式涉及IGF-1R抗体或其抗原结合片段作为试剂的用途,所述试剂用于检测表达IGF-1R的肿瘤细胞。

[0074] 如上述,本发明的另一个实施方式是IGF-1R抗体或其抗原结合片段用于体外或离体诊断或预后致癌疾病的用途,其中所述的致癌疾病和IGF-1R表达相关。

[0075] 如此处所用“诊断”疾病是指鉴定或检测病理性过度增值性致癌疾病的存在、监测疾病的进展、以及鉴定或检测细胞或样本的过程,其中所述的致癌疾病和IGF-1R表达有关或者由IGF-1R表达所介导,其中所述的细胞或样本指示着疾病和IGF-1R表达有关。

[0076] 如此处所用,“预后”是指从疾病当中恢复的可能性,或者预测疾病的可能发展或结果。例如,当来自受试者的样本对于IGF-1R抗体染色呈现阴性,则该受试者的“预后”优于当样本对IGF-1R染色呈现阳性的情况。在适当的等级(scale)上,针对IGF-1R的表达水平对样本进行评分,这将在此后详细描述。

[0077] IGF-1R抗体可以免疫缀合物或者标记抗体的形式存在,以获得可检测/可定量的信号。当和适当的标记或其他适当的可检测生物分子或化学物一同使用时,IGF-1R抗体尤其用于体外或体内诊断性和预后性应用。

[0078] 用于免疫分析的标记通常是本领域技术人员已知的,并且包括酶、放射性同位素以及荧光、发光和发色物质,包括有色颗粒比如胶体金或胶乳珠粒。合适的免疫分析包括酶联免疫吸附分析(ELISA)。各种类型的标记以及将标记缀合至IGF-1R抗体的方法是本领域技术人员已知的,比如,如下所述的那些。

[0079] 如此处所用,术语“和IGF-1R表达相关的致癌疾病”意图包括这样的疾病和其它疾病,在其中患有疾病的受试者中高水平IGF-1R(异常)的存在已显示或疑似和疾病的病理生理学有关、或者是导致疾病恶化的因素。或者,例如,在患有疾病的受试者中受到影响的细胞或组织中,通过细胞表面上IGF-1R水平的提高可以证实这种疾病。使用IGF-1R抗体可检测IGF-1R水平的提高。

[0080] 在某些实施方式中,“提高的表达”当有关IGF-1R时,是指相对于对照而言显示统计学上表达显著提高的蛋白或基因表达水平(如通过RNA表达或蛋白表达所测量的)。

[0081] 如上述,一个实施方式是IGF-1R抗体或其抗原结合片段用于确定患有致癌疾病的患者是否可能受益于治疗的用途,其中所述的治疗使用靶向IGF-1R通路的抑制剂,优选仅IGF-1R抗体、组合的IGF-1R抗体或缀合的IGF-1R抗体。

[0082] 如本说明书所用,表述“靶向IGF-1R通路的抑制剂”是指通过结合IGF-1R的配体或者结合IGFR本身,而能够降低或抑制IGF-1R酪氨酸激酶活性的任何化合物。这种抑制剂的实例是作为IGF-1R拮抗剂发挥作用的蛋白、肽、抗体或抗体-药物-缀合物或者任何化学化合物、抑制IGF-1R基因表达或抑制编码IGFR配体之一的基因表达的反义寡核苷酸或siRNA、或者本领域技术人员已知的任何其他药物或化合物。

[0083] 更具体地,在本说明书的上下文中,靶向IGF-1R通路的抑制剂意图包括能够结合IGF-1R并抑制其配体结合的任何化合物或分子。

[0084] 更具体地,在本说明书的上下文中,靶向IGF-1R通路的抑制剂意图包括结合IGF-1R的任何单克隆抗体。

[0085] 在另一个优选的实施方式中,靶向IGF-1R通路的抑制剂由抗体-药物-缀合物(ADC)组成,其中抗体部分靶向IGF-1R,药物部分可选自任何药物,比如细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素等……在一个示例性实施方式中,药物部分可以由澳瑞他汀、其类似物或衍生物组成。

[0086] 本发明的又一个主题是描述一种用于体外或离体检测受试者中表达IGF-1R的肿瘤细胞的存在和/或位置的方法,所述方法包括步骤:

[0087] (a) 用上述根据本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;以及

[0088] (b) 检测所述IGF-1R抗体或其抗原结合片段与所述生物样本的结合。

[0089] 本发明还涉及一种体外或离体检测和/或定量和/或确定受试者中IGF-1R表达水平(优选在细胞表面上的表达水平)的方法,所述方法包括步骤:

[0090] (a) 用上述根据本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;以及

[0091] (b) 检测和/或定量和/或确定所述IGF-1R抗体或其抗原结合片段与所述生物样本结合的水平。

[0092] 通过技术人员可用的各种分析,可以检测和/或定量和/或确定IGF-1R抗体的结合。尽管用于进行分析的任何合适的方式都包括在本发明之内,尤其可以提及荧光激活细胞分选(FACS)、ELISA、western印记和免疫组织化学(IHC)。优选的方法包括IHC和FACS。

[0093] 本发明还描述一种用于体外或离体检测受试者中表达IGF-1R的肿瘤细胞的百分比的方法,所述方法包括步骤:

- [0094] (a) 用上述IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;以及
- [0095] (b) 对所述生物样本中表达IGF-1R的细胞的百分比进行定量。
- [0096] 另一个实施方式是一种用于体外或离体确定受试者中肿瘤细胞或肿瘤中IGF-1R的表达水平的方法,所述方法包括步骤:
- [0097] (a) 用上述IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;以及
- [0098] (b) 对所述IGF-1R抗体或其抗原结合片段与所述生物样本中IGF-1R结合的水平进行定量。
- [0099] 对于技术人员是显而易见的,通过本领域技术人员已知的任何方式可以定量IGF-1R抗体结合IGF-1R的水平。优选方法包括使用免疫酶促方法,比如ELISA分析、免疫荧光、IHC、放射免疫分析(RIA)或FACS。
- [0100] 根据本发明的方法,通过荧光激活细胞分选(FACS)或免疫组织化学(IHC)定量所述IGF-1R抗体或其抗原结合片段与IGF-1R结合的水平。
- [0101] “生物样本”可以是可取自受试者的任何样本。这种样本必须允许确定本发明的生物标记物的表达水平。样本的性质将因此取决于肿瘤的性质。
- [0102] 当癌症是流体肿瘤时,优选的生物样本包括样本,比如血液样本、血浆样本或淋巴样本。
- [0103] 当癌症是实体肿瘤时,优选的生物样本包括样本,比如活检样本或取自外科切除疗法的样本。
- [0104] 优选地,生物样本是生物流体,比如人源的血清、全血细胞、组织样本或活检。样本可以例如包括活组织检查的组织,其可以对IGF-1R表达相关的病理性致癌疾病的存在进行常规的分析。
- [0105] 一旦在测试生物样本中进行了IGF-1R表达水平的确定,结果可以和对照样本的结果进行比较,按照和测试生物样本相似的方式获得所述对照样本,但是区别在于其来自未患有IGF-1R表达相关的致癌疾病的个体。当测试生物样本中IGF-1R水平显著升高时,可以得出结论,其所来自的受试者患有或将发展成所述疾病的可能性提高。
- [0106] 本发明涉及一种用于体外或离体诊断或预后表达IGF-1R的肿瘤的方法,其中所述方法包括步骤:(i)如上述,通过根据本发明的一种用于体外或离体确定受试者肿瘤细胞或肿瘤中IGF-1R表达水平的方法,来确定IGF-1R的表达水平,以及(ii)将步骤(i)的表达水平与来自正常组织或不表达IGF-1R的组织中IGF-1R的参考表达水平进行比较。
- [0107] 关于靶向抗肿瘤疗法的发展,采用免疫组织化学技术的诊断给出关于受体表达水平的原位信息,因此根据这种治疗所需的受体表达水平能够选择对治疗易感的患者。
- [0108] 确定分期(stage)具有潜在的预后价值,并为设计最佳疗法提供原则。Simpson等人J.Clin.Oncology 18:2059(2000)。例如,实体肿瘤的治疗选择基于肿瘤分期,其通常使用来自美国癌症联合委员会(AJCC)的肿瘤/结节/转移(TNM)测试来进行。尽管此测试和分期系统提供了一些关于在患者中所诊断的实体癌的分期的有价值信息,但是通常认为其不精确和不充分。特别是,其不能鉴定肿瘤进展的最早期。
- [0109] 另一个实施方式由一种体外或离体确定受试者中肿瘤细胞或肿瘤的IGF-1R评分的方法组成,所述方法包括步骤:
- [0110] (a) 用上述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段接触来自所述受试者的生物样本;

[0111] (b) 通过荧光激活细胞分选 (FACS) 或免疫组织化学 (IHC) 对所述 IGF-1R 抗体或其抗原结合片段与所述生物样本中 IGF-1R 结合的水平进行定量; 以及

[0112] (c) 通过将步骤 (b) 所得的定量水平与基于两种参数的适当的等级进行比较从而对肿瘤细胞或肿瘤进行评分, 其中所述的两种参数是染色强度和阳性细胞百分比。

[0113] 在一个实施方式中, 当组织样本经过甲醛固定、甲醛取代固定、Glycol-fixx 固定、石蜡包埋和/或冷冻时, IGF-1R 抗体能够结合 IGF-1R。

[0114] 任何常规危害分析方法可用于评价 IGF-1R 的预后值。代表性分析方法包括 Cox 回归分析, 这是一种半参数方法, 在存在删失的情况下用于建立生存模型或时间-事件的数据 (Hosmer 和 Lemeshow, 1999; Cox, 1972)。不同于其他生存分析, 例如寿命表或 Kaplan-Meyer, Cox 允许在模型中纳入预测变量 (协变量)。使用常规分析方法如 Cox, 人们能够验证关于以下的假设: 原发性肿瘤中 IGF-1R 表达状态和疾病复发的发作时间 (time-to-onset) (无疾病生存时间、或发生转移性疾病的时间)、或者从患病到死亡的时间 (整体生存时间) 的相关性。Cox 回归分析也被视为 Cox 比例危害分析。这种方法是检验肿瘤标记物对患者生存时间预后值的标准方法。当用于多变量模型时, 平行测试多种变量的作用, 从而可以确定具有独立预后值的各变量, 即最有用的标记物。术语阴性或阳性 “IGF-1R 状态” 也可称作 [IGF-1R (-)] 或者 [IGF-1R (+)]。

[0115] 在诊断或监测癌症期间可给样本 “评分”。以其最简单的形式, 通过免疫组织化学目测检验样本进行判断, 评分可划分为阴性或阳性。更加定量的评分涉及判断两种参数, 取样细胞的染色强度和染色 (“阳性”) 细胞的百分比。

[0116] 在本发明的意义中, “IGF-1R 状态” 是指, 如通过任何方法所测量的, 比如免疫组织化学 (IHC)、荧光激活细胞分选 (FACS) 或本领域技术人员已知的其它方法, 基于 IGF-1R 表达水平的确定, 将肿瘤划分为 IGF-1R 阳性 [IGF-1R (+)] 或 IGF-1R 阴性 [IGF-1R (-)] 的类别。

[0117] 在一个实施方式中, 为了确保标准化, 在不同的等级上, 针对 IGF-1R 表达水平给样本进行评分, 它们大多数基于反应产物强度和阳性细胞的百分比的评价 (Payne 等人 Predictive markers in breast cancer-the present. Histopathology 2008, 52, 82-90)。

[0118] 在另一实施方式中, 所述评分, 尤其是本发明方法的步骤 (c) 中, 包括使用基于染色强度和阳性细胞的百分比的适当的等级。

[0119] 作为第一实例, 通过类比用于雌激素受体和孕酮受体 IHC 评价的快速 Allred 评分, 在组合反应性强度和染色细胞比例的分数 0 至 8 的整体等级上对样本的 IGF-1R 表达水平进行评分 (Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC; J. Clin. Oncol. 1999; 17; 1474-1481)。更具体地, 反应性强度的第一原则是在 0 至 3 的等级上进行评分, 0 对应 “无反应性” 以及 3 对应 “强反应性”。比例反应的第二原则是在 0 至 5 的等级上进行评分, 0 对应 “无反应性” 以及 5 对应 “67-100% 比例反应”。反应性强度的评分和比例反应的评分然后进行加和来产生 0 至 8 的总分数。0-2 的总分数被视为阴性, 而 3-8 的总分数被视为阳性。

[0120] 根据这种等级, 本说明书中所用术语肿瘤或肿瘤细胞的阴性或阳性 “IGF-1R 状态” 是指 IGF-1R 的表达水平, 其分别对应着 Allred 等级上的评分 0-2 或 3-8。

[0121] 此后的表 4 表示根据 Allred 方法说明 IHC 结果的指南。

[0122] 表 4

免疫反应性强度	评分 1	比例反应	评分 2
无反应性	0	无反应性	0
弱反应性	1	<1%	1
中等反应性	2	1-10%	2
强反应性	3	11-33%	3
[0123]	-	34-66%	4
	-	67-100%	5
总评分	解释		
(评分 1+ 评分 2)			
0-2	阴性		
3-8	阳性		

[0124] 根据本发明,方法特征在于所述适当的等级是0至8的等级,其中无反应性是评分0,而按照67-100%比例反应的强反应性是评分8。

[0125] 因此,在优选的实施方式中,根据本发明用于体外或离体确定受试者肿瘤细胞或肿瘤的IGF-1R评分的方法,特征在于步骤(c)中所述适当的等级是0至8的等级,其中无反应性是评分0,而按照67-100%比例反应的强反应性是评分8。

[0126] 换言之,其描述并要求保护一种用于体外或离体确定受试者肿瘤或肿瘤细胞状态的方法,其中所述方法包括步骤:

[0127] (a) 根据Allred等级对来自受试者的肿瘤或肿瘤细胞进行评分;以及

[0128] (b) -i) 确定肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为3至8的[IGF-1R(+)] ;或者

[0129] -ii) 确定肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为0至2的[IGF-1R(-)]。

[0130] 在本发明的一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为3的[IGF-1R(+)]。

[0131] 在本发明的一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为4的[IGF-1R(+)]。

[0132] 在本发明的一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为5的[IGF-1R(+)]。

[0133] 在本发明的一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为6的[IGF-1R(+)]。

[0134] 在本发明的一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为7的[IGF-1R(+)]。

[0135] 在本发明的一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为8的[IGF-1R(+)]。

[0136] 在本发明的另一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞的状态是Allred评分为3至8的[IGF-1R(+)]。

[0137] 此处所述的另一个具体的用于体外或离体确定受试者肿瘤细胞或肿瘤IGF-1R状态的方法,特征在于其包括步骤:

[0138] (a) 根据权利要求18的方法,对来自所述受试者的肿瘤细胞或肿瘤进行IGF-1R评分;以及

[0139] (b) 确定肿瘤细胞或肿瘤的IGF-1R状态是评分为3至8的[IGF-1R(+)];或者

[0140] (c) 确定肿瘤细胞或肿瘤的IGF-1R状态是评分为0至2的[IGF-1R(-)]。

[0141] 作为第二实例,通过类比用于HER-2受体IHC评价的常规评分,例如在多少更简单点的评分方法上对样本的IGF-1R表达水平进行评分,该方法将染色强度(优选膜染色)和显示染色的细胞比例整合为0至3+的组合等级。

[0142] 在这个称为最简单等级的等级上,0和1+是阴性,而2+和3+代表阳性染色。无论如何,评分1+至3+可以记录为阳性,这是因为相较于评分0(阴性),每个阳性评分都与更高的复发风险和致死性疾病显著相关,但是增加阳性评分的强度则提供额外的风险降低。

[0143] 通常来说,本说明书所用术语肿瘤或肿瘤细胞的阴性或阳性“IGF-1R状态”是指IGF-1R的表达水平,其分别对应着简化等级上的评分0至1+或者2+至3+。只应考虑侵袭性肿瘤完整的周膜反应性(circumferential membranous reactivity),并通常体现为“鸡笼(chicken wire)”形态。根据当前的指南,评分为IGF-1R边界(2+或者3+的评分)的样本要求进行更进一步的评价。作为非限制性实例,当对照和所预期的不同、伪影(artifacts)涉及到大多数样本并且样本具有强的正常乳导管(内对照)膜阳性时,表明抗原恢复过量,应避免IHC分析,也不要通过FISH或者任何其他方法进行重复或测试。

[0144] 为了清楚,此后的表5总结了这些参数。

[0145] 表5

IGF-1R 状态	IHC 描述
0	无反应性、或在少于 10%的肿瘤细胞中有膜反应性。
1 ⁺	在多于 10%的肿瘤细胞中检测到微弱/几乎不可见的膜反应性。细胞仅在部分膜中有免疫反应性。
2 ⁺	在多于 10%的肿瘤细胞中观察到弱至中等的完整膜反应性。
3 ⁺	在多于 10%的肿瘤细胞中观察到强的完整膜反应性。

[0146] 本发明的方法的特征在于所述适当的等级是0至3+的等级,其中肿瘤细胞无膜反应性是评分0,而在多于10%的肿瘤细胞中强的完整反应性是评分3+。

[0147] 详细而言,如上述,所述适当等级是0至3的等级,其中肿瘤细胞无膜反应性是评分0;在多于10%的肿瘤细胞中微弱几乎不可见的膜反应性是评分1+;在多于10%的肿瘤细胞中弱至中等的完整膜反应性是评分2+;以及在多于10%的肿瘤细胞中强的完整反应性是评分3+。

[0148] 换言之,其描述并要求保护一种用于体外或离体确定受试者肿瘤或肿瘤细胞状态的方法,其中所述方法包括步骤:(a)如上述,根据简化等级对来自受试者的肿瘤或肿瘤细胞进行评分;以及(b)确定肿瘤或肿瘤细胞的状态是评分为2+或3+的[IGF-1R(+)];或者(c)确定肿瘤或肿瘤细胞的状态是评分为0或1+的[IGF-1R(-)]。

[0149] 在本发明的一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞是评分为2+的[IGF-1R(+)]。

[0150] 在本发明的一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞是评分为3+的[IGF-1R(+)]。

- [0152] 在本发明的另一个具体方面中,肿瘤或肿瘤细胞是评分为2+或3+的[IGF-1R(+)]。
- [0153] 在另一实施方式中,本发明涉及一种用于体外或离体确定受试者肿瘤细胞或肿瘤IGF-1R状态的方法,其中所述方法包括步骤:
- [0154] (a) 如上述,根据本发明的方法对来自所述受试者的肿瘤细胞或肿瘤进行IGF-1R评分;以及
- [0155] (b) -i) 确定肿瘤细胞或肿瘤的IGF-1R状态是评分为 2^+ 或 3^+ 的[IGF-1R(+)] ;或者
- [0156] -ii) 确定肿瘤细胞的IGF-1R状态是评分为0或 1^+ 的[IGF-1R(-)]。
- [0157] 一般地,测试或分析的结果可以以各种格式的任意一种呈现。结果可以以定性呈现。例如,测试报告可以仅指示是否检测到具体的多肽,也可能指示检测限。结果可以以半定量显示。例如,可以定义各种范围,并且可以对范围指定评分(例如,依据所使用的等级,0至3+或0至8),提供一定程度的定量信息。这样的评分可以反映各种因素,例如,其中检测IGF-1R的细胞数量、信号的强度(其可以指示IGF-1R或携带IGF-1R的细胞的表达水平)等。结果可以以定量的方式显示,例如,作为在其中检测到IGF-1R的细胞的百分比、作为蛋白浓度等。
- [0158] 如本领域普通技术人员将理解的,由测试提供的输出类型将依据测试的技术限制和与检测多肽相关的生物学意义的不同而变化。例如,在某些多肽的情况下,仅定性输出就提供了重要的信息(例如,是否在某一检测水平检测到多肽)。在其它情况下,需要更多的定量输出(例如,待测样本中多肽的表达水平与正常水平的比例)。
- [0159] 在另一方面,描述了一种在受试者中诊断病理性过度增殖性致癌疾病或与IGF-1R表达相关的病理性病症的易感性的方法,所述方法包括以下步骤:
- [0160] (a) 通过根据本发明的检测表达IGF-1R的细胞的方法和/或确定IGF-1R的表达水平的方法,确定样本中携带IGF-1R的细胞的存在或不存在,以及
- [0161] (b) 基于所述携带IGF-1R的细胞的存在或不存在,诊断病理性病况或对病理性病况的易感性。
- [0162] 在此处描述的方法中,检测到表达IGF-1R的细胞或IGF-1R水平的增加一般指示患者患有或疑似呈现IGF-1R介导的疾病。
- [0163] 本发明还提供了一种用于预测个体发展为癌症的风险的方法,所述方法包括通过根据本发明的用于检测表达IGF-1R的细胞的方法和/或确定IGF-1R的表达水平的方法,检测组织样本中IGF-1R的表达水平,其中高水平的IGF-1R表达指示发展癌症的高风险。
- [0164] 本发明还涉及一种用于评估肿瘤侵袭性的方法。
- [0165] 本文所用的“肿瘤侵袭性”是指肿瘤快速生长并趋于快速扩散。
- [0166] 在一个实施方案中,所述用于评估肿瘤侵袭性的方法包括以下步骤:
- [0167] (a) 通过根据本发明的检测表达IGF-1R的细胞的方法和/或确定IGF-1R的表达水平的方法,确定肿瘤样本中细胞表达的IGF-1R的水平,
- [0168] (b) 通过根据本发明的检测表达IGF-1R的细胞的方法和/或确定IGF-1R的表达水平的方法,确定在更晚的时间来自相同个体获取的等价组织样本中表达的IGF-1R的水平,和
- [0169] (c) 确定步骤(a)中获得的表达水平与步骤(b)中获得的比例之间的比例,
- [0170] 其中肿瘤样本中随时间IGF-1R表达的比例提供关于癌症进展的风险的信息。

[0171] 在一个优选的实施方式中,步骤(a)中获得的水平与步骤(b)中获得的水平的比例大于1指示侵袭性。在另一个实施方式中,小于或等于1的比例指示非侵袭性。

[0172] 本发明的另一方面是通过根据本发明涉及的检测和/或定量IGF-1R的方法、和/或确定表达水平的方法,监测IGF-1R表达对施用靶向IGF-1R通路的疗法的响应。当所述疗法触发IGF-1R的下调和/或降解时,这种监测可以是非常有用的。

[0173] 本发明的另一个目的是描述一种用于确定致癌疾病是否易感于采用靶向IGF-1R通路的抗体药物的治疗的方法,所述方法包括以下步骤:

[0174] (a) 如上所述,根据本发明的评分方法在体外或离体确定受试者肿瘤的肿瘤细胞的IGF-1R状态,以及

[0175] (b) 当肿瘤细胞或肿瘤的IGF-1R状态是IGF-1R(+)时,则确定致癌疾病易感于靶向IGF-1R通路的抗体药物的治疗。

[0176] 尤其是,监测细胞表面上的IGF-1R表达可能是评估临床试验和“个体化”疗法期间的治疗功效的关键工具。

[0177] 因此,该应用提供了用于给受试者确定合适的治疗方案的方法。

[0178] 可以通过根据本发明的检测和/或确定表达水平的方法,确定IGF-1R水平的增加或降低,指示与IGF-1R相关的癌症的进展。因此,通过测量存在于各种组织或细胞中的表达IGF-1R的细胞数量的增加或IGF-1R浓度的变化,可以确定旨在改善与IGF-1R相关的恶性肿瘤的具体治疗方案是否有效。

[0179] 本发明的另一个目的是一种用于在体外或离体确定治疗方案的功效的方法,所述治疗方案设计用于减轻患有与IGF-1R相关的致癌疾病的受试者中的所述疾病,所述方法包括以下步骤:

[0180] (a) 通过如上所述的根据本发明的用于检测和/或确定表达水平的方法,在第一生物样本中,确定IGF-1R的第一表达水平,所述第一生物样本对应于所述治疗的第一时间点;

[0181] (b) 通过如上所述的根据本发明的用于检测和/或确定表达水平的方法,在第二生物样本中,确定IGF-1R的第二表达水平,所述第二生物样本对应于所述治疗的第二更晚的时间点;

[0182] (c) 计算步骤(a)中获得的所述第一表达水平与步骤(b)中获得的所述第二表达水平的比例;和

[0183] (d) 当步骤(c)的比例大于1时,确定所述治疗方案的功效是高的;或者当步骤(c)的比例小于或等于1时,确定所述治疗方案的功效是低的。

[0184] 在一个优选的实施方案中,所述的设计用于减轻患有与IGF-1R相关的致癌疾病的受试者中所述疾病的治疗方案,包括向所述受试者施用靶向IGF-1R通路的疗法。

[0185] 本发明的另一个目的是提供一种体内成像与IGF-1R表达相关的致癌疾病的方法,其使用根据本发明的检测和/或确定表达水平的方法。这种方法对于体内肿瘤细胞的定位以及监测其侵袭性是有用的。同样,该方法用于监测先前诊断为IGF-1R介导的癌症的患者的进展和/或对治疗的响应。

[0186] 一个实施方式是一种用于检测受试者中表达IGF-1R的肿瘤细胞的位置的方法,所述方法包括以下步骤:

[0187] a) 将根据本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段施用至受试者;和

[0188] b) 检测所述IGF-1R抗体的结合,

[0189] 其中所述结合指示肿瘤细胞的存在。

[0190] 对于表达肿瘤的存在检测,可以使用本领域技术人员已知的许多技术。然而,优选的方式是IHC和FACS。

[0191] 另一方面,本发明提供一种体内成像试剂,所述试剂包含根据本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段,优选将所述IGF-1R抗体进行标记,更优选进行放射性标记。

[0192] 本发明还涉及所述试剂在患IGF-1R介导的癌症的患者的医学成像中的用途。

[0193] 本发明的方法包括以下步骤:

[0194] (a) 向所述患者施用成像有效量的本发明的成像试剂,和

[0195] (b) 检测所述试剂。

[0196] 在一个优选的实施方案中,成像试剂包含根据本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段以及活性部分。

[0197] 本文使用的“活性部分”是允许在体内检测所述成像试剂的试剂。根据本发明的活性部分尤其包括如锝-99m (99mTc)、铜-67 (Cu-67)、钪-47 (Sc-47),镱-77 (Lu-177)、铜-64 (Cu-64)、钇-86 (Y-86)或碘-124 (I-124)的放射性元素。

[0198] 成像试剂以在哺乳动物如人中诊断使用的有效用量施用,然后检测成像试剂的定位和积累。成像试剂的定位和积累可以通过放射性核素成像、放射性闪烁照相法 (radioscintigraphy)、核磁共振成像、计算机断层扫描、正电子发射断层扫描、计算机轴向断层扫描、X射线或磁共振成像方法、荧光检测和化学发光检测来检测。

[0199] 关于靶向抗肿瘤疗法的发展,采用免疫组织化学技术的诊断给出了受体表达水平的原位信息,例如,关于肿瘤的尺寸和/或位置。因此,诊断使得能够根据这种治疗所需的受体的表达水平选择对治疗敏感的患者。

[0200] 本发明的尤其有趣的方面是一种用于选择癌症患者的方法,预期所述癌症患者受益于或不受益于施用治疗量的靶向IGF-1R途径的抗体药物,所述方法包括以下步骤:

[0201] (a) 如上述,根据本发明的方法确定IGF-1R的表达水平;

[0202] (b) 将前述步骤(a)的表达水平与参考表达水平进行比较;和

[0203] (c) 当(a)中获得的表达水平与参考表达水平的比例大于1时,则选择预测受益于靶向IGF-1R通路的抗体药物的治疗的患者;或者

[0204] (d) 当(a)中获得的表达水平与参考表达水平的比例小于或等于1时,则选择预测不受益于靶向IGF-1R通路的抗体药物的治疗的患者。

[0205] 有利地,IGF-1R的表达水平相对于对照细胞或样本中的水平(也称为“参考水平”或“参考表达水平”)进行比较或测量。“参考水平”、“参考表达水平”、“对照水平”和“对照”在说明书中可以互换使用。“对照水平”是指在可比较的对照细胞中测量的单独的基线水平,所述对照细胞通常没有疾病或癌症。所述对照细胞可以来自相同的个体,因为即使在癌症患者中,肿瘤部位的组织仍然包含非肿瘤健康组织。它也可能起源于另一个体,所述个体是正常的、或者不存在与患病的或测试样本所得的相同疾病。在本发明的上下文中,术语“参考水平”是指IGF-1R表达的“对照水平”,其用于评估含有癌症细胞的患者样本中IGF-1R表达的测试水平。例如,当患者生物样本中的IGF-1R水平高于IGF-1R的参考水平时,细胞将被认为具有高水平的IGF-1R的表达或过表达。参考水平可以通过多种方法来确定。因此,表

达水平可以定义携带IGF-1R的细胞,或者可选地与表达IGF-1R的细胞数目无关的IGF-1R的表达水平。因此,每个患者的参考水平可以通过IGF-1R的参考比例来规定,其中参考比例可以通过本文所述的用于确定参考水平的任意方法来确定。

[0206] 例如,对照可以是采取各种形式的预定值。它可以是单个截断值,如中位数或平均值。“参考水平”可以是同样适用于每个个体患者的单个数,或者参考水平可以根据患者的特定亚群而变化。因此,例如,同样的癌症,老年人可能具有与年轻人不同参考水平,以及同样的癌症,女性可能具有与男性不同的参考水平。或者,可以通过测量来自与待测试的肿瘤细胞的组织相同组织的非致癌癌症细胞中IGF-1R的表达水平来确定“参考水平”。同样,“参考水平”可能是患者肿瘤细胞中IGF-1R相对于同一患者中非肿瘤细胞中IGF-1R水平的某一比例。“参考水平”也可以是体外培养细胞的IGF-1R水平,其可以被操纵以模拟肿瘤细胞,或者可以以产生精确确定参考水平的表达水平的任意其它方式进行操纵。另一方面,可以基于比较组建立“参考水平”,如不具有升高的IGF-1R水平的组和具有升高的IGF-1R水平的组。比较组的另一个实例是患有具体疾病、病症或症状的组,以及没有疾病的组。预定值可以被设定,例如,将测试的群平均(或不平均)分成若干组,如低风险组、中等风险组和高风险组。

[0207] 参考水平也可以通过比较具有相同癌症的患者的群的IGF-1R水平来确定。这可以通过例如直方图分析完成,其中以图形方式呈现整个患者队列,其中第一轴表示IGF-1R的水平,第二轴表示在该队列中其肿瘤细胞表达给定IGF-1R水平的患者的数目。可以通过鉴定具有相同或相似水平的IGF-1R的队列的子集群来确定两个或多个单独的患者组。然后可以基于最佳区分这些单独的组的水平,来确定参考水平。参考水平也可以表示两种或多种标志物的水平,其中之一是IGF-1R。两种或多种标志物可以例如通过每种标记物的水平的值的比例来表示。

[0208] 同样,显然健康的群与已知具有与IGF-1R表达相关的病症的群具有不同的“正常”范围。因此,所选择的预定值可以考虑个体落入的类别。本领域普通技术人员可以通过不超过常规的实验来选择合适的范围和类别。“升高”、“增加”是指相对于所选择的对照是高的。通常,对照将基于合适年龄段中显然健康的正常个体。

[0209] 还将理解,除了预定值之外,根据本发明的对照可以是与实验材料平行测试的材料样本。实例包括来自相同受试者的在相同时间获得的组织或细胞,例如,单次活检的部分,或者来自受试者的单细胞样本的部分。

[0210] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于在体内成像与IGF-1R表达相关的致癌疾病的药物组合物,所述药物组合物包含上述根据本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段,或者抗原结合片段,其是标记的以及还包含可药用载体。

[0211] 在另一个方面,还描述了一种用于检测患者中表达IGF-1R的肿瘤细胞的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒至少包含如上所述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段,优选抗体816C12。

[0212] 包含预定量的试剂组合和用于进行诊断分析的说明书的包装材料,也在本发明的范围内,例如,试剂盒。试剂盒含有用于体外检测和定量IGF-1R的IGF-1R抗体,例如,在ELISA中。当IGF-1R抗体用酶标记时,试剂盒将包括酶所需的底物和辅因子(例如,提供可检测的发色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包括其它添加剂,如稳定剂、缓冲剂(例如封

闭缓冲液或裂解缓冲液)等。这种试剂盒可以包含被区划的底座(receptacle),以接纳一个或多个容器如小瓶、管等,这种容器持有本发明的单独的元件。例如,一个容器可以含有结合于不溶性或部分可溶性载体的第一抗体。第二容器可含有冻干形式或在溶液中的可溶性的可检测标记的第二抗体。底座还可以包含第三容器,其持有冻干形式或在溶液中的可检测标记的第三抗体。这种性质的试剂盒可用于本发明的夹心分析。标签或包装插页可以提供组合物的描述以及预期的体外或诊断用途的说明书。

[0213] 各种试剂的相对量可以广泛变化以提供在试剂溶液中的浓度,其实质上优化了分析的灵敏度。尤其是,试剂可以作为干粉提供,通常是冻干的,这包括赋形剂,其在溶解时将提供具有合适浓度的试剂溶液。

[0214] 在另一个方面,提供根据本发明本文详细描述IGF-1R抗体或其抗原结合片段,其标记有可检测部分,使得它们可以包装并例如在试剂盒中使用,以诊断或鉴定具有上述抗原的细胞。这种标记的非限制性实例包括荧光团,如异硫氰酸荧光素;发色团、放射性核素、生物素或酶。这种标记的IGF-1R抗体可用于例如抗原的组织学定位、ELISA、细胞分选以及用于检测或定量IGF-1R以及携带该抗原的细胞的其它免疫技术。

[0215] 本发明还涉及一种试剂盒,其中所述试剂盒的特征在于其包含根据本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段。

[0216] 本发明还涉及一种试剂盒,其中所述试剂盒的特征在于其包含嵌合的或人源化的IGF-1R抗体或其抗原结合片段,可以从具有根据本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段的序列SEQ ID No.1至6的6个CDR获得。

[0217] 还提供了可用作从细胞中纯化或免疫沉淀IGF-1R的阳性对照的试剂盒。为了分离和纯化IGF-1R,试剂盒可以含有偶联到珠(例如琼脂糖珠)上的根据本发明本文详细描述的IGF-1R抗体或其抗原结合片段。可以提供含有用于体外检测和定量IGF-1R的抗体的试剂盒,例如,在ELISA中。试剂盒包含容器和在容器上或与容器相关的标签或包装插页。可以包括额外的容器,其含有例如稀释剂和缓冲液、对照抗体。标签或包装插页可以提供组合物的描述以及预期的体外或诊断用途的说明书。

[0218] 更具体地,本发明涉及一种通过本文所述的方法体外或离体确定受试者中肿瘤的肿瘤细胞的IGF-1R状态的试剂盒。在一个优选的实施方案中,如将在实施例中描述的,本发明涉及一种用于通过IHC和/或FACS方法确定肿瘤或肿瘤细胞的IGF-1R状态的试剂盒。

[0219] 在一个具体的实施方案中,本发明包括至少包含如上所述的本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段的试剂盒,所述抗体是标记的。

[0220] 在一个优选的实施方式中,根据本发明的试剂盒还包含可用于检测所述IGF-1R抗体与IGF-1R之间的结合程度的试剂。

[0221] 在另一个优选的实施方式中,可用于体外或离体确定表达IGF-1R的肿瘤中IGF-1R的表达水平的本发明的试剂盒,其还包含用于定量所述标记的IGF-1R抗体和IGF-1R之间的结合水平的试剂。

[0222] 在另一个实施方式中,根据本发明的试剂盒还包含:i)用于检测所述标记的IGF-1R抗体和IGF-1R之间的结合程度的试剂;和ii)用于评分IGF-1R表达水平的阳性和阴性对照样本。

[0223] 所述试剂盒还可以包含对鼠抗体或人的/人源化的抗体特异性的多克隆抗体,优

选对鼠的、人源化的或人的抗体特异性的所述多克隆抗体进行标记。

[0224] 根据本发明的一个具体的实施方式,用于在体外选择预期受益于或不受益于靶向IGF-1R通路的抑制剂的治疗性施用的癌症患者的试剂盒,其可以包括:i)可用于检测所述IGF-1R抗体与IGF-1R之间的结合程度的试剂;ii)与对IGF-1R抑制剂的敏感性相关的对照水平,和/或iii)与IGF-1R抑制剂的耐受相关的对照水平。

[0225] 本发明还涉及用于确定患有致癌疾病的患者是否可能受益于靶向IGF-1R通路的抗体药物的治疗的试剂盒,其特征在於,所述试剂盒至少包含如上所述的本发明的IGF-1R抗体或其抗原结合片段。

[0226] 在另一个实施方案中,所述试剂盒的特征在於,其还包含:

[0227] i) 用于检测所述IGF-1R抗体与肿瘤细胞表面上的IGF-1R之间结合程度的试剂;
和/或

[0228] ii) 用于定量所述IGF-1R抗体与肿瘤细胞表面上的IGF-1R之间的结合水平的试剂。

[0229] 本发明的其它特征和优点出现在以下实施例和附图的继续描述中,附图说明在下面示出。

附图说明

[0230] 图1:在rhIGF1R ELISA中采用816C12抗体获得的OD值的图示。使用Prism应用程序确定数据拟合和EC₅₀确定。

[0231] 图2A-2C:采用816C12(图2A)、G11抗IGF-1R抗体(Roche Ventana)(图2B)或AF-305(R&D system)抗IGF-1R抗体(图2C)的石蜡包埋的肿瘤MCF-7的免疫组织化学(IHC)模式识别。

[0232] 图3:抗IGF-1R ADC在MCF-7异种移植模型中的体内活性。

[0233] 图4A-4C:采用816C12、G11抗IGF-1R抗体(Roche Ventana)(图4B)或AF-305(R&D system)抗IGF-1R抗体(图4C)的石蜡包埋的肿瘤SBC-5的免疫组织化学(IHC)模式识别。

[0234] 图5:抗IGF-1R ADC在SBC-5异种移植模型中的体内活性。

具体实施方式

[0235] 实施例1:816C12生成和选择

[0236] 如下所述的产生并选择针对IGF-1R生成的Mab。

[0237] 通过采用10 μ g的重组人IGF-1R蛋白(R and D Systems,391-GR)与弗氏佐剂皮下注射来免疫雌性Ba1b/C小鼠。每隔两周重复免疫接种3次。在佐剂存在下通过腹膜内注射进行第四次注射。

[0238] 三天后,采用PEG 50%将脾细胞与SP20Ag14骨髓瘤细胞融合。在HAT代谢选择14天后,通过FACS使用人MCF7乳癌细胞测试杂交瘤上清液。只保留了结合MCF7的抗体。

[0239] 然后通过有限稀释来克隆感兴趣的抗体。克隆后8天,通过FACS使用MCF7细胞再次选择上清液。保留三个阳性克隆。使用来自Southern Biotechnologies的SBA克隆分型系统HRP试剂盒(Cat:5300-05)确定分泌的抗体的分型。最后,一个克隆被扩增和冷冻。

[0240] 然后使用杂交瘤上清液如rhIGF-1R或rmIGF-1R或rhIR ELISA进行816C12抗体的

进一步表征。在所有直接ELISA中,将感兴趣的蛋白固定(1 μ g/ml)到每个孔的底部。饱和后,将杂交瘤上清液加入孔中。在1小时的孵育期和洗涤步骤之后,山羊抗小鼠IgG-HRP标记的多克隆抗体的溶液用于检测,之后添加TMB底物。用1M H₂SO₄溶液终止反应,之后在450nm波长下用分光光度计读取OD。数据见下表6。

[0241] 表6

[0242]

通过 ELISA 以 5 μ g/ml 获得的 OD 值			
	rhIGF-1R 包被	rmIGF-1R 包被	rhIR 包被
816C12	2.622	0.065	0.055
阳性对照	2.338	1.293	1.077
阴性对照	0.055	0.065	0.048

[0243] 816C12抗体对rhIGF-1R包被的剂量反应曲线如图1所示。使用Prism应用程序确定EC₅₀值。

[0244] 数据显示,816C12抗体仅识别rh IGF-1R,EC₅₀为0.41nM。它不与鼠形式的IGF-1R、也不和人IR结合。

[0245] 实施例2:分期与本发明的抗体的相关性的评估,以及在MCF-7异种移植模型中靶向IGF-1R的ADC的活性。

[0246] 为了将肿瘤的分级与药理学相关联,肿瘤已经被分级(2.1节),然后采用ADC来进行MCF-7异种移植模型的体内实验,所述ADC包含靶向已知被内在化的IGF-1R的抗体部分和由澳瑞他汀组成的药物部分(2.2节)。

[0247] 2.1:免疫组织化学检测MCF-7异种移植模型的IGF-1R的表达。

[0248] 将来自MCF-7异种移植的组织切片脱蜡,再水化,并置于在98 $^{\circ}$ C预热的沸腾浴中的Target Retrieval缓冲液1 \times (Dako S1699)中,在98 $^{\circ}$ C下40分钟,然后在Target Retrieval缓冲液中额外的20分钟进行热诱导表位恢复(retrieval)。在Tris缓冲盐水-0.05%吐温20(TBS-T) (Dako S3006)中洗涤3次后,使用过氧化物酶封闭试剂(Peroxidase Blocking Reagent, Dako K4007)对内源性过氧化物酶活性封闭5分钟。用TBS-T洗涤切片,并用封闭试剂(UltraV block-TA-125UB-LabVision)孵育5分钟,之后与816C12单克隆抗体(5 μ g/ml)或作为阴性对照的小鼠IgG1/ κ (5 μ g/ml, X0931, Dako)在室温下孵育1小时。切片用TBS-T洗涤并与Envision (Dako)孵育30分钟。二氨基联苯胺用于棕色反应产物(Dako K3468)显色(development)。将玻片浸在苏木精中2分钟以复染(Dako S3309)。

[0249] 本发明的抗IGF-1R单克隆抗体816C12对MCF-7的细胞膜进行差异性染色。在该IHC规程中,棕色反应产物与细胞膜的阳性染色相关,棕色反应产物的缺乏与阴性染色和未观察到细胞膜相关。使用膜算法,MCF-7肿瘤细胞染色评分为3+ (图2A)。使用G11抗体(Roche Ventana)或AF-305 (R&D system)抗IGF-1R抗体,相同肿瘤切片评分为2+ (分别为图2B和2C)。

[0250] 2.2:在MCF-7异种移植模型中抗IGF-1R ADC的体内活性。

[0251] 在MCF-7异种移植模型中体内评估抗IGF-1R ADC。

[0252] 所有动物规程均根据2010/63/UE保护用于科学目的动物的指令(Directive on the protection of animals used for scientific purposes)的指南进行。方案经皮埃

尔法布雷研究所 (Pierre Fabre Institute) 的动物伦理委员会 (Animal Ethical Committee) 批准。将5百万个MCF-7细胞皮下注射入7周龄的Swiss/Nude小鼠。在细胞注射之前,将雌激素丸 (Innovative Research of America) 植入小鼠的左侧肋 (left flank), 以释放MCF-7肿瘤体内生长所必需的雌激素。

[0253] MCF-7细胞植入二十天后,当肿瘤达到平均尺寸120-150mm³时,根据肿瘤尺寸和外表 (aspect) 将动物分成6只小鼠的组。抗IGF-1R ADC通过腹膜内注射接种,每4天6次注射周期 (Q4d4)。每日监测动物的健康状态。每周用电子卡尺测量两次肿瘤体积,直到研究结束。肿瘤体积用下式计算: $\pi/6 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}$ 。根据动物重量每周评估三次毒性。使用Mann-Whitney测试在每次测量中进行统计学分析。

[0254] 如预期的,对于分级3+的肿瘤而非分级2+的肿瘤,注射抗IGF-1R ADC显著抑制并且甚至诱导完全的肿瘤生长退化 (图3)。

[0255] 实施例3:分期与本发明的抗体的相关性的评估,以及在SBC-5异种移植模型中靶向IGF-1R的ADC的活性。

[0256] 为了将肿瘤的分级与药理学相关联,肿瘤已经被分级 (3.1节),然后采用ADC来进行SBC-5异种移植模型的体内实验,所述ADC包含靶向IGF-1R的抗体部分和由澳瑞他汀组成的药物部分 (3.2节)。

[0257] 3.1免疫组织化学检测SBC-5异种移植模型的IGF-1R的表达。

[0258] 使用与之前实施例2的2.1节所述相同的方案分析IGF-1R水平。

[0259] 当用816C12检测IGF-1R时,检测到低水平 (1+) (图4A)。当用G11抗体 (Roche Ventana) 或AF-305 (R&D system) 抗IGF-1R抗体检测IGF-1R时,来自相同肿瘤的切片被评分为3+ (分别为图4B和4C)。

[0260] 3.2:在SBC-5异种移植模型中抗IGF-1R ADC的体内活性。

[0261] 在SBC-5异种移植模型中体内评估抗IGF-1R ADC。

[0262] 所有动物规程均根据2010/63/UE保护用于科学目的动物的指令的指南进行。方案经皮埃尔法布雷研究所的动物伦理委员会批准。将5百万个SBC-5细胞皮下注射入7周龄的无胸腺小鼠 (Athymic mice)。细胞植入十二天后,当肿瘤达到平均尺寸150mm³时,根据肿瘤尺寸和外表将动物分成6只小鼠的组。抗IGF-1R ADC通过腹膜内注射接种,每4天6次注射周期 (Q4d6)。每日监测动物的健康状态。每周用电子卡尺测量两次肿瘤体积,直到研究结束。肿瘤体积用下式计算: $\pi/6 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}$ 。根据动物重量每周评估三次毒性。使用Mann-Whitney测试在每次测量中进行统计学分析。

[0263] 如预期的,对于分级1+的肿瘤而非分级3+的肿瘤,SBC-5肿瘤细胞的肿瘤进展不受注射抗IGF-1R ADC的影响 (图5)。

PCT

打印（原始电子表格）

（此表单不是国际申请的一部分，也不计入国际申请表单之内）

0-1	PCT/RO/134 表 关于保藏的微生物或其它生物材 料的说明（PCT 13bis 条） 备用	
0-1-1		PCT 网上提交 版本 3.5.000.224e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-2	国际申请号	
0-3	申请人或代理人卷号	370173D34866
1	关于保藏的微生物或其它生物材 料所做的如下说明在说明书中：	
1-1	页	10 和 41
1-2	行	10 —— 权利要求 3
1-3	保藏鉴定	
1-3-1	保藏机构名称	CNCM 法国国家微生物保藏 中心（CNCM）
1-3-2	保藏机构地址	法国，巴黎市，邮箱 15，巴 斯德研究所，28，Rue du Docteur Roux，75724
1-3-3	保藏日	2014 年 9 月 17 日 （17.09.2014）
1-3-4	保藏号	CNCMI-4894
1-5	该说明所针对的指定国	所有指定国
仅供受理局使用		
0-4	该表格与国际申请一起收到 （是或不是）	是
0-4-1	授权官员	Kuiper-Cristina, Nathalie
仅供国际局使用		
0-5	国际局收到该表格	
0-5-1	授权官员	

[0264]

序列表

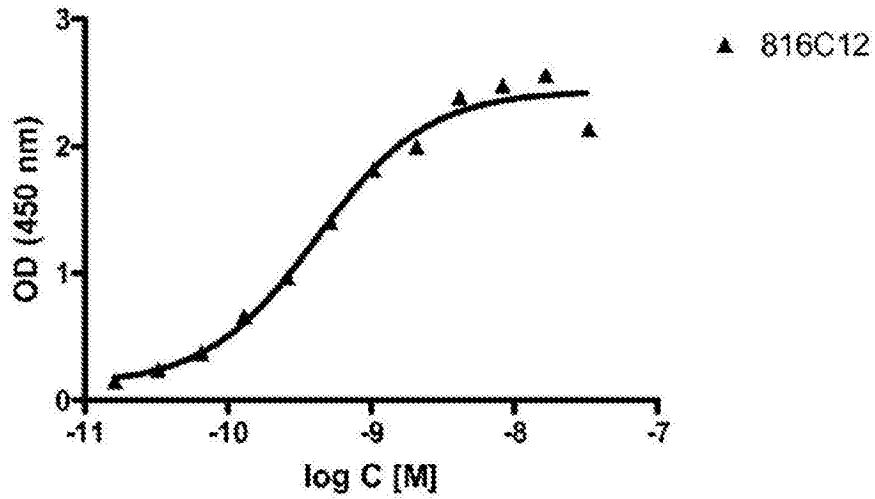
- <110> 皮埃尔法布雷医药公司
 A·茹阿诺
- <120> IGF-1R抗体及其诊断癌症的用途
 <130> D34866
 <140> PCT/EP2016/059338
 <141> 2016-04-27
 <150> EP 15305642.9
 <151> 2015-04-27
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 816C12 I-4894,重链,CDR-H1
 <400> 1
 Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr Val
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 816C12 I-4894,重链,CDR-H2
 <400> 2
 Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr
 1 5
 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 816C12 I-4894,重链,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> 人工序列
 <220>
 <223> 816C12 I-4894,轻链,CDR-L1
 <400> 4
 Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 1 5
 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 816C12 I-4894,轻链,CDR-L2
 <400> 5
 Tyr Thr Ser
 1
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 816C12 I-4894,轻链,CDR-L3
 <400> 6
 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 816C12 I-4894,重链,可变结构域
 <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>	人工序列																		
<220>																			
<223>	816C12	I-4894,	轻链,	可变结构域															
<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>	人工序列																		
<220>																			
<223>	816C12	I-4894,	重链,	可变结构域															
<400>	9																		

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaage ctggggcttc agtgaagatg	60
tcttgcaagg cttctggaca cacattcact agctatgttt tgcaactggat gaagcggaag	120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatectc acaatgatgt tactaagtac	180
aatgagaatt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatactccag cacagtctac	240
atggagggtca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtgt attactgtgt aagtaccgcc	300
tactatggta acggccggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc	360
tca	363
<210> 10	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 816C12 I-4894,轻链,可变结构域	
<400> 10	
gatatccaga tgacacagac tacatcetcc ctgtetgect ctctgggaga cagagtcacc	60
atcagttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtctcatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctetca ccattagcaa cctggagcaa	240
gaagatattg ccaactatct ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

rh IGF1R ELISA



S 型剂量反应 (可变斜率)	
最佳拟合值	816C12
底部	0.1163
顶部	2.438
LOGEC50	-9.380
斜率 (HILLSLOPE)	1.116
EC50	4.173e-010

图1

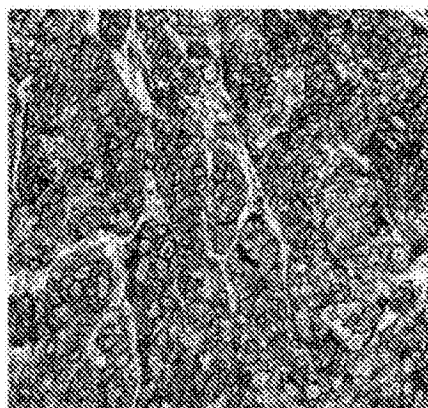


图2A

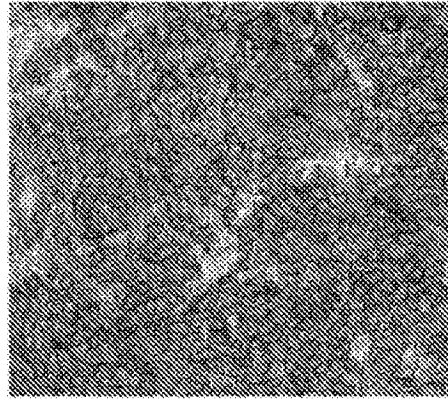


图2B

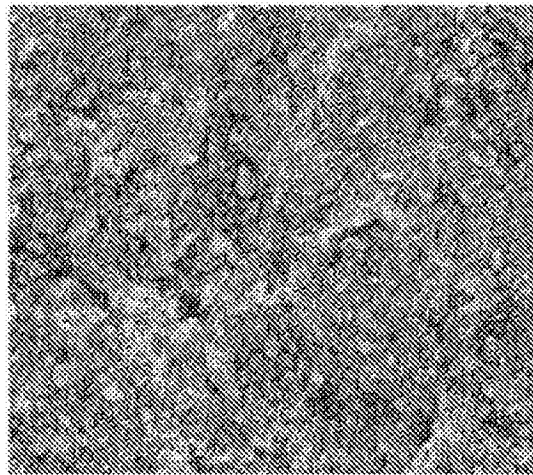


图2C

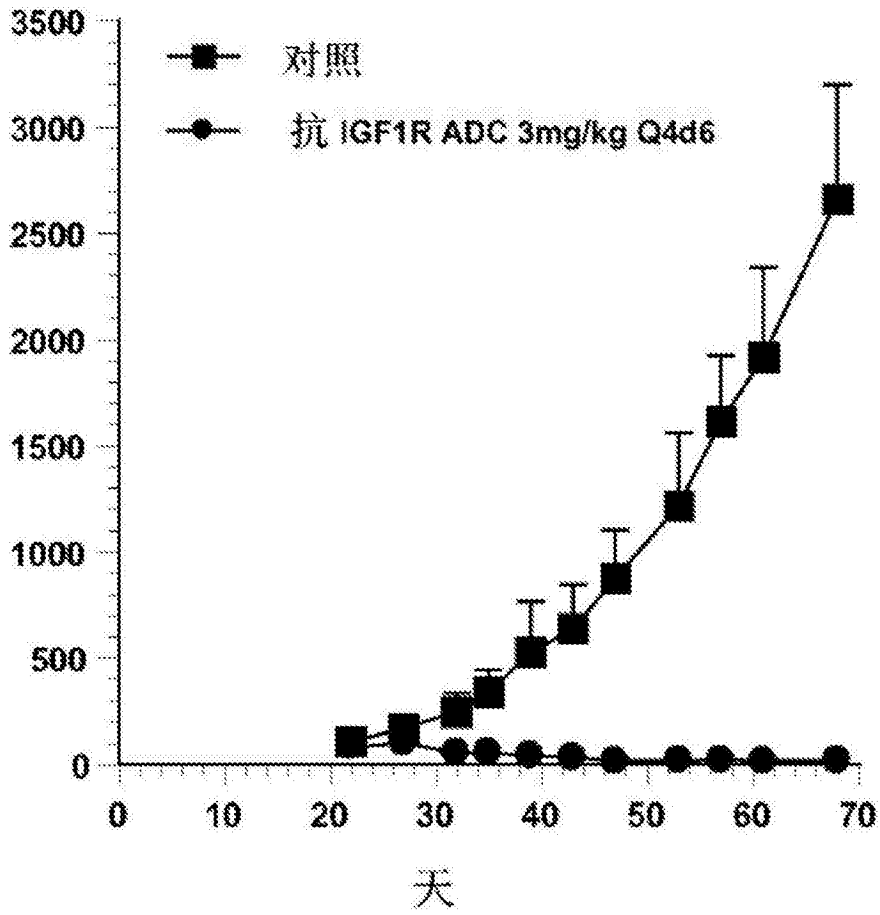


图3

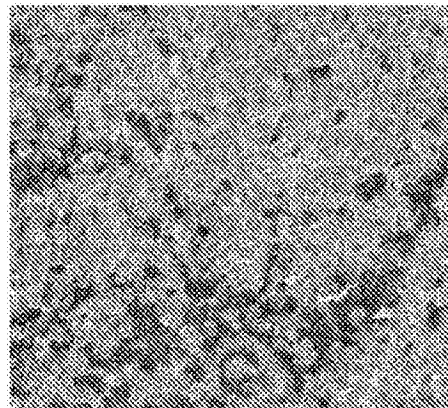


图4A

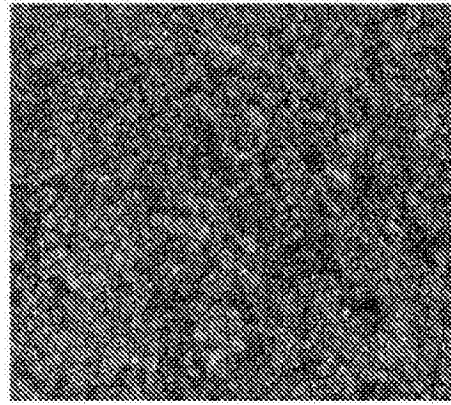


图4B

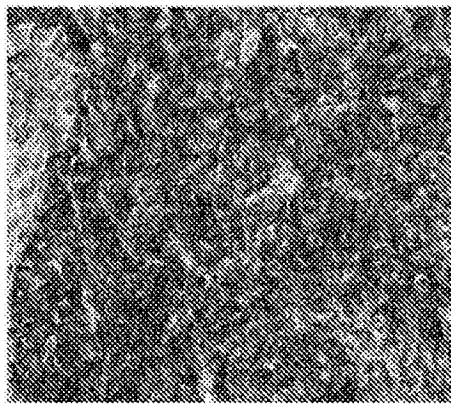


图4C

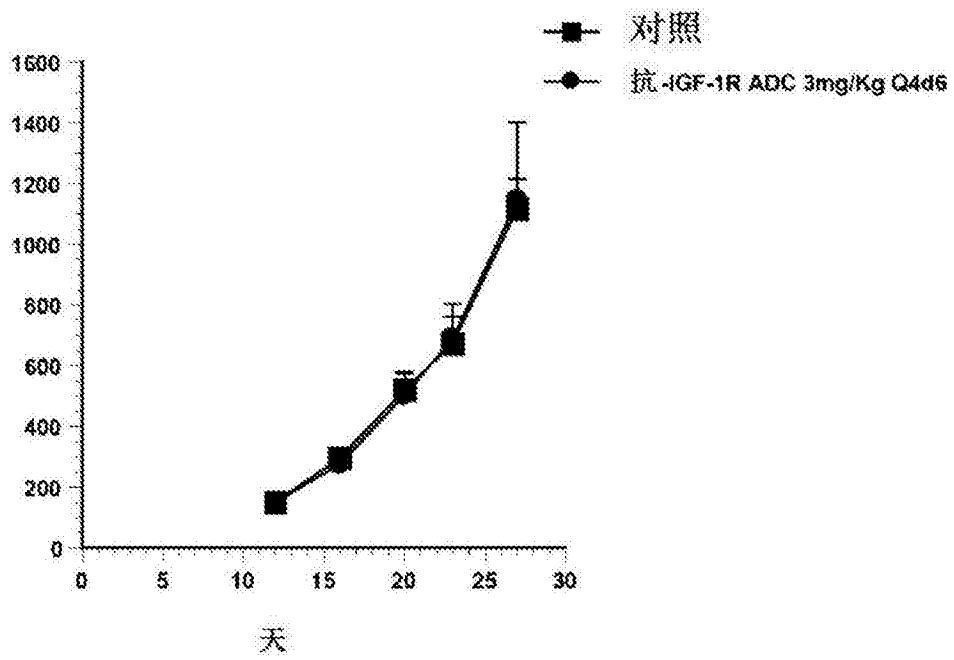


图5